



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**



**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADE DA
PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE EM GENÓTIPOS DE
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum)
SUBMETIDOS AO CONGELAMENTO**

SALOMÃO ROCHA MARTIM

**MANAUS
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

SALOMÃO ROCHA MARTIM

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADE DA
PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE EM GENÓTIPOS DE
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum)
SUBMETIDOS AO CONGELAMENTO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira

**MANAUS
2013**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Martim, Salomão Rocha

M378c Características físico-químicas e atividade da peroxidase e polifenoloxidase em genótipos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum) submetidos ao congelamento / Salomão Rocha Martim. - Manaus: UFAM, 2013.

69 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) — Universidade Federal do Amazonas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ila Maria de Aguiar Oliveira.

1. Cupuaçu – Processamento 2. Tecnologia de alimentos
I. Oliveira, Ila Maria de Aguiar (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 633.74(043.3)

SALOMÃO ROCHA MARTIM

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADE DA
PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE EM GENÓTIPOS DE CUPUAÇU
(*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum) SUBMETIDOS AO
CONGELAMENTO**

Dissertação aprovada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal do Amazonas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira
Universidade Federal do Amazonas
(Presidente/Orientadora)

Dra. Maria Aparecida Claret de Souza
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
(Membro)

Prof. Dr. José Cardoso Neto
Universidade Federal do Amazonas
(Membro)

Prof. Dr. José Merched Chaar
Universidade Federal do Amazonas
(Membro)

Manaus, 30 de agosto de 2012

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me abençoou.

A minha família pelo apoio incondicional.

À professora Dra Ila Maria de Aguiar Oliveira por sua orientação impecável.

À Dra Aparecida Claret de Souza pelo fornecimento das polpas de cupuaçu.

Aos amigos sempre presentes.

RESUMO

No congelamento de polpas de frutas a atividade enzimática não é completamente cessada. Podem ocorrer mudanças sensoriais, nutricionais e de coloração devido à ação de enzimas oxidativas, como a peroxidase e a polifenoloxidase. Considerando que as polpas de cupuaçu congeladas, comercializadas no Brasil, têm um prazo de validade de um ano e tornam-se escurecidas ao longo deste período, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito do tempo de congelamento nas características físico-químicas e nas atividades da polifenoloxidase e peroxidases solúvel e insolúvel presentes nas polpas de quatro novos genótipos de cupuaçu, durante doze meses. Os frutos dos genótipos de cupuaçu, desenvolvidos pela Embrapa Amazônia Ocidental, foram despolpados, congelados e armazenados à temperatura de -30 °C. A polifenoloxidase das polpas dos quatro genótipos apresentou aumento na sua atividade com picos no sexto, nono e décimo mês e as peroxidases apresentaram oscilações na atividade enzimática. As propriedades físico-químicas das polpas apresentaram variações durante os doze meses de armazenamento sob congelamento. O teor de vitamina C dos genótipos D 28-10 e P 3-10 diminuiu a partir do 4º e 10º mês, respectivamente. Por outro lado os genótipos B 28-7 e P 9-8 permaneceram estáveis. Em relação à acidez em ácido cítrico, as amostras B-28-7, D 28-10 e P 9-8 não diferiram, havendo redução no genótipo P 3-10. Os valores de pH e sólidos solúveis totais de todos os genótipos diminuíram ao longo do período avaliado. Houve aumento na concentração de açúcares das polpas dos genótipos B 28-7, P 3-10 e P 9-8, com exceção da amostra D 28-10 que permaneceu inalterada. Todos os genótipos apresentaram-se dentro dos padrões físico-químicos exigidos pela legislação, com exceção do genótipo P 3-10 que apresentou acidez inferior. Em relação aos parâmetros enzimáticos, houve variações na atividade das peroxidases e polifenoloxidases de todos os genótipos avaliados.

Palavras-chave: *Theobroma grandiflorum*, escurecimento enzimático, frutos amazônicos

ABSTRACT

During the freezing of fruits pulps, the enzyme activity is not finished completely. Sensory, nutritional and coloring changes may occur on fruits due to the action of oxidative enzymes such as peroxidase and polyphenoloxidase. The frozen cupuaçu pulps, sold in Brazil, have a shelf life of one year and become browned during this period. The aim of this study was to evaluate the effect of frozen storage on the physicochemical characteristics, polyphenoloxidase activity and soluble and ionically bound peroxidases presented in the pulps of four new cupuaçu genotypes over twelve months. The cupuaçu genotypes developed by the West Amazonian Agroforestry Research Center (EMBRAPA) were pulped, frozen and stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. The polyphenoloxidase of the four cupuaçu genotypes showed an increase in activity according to the storage time with peaks in the sixth, ninth and tenth months, but the peroxidases exhibited oscillations in the enzyme activity. The physicochemical properties of the pulps showed variations during the twelve months of storage under freezing. The vitamin C content of D 28-10 and P 3-10 genotypes decreased from the fourth and tenth months, respectively. Moreover P 9-8 e B 28-7 genotypes remained stable. In relation the acidity of citric acid, the B-28-7, D 28-10 and P 9-8 samples were not different, but P 3-10 genotype presented a reduction. The pH and total soluble solids of all genotypes decreased over the study period. There was an increase in sugar concentration of B 28-7, P 3-10 and P 9-8 genotypes, except for D 28-10 sample which remained unchanged. All genotypes were in accordance with physical-chemicals standards required by legislation, except for P 3-10 genotype that showed a lower acidity. In respect of the enzymatic parameters, there were variations in the activity of peroxidase and polyphenoloxidases of all genotypes.

Keywords: *Theobroma grandiflorum*, enzymatic browning, amazonian fruits

LISTA DE FIGURAS TABELAS, QUADROS E FLUXOGRAMAS

Tabela 1. Composição físico-química da polpa de cupuaçu.....	16
Figura 1. Mecanismo de oxidação do guaiacol.....	22
Quadro 1. Fontes vegetais de peroxidase.....	24
Figura 2. Mecanismo de oxidação da polifenoloxidase.....	29
Quadro 2. Fontes vegetais de polifenoloxidase	30
Fluxograma 1. Etapas do processamento e análises das amostras de polpa de cupuaçu.	36
Tabela 1. Efeito do tempo de congelamento na composição físico-química da polpa de cupuaçu- Genótipo B 28-7.....	59
Tabela 2. Efeito do tempo de congelamento na composição físico-química da polpa de cupuaçu- Genótipo D 28-10	60
Tabela 3. Efeito do tempo de congelamento na composição físico – química da polpa de cupuaçu – Genótipo P 3. 10	60
Tabela 4. Efeito do tempo de congelamento na composição físico-química da polpa de cupuaçu- Genótipo P 9-8	61
Figura 1. Atividade da peroxidase insolúvel nos genótipos de cupuaçu armazenados sob congelamento	63
Figura 2. Atividade da peroxidase solúvel nos genótipos de cupuaçu armazenados sob congelamento	64
Figura 3. Atividade da polifenoloxidase nos genótipos de cupuaçu armazenados sob congelamento	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

M	Metro
Cm	Centímetro
mg	Miligrama
G	Gramma
%	Porcentagem
Kg	Quilograma
Mm	Milímetro
Cv	Cultivar
°C	Graus Celsius
POD	Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H	Hora
TPO	Peroxidase tireoidiana
PFO	Polifenoloxidase
Km	Quilômetro
M	Molar
mL	Mililitro
EDTA	Ácido Etilenodiaminatetraacético
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
PEG	Polietilenoglicol
ART	Açúcares Redutores Totais
NaOH	Hidróxido de sódio
SN	Somogyi e Nelson
DFI	2,6-diclorofenolindofenol
kPa	Kilopascal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Distribuição geográfica e características botânicas do cupuaçu	12
2.2	Importância comercial e composição físico-química do cupuaçu	14
2.3	Congelamento	18
2.4	Peroxidase	21
2.5	Polifenoloxidase.....	28
3	OBJETIVOS	35
3.1	Geral.....	35
3.2	Específicos	35
4	METODOLOGIA.....	36
4.1	Modelo de estudo	36
4.2	Amostras dos frutos	36
4.3	Processamento e análises	36
4.3.1	Seleção e lavagem dos frutos	37
4.3.2	Obtenção das polpas.....	37
4.3.3	Armazenamento das polpas	37
4.4	Análises enzimáticas e físico-químicas.....	37
4.4.1	Análises enzimáticas	38
4.4.2	Análises físico-químicas	38
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7	RESULTADOS	54
7.1	Artigo submetido à revista Semina Ciências Agrárias (qualis B1).....	54

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutos *in natura* e possui amplas possibilidades de conquistar novos mercados no exterior (CANUTO et al., 2010). Na Amazônia, além de representar uma alternativa sustentável para a geração de renda e ocupação de mão de obra, a fruticultura vem se expandindo através de diversos produtos regionais que se ressaltam pelo sabor exótico e diferenciado, dentre estes destaca-se o cupuaçu (CONTEXTO AMAZÔNICO, 2008).

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* SCHUM) é uma árvore frutífera típica da região amazônica que figura como uma das mais promissoras dessa região, sendo crescentes os investimentos em cultivos racionais desse fruto (QUEIROZ; GARCIA, 1999). O Amazonas ocupa a segunda colocação no ranking de produção nacional de cupuaçu, ficando atrás apenas do Estado do Pará. A importância econômica desse fruto está relacionada com a polpa e seus produtos derivados, como suco, licor, sorvete, geleias, doces e o cupulate (COHEN; JACKIX, 2005).

O congelamento de polpas de frutas tornou-se uma opção viável para evitar perdas de produção, pois preserva as características originais das frutas frescas e viabiliza sua comercialização nos períodos de entressafra (LIMA, 2010). Além disso, alguns frutos como o cupuaçu, são bastante perecíveis, sendo seu transporte *in natura*, por longas distâncias, praticamente inviável (MARTINS, 2008). No congelamento, os microrganismos tem sua taxa de crescimento consideravelmente diminuída e há redução da atividade de certas enzimas (COLLA; PRENTICE-HERNANDEZ, 2003).

No entanto, a comercialização de frutos na forma processada ainda enfrenta grandes desafios, pois as enzimas responsáveis pelo escurecimento de frutas e vegetais congelados não são destruídas pelo frio (LOPES; MATTIETTO; MENEZES, 2005). Após o corte, ocorre o escurecimento da polpa devido à presença de compostos fenólicos e atividade das enzimas oxidativas, como a peroxidase e a polifenoloxidase (DAIUTO; VIEITES, 2008). Essas enzimas podem causar, além do escurecimento, perdas nutricionais, mudanças indesejáveis no aroma, sabor, textura e cor dos frutos, devido à capacidade que essas enzimas tem de promover reações de oxidação e de biodegradação em frutos e vegetais processados, ocasionando perdas econômicas (BRITO et al., 2007; MANTOVANI; CLEMENTE, 2010). Devido a sua importância na indústria alimentícia, vários pesquisadores vem avaliando tanto a peroxidase como a polifenoloxidase, a partir de diferentes fontes vegetais.

Na literatura científica há carência de pesquisas em relação a enzimas oxidativas de frutos amazônicos, principalmente, do cupuaçu. Por isso, este estudo teve como objetivos avaliar as alterações físico-químicas e a atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase de polpas congeladas de genótipos de cupuaçu, durante um período de 12 meses.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distribuição geográfica e características botânicas do cupuaçu

O cupuaçuzeiro pertence ao gênero *Theobroma* que compõe a família Sterculiaceae, pertencente à ordem Malvales. Trata-se de uma espécie arbórea nativa da Amazônia Oriental, sendo encontrado espontaneamente em matas de terra firme e várzea alta e nas partes sul e leste do Pará. Está distribuída por toda a Bacia Amazônica, parte do Maranhão, São Paulo, Bahia e, ocasionalmente, em outros países como a Venezuela, o Equador, Colômbia, Guiana, Martinica, Trinidad Tobago, Gana, Suriname e Costa Rica (SOUZA et al., 1996; VILLACHICA, 1996; LOPES; LUZ; BEZERRA, 1999).

No Brasil, o cupuaçu apresenta várias sinonímias, de acordo com a região em que se encontra. No Norte, mais precisamente do estado do Pará ao Acre, o fruto é conhecido por cupu. Já na região Nordeste, em uma faixa que se estende do Maranhão até a Bahia, o fruto recebe o nome de pupu ou pupuaçu. Na Colômbia é chamado de copoasu ou bacau; no México, Costa Rica e Panamá é conhecido por cacau blanco ou pastate. Já no Equador e no Suriname o fruto recebe o nome de patas e iupo, respectivamente (COSTA, 2002).

A árvore do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* SCHUM) mede cerca de 6 a 10 m de altura, possui tronco reto com ramificações tricotômicas, casca marrom-escura e fissurada. Seu sistema radicular é do tipo pivotante e as folhas são inteiras, de coloração rósea e coberta de pelos quando jovens e verde quando maduras. As flores são as maiores do gênero, crescendo ramos, pétalas de coloração branca ou vermelha com tonalidade variável de clara a escura (SOUZA, 2007).

O fruto é uma baga com formatos variáveis: oblongo, ovalado e elíptico, com diâmetro de 9 a 15 cm, comprimento de 10 a 40 cm e peso variando de 200 a 4.000 g, com média de 1.200 g. Quando maduro, o fruto se desprende da planta exalando cheiro agradável e característico. A casca varia de 0,6 a 1 cm de espessura, tem coloração castanho–escura, é dura, porém facilmente quebrável e recoberta de pelos (CAVALCANTE, 1991).

A polpa mucilaginosa é abundante, ácida, de coloração amarela, creme ou branca, com odor ativo e sabor muito agradável. As sementes são em número médio de 32 por fruto, são ovóides ou elipsóides, de 2,0 a 3,0 cm de comprimento, com 2,0 a 2,5 cm de largura e 1,0 a 1,8 cm de espessura, com peso de 4 a 7 g. Em média 37% do peso do fruto é polpa, 15 % são sementes, 3 % é placenta e 45 % é casca. Nos frutos sem sementes o porcentual de polpa é de 60 a 68%. (SOUZA, 2007).

Calzavara (1987) relata que existem diferentes variedades de frutos que se diferenciam entre si por suas características de tamanho, peso, espessura e formato da casca. O cupuaçu-redondo, o mais comum da região amazônica, apresenta extremidades arredondadas, casca variando de 6 a 7 mm de espessura e peso médio de 1,5 kg. Já o cupuaçu-mamona tem extremidades alongadas, casca com cerca de 7 a 9 mm de espessura e chega a produzir frutos com até 4 kg de peso, sendo esta a variedade em que se encontram os maiores frutos. O cupuaçu-mamaú, também chamado de cupuaçu sem semente, possui formato semelhante ao redondo, porém se caracteriza por apresentar polpas desprovidas de sementes. A espessura da casca varia de 6 a 7 mm seu peso médio é de 1,5 kg. Segundo Carvalho e colaboradores (2004) a polpa da variedade mamaú é menos ácida que as outras, porém apresenta maior susceptibilidade a doenças, como por exemplo, a vassoura de bruxa.

O cupuaçuzeiro apresenta bom desenvolvimento em condições climáticas com temperaturas médias anuais de 21,6 a 27,5 °C, regime pluviométrico entre 1.900 e 3.100 mm e faixa de umidade relativa do ar entre 77 a 88 % ao ano. Em relação às condições de solo, aqueles mais profundos, com boa retenção de água e elevada fertilidade, favorecem o desenvolvimento do cupuaçuzeiro (CALZAVARA, 1987; SOUZA, 2007). A espécie adapta-se bem à sombra favorecendo a formação de sistemas agroflorestais, o que permite a obtenção de resultados ecológicos e econômicos positivos no consórcio entre o cupuaçuzeiro e outras espécies florestais como a bananeira, castanheira e a andiroba (OLIVEIRA, 2003; CARVALHO et. al., 2004).

O período de floração do cupuaçuzeiro ocorre de julho a setembro, época considerada a mais seca do ano na região amazônica. Já a frutificação da árvore ocorre na época com maior incidência pluvial, de novembro a maio, com pico de janeiro a março. A produção dos frutos inicia-se no quarto ano, com produção média de oito frutos por planta, porém, no oitavo ano essa produção aumenta consideravelmente para cerca de 25 a 40 frutos por árvore (SOUZA et al., 1996).

2.2 Importância comercial e composição físico-química do cupuaçu

A combinação de fatores como clima favorável, grandes extensões territoriais cultiváveis, investimentos em desenvolvimento tecnológico e melhoria na qualidade dos produtos fizeram com que o Brasil se consolidasse como um dos maiores produtores e exportadores de alimentos do mundo. Exportando para mais de 180 países, atualmente, o Brasil tem como principais compradores os Estados Unidos e a China, além de países do Mercosul e da União Européia (BRASIL, 2011).

As frutas nativas da região amazônica e seus derivados vem se tornando cada vez mais populares no Brasil e tem despertado o interesse internacional (PORTE et al., 2010). Dentre estas, destaca-se o cupuaçu, cujo valor comercial está intimamente relacionado com sua polpa que possui aroma e sabor atrativos (FRANCO; SHIBAMOTO, 2000). Algumas cooperativas da região amazônica comercializam a polpa desse fruto para os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Brasília. No exterior, a polpa é consumida em países como a Inglaterra e Japão (BRASIL, 1998), onde foi registrada uma patente do nome cupuaçu, o que foi legalmente questionado pelo governo brasileiro (ARAÚJO, 2007).

Devido ao aumento da demanda pela polpa desse fruto, principalmente na forma congelada, nos últimos anos as áreas destinadas ao plantio do cupuaçu tem crescido na Amazônia Brasileira (BASTOS et al., 2002), sendo o Estado do Amazonas o segundo maior produtor desse fruto no Brasil. Segundo dados do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas (IDAM) a área destinada ao plantio de cupuaçu aumentou de 2.950 hectares em 1996 para cerca de 5.570 em 2010. O Estado conta com aproximadamente 4.900 produtores e produção anual de 8.730.000 frutos. A região do médio Amazonas se destaca como maior produtora desse Estado (IDAM, 2010).

A composição físico-química da polpa do cupuaçu tem sido determinada por vários autores (Tabela 1). O sabor ácido da polpa restringe seu consumo na forma *in natura*. A elevada acidez em ácido cítrico, que pode variar de 1,62 % (SANTOS et al., 2010) a 3,50% (CANUTO et al., 2010) e os elevados valores de pectina, cerca de 970 mg/100 g de polpa (ARAÚJO, 2007) fazem com que a polpa desse fruto seja empregada em várias preparações culinárias.

Tabela 1. Composição físico-química da polpa de cupuaçu

Parâmetros	Aguiar (1996)	Villachica (1996)	Taco (2006)	Oliveira (2006)	Araújo (2007)	Silva; Silva; Pena (2008)	Freire et al. (2009)	Canuto et al. (2010)	Santos (2010)
Umidade (%)	85,50	89	86,6	82,91	87,1	6,63	NR*	89,2	NR*
Carboidratos	12,36	NR*	11,4	9,12%	9,74	95,70	NR*	NR*	NR*
Lipídios (%)	0,38	0,53	0,6	0,48	0,63	0,80	0,54	0,30	NR*
Proteínas (%)	1,25	2,90	0,8	0,81	1,71	2,20	0,76	NR*	NR*
Cinzas (%)	0,71	0,67	0,6	0,93	0,82	1,30	0,74	NR*	NR*
Fibras (%)	NR*	NR*	1,6	NR*	2,04	NR*	NR*	NR*	NR*
Pectina (mg/100 g)	NR*	390	NR*	NR*	970	NR*	NR*	NR*	NR*
Ácido ascórbico (mg/100g)	NR*	23,10	NR*	NR*	NR*	NR*	2,30	NR*	5,05
Acidez Total Titulável (ácido cítrico)	NR*	2,15	NR*	2,17	2,70	NR*	1,87	3,5	1,62
Açúcares redutores	NR*	3,00	NR*	1,81	3,70	NR*	NR*	NR*	2,86
Açúcares não redutores	NR*	NR*	NR*	7,03	4,60	NR*	NR*	NR*	NR*
Açúcares Totais	NR*	NR*	NR*	9,12	8,60	NR*	NR*	NR*	5,40
pH	NR*	3,30	NR*	3,64	3,58	NR*	3,40	3,50	3,41
Sólidos solúveis totais (°Brix)	NR*	0,80	NR*	NR*	13,60	NR*	9,59	9,00	8,55

NR*: Não reportado

As formas de consumo da polpa são bastante variáveis, incluindo sorvetes, cremes, licores, tortas, iogurtes, gelatinas, pudins, bolos, pavês, biscoitos e compotas (OLIVEIRA, 2006; GIRALDO-ZUNIGA et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Outras preparações como os doces, apresentam boa qualidade. Néctares obtidos a partir do fruto do cupuaçuzeiro demonstraram ótimos resultados tecnológicos e as geleias, excelente textura, odor e sabor (NAZARÉ, 2003). Segundo Martins (2008) a polpa também é uma excelente matéria-prima para elaboração de sucos tropicais com valor calórico reduzido.

O aumento da produção e industrialização da polpa de cupuaçu propiciou um aumento da disponibilidade de sementes (COHEN; JACKIX, 2005), favorecendo o incremento de pesquisas visando demonstrar a viabilidade comercial das sementes do fruto do cupuaçuzeiro.

Carvalho e colaboradores (2004) relataram que a partir das amêndoas do cupuaçu pode-se obter o cupulate, cujo valor nutricional e sabor assemelham-se ao do chocolate feito a partir do cacau (*Theobroma cacao*). Para se obter cerca de 180 kg de cupulate em pó é necessária a utilização de 1 tonelada de sementes frescas. Dessa mesma quantidade de sementes também são produzidos por volta de 135 kg de manteiga que é empregada na elaboração do cupulate em tabletes. Segundo Cohen e Jackix, (2005) essa gordura pode ser utilizada em substituição parcial da manteiga de cacau na elaboração de chocolates, e também é largamente empregada na indústria de cosméticos.

Lannes e Medeiros (2003) realizaram o processamento de achocolatado de cupuaçu por *spray-dryer* obtendo um produto completamente instantâneo apesar do alto conteúdo lipídico de suas sementes. Carvalho e colaboradores (2009) extraíram concentrados e isolados protéicos a partir das sementes de cupuaçu e obtiveram 31,18 e 64,33 % de proteína, respectivamente, concluindo que essas sementes apresentam elevada potencialidade como matéria-prima para a obtenção de ingredientes proteicos com alta solubilidade.

O cupuaçu é um fruto amazônico tão versátil que até mesmo sua casca é aproveitada, podendo ser utilizada em artesanato (SOUZA, et al., 1999). Por apresentar razoáveis teores de minerais como potássio, ferro e manganês, é misturada a outros resíduos, também serve como adubo orgânico (CARVALHO et al., 2004).

2.3 Congelamento

O congelamento é considerado um dos processos mais indicados para a preservação das propriedades químicas, nutricionais e sensoriais de alimentos, pois o frio diminui a ação de atividades fisiológicas como a respiração, que levam ao amadurecimento dos frutos, promovendo, dessa forma, a redução de perdas de cor, sabor e aroma (FILGUEIRAS, 1996). Na produção de polpas congeladas esse método de conservação deve ser efetuado o mais rápido possível visando à manutenção das características da fruta fresca (FAZIO, 2006).

As alterações microbiológicas são indesejáveis em qualquer tipo de alimento, bem como a presença de patógenos e microrganismos indicadores de más condições higiênico-sanitárias (LIMA, 2010). Os microrganismos não são considerados um grande problema em alimentos congelados, pois estes não crescem na temperatura usual de congelamento, que é de cerca de -20 °C (LOPES; MATTIETTO; MENEZES, 2005). Contudo, Colla e Prentice-Hernández (2003) ressaltam que a utilização de temperaturas baixas inibe o crescimento microbiano, mas não destrói totalmente os microrganismos que já estavam presentes nos alimentos.

Por exigir que o produto seja conservado a baixas temperaturas, desde o processo de fabricação até o seu consumo, o congelamento é considerado um método oneroso, devendo-se sempre ponderar sobre a relação custo-benefício (LOPES; MATTIETTO; MENEZES, 2005).

Apesar de ser considerado o mais recomendado para conservar alimentos por longos períodos, o congelamento pode causar efeitos deletérios ao produto, cuja severidade é menor quanto mais rápida é a remoção do calor. No processo de congelamento lento há formação de grandes cristais de gelo pontiagudos, que causam o rompimento das estruturas celulares, ocasionando perda de suco celular e, portanto, redução do valor nutricional, durante o descongelamento. Em contrapartida, o congelamento rápido evita a formação de grandes cristais de gelo e a ruptura de membranas celulares, mantendo o valor nutricional do alimento (CORREIA; FARAONI; PINHEIRO-SANT'ANA, 2008).

Por influência do frio, as enzimas diminuem naturalmente sua atividade, porém sua ação não é impedida completamente, fato que pode comprometer a qualidade do alimento durante o armazenamento e as operações de processamento. O congelamento rápido aliado às baixas temperaturas de armazenamento é melhor para a qualidade do alimento em relação à atividade enzimática, quando comparada ao congelamento lento (COLLA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003; LIMA, 2010). A armazenagem em temperaturas próximas ou logo abaixo do ponto de congelamento, devido à descompartimentalização celular e, conseqüentemente, à união da enzima com o substrato, permite o escurecimento enzimático (DAIUTO et al., 2009).

Vários estudos têm demonstrado os benefícios do armazenamento de frutos em baixas temperaturas. Mélo e colaboradores (2000) observaram efeitos positivos da refrigeração em pitangas maduras e semimaduras, onde os frutos submetidos ao armazenamento em refrigeração, mantiveram a sua qualidade por até cinco dias. Nesse período as alterações físico-químicas não foram significativas.

Antunes e colaboradores (2006) ao estudarem o uso de reguladores vegetais (ácido giberélico e benzilaminopurina) na conservação refrigerada de frutos de acerola, concluíram que

somente o emprego da refrigeração foi suficiente para conservá-los durante 14 dias, ao passo que a aplicação dos reguladores não teve efeito no aumento da conservação refrigerada de acerolas.

Maeda e colaboradores (2007) analisaram a estabilidade de ácido ascórbico e antocianinas em néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia*) armazenados em refrigeração e à temperatura ambiente e verificaram influência negativa da temperatura ambiente sobre o ácido ascórbico e as antocianinas. Porém, sob refrigeração, tanto o ácido ascórbico quanto as antocianinas apresentaram boa estabilidade.

Jacques e colaboradores (2010) avaliaram a estabilidade de compostos bioativos em polpas congeladas de amora-preta (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy). Nesse estudo concluiu-se que o armazenamento a -10 °C não causou mudanças significativas no conteúdo de compostos fenólicos, de antocianinas e na capacidade antioxidante durante dois meses de armazenamento.

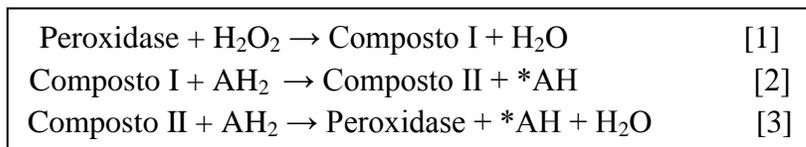
Araújo e colaboradores (2009) estudaram a influência do congelamento sobre as características físico-químicas e o potencial antioxidante de néctar de amora-preta durante 90 dias de armazenamento. Concluíram que o congelamento mantém a estabilidade físico-química e o potencial antioxidante do néctar de amora-preta, evitando que compostos potencialmente funcionais (compostos fenólicos totais, antocianinas e ácido ascórbico) inerentes à fruta fossem altamente degradados.

Segundo Sebastiany e colaboradores (2009) a associação do congelamento com outros métodos de preservação, como a pasteurização, conservaria melhor os alimentos. Freire e colaboradores (2009) relatam que para a polpa do cupuaçu, que apresenta elevada acidez, a pasteurização seguida de enchimento a quente são suficientes para assegurar a esterilidade comercial do produto, pois sua microbiota é relativamente restrita, apresentando microrganismos de menor resistência térmica.

Ferreira (2009) relatou que o congelamento é um método adequado para a conservação da polpa de cupuaçu, tornando esta um produto ideal para o consumo do ponto de vista microbiológico e nutricional. A estabilidade química, físico-química e microbiológica de polpas de acerola orgânicas pasteurizadas e não pasteurizadas foi avaliada por Lima (2010), que verificou que o armazenamento sob congelamento não ocasionou perdas significativas na qualidade das polpas de acerola, possibilitando manutenção das características na maioria dos parâmetros estudados. Além disso, as polpas pasteurizadas apresentaram melhores características microbiológicas em relação àquelas que não foram submetidas a esse processo de conservação.

2.4 Peroxidase

A peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7) é uma enzima pertencente ao grupo das oxidorreduções que tem a capacidade de realizar diversas reações oxidativas em plantas usando compostos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato, ou em alguns casos, o oxigênio como aceptor de hidrogênio (FREITAS et al., 2008). Segundo Dunford (2010) a reação da peroxidase ocorre em várias etapas, como mostrado a seguir:



No primeiro estágio do processo catalítico o sítio ativo da enzima reage com peróxido de hidrogênio. Nessa fase ocorre a redução da água oxigenada, resultando na produção de água, e a oxidação da proteína, formando o composto I, que é uma forma intermediária reativa cujo estado de oxidação é considerado mais elevado em relação à enzima na forma nativa. Na segunda etapa da reação, uma molécula do substrato (AH_2) é oxidada pelo composto I gerando um substrato

radicalar e o composto II. Na última fase, uma segunda molécula de substrato reduz o composto II para o estado ferro III (HERNANDEZ-RUIZ et al., 2001; DUNFORD, 2010).

Em ensaios sobre a atividade da POD, geralmente são adotados compostos fenólicos como *p*-cresol, guaiacol, resorcinol ou aminas aromáticas como a anilina, *o*-dianisidina, *o*-fenilediamina como substratos (CAMARGO, 2007). Nesses ensaios, o produto resultante da reação é colorido, permitindo assim a determinação da atividade dessa enzima por métodos colorimétricos (BRITO et al., 2005). Na figura 1 está esquematizado o mecanismo de oxidação do guaiacol, um dos substratos mais utilizados na determinação da POD:

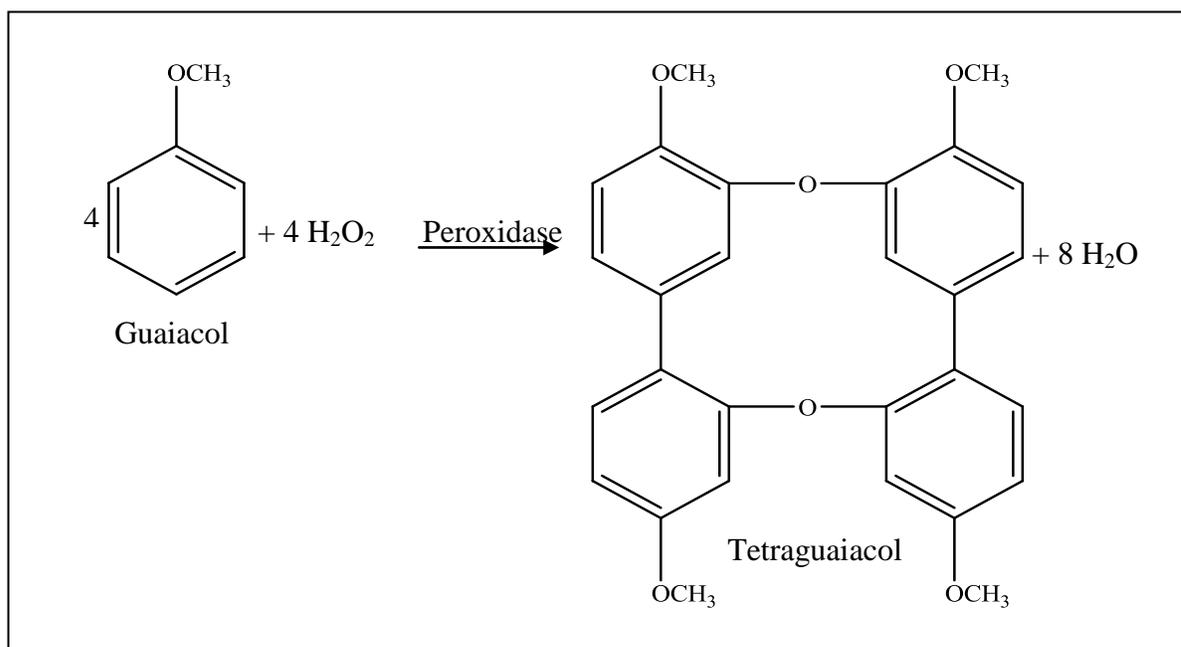


Figura 1. Mecanismo de oxidação do guaiacol.

Fonte : Fatibello – Filho; Vieira (2002)

De acordo com a origem e estrutura, as peroxidases podem ser agrupadas em quatro classes: peroxidases bacterianas, peroxidases de origem animal, peroxidases fúngicas e peroxidases de plantas (DICKO et al., 2006; GUERRA, 2010). A maioria das peroxidases apresenta a protoporfirina IX (grupo heme) como grupo prostético. Essas enzimas catalisam

reações de hidrólise usando o íon ferro do grupo heme (SINGH et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Já as peroxidases não-hêmicas, também conhecidas como peroxirredoxinas, possuem cisteínas em seus sítios ativos (SCHMIDT, 2008).

Para a Ciência de Alimentos, as peroxidases de maior interesse são aquelas contidas em tecidos vegetais, onde se encontram na forma parcialmente solúvel no citoplasma e parcialmente insolúvel quando ligada covalentemente e ionicamente à parede das células e vacúolos (KHAN; ROBINSON, 1994; SBALCHEIRO; DENARDIN; BRAMMER, 2009). Durante o período de maturação, ocorre elevação da atividade enzimática devido ao aumento da solubilidade da enzima (LAURENTI; CLEMENTE, 2005).

A principal representante das peroxidases vegetais é a peroxidase de raiz forte (HRP, Horseradish Peroxidase) que é extraída da *Amoracia rusticana*, uma raiz de planta cultivada em regiões de clima temperado (SCHMIDT, 2008). É considerada a peroxidase mais estudada e a de maior importância comercial (PEREIRA, 2003). Vários autores vêm estudando as diversas fontes vegetais de peroxidase conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1. Fontes vegetais de peroxidase

Fontes	Autores
Abacate (<i>Persea americana</i> Mill.)	Daiuto; Vieites (2008); Luíz; Hirata; Clemente (2007)
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	Brito et al. (2005)
Abobrinha (<i>Cucurbita pepo</i>)	Vieira; Lupetti; Fatibello-Filho (2003)
Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC)	Sousa (2010)
Araçá (<i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh)	Narváez-Cuenca (2008)
Banana (<i>Musa</i> sp.)	Melo; Vilas-Boas (2006)
Batata doce (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.)	Zeraik; Souza; Fatibello-Filho (2008)
Brócolis (<i>Brassica oleracea</i> L. Cv. Italica)	Lopes; Clemente (2002); Thongsook; Barret (2005)
Carambola (<i>Oxalidacia averrhoa</i>)	Laurenti; Clemente (2005)
Goiaba (<i>Pisidium guajava</i> R.)	Zanatta; Zotarelli; Clemente (2006)
Jiló (<i>Solanum gilo</i>)	Oliveira; Viera (2006)
Laranja (<i>Citrus</i> ssp.)	Berbicz, Clemente (2001)
Laranja (<i>Citrus sinenses</i> (L.) Osbeck)	Clemente (2002)
Maçã (<i>Mallus pumilus</i>)	Singh et al. (2010)
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	Oliveira (2006)
Mexerica (<i>Citrus deliciosa</i>)	Alvim; Clemente (1998)
Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i>)	Pelais; Rogez; Pena (2008)
Taperebá (<i>Spondias lutea</i> L.)	Pereira (2003)
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill)	Mantovani; Clemente (2010)
Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	Freitas et al. (2008)

A principal característica das peroxidases é sua termoestabilidade, associada a sua capacidade de regeneração após sofrer desnaturação térmica, sendo este um processo complexo e influenciado por várias causas. Um fator que afeta sua reativação é o tempo necessário para atingir a temperatura de tratamento desejado. Quando esse tempo é curto, a reativação ocorre com mais facilidade. A taxa de renaturação da POD é dependente do pH, sendo menor em valores abaixo de 4,5. A capacidade regenerativa da peroxidase também pode variar entre as espécies de vegetais, devido à presença de isoenzimas (THONGSOOK; BARRETT, 2005).

Ressalta-se ainda que as peroxidases são capazes de manter sua atividade em baixas condições de temperatura e atividade de água, como as encontradas em produtos congelados. Devido a sua resistência térmica, essas enzimas tem sido utilizadas como indicadores da eficácia e adequação em processos de branqueamento de vegetais (FREITAS et al, 2008). Estudos da

inativação da peroxidase em extratos de plantas tem mostrado, de maneira geral, que o fenômeno é linear em relação aos fatores tempo e temperatura, levando a acreditar que esse fato se deve à presença de isoperoxidasas com diferentes graus de termoestabilidade (ALVIM; CLEMENTE, 1998).

A POD é importante do ponto de vista nutricional, de coloração e *flavor*, pois a atividade dessa enzima pode levar à destruição da vitamina C, descoloração de carotenóides e antocianinas. Além de catalisar (grupo heme) a degradação não enzimática de ácidos graxos insaturados, com a consequente formação de compostos voláteis (PAULA, 2007).

Na indústria de alimentos o controle da atividade da POD é importante, uma vez que essas enzimas são responsáveis pelo escurecimento enzimático durante o processamento e armazenamento de frutos, gerando perdas econômicas (LUÍZ; HIRATA; CLEMENTE, 2007). Além disso, essas enzimas necessitam de temperaturas maiores que as utilizadas geralmente nos processos de beneficiamento de frutas e vegetais, como por exemplo, o HTST (High Temperature Short Time), para que sejam inativadas irreversivelmente (VALDERRAMA; MARANGONI; CLEMENTE, 2001). Porém, essas temperaturas elevadas podem comprometer a textura e o sabor desses produtos (CARNEIRO; ROLIM; FERNANDES, 2003).

A determinação das condições necessárias para a inativação da POD sem ocasionar perdas na qualidade nutricional e no *flavor* dos alimentos tem sido objeto de vários estudos (ALVIM; CLEMENTE, 1998). Zanatta e colaboradores (2006) avaliaram a POD extraída da polpa de goiaba. O pH de 6,3 foi considerado o melhor para a extração da POD do fruto da goiabeira. Os autores avaliaram ainda o comportamento dessa enzima frente a um tratamento térmico, em que as temperaturas variaram de 60 a 80 °C, por um período de 0 a 10 minutos. Os resultados demonstraram que houve decréscimo na atividade enzimática dos extratos na medida

em que o tempo e a temperatura foram aumentados, porém a inativação total da enzima não foi atingida, sugerindo a presença de isoenzimas termorresistentes no extrato.

A peroxidase do suco de abacaxi gomo-de-mel foi estudada por Brito e colaboradores (2007), que verificaram que a POD apresentou estabilidade na faixa de pH de 4,0 a 9,0, retendo mais de 80 % da atividade após 24 h de tratamento a 50 °C. A atividade enzimática ótima encontrada foi em pH 4,5 e faixa de temperatura entre 45 a 50 °C. A POD foi inativada após 120 segundos de tratamento a 90 °C, não sendo observada regeneração após 3 e 24 horas de incubação em temperaturas de 5 a 25 °C.

Em estudos realizados por Silva e Koblitz (2010) determinou-se a caracterização parcial da peroxidase extraída de umbu-cajá (*Spondias* spp.). Nessa pesquisa concluiu-se que a peroxidase se manteve estável nas faixas de valores de pH entre 3,0 a 10,0 e apresentou atividade residual de 60% em temperaturas acima de 40 °C . Porém, a enzima apresentou atividade ótima em pH 5,0 e temperatura de 40 °C.

Embora seja originalmente considerada como uma enzima vegetal, as peroxidases são encontradas no leite, nos leucócitos, na saliva, na tireóide, nas plaquetas, na vesícula seminal e no útero. Essas enzimas protegem nosso organismo contra peróxidos prejudiciais que podem se acumular no organismo humano, resultando no rompimento de membranas e, possivelmente, causar câncer e arteriosclerose (PONSONI, 2004).

Em plantas, as peroxidases estão relacionadas com as reações de biossíntese da parede celular, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa contra patógenos, regulação da alongação de células, biossíntese do etileno e destruição das auxinas (VALDERRAMA; MARANGONI; CLEMENTE, 2001 ; CAMPOS; SILVEIRA, 2003; KARSTEN, 2009; GUERRA, 2010).

As peroxidases apresentam um amplo espectro de utilização, podendo ser aplicadas em diferentes áreas da ciência. São utilizadas na construção de biossensores, na indústria de madeira, papel e celulose, em processos de biorremediação e como reagentes em diagnósticos, controle e avaliação de doenças (MACIEL; GOUVÊA; PASTORE, 2007).

A utilização da peroxidase na construção de biossensores, cuja finalidade é quantificar as concentrações de determinados analitos, vem crescendo a cada ano. Vieira e colaboradores (2003) construíram um eletrodo de pasta de carbono modificado adicionado de peroxidase extraída da abobrinha a fim de determinar as concentrações de paracetamol em produtos farmacêuticos. Oliveira e Vieira (2006) promoveram a aplicação e construção de biossensores utilizando a peroxidase de jiló imobilizada em matriz de quitosana, visando pesquisar hidroquinonas em águas obtidas em processos de revelação fotográfica e de raios-x. Schmidt (2008) estudou a interação da peroxidase de raiz forte imobilizada visando à aplicação de biossensores para detecção de peróxido de hidrogênio.

Vários estudos reportam a utilização de certos tipos de peroxidases produzidas por fungos na indústria de madeira, papel e celulose. Segundo Carvalho e colaboradores (2009) as POD produzidas pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora*, a manganês-peroxidase e a lignina-peroxidase, através de suas ações na parede celular lignificada, atuam no processo de biodegradação da madeira. Aguiar e Ferraz (2011) relatam que os basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia subserialis*, *Phanerochaete sordida*, *Pleurotus ostreatus*, também utilizam as mesmas enzimas no processo de a biodegradação da lignina.

A preocupação crescente das indústrias em tratar seus efluentes coloridos tem levado à busca de novas alternativas de descoloração desses resíduos e, nesse contexto, estudos que visam à utilização de microrganismos produtores de peroxidase vem se destacando (SOARES, 2000). Wilberg e colaboradores (2002) utilizaram peroxidase extraída de sementes de soja na remoção

de compostos fenólicos aquosos, obtendo 95% de eficiência na degradação desses compostos. Kamida e colaboradores (2005) relatam que linhagens de *Pleurotus sajor-caju* tem potencial para serem empregadas em bioprocessos para remoção de cor de efluentes têxteis ou no tratamento de resíduos sólidos coloridos. Em estudos realizados por Oliveira (2008) verificou-se que as bactérias *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus* sp. apresentaram potencial para aplicação na remoção da cor do efluente da indústria papeleira.

Veitch (2004) relata a importância da peroxidase em diagnósticos, controle e avaliação de doenças, através do desenvolvimento de kits de diagnóstico e para imunoenaios. Vieira e colaboradores (2003) ressaltam a relevância em pesquisar a presença de anticorpos anti-TPO (peroxidase tireoidiana) uma vez que estes são considerados dados preditores da evolução para hipotireoidismo. Nunes e colaboradores (2009) estudaram a relação entre a presença de anticorpos anti-TPO em pacientes com diabetes melito tipo I e verificaram elevada prevalência de autoimunidade tireoidiana nesses indivíduos. Veitch (2004) relata ainda a associação da peroxidase com o ácido indol-3-acético e seus derivados como marcadores no tratamento do câncer.

2.5 Polifenoloxidase

Polifenoloxidases (PFO) são enzimas capazes de oxidar compostos fenólicos com auxílio de oxigênio molecular. Em geral, essas enzimas possuem em seu sítio ativo dois átomos de cobre e a reação de oxidação envolve mudanças na valência do cobre e a retirada de elétrons dos átomos de oxigênio (MIYAWAKI, 2006; FANG, 2007). A tirosina, o fenol e o *p*-cresol estão entre os monofenóis que podem ser oxidados pela PFO. Como exemplos de difenóis que sofrem

degradação pela mesma enzima podem ser citados, o catecol, a L-dopa, dopamina e a adrenalina (SANTOS, 2001; FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

Também conhecidas por catecol-oxidase, tirosinase, fenolase e catecolase, as PFO catalisam dois tipos de reações distintas, ambas envolvendo o oxigênio molecular. Podem catalisar a oxidação de monofenóis a *o*-difenois (atividade de cresolase ou monofenol-monoxigenase - EC 1.14.18.1) e promover a oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas (atividade de catecolase ou difenolase- EC. 1.10.3.1) (SHIMIZU, 2004), conforme demonstrado na figura 2.

As quinonas são compostos altamente reativos que podem combinar-se entre si ou com outros componentes do meio como, por exemplo, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos, gerando produtos de condensação de alta massa molecular e cor escura, chamados de melaninas, que dão aos alimentos coloração escura. (YORUK; MARSHALL, 2003; ORTOLAN, 2006).

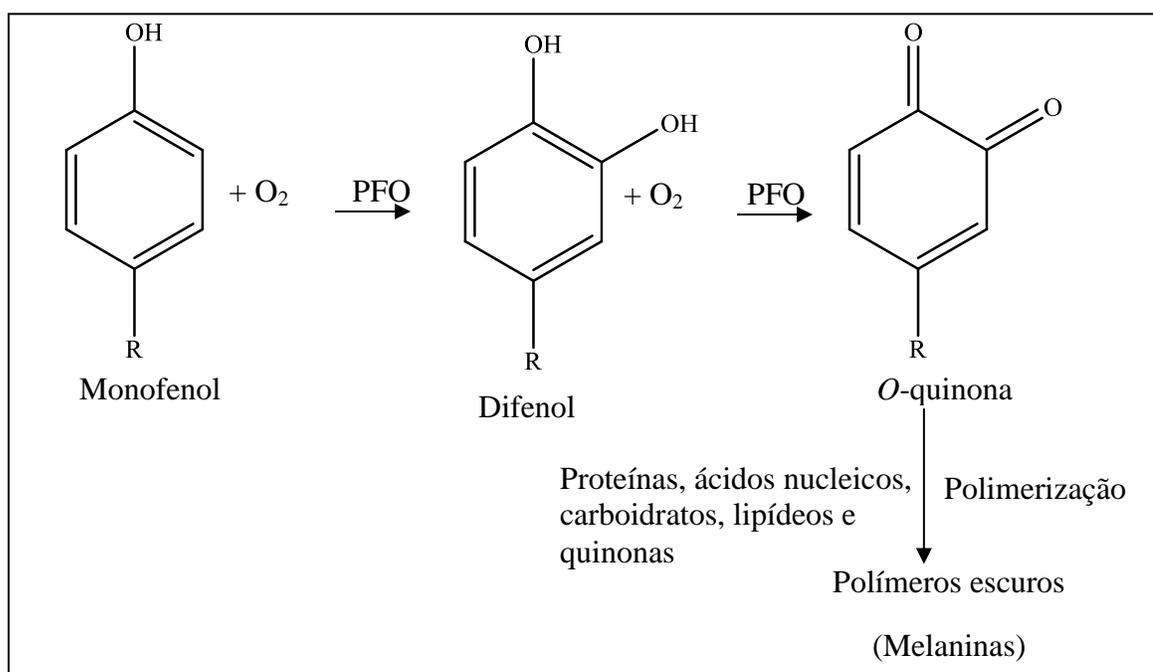


Figura 2. Mecanismo de oxidação da polifenoloxidase.

Fonte: Fang (2007); Queiroz et al. (2008)

A polifenoloxidase é largamente distribuída na natureza podendo ser encontrada em animais, fungos, bactérias e plantas. Para a Ciência de Alimentos as PFO de maior interesse são aquelas obtidas a partir de frutas e hortaliças (Quadro 2), de fungos (cogumelos comestíveis) e de crustáceos (caranguejos e lagosta). Nos tecidos vegetais as PFO se localizam nos cloroplastos e sua concentração varia de acordo com o local do plantio, época da colheita, espécie e estágio de maturação, sendo menor nos frutos e vegetais menos amadurecidos (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; MAYER, 2006).

Quadro 2. Fontes vegetais de polifenoloxidase

Fonte	Autor (es)
Abacate (<i>Persea americana</i> Mill.)	Vanini; Kwiatkowski; Clemente (2010)
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	Paula (2007)
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	Altunkaya; Gökmen (2011)
Araçá (<i>Psidium</i> sp.)	Dantas (2011)
Batata baroa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft)	Menolli (2006)
Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)	Chikezie (2006)
Café (<i>Coffea arabica</i> cv. Novo Mundo)	Melo (2005)
Cajá (<i>Spondias mombin</i> L.)	Guerra (2010)
Lichia (<i>Litchi chinensis</i>)	Souza et al. (2010)
Maçã (<i>Mallus comunis</i>)	Valderrama; Marangoni; Clemente (2001)
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	Wang et al. (2007)
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i> D, cv. ‘Elsanta’ and <i>Fragaria Vesca</i> L, cv. ‘Madame Moutot’)	Chisari; Barbagallo; Spagna (2007)
Palmito de pupunha (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth)	Galdino; Clemente (2008)
Pêssego (<i>Prunus pérsica</i> L.)	Garro; Gasull (2010)
Pinha (<i>Annona squamosa</i> L.)	Lima et al. (2001)
Umbu-cajá (<i>Spondias</i> ssp.)	Silva; Koblitiz (2010)
Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	Troiani; Tropiani; Clemente (2003)

Para a indústria de alimentos, a atividade da polifenoloxidase é considerada um problema uma vez que essa enzima afeta a qualidade nutricional e aparência, reduz a aceitabilidade do consumidor causando significativo impacto econômico para os produtores primários e para a

indústria processadora de alimentos (ZANATTA; ZOTARELLI; CLEMENTE, 2006; PAULA, 2007).

O escurecimento enzimático não ocorre sem que haja um dano celular em frutos ou vegetais. Em tecidos vivos, os substratos fenólicos e a enzima estão separados dentro das células, mas quando ocorre a extração, processos de corte ou trituração, a enzima e o substrato podem entrar em contato, resultando no escurecimento e na alteração não somente estrutural e funcional nas propriedades das proteínas como também em seu valor nutricional (AYDEMIR, 2004).

O controle da integridade celular é necessário para estabelecer os mecanismos de controle que previnem as reações de escurecimento mediadas pela polifenoloxidase. Tal mecanismo de controle existe quando a enzima e os substratos estão compartimentalizados, ou seja, a polifenoloxidase dentro dos cloroplastos e os substratos fenólicos, isolados dentro dos vacúolos citoplasmáticos (CHIKEZIE, 2006).

Em plantas o papel fisiológico das POF tem sido relacionado com a resistência ao ataque de insetos e microrganismos (CAMPOS; SILVEIRA, 2003). Possivelmente, após danos causados nas plantas haveria rompimento celular com conseqüente liberação das enzimas dos cloroplastos e seu posterior contato com seus substratos, os fenóis liberados do vacúolo. Como resultado, os fenóis seriam oxidados formando quinonas, compostos altamente reativos e com alta capacidade de se ligar irreversivelmente a proteínas, além de serem mais tóxicas que o fenol original. As quinonas podem atuar de duas maneiras nos mecanismos de resistência. No primeiro, esses compostos diminuiriam a qualidade protéica das plantas, pois o complexo proteína-quinona é pouco digerível pelo trato digestivo dos insetos, resultando em menor aproveitamento de nitrogênio e conseqüente comprometimento do crescimento. Já no segundo modo de ação, as quinonas se ligariam diretamente a proteínas do trato digestivo dos insetos, diminuindo sua funcionalidade (SHIMIZU, 2004).

Melo (2005) estudou a polifenoloxidase do cafeeiro e sua relação com resistência a pragas. Verificou-se que a inoculação com esporos do fungo *Hemileia vastatrix* e a infestação com ovos do inseto *Perileucoptera coffeella* resultaram em variados níveis de atividade de PFO nos genótipos avaliados. Concluiu-se que a ação da PFO nesse mecanismo de resistência pode ter relação com o potencial oxidativo do tecido e não simplesmente com uma maior atividade enzimática. Além disso, o tipo e quantidade de substrato encontrado no tecido podem ser importantes na resistência do cafeeiro e que entre os genótipos pode existir a especialização de mecanismos de resistência envolvendo a ação da polifenoloxidase.

Shimizu (2004) avaliou a polifenoloxidase como fator de resistência da soja a nematóides. Nesse estudo observou-se aumento na atividade dessa enzima nas amostras inoculadas com larvas de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica* após 48 e 72 h da inoculação, respectivamente, relacionando-se, então, a elevação dos níveis enzimáticos de PFO com o aumento da resistência da soja aos nematóides.

Nem sempre o escurecimento produzido pela polifenoloxidase é indesejável, uma vez que essa enzima desempenha papel importante no desenvolvimento do sabor e cor dos alimentos (LIMA et al., 2001). Soares (2001) utilizou a PFO, obtida da pinha, durante a fermentação das sementes de cacau visando ao melhoramento do sabor desse fruto. Nos experimentos tratados com a PFO obteve-se redução de 18,64 a 20,07 % de fenóis totais. Observou-se que presença da polifenoloxidase durante o processo fermentativo levou à melhoria do sabor, pois essa enzima oxidou compostos fenólicos, levando à diminuição da adstringência e do gosto amargo do cacau, melhorando a qualidade do produto final.

Alguns autores relatam que na fabricação de alguns alimentos a ação enzimática do PFO é requerida, como por exemplo, nas indústrias de produção de café, de chá preto e de cacau (GUERRA, 2010; LIMA et al., 2001). Além disso, a polifenoloxidase é responsável pelo

desenvolvimento da característica de cor dourada em frutas secas como ameixas, uvas passas e tâmaras (CHIKEZIE, 2006).

A PFO de frutos e vegetais vem sendo estudada com o objetivo de determinar as condições necessárias para minimizar o efeito dessas enzimas em vegetais e frutos. Em estudo realizado por Galdino e Clemente (2008) a polifenoloxidase foi avaliada quanto aos parâmetros físico-químicos e cinéticos. O melhor pH de extração foi de 6,5 e observou-se decréscimo da atividade da PFO com aumento do tempo e da temperatura, conseguindo-se 75,14 % de inativação da enzima aos 10 minutos a 80 °C. Porém, o tratamento térmico não foi suficiente para promover a completa inativação enzimática, indicando a possível existência de enzimas termorresistentes.

Luíz e colaboradores (2007) estudaram a cinética de inativação da polifenoloxidase de abacate. Observou-se rápido declínio da atividade enzimática da PFO nos primeiros quatro minutos de análise e, após esse período, mesmo com aumento da temperatura e do tempo, a atividade enzimática decaiu de maneira mais lenta. Concluiu-se que a PFO possuía duas porções, uma termolábil e uma resistente, pois não se conseguiu a inativação total da enzima.

Wang e colaboradores (2007) estudaram a propriedades parciais de polifenoloxidase obtida a partir de extrato de polpa de manga. Nessa pesquisa o pH e a temperatura ótimos de atividade, foram respectivamente de 7,0 e 30 °C. A enzima mostrou atividade com dihidroxifenóis e trihidroxifenóis, mas não com monohidroxifenóis. A PFO ainda apresentou atividade quando o extrato enzimático foi submetido à temperatura de 50 °C por 15 minutos. Porém, após aquecimento a 80 °C durante 5 minutos a enzima perdeu 98 % de atividade.

Assim como a peroxidase, a polifenoloxidase também é utilizada em processos de biorremediação e na construção de biossensores. Louzada e colaboradores (2004) construíram e caracterizaram um biossensor para determinação do pirogalol em tinturas de cabelo, utilizando-

se, como fonte de PFO, extrato bruto de inhame. Concluiu-se que o biossensor apresentou resultados satisfatórios, quando testado para determinar a concentração de fenóis nas amostras analisadas. Pagliai (2009) construiu um biossensor utilizando a PFO extraída do abacate, a fim de se detectar compostos fenólicos como o catecol, possibilitando o uso desses biossensores na análise e no monitoramento de pesticidas presentes no solo e na água.

Vilella (2006) avaliou a lacase extraída de *Aspergillus sp* na biodegradação do efluente de uma indústria de papel e celulose e concluíram que essa enzima pode compor novas tecnologias para o tratamento dos efluentes das indústrias papeleras. Garcia (2006) utilizou a enzima lacase obtida a partir do fungo *Pycnoporus sanguineus* e concluiu que esta foi eficiente na descoloração de corantes empregados na indústria farmacêutica. Gil e colaboradores (2009) também utilizaram a lacase extraída do *Pycnoporus sanguineus* e verificaram que essa enzima pode ser aplicada na detecção de catecol e outros compostos fenólicos em águas residuais.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do processo de congelamento na atividade de enzimas oxidativas presentes nas polpas dos genótipos B 28-7, D 28-10, P 3-10, P 9-8 de cupuaçu, produzidos pela EMBRAPA – Manaus.

3.2 Específicos

- Determinar a composição físico-química e a atividade enzimática da polifenoloxidase e da peroxidase de polpas dos genótipos B 28-7, D 28-10, P 3-10, P 9-8 de cupuaçu;
- Determinar o teor de açúcares totais, acidez titulável, ácido ascórbico, pH, sólidos solúveis e sólidos totais em polpas congeladas de quatro genótipos de cupuaçu durante um ano;
- Analisar o efeito do congelamento na atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase presentes em polpas de quatro genótipos de cupuaçu, por um período de um ano.

4 METODOLOGIA

4.1 Modelo de estudo

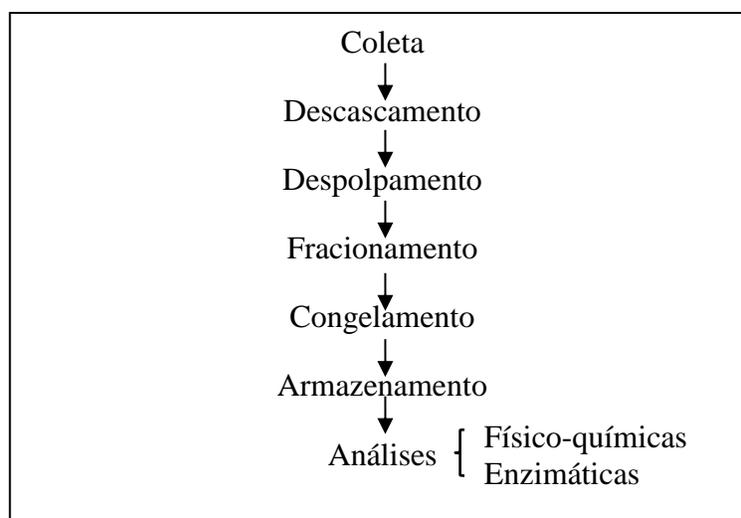
Foi realizado um estudo experimental descritivo prospectivo sobre o efeito do congelamento e da estocagem na qualidade de polpas congeladas de cupuaçu.

4.2 Amostras dos frutos

Os genótipos B 28-7, D 28-10, P 3-10, P 9-8 de cupuaçu foram obtidos na Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na Rodovia AM-010, Km 29, zona rural de Manaus.

4.3 Processamento e análises

No fluxograma 1 estão indicadas as etapas do processamento e análises físico-químicas e enzimáticas do cupuaçu:



Fluxograma 1. Etapas do processamento e análises das amostras de polpa de cupuaçu.

4.3.1 Seleção e lavagem dos frutos

Foram coletados frutos procedentes de quatro genótipos de cupuaçuzeiros, sendo selecionados e lavados em água corrente apenas aqueles que apresentaram boas condições de sanidade e sem injúrias mecânicas.

4.3.2 Obtenção das polpas

Os frutos foram descascados e despulpados manualmente, utilizando-se tesoura de aço inoxidável. As polpas obtidas foram fracionadas em quantidades de 50 g e acondicionadas em sacos plásticos.

4.3.3 Armazenamento das polpas

Após acondicionamento em sacos plásticos, as polpas foram congeladas e armazenadas em freezer (Electrolux/Prosdócimo Freezer F25) em temperatura entre -25 °C e -30 °C.

4.4 Análises enzimáticas e físico-químicas

A cada mês, durante um período de um ano, foram realizadas análises enzimáticas e físico-químicas, constituindo-se treze tempos de análise (t0-t12).

4.4.1 Análises enzimáticas

As atividades da polifenoloxidase e da peroxidase foram determinadas segundo o método descrito por Oktay, M. et al. (1995) e Khan e Robinson (1994), respectivamente. A atividade da peroxidase insolúvel foi realizada conforme a metodologia de Holschuh (2000).

4.4.2 Análises físico-químicas

Para a composição físico-química das polpas de cupuaçu foram analisados os teores de açúcares totais (g/100g), acidez titulável expressa em ácido cítrico (g/100g), ácido ascórbico (mg/100g), pH, sólidos solúveis em °Brix e sólidos totais (g/100g), conforme exigência da Instrução Normativa N°. 01, de 7 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – M.A.P.A., que aprovou o regulamento técnico geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpas de frutas (BRASIL, 2000).

As análises foram executadas de acordo com o estabelecido pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). As exceções foram a determinação da vitamina C que seguiu o método descrito por Ranganna (1986), com modificações e a análise de açúcar total que foi determinada de acordo com a metodologia de Somogyi (1945) e Nelson (1944).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva de cada uma das variáveis: peroxidase solúvel, peroxidase insolúvel, polifenoloxidase, ácido ascórbico, ácido cítrico, açúcares totais, pH, sólidos solúveis totais .

O delineamento experimental utilizado, inicialmente, para todas as variáveis, foi um fatorial 4x12 com três replicações verdadeiras. Apenas a variável “sólidos solúveis totais” satisfaz as pressuposições de normalidade e homocedasticidade. Para as outras variáveis foi utilizado teste de Kruskal-Wallis como alternativa para a análise de variância. As comparações múltiplas, quando necessárias, foram realizadas através do teste de Tukey. Todos os testes foram realizados usando nível de 5 % de significância.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 15, p. 01-10, 2011

AGUIAR, J.P.L. Tabela de composição de alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 26, n. 2, p. 121-126, 1996.

ALTUNKAYA, A.; GÖKMEN, V. Purification and characterization of polyphenol oxidase, peroxidase and lipoxygenase from freshly cut lettuce (*L. sativa*). **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 2, p. 249-256, 2011.

ALVIM, K. C.; CLEMENTE, E. Estudo da termoestabilidade de peroxidases extraídas da polpa e casca de mexerica (*Citrus deliciosa*). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 20, n. 2. p. 201-205, 1998.

ANTUNES, A.M.; VALMÓRBIDA, J.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Uso de reguladores vegetais na conservação refrigerada de acerolas (*Malpighia glabra* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, 2006.

ARAÚJO, L.M. **Produção de alimentos funcionais formulados com xilitol a partir de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. Manaus: UFAM, 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2007.

ARAÚJO, P. F. Influência do congelamento sobre as características físico-químicas e o potencial antioxidante de néctar de amora-preta. **Boletim do Centro Pesquisa de Processamento de Alimentos de Curitiba**, v. 27, n. 2, p. 199-206, 2009.

AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. **Food Chemistry**, v. 87, p. 59-67, 2004.

BASTOS, M. S. R.; GURGEL, T. E. P.; SOUSA FILHO, M. S. M.; LIMA, I. F. B.; SOUZA, A. C. R.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. Comunicação científica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 240-242, 2002.

BERBICZ, F.; CLEMENTE, E. Avaliação da termoestabilidade e da regeneração da atividade da peroxidase extraída de laranja (*Citrus* spp.). **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 23, n. 5, p. 1239-1242, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 01, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de janeiro de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal – DIPOV**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/exportacao/alimentos> >. Acesso em 20 nov. 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Produtos Potenciais da Amazônia**, 1998.

BRITO, C. A. K.; SATO, H. H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W. J. Abacaxi IAC gomo-de-mel (*Ananas comosus* (L.) Merrill): características da polpa e da peroxidase do suco. **Boletim do Centro Pesquisa de Processamento de Alimentos de Curitiba**, v. 25, n. 2, p. 257-266, 2007.

BRITO, C. A. K.; SATO, H. H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W. J. Características da atividade da peroxidase de abacaxis (*Ananas comosus* (L.) Merrill) da cultivar IAC gomo-de-mel e do clone IAC 1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 244-249, 2005.

CALZAVARA, B. B. G. **Cupuaçuzeiro**. Embrapa: Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido-CPATU, 1987.

CAMARGO, L.A. **Glicerol-3-fosfato oxidase em levedura de panificação**. Araraquara: UNESP, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2007.

CAMPOS, A.D.; SILVEIRA, E. M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenoloxidase em plantas**. Comunicado Técnico. Embrapa, Pelotas, 2003.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. M.; FERNANDES, K. F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 189-193, 2003.

CARVALHO, A.V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J. A.; WADA, J. K. A. Caracterização de concentrado e isolado proteico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, SCHUM). **Brazilian Journal Food and Technology**, v.12, n. 1, p. 01-08, 2009.

CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H.; ALVES, R. M.; NAZARÉ, R. F. R. **Cupuaçuzeiro**. Comunicado Técnico 115. Belém, 2004.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5. Ed. Belém: Edições CEJUP, 1991: CNPq: Museu paraense Emílio Goeldi, 1991. – (Coleção Adolfo Ducke).

CHIKEZIE, P. C. Extraction and Activity of Polyphenol Oxidase from Kolanuts (*Cola nitida* and *Cola acuminata*) and Cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Agriculture and Food Sciences**, v. 4, n. 2, 2006.

CHISARI, M.; BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, 2007.

CLEMENTE, E. Peroxidase from oranges (*Citrus sinenses* (L.) Osbeck. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 164-168, 2002.

COHEN, K.O.; JACKIX, M.N.H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.

COLLA, L.M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Congelamento e descongelamento – sua influência sobre os alimentos. **Vetor**, v. 13, p 53-66, 2003.

CONTEXTO AMAZÔNICO. **O Banco da Amazônia e o financiamento da fruticultura regional**. Ano 1, n. 5, 2008.

CORREIA, L. F. M.; FARAONI, A. S.; PINHEIRO-SANT'ANA. Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p. 83-95, 2008.

COSTA, M.C. **Conservação da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiforum*) por métodos combinados com emprego da tecnologia de obstáculos**. Fortaleza: UECE, 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Ceará, 2002.

DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em abacate da variedade Hass, submetidos ao tratamento térmico. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v. 9, n. 2, p.106-112, 2008.

DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L.; VILEIGAS, D. F.; MYAKE, C. N. H. Avaliação da coloração, teor de fenóis e atividade da peroxidase no guacamole conservado pelo frio. **Agronomia Tropical**, v. 59, n. 3, p. 331-342, 2009.

DANTAS, A.L. **Qualidade, compostos bioativos, atividade antioxidante e enzimática de frutos de araçazeiros (*Psidium* sp.) do brejo paraibano**. Areia: UFPB, 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2011.

DICKO, M. H.; GRUPPEN, H.; TRAORÉ, A. S.; VORAGEN, A. G. J.; BERKEL, W. J. H. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 1, n. 1, p. 21-38, 2006.

DUNFORD, H. B. Horseradish Peroxidase. The native enzyme, compounds I and II, their structures, and their cycle. In_____. **Peroxidases and catalases: biochemistry, biophysics, biotechnology and physiology**. 2. ed, 2010. Disponível em <http://books.google.com.br/books?id=GxmbM6X4GBsC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em 22 jun. 2011.

FANG, C. **Characterization of polyphenol oxidase and antioxidants from pawpaw (*Asimina tribola*) fruit**. Kentucky, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Nutricionais), University of Kentucky, 2007.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIERA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 455-464, 2002.

FAZIO, M. L. S. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas**. São José do Rio Preto: UNESP, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2006.

FERREIRA, C. Q. **Efeito do congelamento e da estocagem na atividade enzimática da polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) e na composição físico-química de polpa congelada de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Manaus: UFAM, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Amazonas, 2009.

FILGUEIRAS, H. A. C.; CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Armazenamento de ameixas sob refrigeração e atmosfera modificada 2: colapso interno (internal breakdown) e textura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 18, n. 1, p. 129–135, 1996.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some brazilian fruits: umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1263-1265, 2000.

FREIRE, M. T. A.; PETRUS, R. R.; FREIRE, C. M. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; FELIPE, A. M. P. E.; GATTI, J. B. Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de polpa de cupuaçu congelada (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Brazilian Journal Food Technology**, v.12, n. 1, p. 09-16, 2009.

FREITAS, A. A.; FRANCELIN, M. F.; HIRATA, G. F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F. L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geleias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 172-177, 2008.

GALDINO, N. O.; CLEMETE, E. Palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) composição mineral e cinética de enzimas oxidativas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 540-544, 2008.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Brasília: UnB, 2006. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2006.

GARRO, A.; GASULL, E. Characterization of Polyphenoloxidase from 2 peach (*Prunus persica* L.) varieties grown in Argentina. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 627-632, 2010.

GIL, E. S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M. F.; GARCIA, T. A. Biosensor Based on Brut Extract from Laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for Environmental Analysis of Phenolic Compounds. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 27, n. 3, p. 215-225, 2009.

GIRALDO-ZUNIGA, A. D.; ARÉVALO-PINEDO. A.; SILVA. A. F.; SILVA, P. F.; VALDES-SERRA, J. C.; PAVLAK, M. C. M. Datos experimentales de la cinética del secado y del modelo matemático para pulpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) en rodajas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 179-182, 2010.

GUERRA, I. C. S. **Caracterização parcial de enzimas oxidativas e quantificação de compostos fenólicos em frutos de três genótipos de cajazeira (*Spondias mombin* L.) nos estádios de maturação verde e maduro.** Recife: UFRPE, 2010. Dissertação (Mestrado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.

HERNANDEZ-RUIZ, J.; ARNAO, M. B.; HINER, A. N. P.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; ACOSTA, M. Catalase-like activity of horseradish peroxidase : relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. **Biochemistry Journal**, v. 354, p. 107-114, 2001.

HOLSCHUH, H. J. **Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.),** 2000. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** Versão eletrônica. 1. ed. digital, São Paulo, 2008.

Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas-IDAM. **Cultura: cupuaçu.** Relatório de Acompanhamento Trimestral: janeiro-dezembro de 2010.

JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R. C.; CHIM, J. F. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720-1725, 2010.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KARSTEN, J. **Envolvimento da peroxidase e da polifenoloxidase no bloqueio xilemático de hastes de ave-do-paráiso (*Strelitzia reginae*)**. Viçosa: UFV, 2009. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, 2009.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D.S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidase. **Food Chemistry**, v.49, p.407-410, 1994.

LANNES, S.C.S.; MEDEIROS, M.L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por *spray-dryer*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n. 1, 2003.

LAURENTI, C.; CLEMENTE, E. Avaliação da atividade da peroxidase em carambola (*Oxalidacia avertroha*) em diferentes estádios de maturação. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 159-163, 2005.

LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; BARBERY, S. D. F.; GARCIA, N. H. P.; BRITO, E. S.; LIMA, C. A. A. Obtenção e utilização da enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura no melhoramento do sabor do cacau (*Theobroma cacao* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 709-713, 2001.

LIMA, R. M. T. **Avaliação da estabilidade química, físico-química e microbiológica de polpas de acerola orgânica pasteurizada e não-pasteurizada**. Fortaleza: UFC, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2010.

LOPES, A. S.; CLEMENTE, E. Minerais e enzimas oxidativas em brócolos (*Brassica oleracea* L. Cv.Italica) minimamente processado. **Acta Scientiarum: Technology**, v. 24, n. 6, p. 1615-1618, 2002.

LOPES, A. S.; MATTIETTO, R. A.; MENEZES, H. C. Estabilidade da polpa de pitanga sob congelamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.3, p. 553-559, 2005.

LOPES, J. R. M.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L. Situação atual do cupuaçuzeiro no sul da Bahia. **Agrotrópica**, v. 11, n. 3, p.181-186, 1999.

LOUZADA, E. S.; LUCCAS, P. O.; MAGALHÃES, C. S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. **Revista Analytica**, n. 11, 2004.

LUÍZ, R. C.; HIRATA, T. A. M.; CLEMENTE, E. Cinética de inativação da polifenoloxidase e peroxidase de abacate (*Persea americana* MILL.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1766-1773, 2007.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 221-225, 2007.

MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; YUYAMA, L. K. O; CHAAR, J. M. Estabilidade de ácido ascórbico e antocianinas em néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 313-316, 2007.

MANTOVANI, C.; CLEMENTE, E. Peroxidase and polyphenoloxidase activity in tomato *in natura* and tomato purée. **Acta Scientiarum: Technology**, v. 32, n. 1, p. 91-97, 2010.

MARTINS, V.B. **Perfil sensorial de suco tropical de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) com valor calórico reduzido**. Campinas: UNICAMP, 2008. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2318–2331, 2006.

MELO, A. A. M.; VILAS-BOAS, E. V. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 110-115, 2006.

MÉLO, E. A.; LIMA, A. G.; NASCIMENTO, P. P. Temperatura no armazenamento de pitanga **Scientia Agrícola**, v.57, n.4, 2000.

MELO, G. A. **Purificação da enzima polifenoloxidase do cafeeiro, sua relação com resistência a pragas e o controle da síntese de seu principal substrato, o ácido clorogênico**. Campinas: UNICAMP, 2005. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MENOLLI, L. N. **Atuação das enzimas oxidativas em raízes de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) submetidas à injúria por frio.** Viçosa: UFV, 2006. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MIYAWAKI, M. **Control of polyphenol oxidase and pectin methylesterase activities by ultra high pressure.** Washington, 2006. Tese (Doutorado em Filosofia), Departamento de Ciência de Alimentos e Nutrição Humana, Universidade Estadual de Washington, 2006.

NARVÁEZ-CUENCA, C. E. Extracción y medida de peroxidasa en pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* MC Vaugh). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2047-2051, 2008.

NAZARÉ, R. F. B. **Preparo de produtos derivados de cupuaçu.** Recomendações Técnicas. Embrapa Amazônia Oriental, 2003.

NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NUNES, R. C. ALMEIDA, N. H.; RODACKI, M.; NOÉ, R. A.; BENCKE, M. C.; OLIVEIRA, J. E. P.; VAISMAN, M. Prevalência do anti-TPO e anti-21-hidroxilase no paciente diabético tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 4, 2009.

OLIVEIRA, A. B. **Caracterização físico-química, química e bioquímica do suco tropical de manga (*Mangifera indica* L.) não adoçado obtido pelo processo Hot Fill.** Fortaleza: UFC, 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2006.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

OLIVEIRA, L. P. **Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos encontrados na Amazônia para elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada.** Manaus: UFAM, 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2006.

OLIVEIRA, P. L. **Purificação e caracterização bioquímica de manganês peroxidase de *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus* sp. e sua atuação na remoção da cor do efluente da**

indústria papelreira. Campinas: UNICAMP, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

OLIVEIRA, S.P. Dispersão horizontal da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro (*Conotrachelus humeropictus* FIEDLER, 1940) (COLEOPTERA : CURCULIONIDAE) em sistemas agroflorestais de Nova Califórnia, Rondônia. Manaus: UFAM, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, 2003.

ORTOLAN, F. Genótipos de trigo do Paraná – Safra: 2004: Caracterização e fatores relacionados à alteração de cor da farinha. Santa Maria: UFSM, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

PAGLIAI, R.S. Comparação do uso da tirosinase purificada e na forma de extrato bruto enzimático em biossensores amperométricos para a detecção de catecol. São Carlos: USP, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.

PAULA, G. A. Caracterização físico-química e estudo do escurecimento enzimático em produtos derivados de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Fortaleza: UFC, 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 2007.

PELAIS, A. C. A.; ROGEZ, H.; PENA, R. S. Estudo da pasteurização da polpa do murici. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 17-24, 2008.

PEREIRA, A. M. Purificação e caracterização da peroxidase do taperebá (*Spondias lutea* L.). Campinas: UNICAMP, 2003. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

PONSONI, E. J. Implicação da nicotina sobre a atividade da peroxidase salivar. Araraquara: UNESP, 2004. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

PORTE, A.; REZENDE, C. M.; ANTUNES, O. A. C.; MAIA, L. H. Redução de amonoácidos em polpas de bacuri (*Platonia insignis* Mart), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Wild ex-Spreng Schum) e murici (*Byrsonima crassifolia* L.) processado (aquecido e alcalinizado). **Acta Amazônica**, v. 40, n. 3, p. 573-578, 2010.

QUEIROZ, C.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. **Food Reviews International**, v. 24, n. 4, p. 361-375, 2008.

QUEIROZ, M. B.; GARCIA, N. H. P. Avaliação da torração de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 2, p. 167-173, 1999.

RANGANNA, S. **Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products**. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1986.

SANTOS, E. R. **Caracterização bioquímica da peroxidase e da polifenoloxidase de açaí (*Euterpe oleracea*)**. Campinas: UNICAMP, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 2001.

SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; COSTA, J. M. C.; FONSECA, A. V. V. Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1636-1642, 2010.

SBALCHEIRO, C. C.; DENARDIN, N. D.; BRAMMER, S. P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do crestamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n. 1, p.029-037, 2009.

SCHMIDT, T. F. **Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em interfaces nanoestruturadas**. São Carlos: USP, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

SEBASTIANY, E.; REGO, E. R.; VITAL, M. J. S. Qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, 2009.

SHIMIZU, M. M. **Polifenoloxidase como fator de resistência da soja a nematóides e na oxidação do palmito**. UNICAMP, 2004. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade de Campinas, 2004.

SILVA, A. E.; SILVA, L. H. M.; PENA, R. S. Comportamento higroscópico do açaí e cupuaçu em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 895-901, 2008.

SILVA, C. R.; KOBLITZ, M. G. B. Partial characterization and inactivation of peroxidases and polyphenol-oxidases of umbu-cajá (*Spondias* spp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 790-796, 2010.

SINGH, J.; DUBEY, A.; DIWAKAR, S. K.; RAWAT, S. K.; BATRA, N.; JOSHI, A. Biochemical Characterization of Peroxidases from the Fruits of *Mallus pumilus*. **International Research Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 050-058, 2010.

SOARES, G. M. B. **Aplicação de sistemas enzimáticos à degradação de corantes têxteis**. Braga: UM, 2000. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2000.

SOARES, M. S. **Estudo de melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) através de ação enzimática durante a fermentação**. Campinas: UNICAMP, 2001. Dissertação Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 61-68, 1945.

SOUSA, T. P. A. **Caracterização parcial da peroxidase dos frutos de aceroleira (*Malphigia emarginata* DC), clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação**. João Pessoa: UFPB, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, 2010.

SOUZA, A. G. C.; SILVA, S. E. L.; TAVARES, A. M; RODRIGUES, M. R. L. **A Cultura do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)**. Circular Técnica, n. 2, 1999.

SOUZA, A. G. C. **Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro**. Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, 2007.

SOUZA, A. G. C.; SOUSA, N. R.; SILVA, S. E. L.; NUNES, C. D. M.; CANTO, A. C.; CRUZ, L. A. A. **Fruteiras da Amazônia**. Serviço de Produção de Informação-SPI, Brasília, 1996.

SOUZA, A. V.; VIEITES, R. L.; KOHATSU, D. S.; LIMA, G. P. P. Tratamento térmico na manutenção da coloração de lichias. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, 2010.

SOUZA, D. P. B.; COSTA, I. C. R.; PAIVA, L. M. C.; OESTREICHER, E. G.; BEREZUK, M. E.; CARDOZO-FILHO, L. Peroxidase activity in *Spondias dulcis*. **Acta Scientiarum: Technology**, v. 32, n. 4, p. 341-345, 2010.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA/UNICAMP, 2006.

THONGSOOK, T.; BARRETT, D. M. Heat Inactivation and Reactivation of Broccoli Peroxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 8, p. 3215-3222, 2005.

TROIANI, E. P.; TROPANI, C. T.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis vinifera* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, 2003.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 321-325, 2001.

VANINI, L. S.; KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Polyphenoloxidase and peroxidase in avocado pulp (*Persea americana* Mill.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 525-531, 2010.

VEITCH, Nigel C. Hoseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**. v. 65, p. 249-259, 2004.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 39-43, 2003.

VIEIRA, J. G. H.; KASAMATSU, T. S.; HAUACHE, O. M.; MACIEL, R. M. B. Anticorpos Anti-Tiróide: Aspectos Metodológicos e Importância Diagnóstica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 5, 2003.

VILLACHICA, H. **Frutales e Hortalizas Promisorios de la Amazonia**. Tratado de Cooperacion Amazonica. Lima, 1996.

VILELLA, S. M. **Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras**. Florianópolis: UFSC, 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

WANG, J.; JIANG, W.; WANG, B.; LIU, S.; GONG, Z.; LUO, Y. Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tainong") pulp. **Journal of Food Biochemistry**, v. 31, p. 45–55, 2007.

WILBERG, K.; ASSENHAIMER, C.; RUBIO, J. Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 851-857, 2002.

YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T.; TONZAR, A. C.; MORYIA, S.; FERNANDES, L. G. Produtos de Acerola: Estudo da Estabilidade de Vitamina C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 92-94, 2003.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 361- 422, 2003.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* r.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.3, p. 705-708, 2006.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

7. RESULTADOS

7.1 Artigo submetido à revista *Semina Ciências Agrárias* (qualis B1)

Título em português: Características físico-químicas e atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase em quatro genótipos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum) submetidos ao congelamento.

Título em inglês: Physicochemical characteristics and enzymatic activity of peroxidase and polyphenoloxidase in four genotypes of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum) submitted to freezing.

Autores:

Salomão Rocha Martim^{I*}, Jose Cardoso Neto^{II}, Ila Maria de Aguiar Oliveira^{III}

^IDiscente de Pós-graduação, UFAM, Manaus. E-mail: salomao.martim@gmail.com

^{II}Professor Associado II, UFAM, Manaus. E-mail: jcardoso@ufam.edu.br

^{III}Professor Adjunto IV, UFAM, Manaus. E-mail: ila@ufam.edu.br

***Autor para correspondência**

Resumo

No congelamento de polpas de frutas a atividade enzimática não é completamente cessada. Podem ocorrer mudanças sensoriais, nutricionais e de coloração devido à ação de enzimas oxidativas, como a peroxidase e a polifenoloxidase. Considerando que as polpas de cupuaçu congeladas, comercializadas no Brasil, têm um prazo de validade de um ano e tornam-se escurecidas ao longo deste período, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito do tempo de congelamento nas características físico-químicas e nas atividades da polifenoloxidase e peroxidases solúvel e insolúvel presentes nas polpas de quatro novos genótipos de cupuaçu, durante doze meses. Os frutos dos genótipos de cupuaçu, desenvolvidos pela Embrapa Amazônia Ocidental, foram despulpados, congelados e armazenados à temperatura de -30 °C. A polifenoloxidase das polpas dos quatro genótipos apresentou aumento na sua atividade com picos no sexto, nono e décimo mês e as peroxidases apresentaram oscilações na atividade enzimática. As propriedades físico-químicas das polpas apresentaram variações durante os doze meses de armazenamento sob congelamento. O teor de vitamina C dos genótipos D 28-10 e P 3-10 diminuiu a partir do 4º e 10º mês, respectivamente. Por outro lado os genótipos B 28-7 e P 9-8 permaneceram estáveis. Em relação à acidez em ácido cítrico, as amostras B-28-7, D 28-10 e P 9-8 não diferiram, havendo redução no genótipo P 3-10. O valores de pH e sólidos solúveis totais de todos os genótipos diminuíram ao longo do período avaliado. Houve aumento na concentração de açúcares das polpas dos genótipos B 28-7, P 3-10 e P 9-8, com exceção da amostra D 28-10 que permaneceu inalterada. Todos os genótipos apresentaram-se dentro dos padrões físico-químicos exigidos pela legislação, com exceção do genótipo P 3-10 que apresentou acidez inferior. Em relação aos parâmetros enzimáticos, houve variações na atividade das peroxidases e polifenoloxidases de todos os genótipos avaliados.

Palavras-chave: *Theobroma grandiflorum*, escurecimento enzimático, frutos amazônicos

Abstract

During the freezing of fruits pulps, the enzyme activity is not finished completely. Sensory, nutritional and coloring changes may occur on fruits due to the action of oxidative enzymes such as peroxidase and polyphenoloxidase. The frozen cupuaçu pulps, sold in Brazil, have a shelf life of one year and become browned during this period. The aim of this study was to evaluate the effect of frozen storage on the physicochemical characteristics, polyphenoloxidase activity and soluble and ionically bound peroxidases presented in the pulps of four new cupuaçu genotypes over twelve months. The cupuaçu genotypes developed by the West Amazonian Agroforestry Research Center (EMBRAPA) were pulped, frozen and stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. The polyphenoloxidase of the four cupuaçu genotypes showed an increase in activity according to the storage time with peaks in the sixth, ninth and tenth months, but the peroxidases exhibited oscillations in the enzyme activity. The physicochemical properties of the pulps showed variations during the twelve months of storage under freezing. The vitamin C content of D 28-10 and P 3-10 genotypes decreased from the fourth and tenth months, respectively. Moreover P 9-8 e B 28-7 genotypes remained stable. In relation the acidity of citric acid, the B-28-7, D 28-10 and P 9-8 samples were not different, but P 3-10 genotype presented a reduction. The pH and total soluble solids of all genotypes decreased over the study period. There was an increase in sugar concentration of B 28-7, P 3-10 and P 9-8 genotypes, except for D 28-10 sample which remained unchanged. All genotypes were in accordance with physical-chemicals standards required by legislation, except for P 3-10 genotype that showed a lower acidity. In respect of the enzymatic parameters, there were variations in the activity of peroxidase and polyphenoloxidases of all genotypes.

Keywords: *Theobroma grandiflorum*, enzymatic browning, amazonian fruits

Introdução

O cupuaçuzeiro é uma árvore frutífera típica da região amazônica que figura como uma das mais promissoras dessa região, sendo crescentes os investimentos em cultivos racionais desta espécie. A importância econômica do cupuaçu está relacionada com a polpa e seus produtos derivados, como suco, licor, sorvete, geleias, doces e o cupulate, que é um produto análogo ao chocolate, obtido a partir das sementes de cupuaçu (COHEN; JACKIX, 2005).

O congelamento de polpas de frutas tornou-se uma opção viável para evitar perdas de produção, pois preserva as características originais das frutas frescas por extensos períodos e viabiliza sua comercialização nos períodos de entressafra. Além disso, alguns frutos como o cupuaçu, são bastante perecíveis, sendo seu transporte *in natura* por longas distâncias, praticamente inviável (MARTINS, 2008).

A comercialização de frutos na forma processada ainda enfrenta grandes desafios, pois as enzimas responsáveis pelo escurecimento de frutas e vegetais congelados não são completamente inativadas pelo frio (LOPES; MATTIETTO; MENEZES, 2005). Após o corte, ocorre o escurecimento da polpa devido à presença de compostos fenólicos e atividade das enzimas oxidativas, como a peroxidase e a polifenoloxidase (DAIUTO; VIEITES, 2008). Essas enzimas podem causar, além do escurecimento, perdas nutricionais, mudanças indesejáveis no aroma, sabor, textura e cor dos frutos, devido à ação promotora de reações de oxidação e de biodegradação em frutos e vegetais processados, ocasionando perdas econômicas (MANTOVANI; CLEMENTE, 2010).

Considerando que na literatura científica há carência de pesquisas em relação às enzimas oxidativas de frutos amazônicos, este estudo objetivou avaliar, por um período de um ano, as alterações físico-químicas e a atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase de polpas congeladas de quatro novos genótipos de cupuaçu.

Material e Métodos

Os genótipos B 28-7, D 28-10, P 3-10, P 9-8 de cupuaçu foram coletados na área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na Rodovia AM-010, Km 29, zona rural de Manaus, nas coordenadas geográficas 2°53'25" S e 59°58'06" W e, após lavagem dos frutos em água corrente, foram quebrados e despulpados manualmente, utilizando-se tesoura de aço inoxidável. As polpas obtidas foram fracionadas em quantidades de 50 g e acondicionadas em sacos plásticos sendo, em seguida, congeladas e armazenadas a -30 °C em freezer com

sistema digital de controle de temperatura.

O experimento teve duração de um ano. A cada mês, foram realizadas triplicatas das análises das polpas quanto as suas características físico-químicas e em relação às atividades enzimáticas das peroxidases solúvel e insolúvel e da polifenoloxidase.

As análises físico-químicas de pH, acidez total, sólidos solúveis totais (°Brix) foram realizadas de acordo com as metodologias preconizadas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

O pH foi medido em potenciômetro (TECNAL, modelo Tec-2) e a acidez total por titulometria com NaOH 0,1M sendo os resultados expressos em porcentagem de ácido cítrico. Os sólidos solúveis totais foram medidos em refratômetro digital (QUIMIS, modelo 07678).

Os açúcares totais foram quantificados pela metodologia de Somogyi (1945) e Nelson (1944), com prévia hidrólise ácida da amostra, utilizando-se espectrofotômetro UV-VIS (SHIMADZU, modelo UV-1700). Os valores foram expressos em porcentagem de glicose.

A determinação de ácido ascórbico foi realizada segundo Ranganna (1986) que se baseia na redução do ácido ascórbico pelo 2,6 diclorofenolindofenol.

As amostras de polpa dos quatro genótipos, juntamente com tampão fosfato a 0,1 M , pH 6,0 , foram homogeneizadas em miniprocessador e, em seguida, centrifugadas a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado como fonte de polifenoloxidase e de peroxidase solúvel no citoplasma celular (KHAN; ROBINSON, 1994). Para obtenção da peroxidase insolúvel, ligada covalentemente e ionicamente à parede celular, utilizou-se a metodologia descrita por Holschuh (2000) que utiliza tampão fostato 0,2 M pH 8,0 além de EDTA, CaCl₂ e PEG nas concentrações finais de 0,01 M, 0,2 M e 2 %, respectivamente.

A atividade da polifenoloxidase foi determinada usando-se catecol como substrato, conforme descrito por Oktay et al. (1995). Já as atividades das peroxidases solúvel e insolúvel foram determinadas usando-se guaiacol e peróxido de hidrogênio como substratos, conforme descrito por Khan e Robinson (1994). Para todas as análises enzimáticas, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causou um aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto/g de amostra.

Delineamento Estatístico

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva de cada uma das variáveis: peroxidase solúvel, peroxidase insolúvel, polifenoloxidase, ácido ascórbico, ácido cítrico, açúcares totais,

pH, sólidos solúveis totais .

O delineamento experimental utilizado, inicialmente, para todas as variáveis, foi um fatorial 4x12 com três replicações verdadeiras. Apenas a variável “sólidos solúveis totais” satisfaz as pressuposições de normalidade e homocedasticidade. Para as outras variáveis foi utilizado teste de Kruskal-Wallis como alternativa para a análise de variância. As comparações múltiplas, quando necessárias, foram realizadas através do teste de Tukey. Todos os testes foram realizados usando nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

A Instrução Normativa N^o 1 de 07 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda os seguintes padrões mínimos de qualidade para as polpas de cupuaçu: ácido ascórbico (18,00 mg/100 g), pH (2,60), acidez expressa em ácido cítrico (1,50 g/100 g), açúcares totais (6,00 g/100 g) e sólidos solúveis em °Brix (9,00) (BRASIL, 2000) .Os dados referentes à composição físico-química das polpas dos genótipos B 28-7, D 28-10, P 3-10 e P 9-8 encontram-se nas tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1. Efeito do tempo de congelamento na composição físico-química da polpa de cupuaçu-Genótipo B 28-7

Tempo	Açúcar total (g/100g)**	Ácido ascórbico (mg/100g)**	Acidez em ácido cítrico (g/100g)**	pH**	Sólidos solúveis (°Brix) *
0	7,45±0,02 ^f	27,50±0,00 ^a	1,51±0,00 ^a	3,37±0,01 ^a	13,40±0,00 ^a
1	7,45±0,02 ^f	27,50±0,00 ^a	1,51±0,00 ^a	3,37±0,01 ^a	13,40±0,00 ^a
2	7,95±0,03 ^e	27,49±0,01 ^b	1,51±0,01 ^{ab}	3,36±0,00 ^b	13,13±0,11 ^b
3	7,95±0,03 ^e	27,49±0,01 ^b	1,51±0,01 ^{ab}	3,36±0,00 ^b	13,13±0,11 ^b
4	8,75±0,03 ^d	27,46±0,01 ^c	1,50±0,00 ^{bc}	3,36±0,01 ^b	13,00±0,00 ^b
5	8,75±0,03 ^d	27,46±0,01 ^c	1,50±0,00 ^{bc}	3,36±0,01 ^b	13,00±0,00 ^b
6	8,93±0,02 ^c	27,42±0,00 ^d	1,50±0,01 ^{cd}	3,31±0,01 ^c	12,47±0,06 ^b
7	8,93±0,02 ^c	27,42±0,00 ^d	1,50±0,01 ^{cd}	3,31±0,01 ^c	12,47±0,06 ^b
8	8,97±0,02 ^b	27,41±0,01 ^e	1,49±0,01 ^{de}	3,28±0,01 ^d	12,40±0,10 ^b
9	8,97±0,02 ^b	27,41±0,01 ^e	1,49±0,01 ^{de}	3,28±0,01 ^d	12,40±0,10 ^b
10	9,13±0,15 ^a	27,38±0,01 ^f	1,49±0,00 ^e	3,26±0,01 ^e	12,33±0,15 ^b
11	9,13±0,15 ^a	27,38±0,01 ^f	1,49±0,00 ^e	3,26±0,01 ^e	12,33±0,15 ^b
12	9,30±0,03 ^a	27,37±0,01 ^f	1,49±0,00 ^e	3,20±0,01 ^e	12,43±0,06 ^b
p-valor	0,000230675	0,000221121	0,001696295	0,000298237	< 0,00001

Dados expressos como média de triplicata ± desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si (p > 0,05). Testes submetidos ao Teste de Tukey *. Testes submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis **.

Fonte: Elaboração dos autores

Tabela 2. Efeito do tempo de congelamento na composição físico-química da polpa de cupuaçu-Genótipo D 28-10

Tempo	Açúcar total (g/100g)**	Ácido ascórbico (mg/100g)**	Acidez em ácido cítrico (g/100g) **	pH**	Sólidos solúveis (°Brix) *
0	10,75±0,10 ^{abc}	19,73±0,06 ^a	1,94±0,01 ^a	4,00±0,01 ^a	16,62±0,01 ^a
1	10,75±0,10 ^{abc}	19,73±0,06 ^a	1,94±0,01 ^a	4,00±0,01 ^a	16,62±0,01 ^a
2	7,76±5,17 ^e	19,60±0,26 ^a	1,94±0,00 ^{ab}	3,99±0,00 ^a	16,61±0,01 ^a
3	7,76±5,17 ^e	19,60±0,26 ^a	1,94±0,00 ^{ab}	3,99±0,00 ^a	16,61±0,01 ^a
4	10,76±0,00 ^d	19,00±0,00 ^b	1,94±0,01 ^{abc}	3,97±0,00 ^b	16,27±0,11 ^b
5	10,76±0,00 ^d	19,00±0,00 ^b	1,94±0,01 ^{abc}	3,97±0,00 ^b	16,27±0,11 ^b
6	10,73±0,06 ^c	19,00±0,00 ^b	1,93±0,01 ^{bcd}	3,94±0,01 ^c	15,73±0,11 ^b
7	10,73±0,06 ^c	19,00±0,00 ^b	1,93±0,01 ^{bcd}	3,94±0,01 ^c	15,73±0,11 ^b
8	10,78±0,01 ^b	18,93±0,06 ^{bc}	1,93±0,00 ^{cd}	3,91±0,01 ^d	15,50±0,00 ^b
9	10,78±0,01 ^b	18,93±0,06 ^{bc}	1,93±0,00 ^{cd}	3,91±0,01 ^d	15,50±0,00 ^b
10	10,78±0,00 ^a	18,90±0,10 ^c	1,93±0,01 ^d	3,89±0,01 ^d	15,37±0,11 ^b
11	10,78±0,00 ^a	18,90±0,10 ^c	1,93±0,01 ^d	3,89±0,01 ^d	15,37±0,11 ^b
12	10,80±0,02 ^a	18,80±0,10 ^c	1,92±0,01 ^{cd}	3,96±0,01 ^e	15,18±0,15 ^b
p-valor	0,02700834	0,001004204	0,01577069	0,0002431	< 0,00001

Dados expressos como média de triplicata ± desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si (p > 0,05). Testes submetidos ao Teste de Tukey *. Testes submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis **.

Fonte: Elaboração dos autores

Tabela 3. Efeito do tempo de congelamento na composição físico – química da polpa de cupuaçu – Genótipo P 3. 10

Tempo	Açúcar total (g/100g)**	Ácido ascórbico (mg/100g)**	Acidez em ácido cítrico (g/100g) **	pH**	Sólidos solúveis (°Brix) *
0	12,76±0,01 ^d	28,07±0,06 ^a	0,76±0,01 ^a	3,62±0,00 ^a	15,00±0,00 ^a
1	12,76±0,01 ^d	28,07±0,06 ^a	0,76±0,01 ^a	3,62±0,00 ^a	15,00±0,00 ^a
2	12,77±0,01 ^d	28,03±0,06 ^{ab}	0,75±0,00 ^b	3,62±0,01 ^a	14,90±0,00 ^a
3	12,77±0,01 ^d	28,03±0,06 ^{ab}	0,75±0,00 ^b	3,62±0,01 ^a	14,90±0,00 ^a
4	12,84±0,02 ^c	28,00±0,00 ^b	0,74±0,01 ^c	3,62±0,01 ^a	14,90±0,01 ^a
5	12,84±0,02 ^c	28,00±0,00 ^b	0,74±0,01 ^c	3,62±0,01 ^a	14,90±0,0 ^a 1
6	12,84±0,02 ^c	27,98±0,01 ^c	0,60±0,00 ^d	3,61±0,01 ^b	14,88±0,02 ^a
7	12,84±0,02 ^c	27,98±0,01 ^c	0,60±0,00 ^d	3,61±0,01 ^b	14,88±0,02 ^a
8	13,00±0,00 ^b	27,96±0,01 ^c	0,60±0,00 ^d	3,59±0,01 ^c	14,71±0,01 ^b
9	13,00±0,00 ^b	27,96±0,01 ^c	0,60±0,00 ^d	3,59±0,01 ^c	14,71±0,01 ^b
10	13,11±0,01 ^a	27,78±0,00 ^d	0,60±0,01 ^d	3,58±0,00 ^c	14,51±0,01 ^b
11	13,11±0,01 ^a	27,78±0,00 ^d	0,60±0,01 ^d	3,58±0,00 ^c	14,51±0,01 ^b
12	13,12±0,01 ^a	27,78±0,01 ^d	0,59±0,00 ^e	3,58±0,00 ^c	14,13±0,01 ^b
p-valor	0,000331806	0,00035149	0,0002617	0,000488424	< 0,00001

Dados expressos como média de triplicata ± desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si (p > 0,05). Testes submetidos ao Teste de Tukey *. Testes submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis **.

Fonte: Elaboração dos autores

Tabela 4. Efeito do tempo de congelamento na composição físico-química da polpa de cupuaçu-Genótipo P 9-8

Tempo	Açúcar total (g/100g)**	Ácido ascórbico (mg/100g)**	Acidez em ácido cítrico (g/100g)**	pH**	Sólidos solúveis (°Brix) *
0	8,12±0,02 ^g	24,39±0,01 ^a	1,47±0,00 ^a	3,77±0,01 ^a	12,00±0,00 ^a
1	8,12±0,02 ^g	24,39±0,01 ^a	1,47±0,00 ^a	3,77±0,01 ^a	12,00±0,00 ^a
2	8,16±0,01 ^f	24,38±0,01 ^{ab}	1,47±0,01 ^a	3,75±0,00 ^b	12,00±0,00 ^a
3	8,16±0,01 ^f	24,38±0,01 ^{ab}	1,47±0,01 ^a	3,75±0,00 ^b	12,00±0,00 ^a
4	8,29±0,01 ^e	24,37±0,00 ^{bc}	1,46±0,01 ^a	3,75±0,01 ^b	11,00±0,00 ^b
5	8,29±0,01 ^e	24,37±0,00 ^{bc}	1,46±0,01 ^a	3,75±0,01 ^b	11,00±0,00 ^b
6	8,39±0,01 ^d	24,36±0,01 ^{cd}	1,46±0,00 ^a	3,74±0,00 ^c	10,87±0,11 ^b
7	8,39±0,01 ^d	24,36±0,01 ^{cd}	1,46±0,00 ^a	3,74±0,00 ^c	10,87±0,11 ^b
8	8,46±0,01 ^c	24,35±0,01 ^d	1,46±0,01 ^a	3,72±0,01 ^d	10,77±0,06 ^b
9	8,46±0,01 ^c	24,35±0,01 ^d	1,46±0,01 ^a	3,72±0,01 ^d	10,77±0,06 ^b
10	8,57±0,01 ^b	24,35±0,01 ^d	1,46±0,00 ^a	3,71±0,01 ^d	10,43±0,06 ^b
11	8,57±0,01 ^b	24,35±0,01 ^d	1,46±0,00 ^a	3,71±0,01 ^d	10,43±0,06 ^b
12	8,63±0,02 ^a	24,36±0,30 ^{cd}	1,46±0,01 ^a	3,70±0,01 ^d	10,40±0,00 ^b
P-valor	0,000199311	0,00159547	0,2190273	0,000376684	< 0,00001

Dados expressos como média de triplicata ± desvio-padrão. Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Testes submetidos ao Teste de Tukey *. Testes submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis **.

Fonte: Elaboração dos autores

Na análise do conteúdo de vitamina C dos genótipos, durante o período de 12 meses de congelamento, a amostra P 3-10 foi a que apresentou maior teor de ácido ascórbico para a polpa *in natura* (28,06 mg / 100 g), no tempo zero, e após um ano de congelamento (27,77 mg / 100 g). Esses valores estão de acordo com as recomendações do MAPA e são superiores ao resultado de 5,05 mg/100 g de ácido ascórbico encontrado por Santos et al. (2010) para a polpa de cupuaçu. A análise estatística das médias dos resultados apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 demonstrou que o conteúdo de vitamina C dos genótipos D 28-10 e P 3-10 diminuiu, a partir do 4º e 10º mês de congelamento, respectivamente. Parâmetros físico-químicos, como os teores de vitamina C, são afetados não somente pelas características genéticas das plantas, mas, também, por outros fatores como temperatura, precipitações fluviais e tipo de adubação (NOGUEIRA et al., 2002). O congelamento não afetou o conteúdo de vitamina C das amostras B 28-7 e P 9-8, corroborando com os resultados obtidos por Aquino, Moés e Castro (2011) que também não constataram a influência do congelamento em frutos de acerola congelados por diferentes métodos criogênicos.

Quanto ao pH das polpas *in natura* dos quatro genótipos, verificou-se que os valores médios variaram de 3,37 a 4,00. Esses valores foram similares aos reportados por Porte et al. (2010) e Costa (2002) que encontraram pH de 3,60 e 3,34, respectivamente. Todas as polpas avaliadas estavam de acordo com a legislação vigente que estipula um valor mínimo de pH 2,6 para polpas de cupuaçu (BRASIL,

2000). A análise estatística detectou que o pH de todos os genótipos diminuiu, durante os 12 meses de congelamento.

Em relação à acidez em ácido cítrico, as polpas *in natura* dos genótipos B 28-7 e D 28-10 apresentaram, respectivamente, valores de 1,51 e 1,94 g/100 g, estando, portanto, dentro dos padrões de qualidade exigidos pelo MAPA que estipula um teor mínimo de 1,5 g/100 g e similares aos valores de 2,17 g/100 g e 2,70 g/100 g observados, respectivamente, por Oliveira (2006) e Araújo (2007). Após um ano de congelamento essas amostras não diferiram estatisticamente. Observou-se um teor de acidez 1,47 g/100 g para a amostra *in natura* do genótipo P 9-8 que permaneceu estável durante o seu armazenamento a temperatura de -30 °C, porém a polpa *in natura* do genótipo P 3-10 apresentou uma acidez de 0,76 g/100 g e, após 12 meses de congelamento, houve uma redução para 0,59 g/100 g. Freire et al. (2009) analisaram polpas de cupuaçu com uma semana de congelamento e constataram uma acidez expressa em ácido cítrico entre 1,38 e 1,87 g/100 g. Esses teores foram inferiores ao das polpas de três genótipos de cupuaçu com um ano de congelamento que variaram de 1,49 a 1,92 g/100 g, com exceção do genótipo P 3-10 que apresentou uma acidez de 0,59 g/100 g.

Alterações no teor de acidez total e pH ocorrem devido a mudanças nos conteúdos de ácidos orgânicos nos produtos (MULYAWANTI; DEWANDARI; YULIANINGSIH, 2010). De acordo com Sahari, Mohsen e Zohreh (2004) essas modificações podem ser influenciadas pelo tempo de armazenamento, reações enzimáticas, método de congelamento e pela presença de microrganismos.

A análise estatística detectou um aumento em função do tempo de congelamento na concentração de açúcares das polpas dos genótipos B 28-7, P 3-10 e P 9-8, com exceção do D 28-10 que permaneceu estável. A polpa *in natura* do genótipo P 3-10 apresentou a maior concentração de açúcares totais (12,76 g/ 100 g). Oliveira (2006) e Araújo (2007) detectaram, respectivamente, teores de 9,12 g/ 100 g e 8,60 g/100 g de açúcares totais em polpas de cupuaçu, valores inferiores aos encontrados neste estudo. A elevação nas concentrações de açúcares totais também foi observada por Evangelista e Vieites (2006), em polpas de goiaba congeladas e armazenadas a -18 °C. Lopes, Mattietto e Menezes (2005) verificaram discreta elevação dos teores de açúcares totais ao avaliar a estabilidade da polpa de pitanga submetida ao congelamento e armazenada por 90 dias. Silva et al. (2010), ao estudarem a estabilidade da polpa de bacuri, verificaram diferenças nos teores de açúcares totais nas amostras analisadas. Os açúcares totais variaram de 10,11 a 13,65 % nas polpas de bacuri armazenadas a -20 °C, durante doze meses. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), a hidrólise do amido, a degradação de polissacarídeos das paredes celulares e a perda de água pelos frutos podem contribuir para o aumento nos conteúdos de açúcares durante o período de armazenamento.

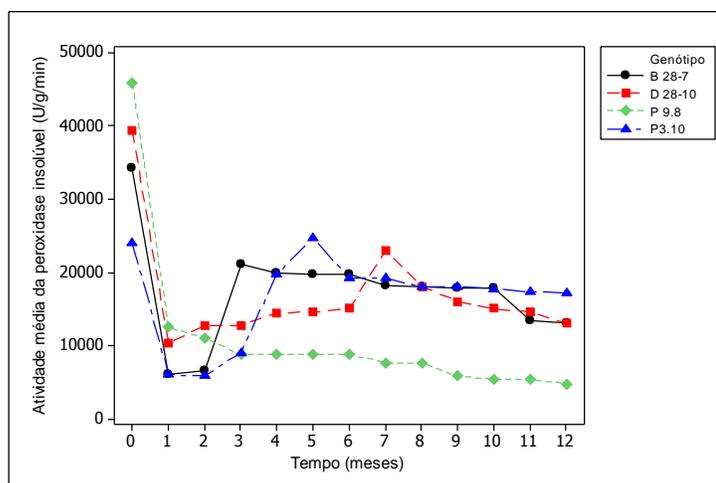
O maior valor de sólidos solúveis totais foi encontrado na polpa *in natura* do genótipo D 28-10 (16,62 %) e o menor na amostra P 9-8 (12,00 %), estando de acordo com a legislação vigente. No decorrer

do período de um ano de armazenamento das polpas congeladas dos quatro genótipos de cupuaçu, houve uma redução no conteúdo de sólidos solúveis totais. Brunini, Oliveira e Varanda (2003) também verificaram uma diminuição nos teores de sólidos solúveis totais ao avaliar a qualidade de polpa de goiaba “paluma” armazenada a -20 °C, durante 24 semanas. Segundo Faraoni (2006) o decréscimo dos teores de sólidos solúveis totais pode ocorrer devido à formação de grandes cristais de gelo decorrente do congelamento lento. Yamashita et al. (2003) observaram diminuição dos teores de sólidos solúveis ao avaliar produtos obtidos a partir da acerola e atribuiu esse decréscimo à atividade enzimática, mesmo estando os produtos em temperaturas de congelamento.

De acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis houve diferença entre os genótipos para as atividades enzimáticas das peroxidase solúvel, insolúvel e da polifenoloxidase.

Nas análises realizadas com a polpa *in natura*, (t₀), o genótipo que apresentou maior atividade enzimática de peroxidase insolúvel foi a P 9-8 com 45.833,33 U/g/min, seguido do D 28-10 (39.333,33 U/g/min), B 28-7 (34.166,66 U/g/min) e P 3-10 (24.000 U/g/min), conforme figura 1. Porém, após um mês de congelamento houve acentuado declínio da atividade enzimática em todos os genótipos. Nos meses seguintes houve oscilações de atividade enzimática das amostras B 28-7, D 28-10 e P 3-10 ao contrário do genótipo P 9-8 que apresentou tendência decréscimo de atividade. Berbicz e Clemente (2001) determinaram a peroxidase insolúvel extraída da polpa de laranja e constataram valores de até 11,45 U/g/min. Neves (2002) relatou atividade enzimática de 10.000 U/g/min para a peroxidase insolúvel extraída da polpa de pêsego. Freitas et al. (2008) observaram valores de 2,97 e 2,83U/g/min de atividade de peroxidase insolúvel para uvas das variedades Benitaka e Rubi, respectivamente.

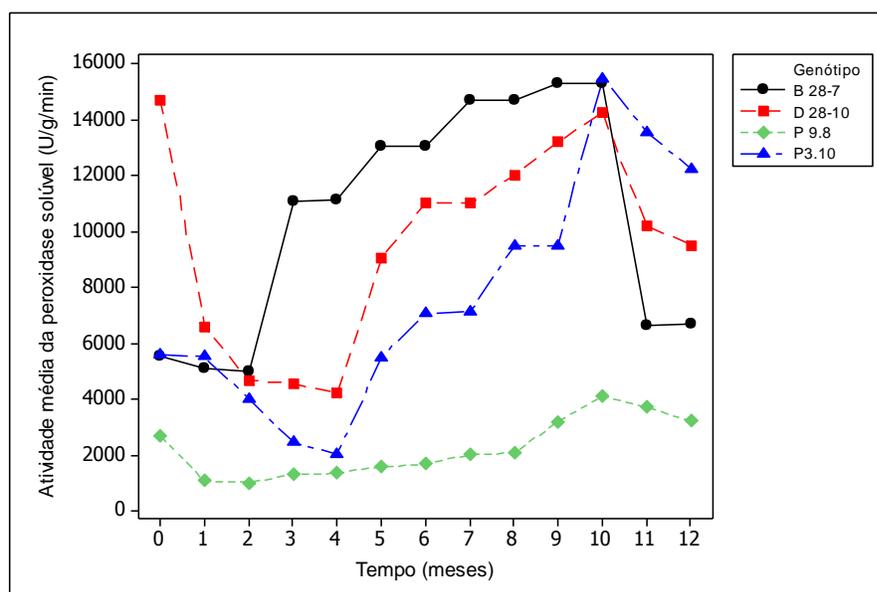
Figura 1. Atividade da peroxidase insolúvel nos genótipos de cupuaçu armazenados sob congelamento



Fonte: Elaboração dos autores

Em relação à peroxidase solúvel, o genótipo D 28-10 foi o que apresentou maior atividade (14.722,22 U/g/min), conforme demonstra a figura 2. Foi observado um declínio na atividade enzimática das peroxidases solúvel e insolúvel dos quatro genótipos de cupuaçu, após um mês de congelamento. Houve oscilações na atividade dessas enzimas nos meses seguintes, sendo que no décimo mês de armazenamento todas as amostras apresentaram picos na atividade da peroxidase solúvel. O genótipo P 9-8 foi o que apresentou menor atividade de peroxidase solúvel (1.000 U/g/min), o que foi observado após um mês do congelamento inicial. Ferreira (2009) ao analisar a atividade da peroxidase solúvel de polpas de cupuaçu congeladas, procedentes do estado de Roraima e município de Itacoatiara – AM, constatou que a atividade inicial foi de 16.780 U/g/min e 18.067 U/g/min, respectivamente, com uma redução de 52% e 55%, após dois meses de armazenamento sob congelamento, com oscilações durante os doze meses de estocagem. Nunes et al. (2010) observaram aumento da atividade enzimática da peroxidase ao analisar o efeito de diferentes temperaturas na qualidade da mandiocinha minimamente processada e armazenada a 0 °C durante 15 dias. Segundo Cano, Marin e Fúster (1990) a solubilidade da peroxidase pode ser afetada pela perda da integridade da membrana celular como resultado do crescimento dos cristais de gelo no tecido promovendo o incremento da atividade residual dessa enzima.

Figura 2. Atividade da peroxidase solúvel nos genótipos de cupuaçu armazenados sob congelamento

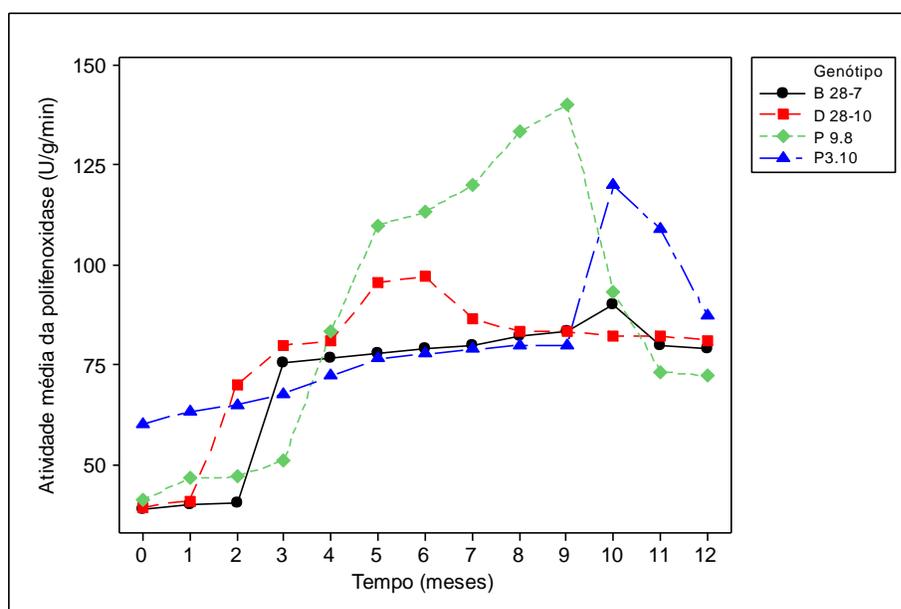


Fonte: Elaboração dos autores

Em relação à polifenoloxidase, observou-se elevação da atividade em todos os genótipos, tendo a amostra P 9-8 apresentado maior atividade (140 U/g/min) com 9 meses de congelamento e a B 28-7

menor atividade (40 U/g/min) com um mês, conforme demonstra a figura 3. Ferreira (2009) determinou a atividade da polifenoloxidase em polpas de cupuaçu congeladas, procedentes do estado de Roraima e município de Itacoatiara- AM tendo constatado que após 4 meses de estocagem em temperaturas de -25 a -35 °C, houve elevação da atividade da polifenoloxidase em 50 % e 31 %, respectivamente, corroborando com os resultados de Lobo e Cano (1998) que verificaram incremento na atividade da polifenoloxidase de mamões congelados e armazenados em temperatura de -24 °C ao final de três meses. Segundo Pinheiro et al. (2009) a polifenoloxidase pode ser influenciada por fatores como tempo e temperatura de armazenamento, tendo encontrado valores de 328,37 e 369,54 U/g/min para a atividade de polifenoloxidase de abacates, armazenados a 0 °C e 10 °C, respectivamente. Relatou, ainda, que a polifenoloxidase apresentou comportamento oscilante durante os seis dias de armazenamento.

Figura 3. Atividade da polifenoloxidase nos genótipos de cupuaçu armazenados sob congelamento



Fonte: Elaboração dos autores

Conclusões

O armazenamento a -30 °C, durante um ano, das polpas dos quatro genótipos de cupuaçu não inibiu a atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidases. A polifenoloxidase apresentou aumento na sua atividade em função do tempo de estocagem sob congelamento com picos no sexto, nono e décimo mês e as peroxidases solúvel e insolúvel apresentaram oscilações na atividade enzimática nesse período.

Os resultados das análises físico-químicas das polpas dos quatro genótipos de cupuaçu apresentaram variações durante os doze meses de armazenamento sob congelamento, porém dentro dos

padrões exigidos pela legislação vigente, com exceção do genótipo P 3-10 que apresentou acidez inferior.

Referências

AQUINO, A. C. M. S.; MOÉS, R. S.; CASTRO, A. A. Estabilidade de ácido ascórbico, carotenoides e antocianinas de frutos de acerola congelados por métodos criogênicos. *Brazilian Journal Food and Technology*, Campinas, v. 14, n. 2, p. 154-163, 2011.

ARAÚJO, L. M. *Produção de alimentos funcionais formulados com xilitol a partir de cupuaçu (Theobroma grandiflorum) e maracujá (Passiflora edulis f. flavicarpa)*. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

BERBICZ, F.; CLEMENTE, E. Avaliação da termoestabilidade e da regeneração da atividade da peroxidase extraída de laranja (*Citrus spp.*). *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1239-1242, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 01, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 10 de janeiro de 2000.

BRUNINI, M. A.; OLIVEIRA, A. L.; VARANDA, D. B. Avaliação da qualidade de polpa de goiaba “paluma” armazenada a -20°C. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 25, n. 3, p. 394-396, 2003.

CANO, P.; MARIN, M. A.; FÚSTER, C. Freezing of banana slices. Influence of maturity level and thermal treatment prior to freezing. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 55, n. 4, p. 1070-1072, 1990.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Lavras: UFLA, 2005.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.

COSTA, M. C. *Conservação da polpa de cupuaçu (Theobroma grandiflorum) por métodos combinados com emprego da tecnologia de obstáculos*. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em abacate da variedade Hass, submetidos ao tratamento térmico. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, México, v. 9, n. 2, p.106-112, 2008.

EVANGELISTA, R. M.; VIEITES, R. L. Avaliação da qualidade de polpa de goiaba congelada, comercializada na cidade de São Paulo. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, v. 13, n. 2, p. 76-81, 2006.

FARAONI, A. S. *Efeito do tratamento térmico, do congelamento e da embalagem sobre o armazenamento da polpa de manga orgânica (Mangifera indica L.) cv "ubá"*. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERREIRA, C. Q. *Efeito do congelamento e da estocagem na atividade enzimática da polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) e na composição físico-química de polpa congelada de cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum)*. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

FREIRE, M. T. A.; PETRUS, R. R.; FREIRE, C. M. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; FELIPE, A. M. P. F.; GATTI, J. B. Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de polpa de cupuaçu congelada (*Theobroma grandiflorum* Schum). *Brazilian Journal Food Technology*, Campinas, v. 12, n. 1, p. 9-16, 2009.

FREITAS, A. A.; FRANCELIN, M. F.; HIRATA, G. F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F. L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geleias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 1, p. 172-177, 2008.

HOLSCHUH, H. J. *Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (Averrhoa carambola, L.)*. 2000. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. Versão eletrônica. 1. ed. digital, São Paulo, 2008.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidase. *Food Chemistry*, London, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

LOBO, M. G.; CANO, M. P. Preservation of hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica papaya* L., Cv Sunrise, Solo group) by freezing: physical, physicochemical and sensorial aspects. *ZLebensm Unters Forsch A*, Berlim, v. 206, n. 5, p. 343-349, 1998.

LOPES, A. S.; MATTIETTO, R. A.; MENEZES, H. C. Estabilidade da polpa de pitanga sob congelamento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 3, p. 553-559, 2005.

MANTOVANI, C.; CLEMENTE, E. Peroxidase and polyphenoloxidase activity in tomato *in natura* and tomato purée. *Acta Scientiarum: Technology*, v. 32, n. 1, p. 91-97, 2010.

MARTINS, V. B. *Perfil sensorial de suco tropical de cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum) com valor calórico reduzido*. 2008. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- MULYAWANTI, I.; DEWANDARI, K. T.; YULIANINGSIH. Effects of freezing and storage periods on characteristics of frozen sliced *Arumanis mango*. *Indonesian Journal of Agriculture*, Indonesia, v. 3, n. 1, p. 32-38, 2010.
- NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, Maryland, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NEVES, V. A. Ionically bound peroxidase from peach fruit. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 45, n. 1, p. 7-16, 2002.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; SILVA JUNIOR, J. F. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.
- NUNES, E. E.; VILAS BOAS, E. V.; PICCOLI, R. H.; XISTO, A. L. R. P.; VILAS BOAS, B. M. Efeito de diferentes temperaturas na qualidade de mandioquinha-salsa minimamente processada. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 3, p. 311-315, 2010.
- OKTAY, M.; KUFREVIDGLU, I.; KOCACALISKAN, L.; SAKIROGLU, H. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 60, n. 3, p. 494-496, 1995.
- OLIVEIRA, L. P. *Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos encontrados na Amazônia para elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada*. 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- PINHEIRO, A. C. M.; VILAS BOAS, E. V. B.; SILVA, L. C.; ALVES, A. P.; SELVA, M.; CHITARRA, A. B. Quality of fresh-cut avocado (*Persea Americana* Mill.) stored under different temperatures. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1095-1102, 2009.
- PORTE, A.; REZENDE, C. M.; ANTUNES, O. A. C.; MAIA, L. H. Redução de aminoácidos em polpas de bacuri (*Platonia insignis* Mart), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Wild ex-Spreng Schum) e murici (*Byrsonima crassifolia* L.) processado (aquecido e alcalinizado). *Acta Amazônica*, Manaus, v. 40, n. 3, p. 573-578, 2010.
- RANGANNA, S. *Analysis and quality control for fruit and vegetable products*. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1986.
- SAHARI, M. A.; MOHSEN, B. F.; ZOHREH, H. E. Effect of low temperature on the ascorbic acid content and quality characteristics of frozen strawberry. *Journal of Food Chemistry*, Philadelphia, v. 86, n. 3, p. 357-363, 2004.
- SANTOS, G. M.; MAIA, G.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; COSTA, J. M. C.; FONSECA, A. V. V. Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1636-1642, 2010.
- SILVA, V. K. L.; FIGUEIREDO, R. W.; BRITO, E. S.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, E. A. T. Estabilidade da polpa do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) congelada por 12 meses. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1293-1300, 2010.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, Maryland, v. 160, p. 61-68, 1945.

YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T.; TONZAR, A. C.; MORIYA, S.; FERNANDES, J. G. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 1, p. 92-94, 2003.