

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Química de Araraquara

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ÂNGELA PINHEIRO MARTINS

Contribuição ao estudo bioquímico de polpa de híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo (Passiflora edulis f. flavicarpa Degener): enzimas e compostos bioativos

Araraquara

2013

ÂNGELA PINHEIRO MARTINS

*Contribuição ao estudo bioquímico de polpa de híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo (Passiflora edulis f. flavicarpa Degener):
enzimas e compostos bioativos*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Adj. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira

Coorientadora: Dr. Kátia Maria da Silva Cerqueira Leite

Araraquara

2013

ÂNGELA PINHEIRO MARTINS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 11 de março de 2013.

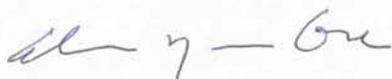
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Giuseppina Pace Pereira Lima
Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu



Profª Drª Glaucia Maria Pastore
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas

INFORMAÇÕES CURRICULARES

Ângela Pinheiro Martins

Dados Pessoais

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo

Nascimento: 23/09/1980

Filiação: Antonio de Sousa Martins e Maria José Pinheiro Martins

Endereço Pessoal: Avenida Alberto Toloi, 185 – Jardim Quitandinha, CEP: 14800-105 – Araraquara – SP

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP; Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Jardim Quitandinha, CEP: 14800-900 – Araraquara – SP

Endereço eletrônico: martinsap@gmail.com

Formação Acadêmica

Bacharel em Química, curso concluído em 10 de dezembro de 2005, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara/SP.

Técnica em Nutrição e Dietética, curso concluído em julho de 2008, na ETEC Camargo Aranha, São Paulo/SP.

Mestrado (em andamento) em Biotecnologia no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara/SP.

Orientadora: Prof. Adj. Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira

Coorientadora: Dr. Kátia Maria da Silva Cerqueira Leite

Bolsista CAPES

Atividades de Pesquisa

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

MARTINS, A. P.; PEREIRA, M. J. V.; BAETA, D. S.; TADIOTTI, A. C.; LEITE, K. M. S. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Correlação da enzima peroxidase com o conteúdo de compostos fenólicos em híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 10, 2012, Blumenau – SC.

MARTINS, A. P.; PEREIRA, M. J. V.; BAETA, D. S.; TADIOTTI, A. C.; LEITE, K. M. S. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Atividade enzimática da polifenoloxidase e potencial antioxidante em polpa de híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 10, 2012, Blumenau – SC.

BAETA, D. S., MARTINS, A. P.; PEREIRA, M. J. V.; TADIOTTI, A. C.; LEITE, K. M. S. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Atividade antioxidante, vitamina c e cinética da ascorbato oxidase em polpa de híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 9, 2012, João Pessoa – PB.

MARTINS, A. P.; PEREIRA, M. J. V.; BAETA, D. S.; TADIOTTI, A. C.; LEITE, K. M. S. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Enzyme study of pectinmetylesterase, peroxidase and polyphenoloxidase of hybrid cultivars pulp on sour yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). In: WORD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 16, 2012, Foz do Iguaçu - PR.

MARTINS, A. P.; PEREIRA, M. J. V.; BAETA, D. S.; TADIOTTI, A. C.; LEITE, K. M. S. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Análise bioquímica de híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener), com vistas ao processamento industrial: vitamina C, proteína e compostos fenólicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 23, 2012, Campinas - SP.

Participações em Reuniões Científicas

XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, ocorrido no período de 01 a 04 de maio de 2012, no Centro de Convenções da Unicamp, na cidade de Campinas – SP;

X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), que ocorrerá no período de 07 a 10 de outubro de 2012, no Grande Hotel Blumenau, na cidade de Blumenau – SC.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

“Eu não procuro saber as respostas, procuro compreender as perguntas”.

Confúcio

*Aos meus pais Antonio (in memoriam) e
Maria José (in memoriam) e as minhas irmãs
Denise, Ana Lucia e Marisa, dedico.*

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, por estar sempre comigo me dando forças, amparo nas horas difíceis e sendo meu guia em todos os momentos.

Aos meus amados pais, Antonio (in memorian) e Maria José (in memorian) que mesmo não estando mais presente fisicamente em minha vida sei que guiam meus passos e me dão forças sempre que preciso! Muitas saudades...

*Às minhas irmãs Denise, Ana Lucia e Marisa que sempre me apoiam e me dão suporte em todos os momentos. Muito obrigada por sempre acreditarem em mim!
Amo vocês!*

*À minha estimada orientadora Prof^a. Dr^a. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira, pela orientação, amizade e valiosos ensinamentos transmitidos nos últimos anos.
Muito obrigado pela confiança!*

Meus agradecimentos à Dr^a Kátia Maria da Silva Cerqueira Leite pela coorientação, por ter me acolhido com carinho e paciência, pela amizade e convivência diária.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Enzimologia: Mauro, Danilo, Juliana, Kamila, Bruna, Maisa e em especial as amigas/irmãs Vanessa e Daniele pelo convívio e apoio na alegria e na tristeza, na saúde e na doença e em todos os momentos! Adoro vocês!!!

Aos colegas do laboratório da Farmácia: Prof. Iguatemy, Renata, Vânia, Carlos e Vivian pela convivência e apoio.

Às amigas Susi, Ana Flávia e Mariana (Zica) por me acolher e me deixar fazer parte de suas vidas... Pelo companheirismo... Pelas risadas... Pela compreensão... Pela amizade verdadeira!

Aos amigos Andréa, Aline, Vitor, Thiago, Thayz e Carol Boni, Marcelo (Sauna), Victor (Cupim) pelo companheirismo e amizade sincera que espero ter pra sempre!

A todos os amigos que de forma direta ou indireta contribuíram com amizade, companhia (presencial e virtual) e palavras de incentivo!

Aos amigos de outras cidades: Keity, Rosana Alencar, Josi, Gilmara, Concheta, Rosana Rocha e outros tantos que mesmo de longe sempre me apoiaram!

Aos amigos musicais André Ribeiro, Daniel Cestari e tantos outros que em várias ocasiões proporcionaram momentos de diversão e até refúgio...

Ao Instituto de Química de Araraquara que me acolhe desde a graduação e que considero como minha terceira casa!

Aos funcionários do Instituto de Química, da Biblioteca e da Pós-graduação pela dedicação, competência e por serem sempre prestativos.

Ao técnico do laboratório Waldenir, pelo apoio e amizade e a todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química.

À todos os professores e pós-graduandos do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Ao Engenheiro Agrônomo José Rafael da Silva responsável pelo Viveiros Flora Brasil fornecedora das amostras.

À Indústria e Comércio de Conservas Alimentícias Predilecta LTDA, e ao Diretor Sr. Antônio Carlos Tadiotti pelo convênio e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

RESUMO

O maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) pode ser consumido *in natura* ou industrializado. Sua importância é dada pelo valor medicinal, popularmente usado no tratamento da ansiedade, insônia e irritabilidade; alimentício, na forma de polpa congelada e suco, doces, geleia e sorvete; e nutracêutico ou alimento funcional, apresentando elevados teores de íons fosfato e potássio, vitamina A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e C (ácido ascórbico). Algumas alterações podem ocorrer durante o processamento e armazenamento do suco interferindo na cor e sabor do produto final, o que pode implicar em não aceitação por parte dos consumidores. Isso pode ocorrer principalmente devido a reações bioquímicas de escurecimento e alterações bioquímicas moleculares que resultam em *flavors* indesejáveis e perda de nutrientes. Por esse motivo o controle desses efeitos indesejáveis durante o processamento de frutos é muito importante para a preservação da aparência natural dos mesmos. Deste modo as enzimas Pectinametilesterase (PME; EC: 3.1.1.11), Peroxidase (POD; EC: 1.11.1.7), Polifenoloxidase (PPO; EC: 1.10.3.1) e Ascorbato Oxidase (AO; EC: 1.10.3.3) podem ser responsáveis pelo escurecimento enzimático e outras reações que alteram o produto durante e ao final do processamento. Visto isso, com o objetivo de agregar valores nutricionais e mercadológicos ao maracujá vem sendo desenvolvida e usada a cultura híbrida, que, em síntese, significa o uso de sementes modificadas e com manejo adequado, com vistas à racionalização do uso de defensivos agrícolas e aumento de produtividade. O objetivo desse trabalho é estudar o comportamento cinético das enzimas já citadas e avaliar os teores de compostos bioativos como vitamina C, compostos fenólicos, flavonóides, e atividade antioxidante em cinco híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo. Os resultados principais desse estudo foram a visualização de distintos comportamentos cinéticos da mesma enzima nos híbridos estudados e teores de compostos bioativos maiores, como a vitamina C que apresentou teores de 21 a 115% superiores e atividade antioxidante cujos teores foram de 6 a 68,5% maiores que a atividade do maracujá amarelo azedo comercial.

Palavras chaves: Ascorbato oxidase. Compostos bioativos. Maracujá amarelo azedo. Pectinametilesterase. Peroxidase. Polifenoloxidase.

ABSTRACT

The yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) can be eaten *in natura* or industrialized. Its importance is given by medicinal value, commonly used for treating anxiety, insomnia and irritability; food in the form of frozen pulp and juice, candy, jelly and ice cream, and nutraceutical or functional food, with high levels of potassium and phosphate ions, Vitamin A, B1 (thiamine), B2 (riboflavin) and C (ascorbic acid). Some changes may occur during processing and storage of the juice interfere the color and flavor of the final product, which can result in non-acceptance by the consumers. This can occur mainly due to biochemical browning and reactions molecular biochemical changes that result in undesirable flavors and nutrient loss. Therefore the control of these undesirable effects during processing of fruits is very important for preserving the natural appearance. Thus, enzymes pectinmethylesterase (PME, EC: 3.1.1.11), peroxidase (POD, EC: 1.11.1.7), Polyphenoloxidase (PPO, EC: 1.10.3.1) and ascorbate oxidase (AO, EC: 1.10.3.3) can be responsible for enzymatic browning and other reactions that alter the product during and after processing. Seen it, with the goal of adding nutritional value and market the passion fruit has been developed and used a hybrid culture, which, in summary, means the use of modified seeds and with appropriate management, with a view to rationalizing the use of pesticides and increase productivity. The aim of this work is to study the kinetic behavior of the enzymes already mentioned and evaluate the contents of bioactive compounds such as vitamin C, phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of five hybrid the yellow passion fruit tart cultivar. The main results of this study was to visualize distinct kinetic behaviors of the same enzyme in hybrids studied and higher levels of bioactive compounds such as vitamin C levels which was 21 to 115% higher and antioxidant activity whose contents were 6 to 68.5 % greater than the activity of passion fruit tart commercial.

Keywords: Ascorbate oxidase. Bioactive compounds. Yellow passion fruit. Pectin methylesterase. Peroxidase. Polyphenol oxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Frutos do maracujá amarelo azedo (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener)	22
Figura 2	Estrutura da enzima (a) Polifenoloxidase (PPO) e da enzima (b) Peroxidase (POD)	26
Figura 3	Esquema da reação onde a enzima polifenoloxidase converte o catecol em o-quinona na presença de oxigênio (composto colorido).	27
Figura 4	Esquema da reação onde a enzima peroxidase converte o guaiacol e o peróxido de hidrogênio em tetraguaiacol (composto colorido).	27
Figura 5	Estrutura da enzima Ascorbato Oxidase.	28
Figura 6	Reação catalisada pela Ascorbato oxidase.	28
Figura 7	Estrutura da enzima Pectinaesterase	29
Figura 8	Estrutura da Vitamina C (Ácido L-ascórbico)	31
Figura 9	Fluxograma para obtenção do pó-cetônico de polpa de maracujá.	35
Figura 10	Curva analítica para determinação do coeficiente de absorvidade da soro albumina bovina (BSA).	42
Figura 11	Curva analítica para obtenção do coeficiente de extinção do ácido ascórbico, usando 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP).	43
Figura 12	Curva analítica para determinação do coeficiente de absorvidade do ácido gálico.	44
Figura 13	Formação do cromóforo flavonoíde-alumínio.	45
Figura 14	Curva analítica para determinação do coeficiente de absorvidade da quercetina.	46
Figura 15	Curva analítica para determinação do coeficiente de absorvidade da soro albumina bovina (BSA).	47
Figura 16	Representação da formação do cátion ABTS ^{•+}	48
Figura 17	Representação da oxidação do TMB pelo HOCl/OCl ⁻	49
Figura 18	Comportamento cinético da PME.	52
Figura 19	Comportamento do pH ótimo e da temperatura ótima da PME	53
Figura 20	Comportamento cinético da enzima POD.	54
Figura 21	Comportamento da atividade enzimática (UA/mL) de extrato da POD.	55

Figura 22	Atividade enzimática (UA.mL ⁻¹) da PPO nos híbridos estudados.	56
Figura 23	Comportamento da atividade enzimática (UA/mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹) da AO.	58
Figura 24	Comportamento das atividades específicas das enzimas PME, POD, PPO e AO dos híbridos.	59
Figura 25	Conteúdos de vitamina C encontrados nos híbridos de maracujá azedo.	60
Figura 26	Comportamento da extração etanólica e aquosa dos compostos fenólicos dos híbridos.	62
Figura 27	Comportamento da extração etanólica e aquosa do conteúdo de flavonóides dos híbridos.	63
Figura 28	Comportamento da extração etanólica e aquosa das proteínas totais dos híbridos.	64
Figura 29	Capacidade antioxidante dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo e do maracujá amarelo azedo comum, via radical ABTS ^{•-} .	66
Figura 30	Capacidade antioxidante dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo e do maracujá amarelo azedo comum pelo ensaio do HOCl e TMB.	68
Figura 31	Correlação entre os parâmetros Atividade enzimática da Peroxidase (POD) (UA.mL ⁻¹) e a capacidade antioxidante, via ensaio de HOCl e TMB.	69
Figura 32	Correlação entre os parâmetros Atividade enzimática da Polifenoloxidase (PPO) (UA.mL ⁻¹) e a capacidade antioxidante, via ensaio de HOCl e TMB.	69
Figura 33	Correlação entre os parâmetros conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante, via ensaio de HOCl e TMB.	70
Figura 34	Correlação entre os parâmetros conteúdo de compostos fenólicos e conteúdo de flavonóides dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo.	71
Figura 35	Correlação entre os parâmetros conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, via radical ABTS ^{•-} , dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo.	71
Figura 36	Correlação entre os parâmetros Atividade enzimática da Polifenoloxidase (PPO) (UA.mL ⁻¹) e o conteúdo de compostos fenólicos (EAG [mg.(100g de polpa liofilizada) ⁻¹]) dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo.	72
Figura 37	Correlação entre os parâmetros Atividade enzimática da Polifenoloxidase (PPO) (UA.mL ⁻¹) e a capacidade antioxidante, via captura do radical ABTS ^{•-} , dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características físico-químicas dos híbridos de maracujá-azedo estudados (T= 25°C).	50
Tabela 2	Atividade da PME nos híbridos estudados. Condições de ensaio: 15 mL de solução de pectina cítrica (0,25%); NaCl (0,15 mol.L ⁻¹); 0,5 mL de extrato concentrado de PME; água destilada; NaOH (0,1 mol.L ⁻¹); T=50°C, volume final 30 mL, tempo de reação 10 minutos.	51
Tabela 3	Atividade da POD nos híbridos estudados. Condições de ensaio: 200 µL de extrato concentrado de POD; peróxido de hidrogênio (3,12 mmol.L ⁻¹); guaiacol (16,34 mmol.L ⁻¹); solução tampão ácido bórico/Bórax (50 mmol.L ⁻¹ , pH 8,0), T = 25°C, Tempo de reação: 2 minutos.	54
Tabela 4	Atividade da PPO nos híbridos estudados. Condições de ensaio: extrato concentrado de PPO; 900µL de catecol (0,12 mol.L ⁻¹); solução tampão fosfato de sódio (50mmol.L ⁻¹ , pH 6,0). T=25°C, volume final 3,0 mL. Tempo de reação: 1 minuto.	56
Tabela 5	Atividade da AO nos híbridos em estudo. Condições de ensaio: 100 µL de extrato concentrado de AO; 600 µL de ácido ascórbico (1 mmol.L ⁻¹); solução tampão citrato/ácido cítrico (25 mmol.L ⁻¹ , pH 5,0). T=25°C.	56
Tabela 6	Atividade específica das enzimas PME, POD, PPO e AO nos híbridos da cultivar maracujá-amarelo. Condições de ensaio: amostra de extrato concentrado de cada enzima, solvente, reagente de biureto, repouso por 5 minutos, T = 25°C.	58
Tabela 7	Conteúdos de vitamina C encontrados nos híbridos de maracujá azedo. Condições de ensaio: 10 mL de extrato diluído em ácido oxálico 2%; solução 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), T = 25°C, e valor encontrado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).	59
Tabela 8	Conteúdo de fenóis totais nos híbridos da cultivar maracujá-amarelo, expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) (mg de ácido gálico/100g polpa liofilizada). Condições de ensaio: 500µL de extrato diluído, 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteau 10%, 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 7,5%, incubação por 5 minutos em banho-maria a 50°C.	61

Tabela 9	Conteúdo de proteína total nos híbridos da cultivar maracujá-amarelo. Condições de ensaio: 200 µL de extrato, 800 µL do solvente, 4 mL do reagente de biureto, repouso por 5 minutos, T=25°C.	63
Tabela 10	Conteúdo de flavonóides totais nos híbridos da cultivar maracujá-amarelo, expressos em equivalentes de Quercetina (EQ) (mg de quercetina /100g de polpa liofilizada). Condições de ensaio: extrato (0,1 mg/mL), Nitrato de Sódio 5%, Cloreto de Alumínio 10% em etanol 80%, Hidróxido de Sódio 1M e água destilada.	64
Tabela 11	Capacidade antioxidante dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo e do maracujá amarelo azedo comum. Condições de ensaio: 100 µL da solução de ABTS ^{•+} , Volumes variáveis de extrato (0,01 g/mL), solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4) para completar o volume para 300 µL. Repouso por 15 minutos, leitura a 734nm no espectrofotômetro de placa Biotek, T = 25°C.	66
Tabela 12	Capacidade antioxidante dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo e do maracujá amarelo azedo comum. Condições de ensaio: solução de HOCl, volumes variáveis de extrato (0,01 g/mL), solução tampão fosfato de sódio 50mmol.L ⁻¹ (pH 7,4) para completar o volume para 240 µL, repouso por 15 minutos no escuro, solução de TMB e repouso por 5 minutos; leitura a 652nm no espectrofotômetro de placa Biotek, T = 25°C.	67
Tabela 13	Coefficientes de correlação linear de Pearson	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)
AE	Atividade Específica
AO	Ascorbato Oxidase
BSA	Soro Albumina Bovina
DCPIP	2,6 -diclorofenolindofenol
EAG	Equivalente Ácido Gálico
EQ	Equivalente Quercetina
GiganteAm	BRS Gigante Amarelo
HOCl	Ácido Hipocloroso
IC ₅₀	Porcentagem de inibição
NaCl	Cloreto de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OuroVerm	BRS Ouro Vermelho
PME	Pectinametilesterase
PPO	Polifenoloxidase
POD	Peroxidase
SolCerrado	BRS Sol do Cerrado
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
UA	Unidade de Atividade

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
mg	Miligrama
g	Gramas
μL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
μmol	Micromol
mmol	Milimol

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	20
I.1. Fruticultura no Brasil	20
I.2. O Maracujá.....	22
I.3. Híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo	23
I.4. Bebidas a base de maracujá	24
I.5. Enzimas.....	25
1.5.1. Polifenoloxidase e Peroxidase	25
1.5.2. Ascorbato Oxidase	28
1.5.3. Pectinametilesterase	29
I.6. Compostos Bioativos.....	30
I.7. Justificativa do estudo	31
II. OBJETIVOS	33
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
III.1. Obtenção das amostras	34
III.2. Tratamento das amostras.....	34
III.3. Liofilização das amostras	35
III.4. Extrações aquosa e etanólica	35
III.5. Características físico-químicas das frutas <i>in natura</i>	36
III.6. Estudo das enzimas da polpa de maracujá <i>in natura</i>	36
III.6.1. Obtenção dos extratos	36
III.6.1.1. Pectinametilesterase (PME)	36
III.6.1.2. Peroxidase (POD)	37
III.6.1.3. Polifenoloxidase (PPO)	37
III.6.1.4. Ascorbato Oxidase (AO).....	38
III.6.2. Estudos cinéticos da PME, POD, PPO e AO	38
III.6.2.1. Determinação da unidade de atividade da enzima PME	38
III.6.2.1.1. Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima da PME	39
III.6.2.2. Determinação da unidade de atividade da enzima POD	39
III.6.2.3. Determinação da unidade de atividade da enzima PPO	40
III.6.2.4. Determinação da unidade de atividade da enzima AO.....	40
III.6.3. Determinação da atividade específica (AE).....	41
III.7. Compostos Bioativos.....	42
III.7.1. Determinação de Vitamina C (ácido L-ascórbico)	42
III.7.2. Determinação do conteúdo de fenóis totais	43
III.7.3. Avaliação do conteúdo de Flavonóides Totais	45

III.8. Determinação do conteúdo de proteína total.....	46
III.9. Determinação do potencial antioxidante.....	47
III.9.1. Captura do cátion radical ABTS ^{•+}	47
III.9.2. Ensaio com HOCl e TMB	48
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
IV.1. Características físico-químicas das frutas <i>in natura</i>	50
IV.2. Determinação da unidade de atividade da PME, POD, PPO e AO.....	51
IV.2.1. Atividade enzimática da PME	51
IV.2.1.1. Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima da PME.....	53
IV.2.2. Atividade enzimática da POD	53
IV.2.3. Atividade enzimática da PPO.....	55
IV.2.4. Atividade enzimática da AO	57
IV.3. Atividade Específica (AE).....	58
IV.6. Compostos Bioativos	59
IV.6.1. Determinação do conteúdo de Vitamina C.....	59
IV.6.2. Determinação do conteúdo de fenóis totais	61
IV.6.3. Determinação do conteúdo de flavonóides	63
IV.7. Determinação do conteúdo de proteína total	64
IV. 8. Determinação da capacidade antioxidante	65
IV.8.1. Captura do cátion radical ABTS ^{•+}	65
IV.8.2. Ensaio com HOCl e TMB	67
IV.9. Correlações entre duas análises dos híbridos	68
V. Considerações finais.....	74
REFERÊNCIAS.....	76

I. INTRODUÇÃO

I.1. Fruticultura no Brasil

A produção mundial de frutas tem apresentado um crescimento contínuo. Em 2009 a produção foi de aproximadamente 720 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por 5,5% dessa produção ocupando o terceiro lugar, atrás de China e Índia. No ano de 2010 foram colhidas 42,2 milhões de toneladas, um aumento significativo em relação ao ano anterior, quando os volumes colhidos foram de 39,6 milhões de toneladas. A significativa presença brasileira no mercado externo deve-se a oferta de frutas tropicais, clima favorável ao plantio e produção durante boa parte do ano, situação possível graças à extensão territorial do país, posição geográfica e condições de clima e solo privilegiadas (PARANÁ, 2011).

Como visto, a produção brasileira de frutas aumentou e o consumo também cresceu de 113 kg/hab/ano em 2001, para 125 kg/hab/ano em 2009 (BRASIL, 2011). O aumento no consumo tem como uma das justificativas a busca por uma vida com mais qualidade que vem incentivando a inserção de frutas e outros alimentos na dieta, a fim de somar valores nutricionais importantes para sua saúde humana. Segundo a Coordenação-Geral para Pecuária e Culturas Permanentes, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o crescimento também se deu com a melhora de produtividade e rendimento. Provavelmente isso se deve ao fato dos produtores estarem investindo em tecnologia ao longo desses anos, melhorando a produtividade da maioria das culturas. Outro fator que explica o bom desempenho do setor é o preço. O Índice Nacional de Preços ao Consumidor (IPCA) das frutas é o mais baixo (16% de acréscimo) entre os itens do grupo alimentação e bebidas (110% de aumento). Contudo, apesar do cenário positivo, o saldo da balança comercial de frutas frescas (US\$ 312,6 milhões em 2010) sofreu uma queda de 21% em relação a 2009 e de 46% se comparado a 2007 (BRASIL, 2011).

Neste contexto, onde se tem as frutas como fonte de renda e de nutrientes, encontra-se a fruta maracujá originária da América Tropical. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, onde o maracujá amarelo azedo representa em torno de 97% da área plantada em todo país. Em 2010 a produção de maracujá ficou em aproximadamente 920 mil toneladas, sendo os estados Bahia,

Ceará e Sergipe responsáveis por cerca de 72% dessa produção. Estima-se que 60% da produção sejam vendidas *in natura* e o restante é destinada ao processamento industrial, principalmente indústrias de suco e de produção de polpas congeladas. Além disso, a referida fruta também é destinada para a obtenção de produtos como sorvetes, mousses, bebidas alcoólicas, entre outras (SANDI et al., 2003a; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2010).

Visando o alto rendimento de polpa de frutas, com resistência e tolerância às doenças, alguns produtores estão investindo na cultura híbrida que, em síntese, significa o uso de sementes modificadas e manejo adequado, técnica que inclui também a correção dos nutrientes no solo, menor dependência da polinização artificial, maior longevidade, vigor e alta produtividade (GAMA, 2008). De acordo com a Embrapa Cerrados nos últimos anos tem-se observado problemas sérios com várias doenças na cultura do maracujazeiro, o que deprecia a qualidade do fruto. O uso de variedades resistentes e outras técnicas de manejo integrado é a medida mais eficaz, econômica e ecologicamente correta de controle de doenças. O desenvolvimento de cultivares resistente a doenças é estratégico, a saber: redução de custos de produção, qualidade mercadológica, preservação do ambiente e sustentabilidade do agronegócio (GAMA, 2008).

Segundo a Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária, a participação do Brasil na exportação de sucos de frutas vem caindo, explicado pela forte concorrência *versus* qualidade do produto com países como a Colômbia, Peru e Equador. Por isso, são justificados os investimentos em tecnologias, no desenvolvimento de processos que visem uma melhor qualidade na produtividade, com possibilidade de concorrência internacional. Assim, é importante destacar que neste caso específico, estudos para o entendimento das reações químicas e dos efeitos físicos que ocorrem durante a transformação da fruta *in natura* devem ser efetuados com o objetivo de melhorar o processamento industrial para a obtenção de sucos concentrados e néctares de alta qualidade. Pois, durante o processamento da polpa de maracujá pode ocorrer alterações no sabor e no aroma, principalmente na etapa de pasteurização, as quais são intensificadas durante o armazenamento (SANDI et al., 2003b). Sabe-se, no entanto, que essas alterações são passíveis de ocorrerem principalmente devido às reações bioquímicas de escurecimento, tais como: alterações moleculares resultando em *flavors* indesejáveis, perda de

nutrientes, e formação de pigmentos de coloração marrom. Manter o produto a baixas temperaturas, por longo tempo de estocagem, ainda é uma alternativa para evitar a deteriorização da cor e do *flavor* de sucos de frutas processadas, de concentrados, e de produtos desidratados (HANDWERK; 1988).

I.2. O Maracujá

O maracujá-amarelo pertence à família Passifloraceae que possui cerca de 16 gêneros e 650 espécies, sendo o gênero *Passiflora* o mais importante representando aproximadamente 400 espécies (RAMOS et al, 2007). Entre as espécies, cerca de 70 produzem frutas que podem ser aproveitadas como alimento. A fruta é uma baga ovóide ou subglobosa, com diâmetro equatorial variando de 4,9 a 7,8 cm e longitudinal entre 5,4 a 10,4 cm (DURIGAN et al., 2004). O suco, com aroma e sabor bastante agradável é bem aceito nos diversos centros consumidores (LIMA et al., 2002).

Figura 1 – Frutos do maracujá amarelo azedo
(*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener)



Fonte: <http://www.qualidadedesdeorigem.com.br/saiba-mais/maracuja/>

Apesar do elevado número de espécies que formam o gênero *Passiflora*, apenas algumas são de interesse por causa da qualidade das frutas utilizadas na indústria para fabricação de sorvetes, licores e doces, como também, em virtude da adaptabilidade como trepadeiras ornamentais, ou ainda, pelas propriedades medicinais (MEDINA et al., 1980). Dentre as espécies, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. é bastante cultivada por ser mais vigorosa, adaptada a altas temperaturas, apresenta frutas com peso entre 43 g a 131 g, maior produção por hectare, maior acidez total e grande rendimento de suco (LIMA et al., 1994).

A importância do suco é dada pelo valor: i) medicinal, popularmente usado no tratamento da ansiedade, da insônia e da irritabilidade, ii) alimentício, na forma de polpa congelada e suco, doces, geléia, sorvete e licor (CANÇADO JÚNIOR; ESTANISLAU; PAIVA; 2000), iii) nutracêutico ou alimento funcional, apresentando elevados teores de íons fosfato e potássio, vitaminas A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), C (ácido ascórbico) e, também, niacina (MATSUURA; FOLEGATTI, 2002).

I.3. Híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo

Com o objetivo de agregar valores nutricionais e mercadológicos ao maracujá vem sendo de grande importância o desenvolvimento e uso da cultura híbrida, que, em síntese, significa o uso de sementes modificadas e com manejo adequado, com vistas à racionalização do uso de defensivos agrícolas e aumento de produtividade, o que resulta em: i) diminuição dos custos de produção da cultura, ii) potencial aumento da renda do produtor e, iii) diminuição do preço do produto para o consumidor.

Com a redução do uso de defensivos agrícolas também é esperada a redução dos riscos à saúde dos produtores rurais e dos consumidores, redução da poluição das águas dos rios, além do aumento da qualidade mercadológica devido à menor presença de resíduos nas frutas e assim, favorecer a competitividade do produto no mercado, tanto nacional como internacional (GAMA, 2008).

I.4. Bebidas a base de maracujá

Os produtos formulados e prontos para o consumo tais como suco tropical, suco concentrado, néctar e refresco de maracujá, diferem basicamente pela quantidade de polpa ou suco de fruta integral presente em cada um (CABRAL, 2005). A adição de água e demais ingredientes, como açúcares e ácidos, é função do padrão definido para cada produto.

No Brasil, a normatização do registro, padronização, classificação, inspeção e fiscalização da produção e comércio de bebidas ficam a cargo do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (CLETO; CONSOLINI, 2005).

De acordo com o Decreto nº 6.871 de 4 de Junho de 2009, suco ou sumo é bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.(BRASIL, 2009).

O suco poderá ser adicionado de açúcares na quantidade máxima fixada para cada tipo de suco, observado o percentual máximo de dez por cento em peso, calculado em gramas de açúcar por cem gramas de suco, tendo sua denominação acrescida pela designação “adoçado”. (BRASIL, 2009).

No rótulo da embalagem ou vasilhame do suco deverá ser mencionado o nome da fruta, ou parte do vegetal, e sua origem da parte comestível. No caso do maracujá (*Passiflora* spp.) deverá ser mencionada a parte comestível retirada, por meio de processo tecnológico adequado.

O suco de maracujá deverá obedecer aos Padrões de Identidade e Qualidade fixados para suco de fruta. Sendo, segundo Brasil (2003):

- **Suco integral:** suco sem adição de açúcar e na sua concentração natural, sendo vedada o uso de tal designação para o suco reconstituído;
- **Suco reconstituído:** suco obtido pela diluição de suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor de sólidos solúveis mínimo estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade

para cada tipo de suco integral, sendo obrigatório constar de sua rotulagem a origem do suco utilizado para sua elaboração, se concentrado ou desidratado, sendo opcional o uso da expressão "reconstituído";

- **Suco concentrado:** suco que for parcialmente desidratado, devendo mencionar no rótulo o percentual de sua concentração;

- **Suco Tropical:** produto obtido pela dissolução, em água potável, da polpa da fruta polposa de origem tropical, por meio de processo tecnológico adequado, não fermentado, de cor, aroma e sabor característicos da fruta, submetido a tratamento que assegure sua conservação e apresentação até o momento do consumo.

As designações Néctar e Refresco também são comumente usadas em referência aos sucos. Neste caso “néctar” é a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal ou de seu extrato, adicionado de açúcares, destinada ao consumo direto; e “refresco” é a bebida não fermentada, obtida pela diluição, em água potável, do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal de sua origem, com ou sem adição de açúcares sendo que o refresco de maracujá deverá conter no mínimo 6% em volume de suco de maracujá (BRASIL, 2009).

1.5. Enzimas

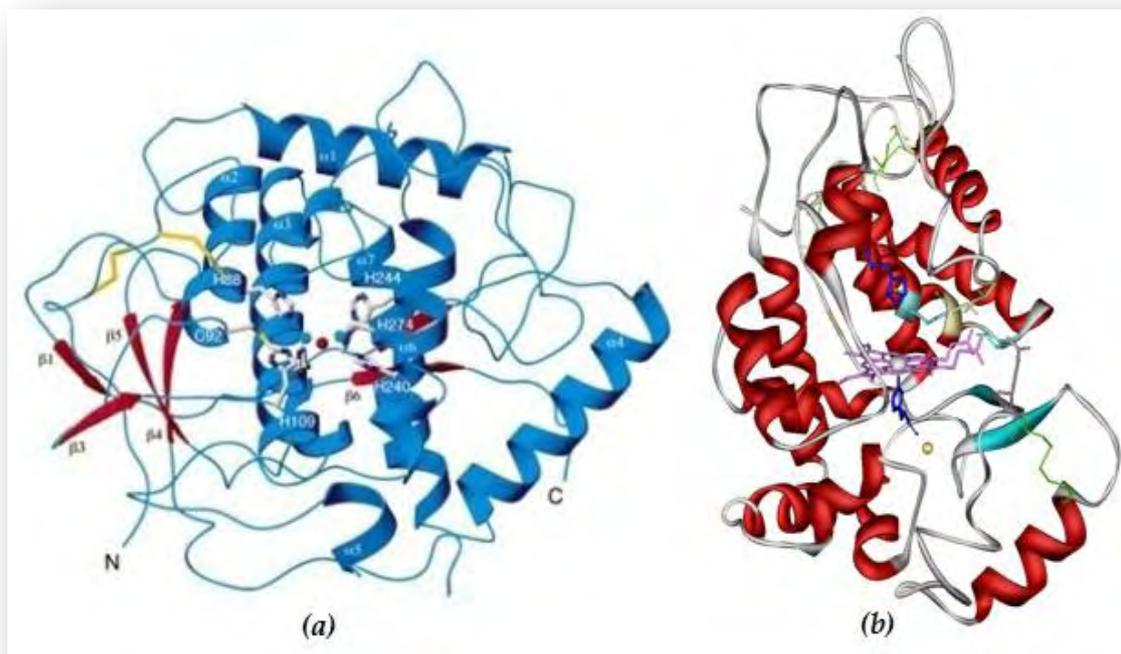
As reações de escurecimento catalisadas por enzimas, constituintes do suco/frutas, podem gerar produtos, ou reações secundárias, que alteram a cor do produto final, perdendo assim significativamente a qualidade do mesmo.

1.5.1. Polifenoloxidase e Peroxidase

O escurecimento em tecidos de frutas e vegetais danificados, ou em fase após amadurecimento, é decorrente da oxidação de compostos fenólicos, quer seja enzimático ou não. As enzimas peroxidase e polifenoloxidase estão no grupo de enzimas responsáveis pelo escurecimento em frutas, vegetais e seus produtos processados, por isso, o controle das atividades destas enzimas é de grande

importância durante a transformação dessas matérias primas para a obtenção de produtos processados, além da estocagem e tempo de permanência nas prateleiras para venda ao consumidor. (CLEMENTE; PASTORE, 1998).

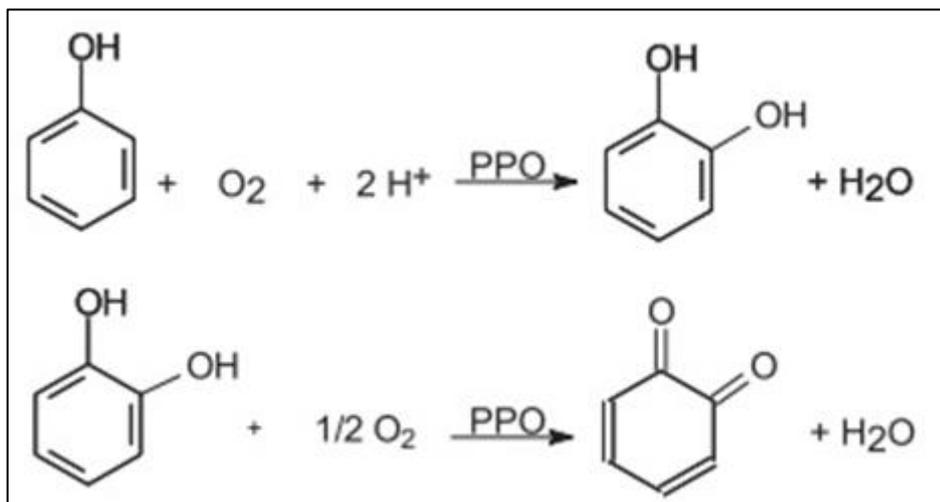
Figura 2 – Estrutura da enzima (a) Polifenoloxidase (PPO) e da enzima (b) Peroxidase (POD)



Fonte: (a) KLABUNDE et. al. (1998) e (b) <http://www.tifr.res.in/~shyamal/research.html>.

Polifenoloxidases (PPO, EC: 1.10.3.1) são enzimas que catalisam duas reações distintas: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois e a oxidação (desidrogenação) desses compostos para respectivas *o*-quinonas como visto na figura 3. (MAYER; HAREL, 1979).

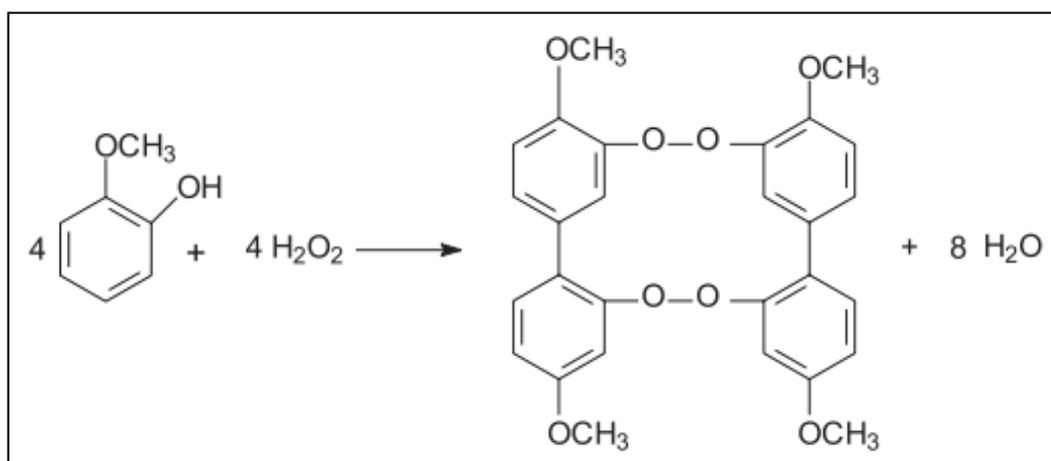
Figura 3 – Esquema da reação onde a enzima polifenoloxidase converte o catecol em o-quinona na presença de oxigênio (composto colorido).



Fonte: FATIBELLO FILHO; VIEIRA (2002).

A peroxidase (POD; EC: 1.11.1.7) é capaz de catalisar um grande número de reações oxidativas em plantas, usando peróxido como pseudo-substrato, ou, em alguns casos, oxigênio como um aceptor de hidrogênio. Em vegetais, a peroxidase induz a mudanças negativas de sabor durante a estocagem. É considerada a enzima vegetal mais estável ao calor e sua inativação tem sido convencionalmente usada como indicador de adequação de branqueamento em processamentos vegetais. (FATIBELLO FILHO; VIEIRA, 2002).

Figura 4 – Esquema da reação onde a enzima peroxidase converte o guaiacol e o peróxido de hidrogênio em tetraguaiacol (composto colorido).



Fonte: FATIBELLO FILHO; VIEIRA, (2002)

1.5.2. Ascorbato Oxidase

Outra enzima que também tem participação no processo de escurecimento é a ascorbato oxidase (AO; EC 1.10.3.3). Sua estrutura está representada na figura 5.

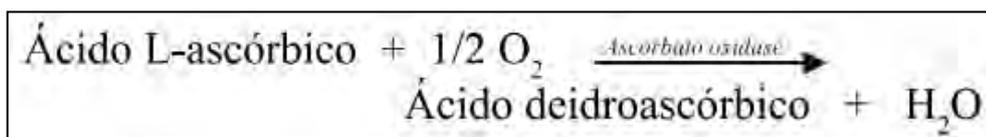
Figura 5 – Estrutura da enzima Ascorbato Oxidase



Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1AOZ>

A Ascorbato Oxidase catalisa a oxidação do ácido-L-ascórbico na presença de oxigênio molecular produzindo o ácido dehidroascórbico (DHA) e água, que leva à formação de compostos de coloração escura (FATIBELLO FILHO; VIEIRA, 2002). Esta reação está representada na Figura 6.

Figura 6 – Reação catalisada pela Ascorbato oxidase.

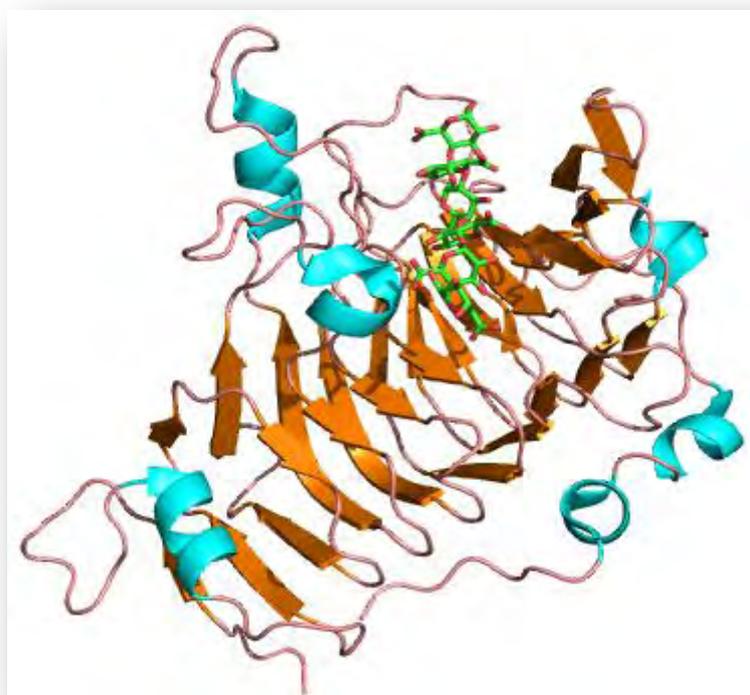


Fonte: FATIBELLO FILHO; VIEIRA, (2002).

1.5.3. Pectinametilesterase

A enzima pectinametilesterase (PME; EC: 3.1.1.11), denominadas também como pectinesterase (PE, figura 7), pertence ao grupo das pectinases que formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécicas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. A PME catalisa especificamente a desmetoxilação da pectina liberando metanol e pectina de baixo grau de esterificação (UENOJO, PASTORE; 2007).

Figura 7 – Estrutura da enzima Pectinaesterase



Fonte: <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF01095>

A pectina está relacionada ao desenvolvimento das plantas e maturação dos frutos (JOLIE et al., 2009). Em algumas indústrias de suco a presença da PME e a sua ação catalítica sobre no produto industrial são desejáveis para diminuir a viscosidade da polpa asséptica utilizada para a obtenção de polpa para suco, néctar e para obter uma fluidez e transparência, mantendo o aspecto sensorial de origem. Portanto ela tem significativa importância na obtenção do produto final de processamento industrial de frutas.

I.6. Compostos Bioativos

Em alimentos podem-se encontrar biomoléculas com ação benéfica ou não no organismo humano, em geral são moléculas orgânicas, denominadas como compostos bioativos. O interesse deste trabalho foi determinar o conteúdo de alguns destes compostos bioativos e correlacionar com a ação antioxidante de cada amostra, objeto de estudo.

Antioxidantes são substâncias que podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos à lipídios, à proteínas e à ácidos nucleicos, causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que incluem os radicais livres. Compostos bioativos podem atuar reagindo ou sequestrando tais espécies e, conseqüentemente, reduzindo os efeitos maléficos ao organismo vivo. Por sua ação, substâncias antioxidantes presentes no alimento (fruta) podem auxiliar a diminuir: a incidência de doenças degenerativas, como o câncer, as doenças cardiovasculares, inflamações, disfunções cerebrais e, também, a retardar o envelhecimento precoce (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

Visto a importância e o interesse socioeconômico pelas frutas, alimento fonte de importantes nutrientes, muitas indicadas como alimento nutracêutico, a proposta deste trabalho foi verificar a presença e o teor de vitamina C, teores de compostos fenólicos e flavonóides, e correlacionar com a ação antioxidante, nas amostras dos híbridos da polpa de maracujá, a saber:

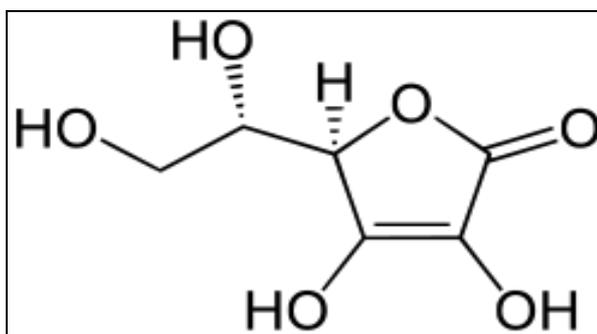
- **Compostos fenólicos:** presentes nas plantas eles estão relacionados, principalmente com a proteção, conferindo alta resistência a microrganismos e pragas. Nos alimentos, estes compostos podem influenciar o valor nutricional e a qualidade sensorial, conferindo atributos como cor, textura, amargor e adstringência. Na maioria dos vegetais, em geral, os compostos fenólicos constituem os antioxidantes mais abundantes (EVERETTE et al., 2010);

- **Compostos flavonóides:** são responsáveis pela coloração de frutas, flores e algumas vezes de folhas; apresentam vários efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica e

vasodilatadora. Além disso, estas substâncias inibem a peroxidação lipídica e reduzem o risco de doenças cardiovasculares (ZERAIK et al., 2010);

- **Vitamina C (ácido L-ascórbico):** investigar o teor de vitamina C é também de grande importância, visto que sua oxidação é uma das principais degradações que ocorre durante o processamento de sucos.

Figura 8 – Estrutura da Vitamina C
(Ácido L-ascórbico)



Fonte: <<http://www.entrenalinea.com.br/vitaminado-saiba-mais-sobre-a-vitamina-c/>>

Essa vitamina constitui um agente antioxidante natural e muito utilizada no processamento industrial de cerveja, bebidas não alcoólicas, entre outros, como um aditivo de ação antioxidante. Além de seu uso industrial a vitamina C é um nutriente essencial na alimentação humana, ajudando na absorção de ferro e cálcio pelo organismo, atuando na prevenção do envelhecimento precoce da pele, diminuindo também a incidência de doenças cardiovasculares, e também, possivelmente na prevenção de gripes e resfriados por agir no sistema imunológico (STADLER, 1999).

I.7. Justificativa do estudo

Foi firmado um Convênio de Cooperação, vigência por 5 anos (2011-2015), entre a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” através do Instituto de Química, e a Indústria Predilecta Alimentos LTDA, representados, respectivamente, pelo Vice-Reitor no exercício da Reitoria, Prof. Dr. Julio Cezar Durigan, e o Diretor Industrial Sr. Antonio Carlos Tadiotti, com o objetivo de realizar estudos acadêmicos e industriais (teste piloto na indústria) sobre: “*Desenvolvimento*

de pesquisa acadêmico-científica sobre frutas e seus processos industriais: estudos de metabólitos primários e secundários, propriedades funcionais e nutricionais, e obtenção de pectinases a partir de rejeito industrial". Portanto, o projeto desenvolvido está de acordo com os objetivos propostos no Convênio.

A proposta de estudos bioquímicos de amostras de maracujá visando aplicação industrial partiu do interesse da referida Indústria em montagem de uma linha de obtenção de produtos processados de maracujá, principalmente suco e néctar, com uma menor relação custo/benefício e maior aceite do consumidor (grande dificuldade industrial para suco/néctar). Assim, anexo à Minuta do Convênio, consta plano de trabalho sobre estudos específicos de híbridos da fruta maracujá visando aplicação industrial.

II. OBJETIVOS

Visto que o maracujá é uma fruta com elevado potencial de aplicação tecnológica, principalmente no processamento industrial de polpa para suco e néctar, esse trabalho visa o estudo bioquímico de diferentes híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) – FB200, FB300, BRS Ouro Vermelho, BRS Gigante Amarelo e BRS Sol do Cerrado - com o propósito de se encontrar um híbrido que melhor atenda as necessidades processuais da indústria.

A escolha desses híbridos foi feita de forma a atender as exigências do Convênio UNESP/Indústria Predilecta Alimentos e, também, por indicação do Engenheiro Agrônomo José Rafael da Silva responsável pelo Viveiros Flora Brasil, fornecedora das amostras.

Partindo da polpa dos híbridos de maracujá como amostras objeto de estudo, os objetivos foram:

- Determinação das características físico-químicas das frutas;
- Determinação da unidade de atividade e atividade específica por volume de extrato da PME, POD, AO e PPO;
- Avaliação do conteúdo de compostos bioativos de cada amostra;:
 - vitamina C;
 - compostos fenólicos;
 - flavonóides;
- Determinação do conteúdo de proteína total;
- Avaliar a atividade antioxidante de cada amostra de híbrido em estudo.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes usados foram de grau pureza analítica e os equipamentos utilizados foram:

- Centrifuga Beckman - Avanti™ Centrifuge J-25; Centrifuga Centrifuge 5415R – Eppendorf, Liofilizador LabConco Freeze Dry Sistem/ Freezone® 4,5 do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química (DBQT), Instituto de Química (IQ) – UNESP;
- Espectrofotômetro de Placa Biotek (Power Wave XS2) do Laboratório de Bioquímica Clínica (LBC), Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFar) – UNESP;
- Espectrofotômetro UV/VIS, da Diode Array HP 8453E, usando celas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, do Laboratório de Enzimologia, DBQT/IQ/UNESP;
- pHmetro Digital TEC-2 MP (4 casas decimais), para análise cinética da PME;
- Espectrofotômetro FEMTO 600 Plus, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, LBC/FCFar/UNESP.

III.1. Obtenção das amostras

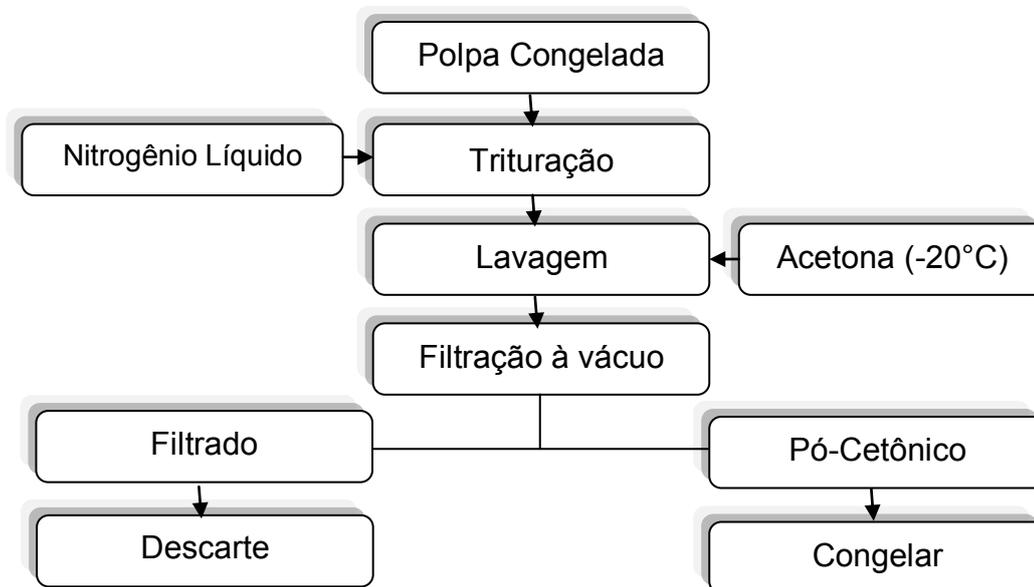
Foram utilizadas amostras de maracujá *in natura* oriundas de cinco híbridos (FB200, FB300, BRS Ouro Vermelho, BRS Gigante Amarelo e BRS Sol do Cerrado) da cultivar maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener), que foram fornecidas pelo Viveiros Flora Brasil, localizado na cidade de Araguari no Estado de Minas Gerais.

III.2. Tratamento das amostras

As amostras (*in natura*) foram transportadas para o laboratório sob refrigeração e, estocadas em temperaturas inferiores à 0°C até serem utilizadas para: extração e caracterização enzimática, determinação das características físico-químicas, determinação do conteúdo de vitamina C, compostos fenólicos, flavonóides e proteínas, e, também, avaliação do potencial antioxidante.

Para a extração enzimática foi utilizado o pó-cetônico de polpa de maracujá que foi obtido conforme o esquema apresentado a seguir.

Figura 9 – Fluxograma para obtenção do pó-cetônico de polpa de maracujá.



III.3. Liofilização das amostras

Após a lavagem das frutas em água corrente, procedeu-se a separação das frutas em casca e “polpa bruta” (polpa + sementes). Esta última foi submetida ao congelamento com nitrogênio líquido, seguido de liofilização com vácuo de 50–200 μHg a temperatura de -98°C . Após a liofilização, as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas à -18°C até o momento das análises.

III.4. Extrações aquosa e etanólica

Foi feita a extração das polpas liofilizadas da seguinte maneira: 1,0 g da amostra liofilizada foi transferida para um béquer onde se adicionou 10 mL do solvente (aquoso = água; etanólico = etanol 80%). Os béqueres contendo as amostras e os solventes foram então submetidos à agitação, em agitador magnético, por 5 minutos, a temperatura ambiente (25°C). Em seguida, os extratos passaram pelo processo de filtração, sendo a primeira feita com gaze e a segunda com papel

de filtro (Whatman nº1). Na sequência os extratos foram armazenados em frascos tipo *ependorf* e congelados à temperatura de -18°C até o momento da análise.

III.5. Características físico-químicas das frutas *in natura*

As características físico-químicas foram mensuradas usando três frutas de cada híbrido. Cada fruta inteira foi pesada (g) em uma balança semi analítica, após foi realizada a média aritmética das massas obtidas das três frutas de cada híbridos. O volume das frutas foi determinado pelo volume de água deslocado, colocando-se a fruta em um cilindro graduado com um volume de água estabelecido, após foi calculada a média aritmética dos volumes das três frutas de cada híbridos. O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado pela medida potenciométrica direta de uma solução contendo 1,0 g de polpa bruta (polpa + sementes) homogenei em 10 mL de água destilada. O mesmo procedimento foi feito para todos os híbridos. A leitura do pH foi realizada utilizando um pHmetro, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7.

III.6. Estudo das enzimas da polpa de maracujá *in natura*

A proposta do trabalho foi verificar o comportamento da atividade das enzimas PME, POD, PPO e AO na polpa dos híbridos objetos de estudos.

III.6.1. Obtenção dos extratos

As polpas dos híbridos foram tratadas individualmente para obtenção dos extratos característicos de cada enzima. Para as enzimas PME, POD e PPO foi usado o pó cetônico e para estudo da AO foi usada a polpa *in natura*.

III.6.1.1. Pectinametilesterase (PME)

Com o pó-cetônico foi realizado o procedimento de extração enzimática com tampão extrator borato-acetato (50mmol.L⁻¹, pH 8,34) e cloreto de sódio (NaCl – concentração final 0,1mol.L⁻¹) segundo adequação da metodologia realizada pelo

grupo de pesquisa do laboratório de Enzimologia (pesquisa em andamento). Após agitação em banho de gelo por 60 minutos, extrato bruto foi submetido à centrifugação (20 minutos, 17418 x g, 4°C) e, o sobrenadante obtido foi submetido à adição do sal sulfato de amônio, para precipitação das proteínas, à 70% segundo o nomograma de Dixon & Webb (1979) permanecendo em repouso *overnight* sob refrigeração. Após, outra centrifugação (20 minutos, 17418 x g, 4°C) foi feita e o precipitado obtido foi ressuspenso em solução tampão extratora, na proporção massa/volume 1:2 (g/mL), sendo denominado **Extrato concentrado de PME**, que foi armazenado sobre congelamento para posteriores análises cinético enzimáticas.

III.6.1.2. Peroxidase (POD)

A partir do pó-cetônico de cada amostra, esta foi ressuspensa em tampão extrator fosfato de sódio (50 mmol.L⁻¹), pH 6,0, cloreto de sódio (NaCl – concentração final 0,7 mol.L⁻¹) seguindo a adequação da metodologia realizada pelo grupo de pesquisa do laboratório de Enzimologia (pesquisa em andamento) e denominado extrato bruto. O extrato bruto foi submetido à agitação em banho de gelo por 60 minutos, e em seguida à centrifugação (20 minutos, 17418 x g, 4°C); ao sobrenadante obtido foi adicionado o sal sulfato de amônio à 70%, para precipitação das proteínas, segundo o nomograma de Dixon & Webb (1979), permanecendo em repouso *overnight* sob refrigeração. Outra centrifugação (20 minutos, 17418 x g, 4°C) foi feita e o precipitado obtido foi ressuspenso em solução tampão extratora, na proporção 1:2 (g/mL), sendo denominado **Extrato concentrado de POD**, após armazenado sob congelamento para posteriores análises cinético enzimáticas.

III.6.1.3. Polifenoloxidase (PPO)

Nesse caso o pó-cetônico da polpa das amostras de cada híbrido do maracujá foi homogeneizado lentamente em temperatura baixa (5°C), com uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 6,0, na proporção 1:20 (g/mL) , na presença de 3% de Triton X-100 e 1% de polivinil pirrolidona insolúvel (Polyclar AT) durante 60 minutos efetuando-se a primeira centrifugação (10 minutos, 12000 x g, 4°C). O sobrenadante obtido foi fracionado duas vezes com saturação com sulfato de amônio 20% e depois 70%, segundo o nomograma de Dixon; Webb (1979),

permanecendo em repouso *overnight* (5°C) entre os fracionamentos. Após essa etapa foi feita outra centrifugação (10 minutos, 12000 x g, 4°C) e o precipitado foi ressuspenso em solução tampão extratora, na proporção 1:2 (g/mL), sendo denominado **Extrato concentrado de PPO** que foi armazenado sobre congelamento para posteriores análises cinético enzimáticas.

III.6.1.4. Ascorbato Oxidase (AO)

A extração do ascorbato oxidase foi feita de acordo com a metodologia adotada por CARDELLO (1998) com algumas modificações e o precipitado enzimático foi ressuspenso em solução tampão extratora. O procedimento consiste em trabalhar a polpa de maracujá com solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol.L⁻¹ em pH 5,0, tratamento com amido e saturação com sulfato de amônio em duas etapas (30% e depois 70%), segundo o nomograma de Dixon & Webb (1979), permanecendo em repouso *overnight* (5°C) entre as saturações. O precipitado contendo a AO foi obtido por meio de centrifugação (10 minutos, 12000 x g, 4°C) após a segunda saturação e ressuspenso em solução tampão extrator, sendo denominado **Extrato concentrado de AO** e armazenado sob congelamento para posterior análise cinético enzimática.

III.6.2. Estudos cinéticos da PME, POD, PPO e AO

Foram realizados os estudos cinéticos das enzimas PME, POD, PPO e AO, seguindo técnicas específicas de cada uma.

III.6.2.1. Determinação da unidade de atividade da enzima PME

Para a PME foi utilizado o método titulométrico. O meio reacional termostatizado à 50°C para a análise constituiu-se de 15 mL de pectina cítrica (0,25%), cloreto de sódio (NaCl - 0,15 mol.L⁻¹), 0,5 mL de extrato enzimático concentrado e água destilada completando um volume final de reação de 30 mL, sendo o pH corrigido para 8,0 pela adição de NaOH 0,01 mol.L⁻¹. Mediu-se de minuto a minuto o volume necessário de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ para manter o pH em

uma faixa fixa (pH = 8,0), variando até 0,02 unidades (KERTESZ, 1955), a reação foi seguida por 10 minutos.

Os resultados foram expressos em unidade de atividade (UA/mL de extrato concentrado) da PME, definida como “a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de éster hidrolizado por minuto nas condições de ensaio” (CASTALDO et al., 1991; LEITE et al., 2009).

Em seguida, foi traçada a curva produto formado (μmol) versus tempo (min), onde determinou-se a velocidade inicial da reação (V_0).

III.6.2.1.1. Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima da PME

A determinação do pH ótimo de dois híbridos foi realizada pela medida da atividade (**UA**) da enzima em estudo, variando-se os valores de pH do meio de reação entre 7,5 e 10, utilizando-se para este fim solução tampão fosfato de sódio na faixa de 6,0 a 8,0, e solução tampão ácido bórico-borax entre valores de pH de 8,0 a 10 e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Semelhante ao que foi feito na determinação do pH ótimo foi feita a determinação da temperatura ótima dos dois híbridos. A variação de temperatura usada no meio de reação foi entre 50°C a 85°C, usando um banho com controle da temperatura e os meios reacionais descritos anteriormente; as demais condições de ensaio mantiveram constantes e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

III.6.2.2. Determinação da unidade de atividade da enzima POD

A determinação da atividade da POD (UA/mL de extrato concentrado) foi calculada por método adaptado a partir dos princípios adotados por Makinen (1982) e Ponsoni (2004). Uma unidade de atividade foi definida como a “quantidade de enzima que provoca um aumento na absorvância de 0,001 unidades por minuto, nas condições de ensaio previamente determinadas”. As condições de ensaio foram: 200 μL de extrato enzimático, guaiacol (16,34 mmol.L^{-1}) como substrato, peróxido de hidrogênio (3,12 mmol.L^{-1}) e tampão ácido bórico/bórax (50 mmol.L^{-1}) (pH = 8,0), leituras da absorvância foram seguidas a 470 nm, por 2 minutos e a velocidade inicial de reação foi determinada graficamente, absorvância x tempo de reação, por meio da tangente da reta obtida à curva cinética quando tempo tende a

zero. A concentração do peróxido de hidrogênio, na solução estoque, foi determinada sempre no momento do uso, utilizando o coeficiente de extinção molar (ξ) de $80 \text{ mol.L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 230 nm (BRESTEL, 1985).

III.6.2.3. Determinação da unidade de atividade da enzima PPO

A medida da atividade enzimática (UA/mL de extrato concentrado) da enzima PPO foi realizada pelo método espectrofotométrico, meio reacional constituído de extrato concentrado de PPO, solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,0 e de solução de catecol $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ em água ultra pura (*Mili-Q*), a 25°C , utilizando cela de quartzo de 1 cm de caminho ótico. O branco foi feito com 2,1 mL de solução tampão e 0,9 mL de substrato catecol. A velocidade da reação foi seguida acompanhando o aumento da absorção em 420 nm, com leituras a cada 0,5 segundos durante 1 minuto. Uma UA enzimática foi definida como “a quantidade de enzima que provoca um aumento na absorbância de 0,001 unidades por minuto nas condições de ensaio estabelecidas”. A velocidade inicial de reação foi determinada graficamente, absorbância x tempo de reação, por meio da tangente da reta obtida à curva cinética quando tempo tende a zero.

III.6.2.4. Determinação da unidade de atividade da enzima AO

A atividade enzimática ($\text{mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$) foi mensurada pelo método espectrofotométrico, meio reacional composto por 0,1 mL de extrato concentrado de enzima, 0,6 mL de ácido ascórbico 1 mmol.L^{-1} em água ultra pura (*Mili-Q*) acidificada com HCl 3 mmol.L^{-1} , 2,3 mL de solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol.L^{-1} , pH 5,0, a 25°C , em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho ótico, contra um branco constituído por 2,4 mL de solução tampão e 0,6 mL de solução de ácido ascórbico. A cinética da reação foi seguida em 245 nm, com leitura em 1 minuto. Uma unidade de atividade enzimática – UA_{AO} - foi calculada a partir da oxidação de 1mmol de ácido ascórbico/min/mL de enzima através da equação 1 (NAKAMURA et. al.,1968), a saber:

$$UA_{AO} = \frac{\Delta A_{245nm}(A_{245nm} \text{ inicial} - A_{245nm} \text{ final}) \times Vt \times fd}{10 \times 1 \times t \times Ve} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

- V_t – Volume total do meio reacional (mL)
- V_e – Volume da solução de enzima (mL)
- 10 – Coeficiente de extinção do ácido ascórbico ($\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- 1 – Caminho óptico (cm)
- t – tempo da reação (min)
- f_d – fator de diluição da enzima caso haja

III.6.3. Determinação da atividade específica (AE)

A atividade específica das enzimas PME, POD, PPO e AO foi calculada utilizando a UA/mL determinado e o conteúdo de proteína total (mg/mL), de cada amostra. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID; 1949).

O método do Biureto consiste numa reação entre o extrato enzimático da fruta e o reagente de biureto (mistura de cobre, tartarato de sódio e potássio, e hidróxido de sódio 10%). A reação, originalmente, é deixada em repouso por 30 minutos para desenvolvimento da cor, porém, nos estudos realizados o tempo de repouso foi de 5 minutos, pois avante esse tempo, ocorreu a formação de um precipitado que interferia na leitura do produto formado. A cinética da reação foi seguida em 540nm e os resultados foram expressos em equivalente de soro albumina bovina (BSA), usado como padrão, de acordo com o coeficiente de absorvidade determinado pela curva analítica (Fig. 10) obtida com concentrações que variaram de 0,4 a 2,0 mg/mL.

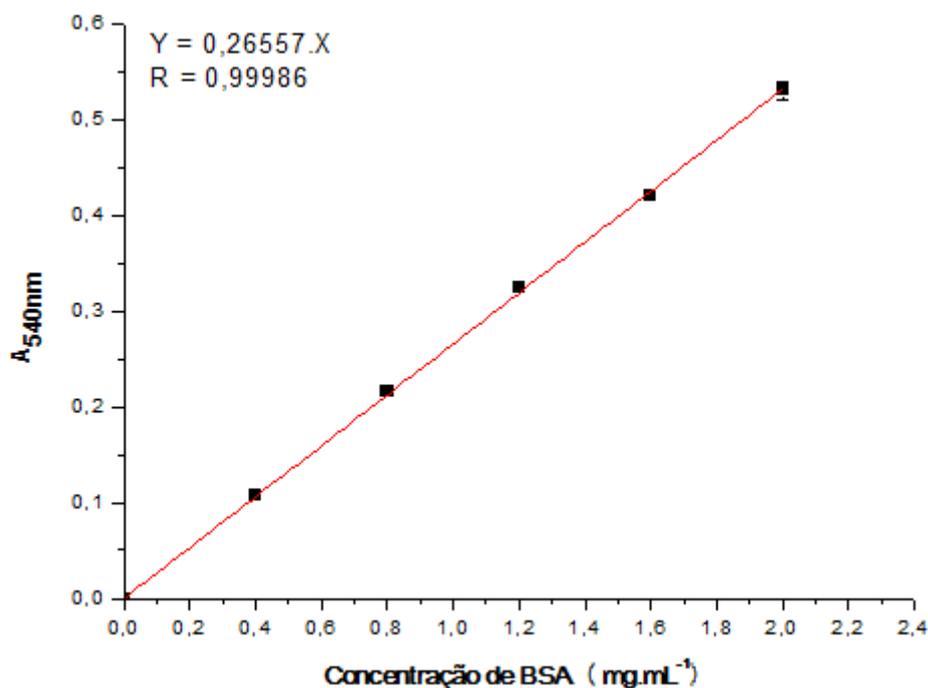
O cálculo da concentração de proteínas nas amostras foi determinado utilizando o coeficiente de absorvidade (a) aplicando a equação de Lambert-Beer, equação 2:

$$A = a \cdot c \text{ (equação 2)}$$

Onde:

- A : absorvância;
- a : coeficiente de absorvidade;
- c : concentração da amostra.

Figura 10 – Curva analítica para determinação do coeficiente de absorvidade da soro albumina bovina (BSA).



A quantificação do teor de proteínas em cada extrato enzimático também foi feita utilizando o método de Biureto. Foram usados para as reações os extratos aquosos e os etanólicos da polpa de maracujá liofilizada.

Após a determinação do conteúdo protéico (mg/mL) e da UA/mL de cada amostra foi calculada a atividade específica das enzimas PME, POD, PPO e da AO (AE_{enzima}) pela razão entre UA/mL e o conteúdo de proteína (mg/mL)

III.7. Compostos Bioativos

Foram feitas dosagens de Vitamina C, fenóis totais e flavonóides.

III.7.1. Determinação de Vitamina C (ácido L-ascórbico)

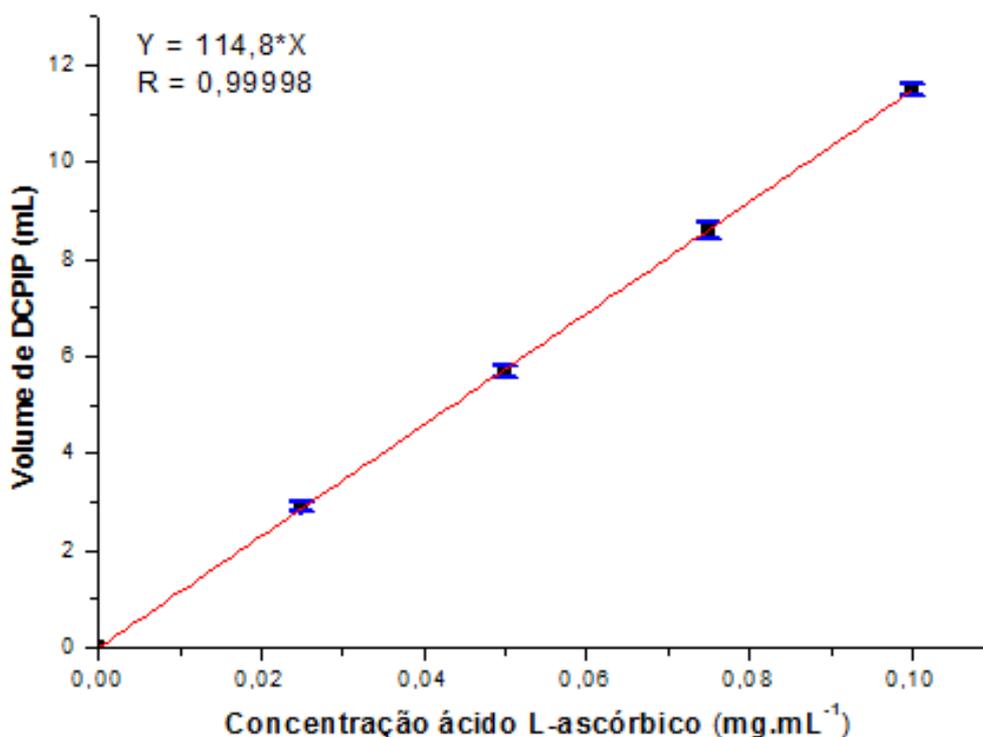
Para determinação do teor de vitamina C foi utilizado o método titulométrico baseado no processo de oxiredução do 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) pelo ácido L-ascórbico, segundo a metodologia da AOAC nº 43605 de 1984 e modificada por Benassi (1990).

O DCPIP em meio básico ou neutro apresenta coloração azul, em meio ácido a coloração rosa, e sua forma reduzida é incolor. O ponto final da titulação foi detectado pela viragem da solução de incolor para rosa, quando se tem todo o ácido L-ascórbico oxidado e DCPIP na forma reduzida.

O preparo da amostra é feito com a homogeneização da polpa bruta *in natura* com uma solução de ácido oxálico 2% em liquidificador.

Para a determinação do conteúdo de vitamina C no meio foi construída uma curva analítica a partir de uma solução padrão de ácido-L-ascórbico, onde determinou-se o coeficiente de absorvidade, utilizando o gráfico DCPIP *versus* concentração de ácido L-ascórbico (mg/mL), como mostrado na figura 11.

Figura 11 – Curva analítica para obtenção do coeficiente de extinção do ácido ascórbico, usando 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP).



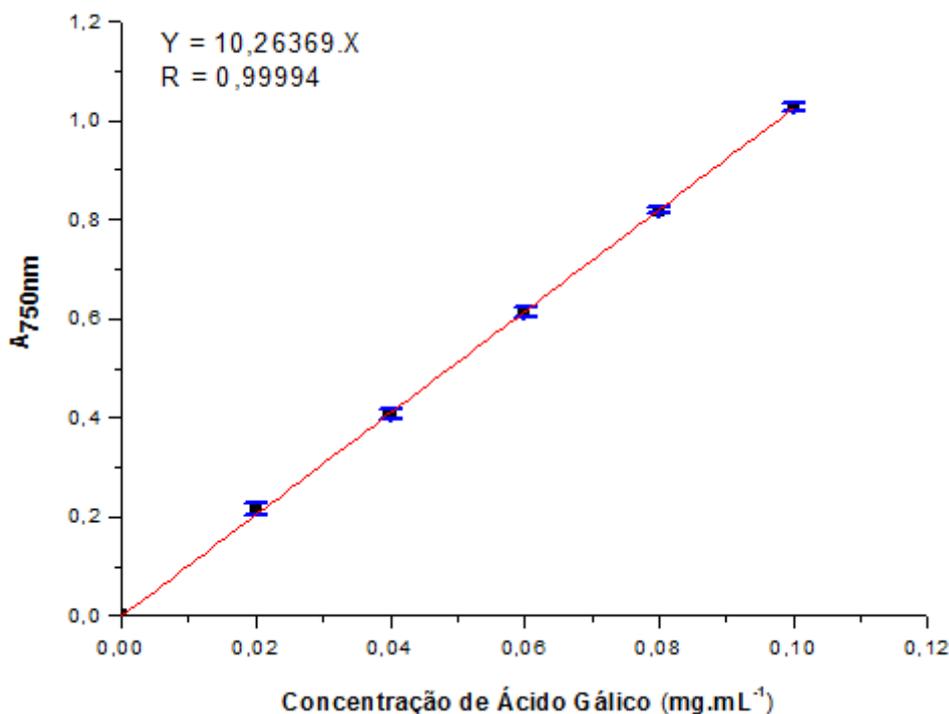
III.7.2. Determinação do conteúdo de fenóis totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de

referência. Nesse caso foram utilizados os extratos aquoso e etanólico das amostras liofilizadas.

O reagente de Folin Ciocalteau oxida os fenolatos, reduzindo-o, formando um complexo de coloração azul no meio reacional (WANG, 2008; SINGLETON, 1998). Os extratos obtidos foram re-diluídos na proporção 1:5 (mL/mL) com volume final de 0,6 mL. Alíquotas de 0,5 mL foram transferidas para um tubo de ensaio, e adicionado 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteau 10% em água. Em seguida foram adicionados 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 7,5%. Após os tubos foram colocados em banho Maria a 50°C por 5 minutos para ocorrer a reação. A leitura de absorbância foi feita a 750 nm. O branco utilizado continha 0,5 mL de água, 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteau 10% em água e 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 7,5%, completando o volume final de 5mL e submetido às mesmas condições das amostras. Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG). A determinação da quantidade de fenóis totais de cada amostra foi calculada utilizando o coeficiente de absorvidade obtido da curva analítica do ácido gálico (fig. 12) com concentrações que variaram de 0,02 à 0,1mg.mL⁻¹.

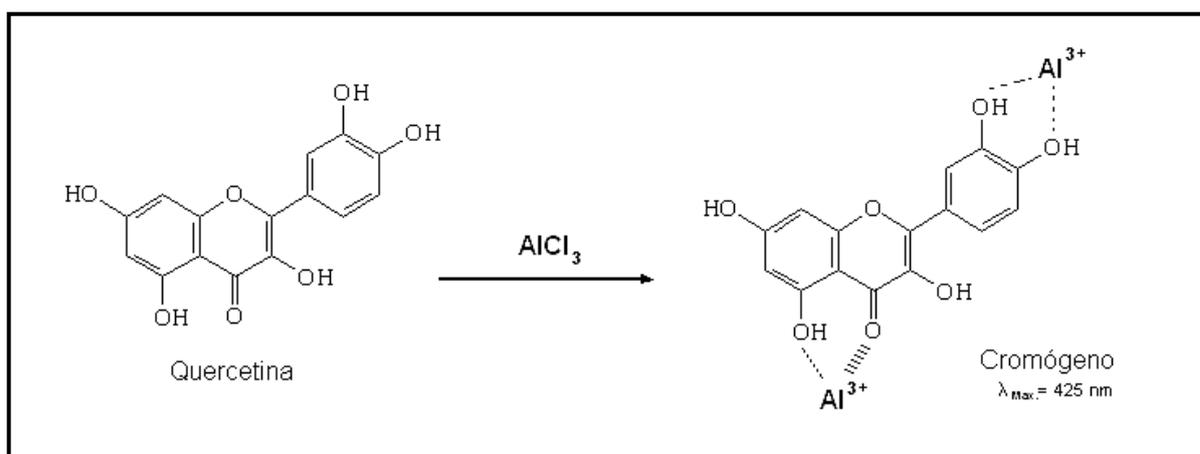
Figura 12 – Curva analítica para determinação do coeficiente de absorvidade do ácido gálico.



III.7.3. Avaliação do conteúdo de Flavonóides Totais

A determinação de flavonóides totais, presentes nos extratos, foi realizado por meio de espectroscopia utilizando o método descrito por Chang et al (2002); Woisky & Salatino (1998) e Markham (1982), com algumas modificações. O método baseia-se no uso de cloreto de alumínio. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides (fig. 13), ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio batocrômico para maiores comprimentos de onda e, também, maior intensidade de absorção de luz. É importante destacar que os compostos fenólicos formam complexos com o Al^{3+} mas tem banda de absorção em comprimentos menores que os complexos flavonóides- Al^{3+} , portanto, não haverá interferência na análise de compostos fenólicos e flavonóides.

Figura 13 – Formação do cromóforo flavonoíde-alumínio.

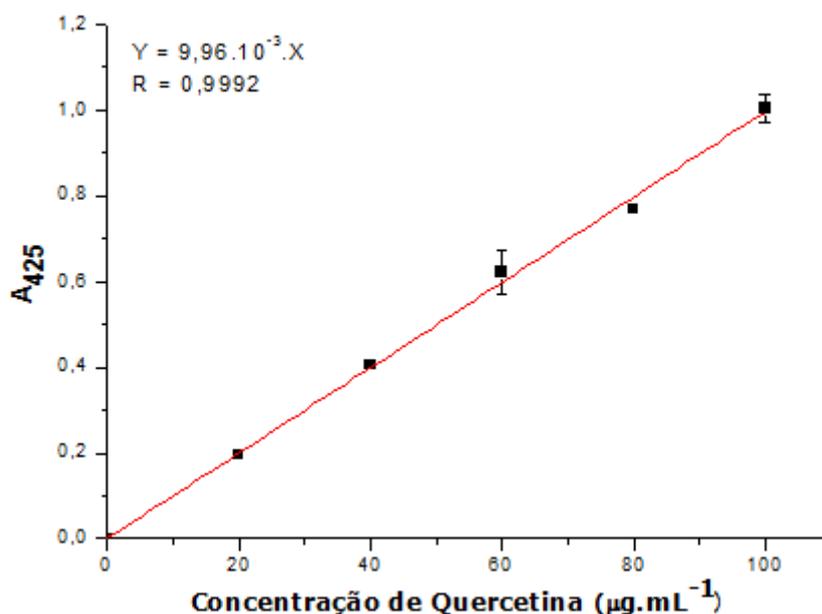


Fonte: Marcucci et al. (1998).

Para cada amostra em análise utilizou-se alíquotas de 250 μL , sendo estas transferidas para um tubo de ensaio, adicionado 1,25 mL de água ultra pura (*Mili-Q*) e 75 μL de Nitrato de Sódio 5%, deixando em repouso por 6 minutos. Após o repouso, foi adicionado 150 μL de cloreto de alumínio 10% em etanol 80%. Novamente deixou-se a reação em repouso por 5 minutos, na ausência de luz. Após os 5 minutos adicionou-se ao meio reacional 500 μL de hidróxido de sódio 1 mol.L^{-1} e 275 μL de água pura (*Mili-Q*). A absorbância foi medida em espectrofotômetro FEMTO 600 Plus a 425nm. Um branco foi feito para cada amostra e continha 250 μL de amostra, 1,25 mL de água ultra pura (*Mili-Q*), 75 μL de Nitrato de Sódio 5%, 500

μL de hidróxido de sódio 1mol.L^{-1} e $425\ \mu\text{L}$ de água pura (*Mili-Q*) adicionados nas mesmas condições de análise das amostras. A absorbância foi medida em espectrofotômetro FEMTO 600 Plus a 425nm . Uma amostra contendo o extrato, sem a solução de cloreto de alumínio, foi utilizada como branco e conduzida nas mesmas condições de análise. Os resultados da quantificação de flavonóides totais foram expressos em equivalente de quercetina (EQ) A determinação da quantidade de flavonóides totais, em cada amostra, foi calculada utilizando o coeficiente de absorvidade obtido da curva analítica da quercetina (fig. 14) em concentrações que variaram de $20 - 100\ \mu\text{g/mL}$.

Figura 14 – Curva analítica para determinação do coeficiente de absorvidade da quercetina.

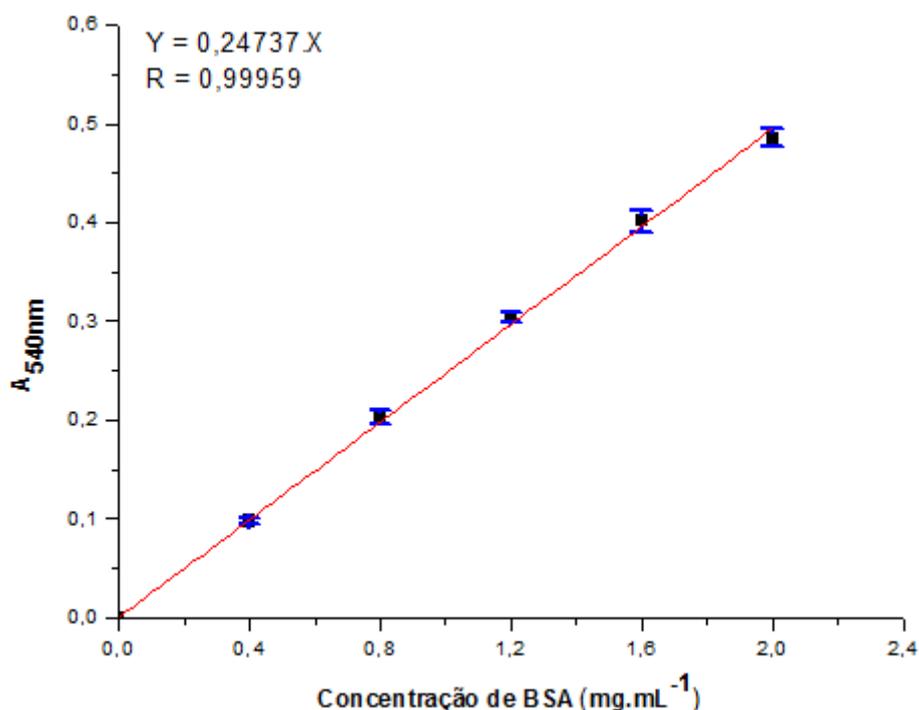


III.8. Determinação do conteúdo de proteína total

A proteína total (g/100g de polpa liofilizada) foi também determinada pelo método do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID; 1949) usando os extratos aquoso e etanólico das amostras liofilizadas.

Nesse caso, o cálculo da concentração de proteínas total nas amostras foi determinado usando outra curva analítica de Soro Albumina Bovina (BSA) e obtendo o coeficiente de absorvidade (a), após aplicando novamente a equação de Lambert-Beer.

Figura 15 – Curva analítica para determinação do coeficiente de absorvidade da soro albumina bovina (BSA).



III.9. Determinação do potencial antioxidante

Foram realizados dois experimentos para determinação do potencial antioxidante das amostras dos híbridos de maracujá amarelo azedo e do maracujá amarelo azedo comercial.

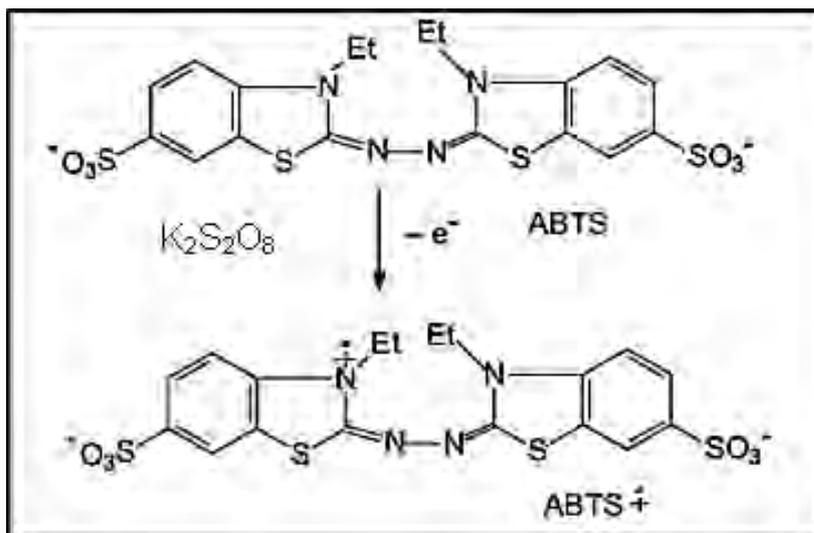
III.9.1. Captura do cátion radical ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método do ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)] foi realizada conforme metodologia descrita por Velloso, et al. (2007) usando os extratos aquoso e etanólico das amostras liofilizadas.

Uma forma usual de expressar os resultados nesse ensaio é calculando o índice denominado IC₅₀, quanto menor o valor de IC₅₀ apresentado pela reação com a amostra em estudo, menor quantidade da amostra será necessária para reduzir 50% do cátion radical ABTS^{•+} e, portanto, maior será sua atividade antioxidante.

O cátion radical $ABTS^{+\cdot}$ foi formado pela reação de 140 mmol.L^{-1} de persulfato de potássio com 7 mmol.L^{-1} de ABTS (fig. 16), armazenado no escuro e na temperatura ambiente, durante 12 a 16 horas. Uma vez formado, o $ABTS^{+\cdot}$ foi diluído em tampão fosfato de sódio (10 mmol.L^{-1} , pH 7,4) até a obtenção do valor de absorvância de $0,750 \pm 0,020$ em 734 nm .

Figura 16 – Representação da formação do cátion $ABTS^{+\cdot}$



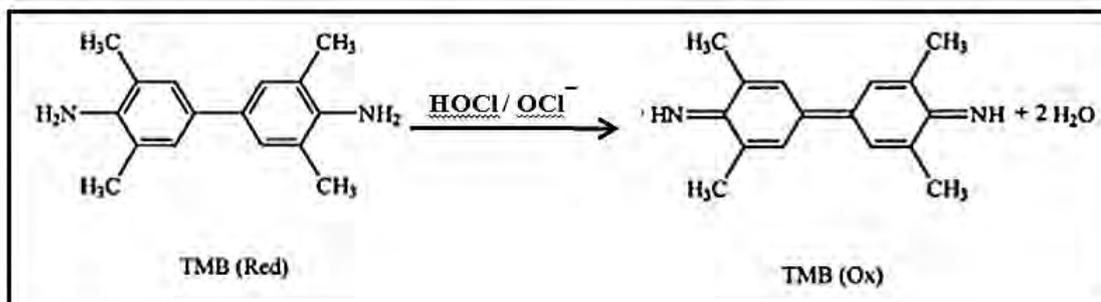
As análises do potencial antioxidante foram determinadas em triplicata e a concentração dos extratos (aquoso e etanólico) das amostras foi de $0,01 \text{ g.mL}^{-1}$. Foram usadas as amostras liofilizadas dos híbridos e do maracujá amarelo comum. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro com microplacas a 734 nm , após 15 minutos de incubação no escuro. O volume total da reação foi de $300 \mu\text{L}$, contendo $100 \mu\text{L}$ de $ABTS^{+\cdot}$, volumes variáveis de amostras ($0,01\text{g/mL}$) e solução tampão fosfato de sódio para completar o volume final.

III.9.2. Ensaio com HOCl e TMB

O ensaio foi realizado segundo Costa, Ximenes e Fonseca (2004), com adaptações necessárias para análises das amostras objeto de estudo. A determinação da capacidade antioxidante baseia-se na habilidade da amostra em análise em capturar o HOCl, impedindo que o mesmo oxide a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Como pode ser visto na figura 17 a oxidação do TMB pelo HOCl/OCl⁻ gera um composto de coloração azul com máximo de absorvância

em 652 nm. Tal método é extremamente sensível para determinação da capacidade antioxidante da amostra no sistema HOCl/TMB. Assim, quanto menor o valor da absorção à 652nm, maior a capacidade antioxidante.

Figura 17 – Representação da oxidação do TMB pelo HOCl/OCl⁻



O agente oxidante é obtido através da diluição do NaOCl 12% em NaOH 10mmol.L⁻¹, onde sua concentração é determinada, antes das análises, utilizando seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 350 \text{ mol.L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 292 nm, ZGLICZYNSKI et al.,1971). O meio reacional consistia de: volumes variados (5 - 100 μL) de amostras (aquosa ou etanólica), seguido de solução tampão fosfato de sódio (50mM), volume de HOCl de forma que no meio tenha uma concentração de 30 μM , repouso por 15 minutos no escuro, e por último 60 μL de TMB (2,8mM), somando um volume final de 300 μL e ficando em repouso por mais 5 minutos. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro, com microplacas, a 652 nm.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Características físico-químicas das frutas *in natura*

As características físico-químicas dos frutos são de grande importância tanto para seu consumo *in natura* quanto para processamento industrial. Os parâmetros analisados foram: massa (g) da fruta inteira, densidade ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) da fruta inteira, massa (g) do conteúdo (polpa e semente), rendimento (%) de conteúdo e pH da polpa da fruta. Na tabela 1 estão relacionados os parâmetros de cada híbrido estudado.

Tabela 1. Características físico-químicas dos híbridos de maracujá-azedo estudados (T= 25°C). (n=3)

Híbrido	FB200	FB300	BRS Ouro Vermelho	BRS Gigante Amarelo	BRS Sol do Cerrado
Massa fruta (g)	275,8	147,7	248,2	245,4	193,4
Volume fruta (mL)	293,8	158,3	256,2	200,0	261,2
Densidade (g/mL)	0,939	0,933	0,969	0,939	0,967
Massa de polpa (g)	97,7	49,1	71,4	91,1	75,5
Rendimento de polpa (%)	35,4	33,2	28,8	37,1	39,0
pH da polpa	3,07	3,11	3,06	3,03	3,04

Outros parâmetros importantes em relação aos híbridos estudados são: i) cores dos frutos, e ii) produtividade. O híbrido FB200 apresenta coloração uniforme amarela esverdeada, o FB300 apresenta cores não uniformes, com frutos amarelos e roxos; o BRS Ouro Vermelho coloração vermelha e arroxeadada, o BRS Gigante Amarelo coloração amarela esverdeada e o BRS Sol do Cerrado com coloração amarela. Os híbridos FB200 e FB300 apresentam produtividade de 50 ton/ha/ano, os híbridos BRS Ouro Vermelho e BRS Sol do Cerrado 40 ton/ha/ano e o BRS Gigante Amarelo de 20 a 25 ton/ha/ano.(Viveiros Flora Brasil).

Os dados obtidos indicam que: o híbrido FB200 tem maior massa (g) de fruta e de polpa e está entre os três híbridos com maior rendimento de polpa com 35,4%, ficando atrás do BRS Sol do Cerrado (39,0%) e do BRS Gigante Amarelo (37,1%), e também maior produção por ano. Comparando com o híbrido BRS Gigante Amarelo, o híbrido FB200 tem cerca do dobro de produtividade. Possivelmente pra indústria,

o híbrido FB200 poderá ser o melhor híbrido para o processamento industrial (custo/benefício) analisando apenas os dados mostrados.

Em segundo lugar, de interesse para a industrialização, seria o híbrido BRS Sol do Cerrado, analisando apenas esses dados obtidos, pois o rendimento de polpa é o maior de todos.

IV.2. Determinação da unidade de atividade da PME, POD, PPO e AO

Importante salientar que, na literatura científica, até o momento, não foram encontrados dados das referidas enzimas em relação aos híbridos objetos de estudo.

Com os extratos obtidos das polpas dos híbridos foram realizados os estudos cinéticos. Cada enzima teve sua atividade mensurada de forma específica.

IV.2.1. Atividade enzimática da PME

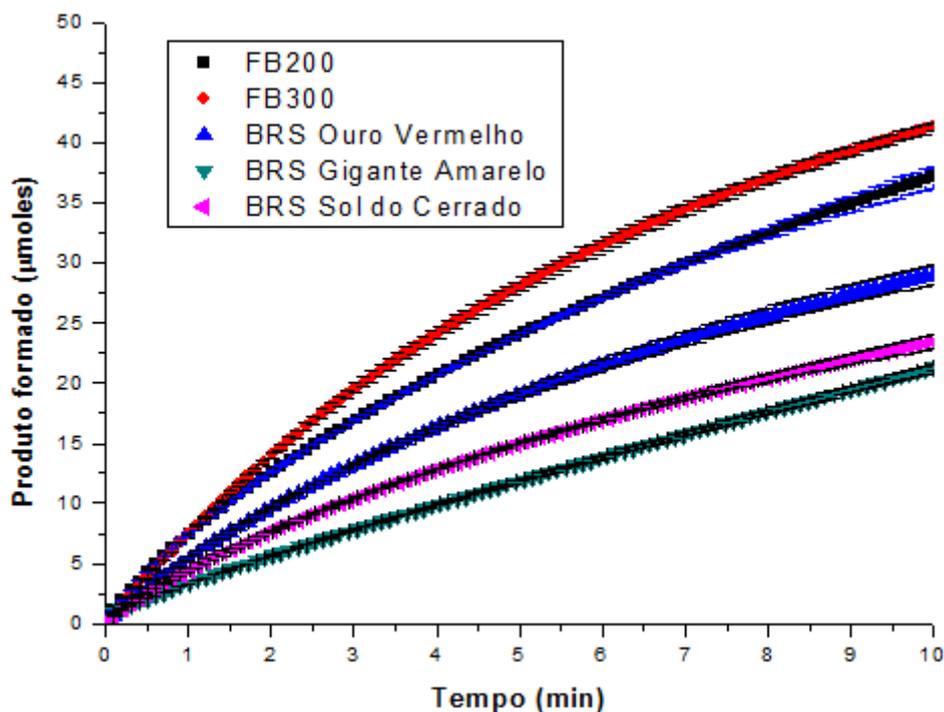
Como já mencionado a PME é responsável pela catálise da desmetilação da pectina nas frutas, o que implica em modificações na textura (processo de crescimento, amadurecimento e senescência) que é de grande importância no mecanismo de amolecimento de frutas e vegetais (CARDELLO; LOURENÇO, 1995).

Os ensaios foram realizados com o substrato pectina cítrica e os resultados obtidos, expressos em UA/mL de extrato encontram-se na tabela 2 e figura 18.

Tabela 2. Atividade da PME nos híbridos estudados. Condições de ensaio: 15 mL de solução de pectina cítrica (0,25%); NaCl (0,15 mol.L⁻¹); 0,5 mL de extrato concentrado de PME; água destilada; NaOH (0,1 mol.L⁻¹); T=50°C, volume final 30 mL, tempo de reação 10 minutos. (n=3).

Híbrido	UA/mL de extrato	Desvio Padrão
FB200	13,55	0,3651
FB300	14,23	0,2734
BRS Ouro Vermelho	10,85	0,1491
BRS Gigante Amarelo	5,92	0,0395
BRS Sol do Cerrado	9,32	0,1250

Figura 18 – Comportamento cinético da PME.



Pelos resultados obtidos nota-se que há uma diferença significativa entre os híbridos estudados, sendo que o BRS Gigante Amarelo apresentou uma menor UA/mL de extrato em relação aos demais.

Os ensaios indicaram também uma menor atividade enzimática da PME em relação aos estudos realizados em nosso laboratório (pesquisa em andamento), onde para o maracujá amarelo azedo disponível no mercado nacional a atividade enzimática foi de 20,21 UA/mL (+/- 0,7495).

Analisando os dados em termos das implicações da PME em processamento industriais, menor ação catalítica implica em menor efeito indesejável na produção de suco. Mas para a produção de néctar, favorece.

Assim, o híbrido BRS Sol do Cerrado, que tem maior rendimento de polpa, excelente produção (40 ton/ha/ano) poderá ser o mais indicado pois tem baixa UA/mL de extrato.

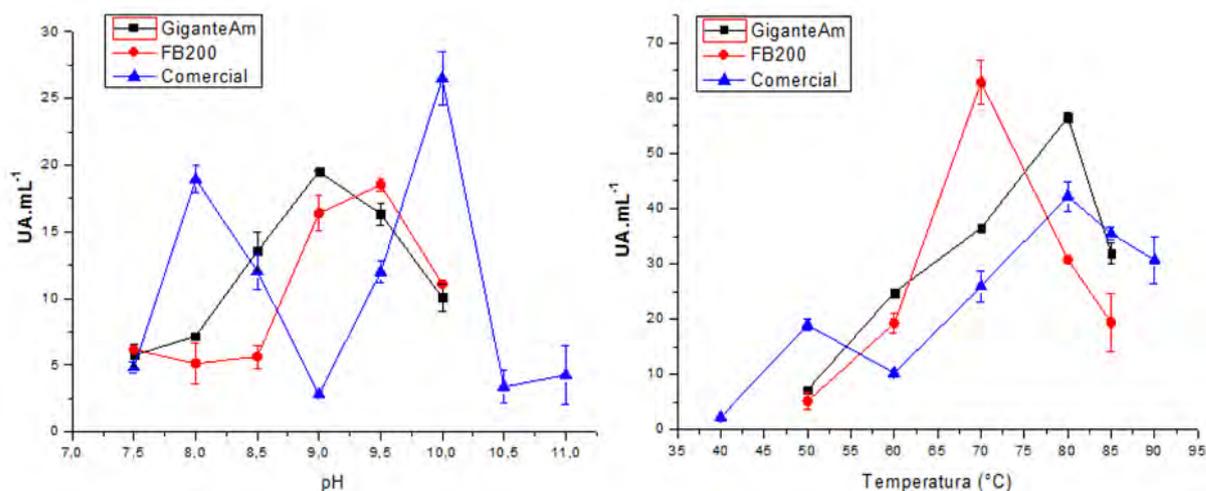
Mas, para a análise de qual ou quais seriam os indicados, tem que ter outros parâmetros que auxiliarão no híbrido mais adequado.

IV.2.1.1. Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima da PME

Para a determinação do pH ótimo e da temperatura ótima foram escolhidos os híbridos FB200 e BRS Gigante Amarelo, pois estes apresentaram uma das maiores e a menor atividade enzimática, respectivamente. Em relação ao resultado observado para a amostra comercial os híbridos apresentaram apenas um valor ótimo para ambos os parâmetros. Uma hipótese é que a amostra comercial é uma mistura de maracujás de vários lugares e por isso apresenta, como visto, dois valores de pH e temperaturas ótimas para a atividade da enzima PME.

Uma outra possível explicação é que o extrato concentrado da PME no maracujá amarelo comercial estejam presentes isoenzimas.

Figura 19 – Comportamento do pH ótimo e da temperatura ótima da PME.

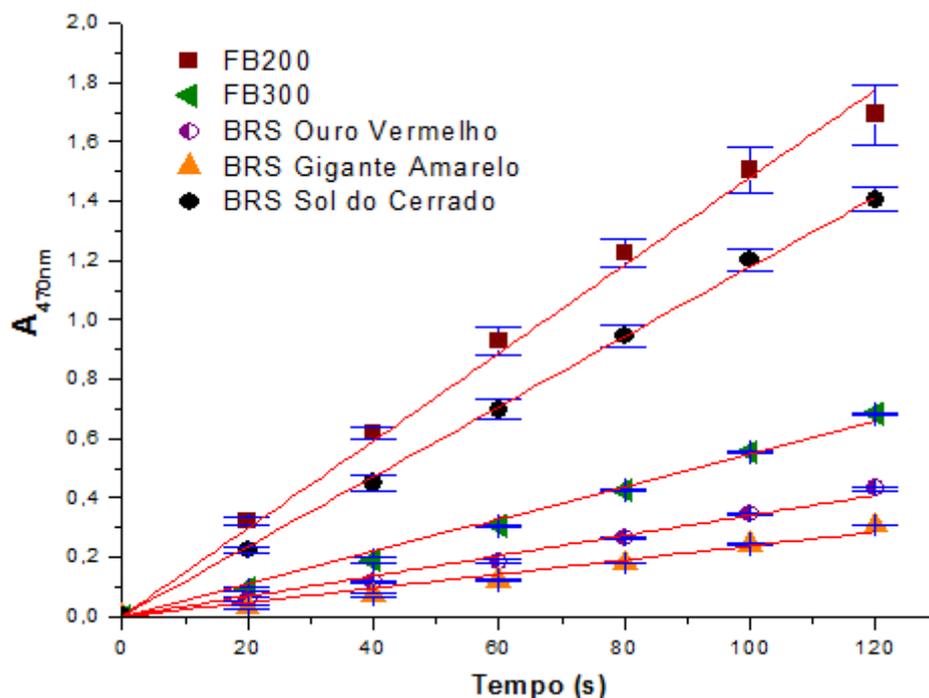


IV.2.2. Atividade enzimática da POD

Essa enzima faz parte de um grande número de enzimas conhecidas como oxireduases, podendo promover uma variedade de reações. A investigação desse grupo de enzima tem sido de grande importância para a tecnologia de alimentos, uma vez que a continuidade da atividade enzimática pode ocasionar mudança na cor, variações de aroma, alterações no teor de vitaminas e até modificações na textura (ZANATTA, 2006).

Observa-se na figura 20 o comportamento cinético da POD para todos os híbridos de maracujá amarelo azedo estudados.

Figura 20 – Comportamento cinético da enzima POD.



Como descrito no item III.6.2.2. a unidade de atividade enzimática foi calculada e os valores da média e desvio padrão da unidade de atividade enzimática obtidos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Atividade da POD nos híbridos estudados. Condições de ensaio: 200 μL de extrato concentrado de POD; peróxido de hidrogênio ($3,12 \text{ mmol.L}^{-1}$); guaiacol ($16,34 \text{ mmol.L}^{-1}$); solução tampão ácido bórico/Bórax (50 mmol.L^{-1} , pH 8,0), T = 25°C , Tempo de reação: 2 minutos. (n=3)

Híbrido	UA/mL de extrato	Desvio Padrão
FB200	74,00	0,7212
FB300	27,35	0,0566
BRS Ouro Vermelho	17,03	0,0566
BRS Gigante Amarelo	11,90	0,0566
BRS Sol do Cerrado	58,90	0,5091

Os híbridos FB200 e BRS Sol do Cerrado foram os que apresentaram maior UA/mL entre os demais híbridos estudados, bem como, em relação à amostra de polpa de maracujá amarelo azedo disponível no mercado nacional, que foi analisado em outro estudo realizado paralelamente por nosso grupo (PEREIRA, 2012) ainda não publicados, que apresentou uma atividade enzimática para a POD de $46,20 (+/- 0,2828)$ UA/mL.

De forma similar a análise feita individual dos dados, a POD pode implicar em perdas significativas da qualidade do produto final industrializado. Assim, os híbridos FB200 e BRS Sol do Cerrado seriam os menos indicados para a industrialização. Já o híbrido BRS Gigante Amarelo seria o mais indicado. Entretanto, ainda é uma análise isolada.

Figura 21 – Comportamento da atividade enzimática (UA/mL) de extrato da POD.



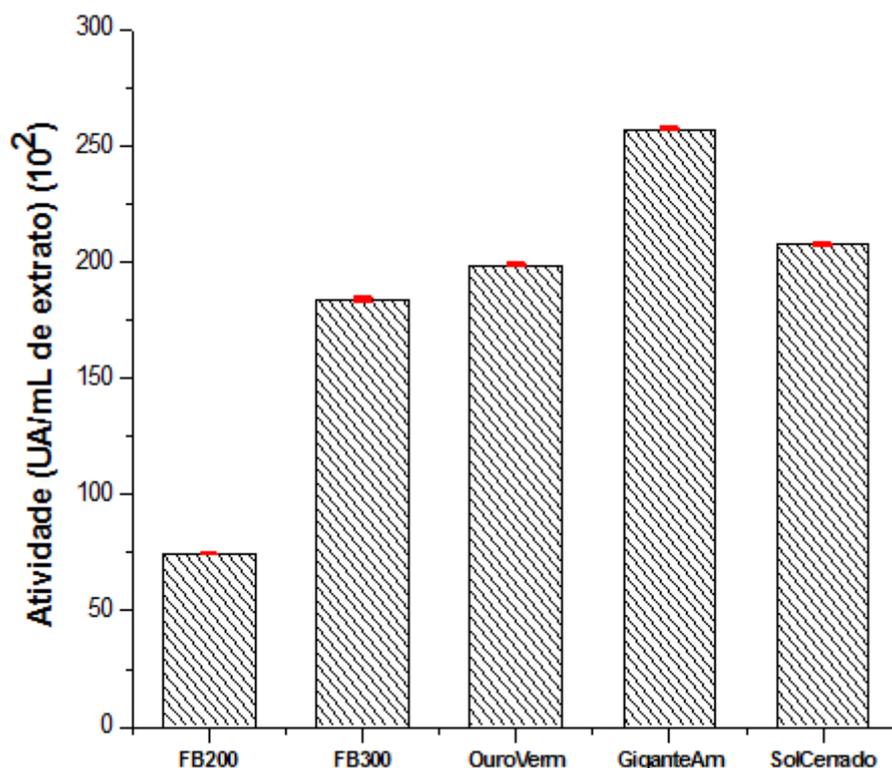
Quando se compara os valores de atividade enzimática da POD com outras fontes encontradas na literatura, verifica-se que os híbridos apresentam valores inferiores. O pêssego e a mandioca, por exemplos, apresentam atividades de POD de 262 UA/mL e 1738 UA/mL, respectivamente (VIEIRA; LUPETTI; FATIBELLO-FILHO; 2003). Uma possível explicação seria que esses exemplos, em contato com o ar, escurecem mais rápido.

IV.2.3. Atividade enzimática da PPO

As reações de escurecimento catalisadas pela PPO presente em sucos/frutas podem gerar produtos que alteram a cor do produto final.

Observa-se na figura 22 as atividades da PPO para os híbridos de maracujá amarelo azedo estudados.

Figura 22 – Atividade enzimática (UA.mL⁻¹) da PPO nos híbridos estudados.



Os valores da média e desvio padrão da unidade de atividade enzimática obtidos estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4. Atividade da PPO nos híbridos estudados. Condições de ensaio: extrato concentrado de PPO; 900µL de catecol (0,12 mol.L⁻¹); solução tampão fosfato de sódio (50mmol.L⁻¹, pH 6,0). T=25°C, volume final 3,0 mL. Tempo de reação: 1 minuto. (n=3)

Híbrido	UA/mL de extrato (10 ²)	Desvio Padrão
FB200	74,5	0,1741
FB300	183,5	0,6562
BRS Ouro Vermelho	198,5	0,5699
BRS Gigante Amarelo	256,9	0,5317
BRS Sol do Cerrado	207,4	0,6882

Todos os híbridos apresentaram maior UA/mL em relação à amostra de polpa de maracujá amarelo azedo disponível no mercado nacional, análises feitas em nosso laboratório (PEREIRA, 2012), dados não publicados, que apresentou uma atividade enzimática para PPO de aproximadamente 22,3x10² UA/mL de extrato concentrado de PPO.

A PPO constitui o sistema enzimático que mais afeta a qualidade de um alimento, independente se industrializado ou não. De forma isolada, analisando os dados obtidos, o híbrido FB200 poderia ser o mais indicado para a industrialização, pois tem menor UA/mL. É interessante verificar que o híbrido BRS Gigante Amarelo, em relação a PME e a POD, estaria entre os indicados para industrialização. No caso da PPO seria o primeiro a não ser indicado.

IV.2.4. Atividade enzimática da AO

A atividade da AO no extrato foi mensurada nas condições de ensaios descritas no item III.6.2.4. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.

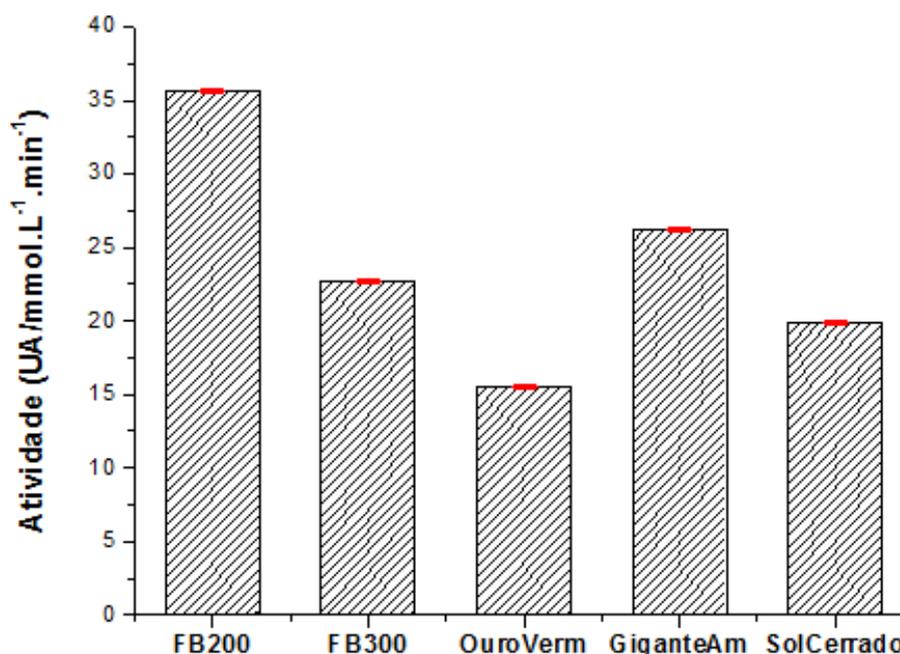
Tabela 5. Atividade da AO nos híbridos em estudo. Condições de ensaio: 100 µL de extrato concentrado de AO; 600 µL de ácido ascórbico (1 mmol.L⁻¹); solução tampão citrato/ácido cítrico (25 mmol.L⁻¹, pH 5,0). T=25°C. (n=3).

Híbrido	UA/mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹	Desvio Padrão
FB200	35,62	0,00251
FB300	22,68	0,00534
BRS Ouro Vermelho	15,50	0,00288
BRS Gigante Amarelo	26,16	0,00372
BRS Sol do Cerrado	19,84	0,00226

A atividade enzimática de todos os híbridos apresentaram valores menores em relação à variedade de maracujá amarelo azedo disponível no mercado nacional, cujo estudo foi feito em nosso laboratório (pesquisa em andamento), que apresentou uma atividade enzimática para AO de cerca de 55 UA/mmol.L⁻¹min⁻¹.

O comportamento cinético da AO para todos os híbridos de maracujá amarelo azedo estudados está apresentado na figura 23.

Figura 23 – Comportamento da atividade enzimática (UA/mmol.L⁻¹.min⁻¹) da AO.



Em relação a AO, o híbrido menos indicado é o FB200. O híbrido BRS Ouro Vermelho, em relação aos demais, é o que apresenta menor UA/mL de extrato.

Para uma análise mais precisa em relação as enzimas, tem que ser feito o cálculo da atividade específica.

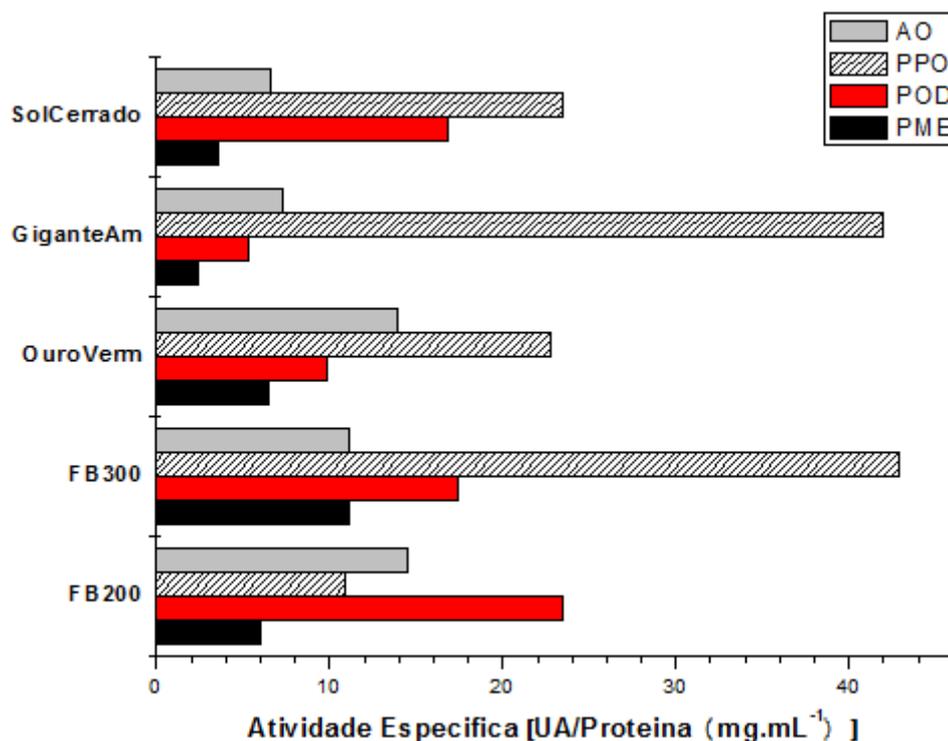
IV.3. Atividade Específica (AE)

Após a determinação do conteúdo protéico (mg.mL⁻¹) e da unidade de atividade enzimática (UA.mL⁻¹), foi calculada a atividade específica das enzimas PME, POD, PPO e da AO.

Tabela 6. Atividade específica das enzimas PME, POD, PPO e AO nos híbridos da cultivar maracujá-amarelo. Condições de ensaio: amostra de extrato concentrado de cada enzima, solvente, reagente de biureto, repouso por 5 minutos, T = 25°C. (n=3).

Híbrido	Atividade enzimática [UA/(mg) Proteína]			
	PME	POD	PPO	AO
FB200	6,0	23,4	10,9	14,4
FB300	11,1	17,4	42,8	11,1
BRS Ouro Vermelho	6,4	9,9	22,8	14,0
BRS Gigante Amarelo	2,4	5,2	42,0	7,3
BRS Sol do Cerrado	3,6	16,8	23,4	6,6

Figura 24 – Comportamento das atividades específicas das enzimas PME, POD, PPO e AO dos híbridos.



A análise geral dos dados mostra que o híbrido BRS Gigante Amarelo apresentou menor atividade específica (AE) na maioria dos híbridos estudados. Portanto, tem menor quantidade de enzima ativa por mg de proteínas totais no extrato de polpa.

Os híbridos que tem maior atividade específica em relação a AO, PPO, POD e PME, são, respectivamente, FB200 e BRS Ouro Vermelho, BRS Gigante Amarelo e FB300, FB200 e FB300.

IV.6. Compostos Bioativos

IV.6.1. Determinação do conteúdo de Vitamina C

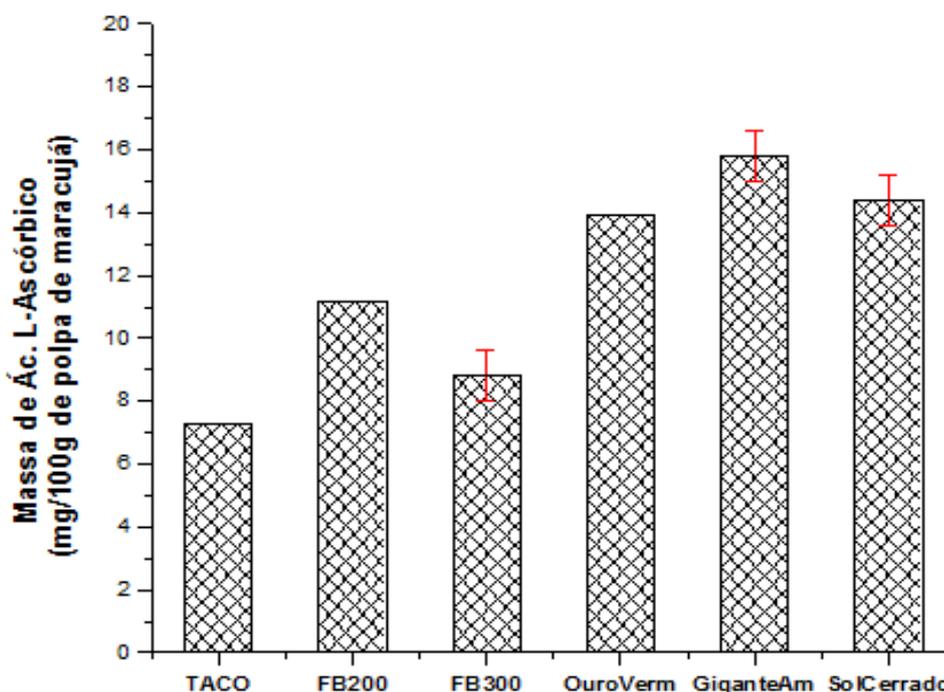
A investigação do conteúdo de vitamina C é importante, pois sua degradação ocorre durante o processamento de sucos. Os conteúdos de vitamina C determinados nas amostras de polpa congelada, mostraram-se acima do valor encontrado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2011) onde o conteúdo de vitamina C é de 7,3 mg por 100 g de material (polpa de maracujá

congelada – *Passiflora edulis f. flavicarpa*). Esses resultados estão apresentados na tabela 7 e figura 25.

Tabela 7. Conteúdos de vitamina C encontrados nos híbridos de maracujá azedo. Condições de ensaio: 10 mL de extrato diluído em ácido oxálico 2%; solução 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), T = 25°C, e valor encontrado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). (n=3).

Híbrido	Vitamina C* (mg/100g polpa)	Desvio
FB200	11,1	0
FB300	8,8	0,8047
BRS Ouro Vermelho	13,9	0
BRS Gigante Amarelo	15,8	0,8044
BRS Sol do Cerrado	14,4	0,8047
TACO	7,3	-

Figura 25 – Conteúdos de vitamina C encontrados nos híbridos de maracujá azedo.



Nesse caso o híbrido BRS Gigante Amarelo apresenta maior teor, seguido do BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho. Associando esses valores com os obtidos nas análises das enzimas, destaca-se o híbrido BRS Gigante Amarelo que contém maior conteúdo de Vitamina C e menor atividade específica (AE) na maioria dos sistemas enzimáticos estudados (análise parcial dos dados). Assim espera-se

que o BRS Gigante amarelo esteja entre os híbridos que apresenta maior atividade antioxidante.

Devido aos fatores já descritos na introdução é de grande relevância saber o conteúdo de vitamina C e estudar formas de minimizar sua perda, devido ao processo de oxidação, durante o processamento industrial e a sua interação com determinadas enzimas intrínsecas da fruta que podem levar a degradação nutricional e ao escurecimento da polpa processada.

Comparando com outras frutas, usando a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2011) como referência, nota-se que os conteúdos encontrados estão acima dos teores de vitamina C de frutas que também tem grande consumo como o abacaxi que apresenta um conteúdo de 1,2 mg por 100g de polpa congelada e do cupuaçu cujo conteúdo é de 10,5 mg por 100g de polpa congelada. Porém, os teores encontrados mostraram-se inferiores ao conteúdo de vitamina C da acerola que oferece 623,2 mg por 100g de polpa.

IV.6.2. Determinação do conteúdo de fenóis totais

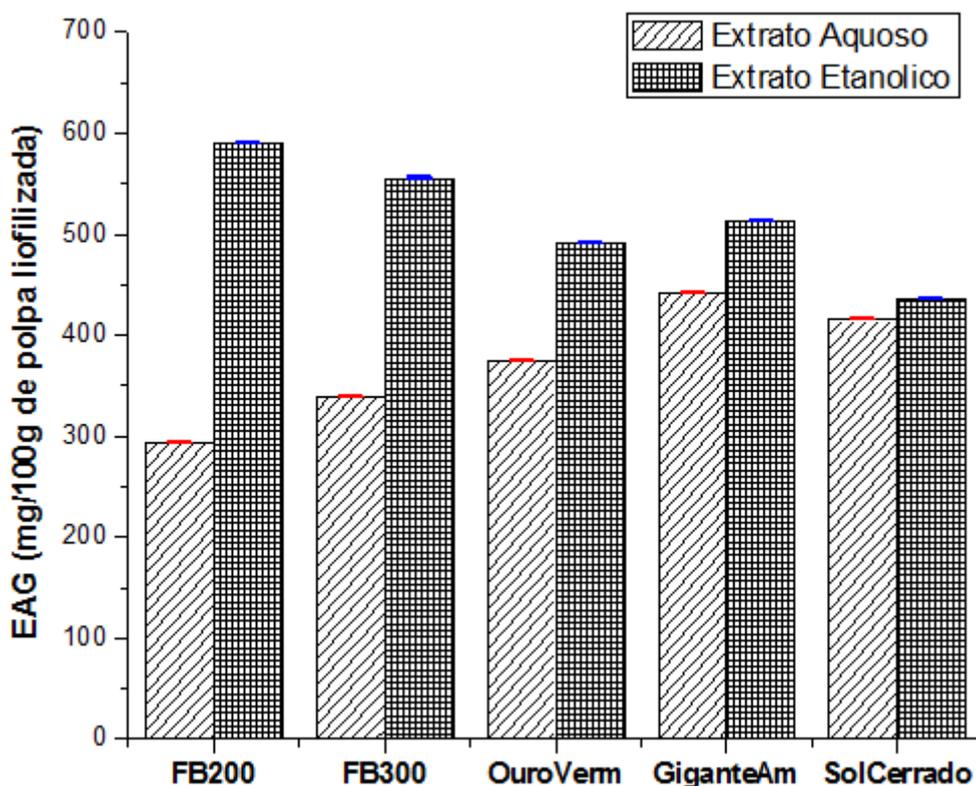
Os conteúdos de fenóis totais determinado nos extratos das amostras em estudo podem ser vistos na figura 26 e tabela 8. Os extratos usados foram o aquoso e o etanólico da polpa de maracujá liofilizada. Como esperado, as análises mostram que a extração etanólica foi mais eficiente que a extração aquosa, para todos os híbridos estudados.

Os resultados indicam que os dados obtidos, comparando extrato aquoso e extrato etanólico, são diferentes tanto no próprio híbrido como entre eles (exceto para o híbrido BRS Sol do Cerrado que apresentou valores semelhantes).

Tabela 8. Conteúdo de fenóis totais nos híbridos da cultivar maracujá-amarelo, expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) (mg de ácido gálico/100g polpa liofilizada). Condições de ensaio: 500µL de extrato diluído, 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10%, 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 7,5%, incubação por 5 minutos em banho-maria a 50°C. (n=3)

Híbrido	EAG mg/100g de polpa			
	Extrato Aquoso		Extrato Etanólico	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
FB200	294,2	0,1017	590,2	0,2854
FB300	339,1	0,0946	555,5	0,2056
BRS Ouro Vermelho	375,4	0,0494	491,9	0,1538
BRS Gigante Amarelo	441,6	0,1075	513,3	0,1895
BRS Sol do Cerrado	415,2	0,1387	435,1	0,1972

Figura 26 – Comportamento da extração etanólica e aquosa dos compostos fenólicos dos híbridos.



Considerando o conteúdo de fenóis no meio aquoso, outra vez o híbrido BRS Gigante Amarelo está entre os que tem maior conteúdo, diferente do híbrido FB200 que apresenta menor teor.

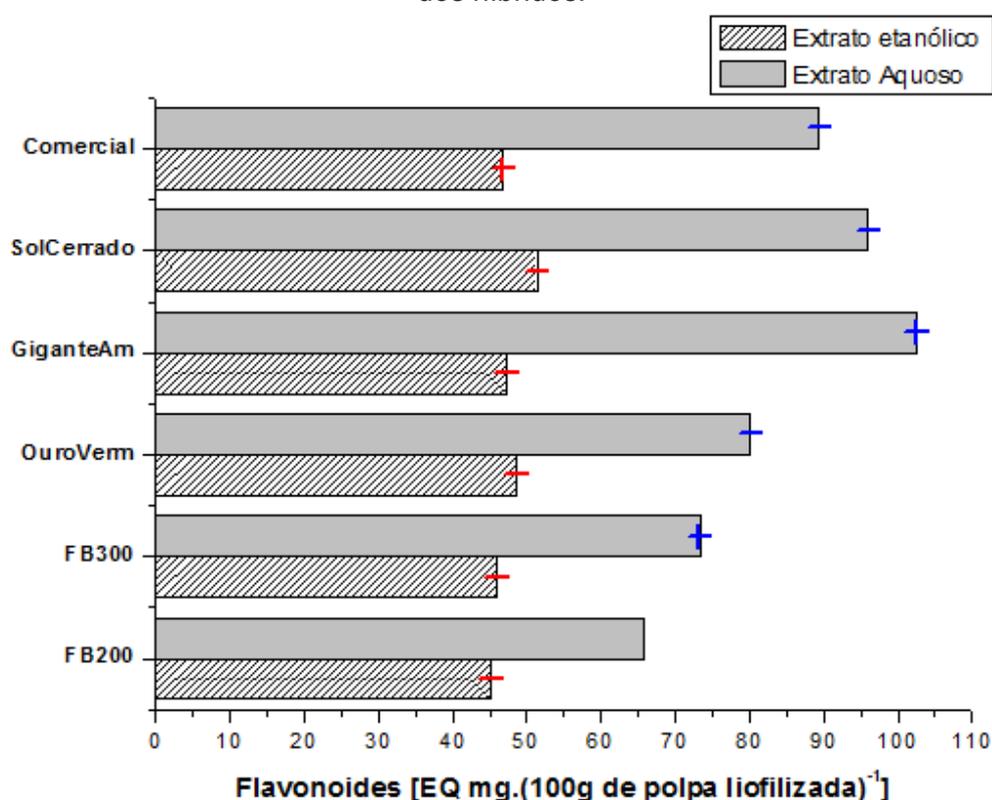
IV.6.3. Determinação do conteúdo de flavonóides

Os resultados obtidos na quantificação dos flavonóides podem ser vistos na tabela 10 figura 27. Os extratos usados foram o aquoso e o etanólico da polpa de maracujá liofilizada. Ao contrário do observado na análise dos compostos fenólicos a extração aquosa foi mais eficiente que a extração etanólica, em todos os híbridos estudados.

Tabela 10. Conteúdo de flavonóides totais nos híbridos da cultivar maracujá-amarelo, expressos em equivalentes de Quercetina (EQ) (mg de quercetina /100g de polpa liofilizada). Condições de ensaio: extrato (0,1 mg/mL), Nitrato de Sódio 5%, Cloreto de Alumínio 10% em etanol 80%, Hidróxido de Sódio 1 mol.L⁻¹ e água ultra pura (*Mili-Q*) para completar volume final de 2,5 mL. (n=3).

Híbrido	EQ mg/100g de polpa liofilizada			
	Extrato Etanólico		Extrato Aquoso	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
FB200	45,18	0,0007	65,86	0,0000
FB300	45,98	0,0007	73,29	0,0057
BRS Ouro Vermelho	48,59	0,0028	80,12	0,0007
BRS Gigante Amarelo	47,19	0,0007	102,40	0,0057
BRS Sol do Cerrado	51,41	0,0028	95,98	0,0014
Comercial	46,79	0,0071	89,36	0,0021

Figura 27 – Comportamento da extração etanólica e aquosa do conteúdo de flavonóides dos híbridos.



IV.7. Determinação do conteúdo de proteína total

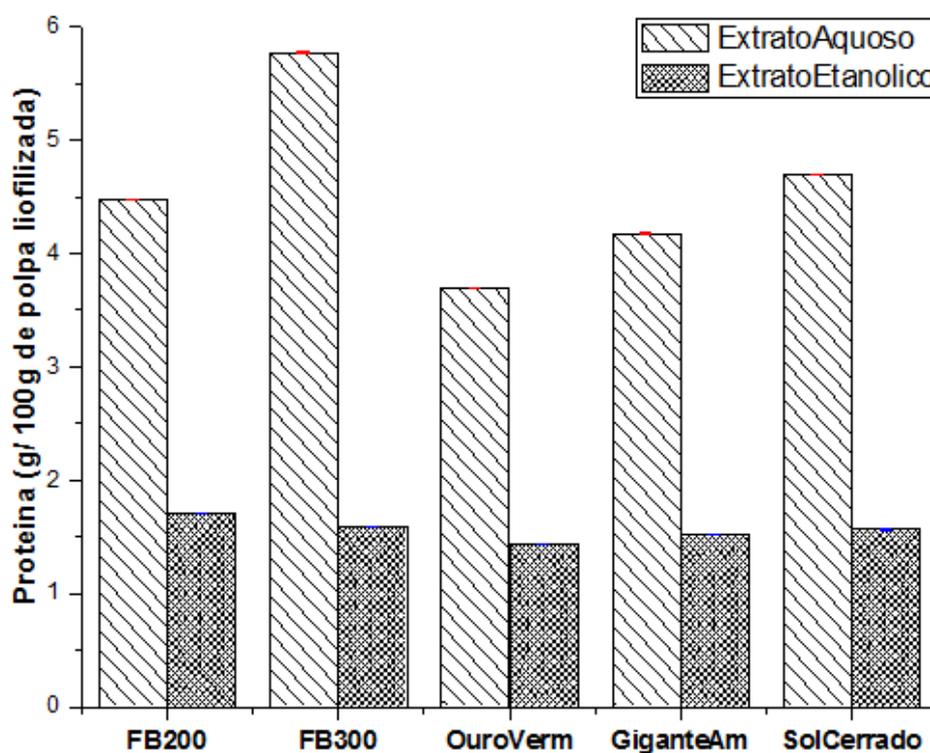
A quantificação do conteúdo de proteína total foi feito pelo método do biureto. Foram usados para as análises dos extratos aquosos e etanólicos da polpa de maracujá liofilizada.

Pelos dados obtidos (tabela 9) a maioria dos híbridos não apresenta diferença significativa no conteúdo de proteína total.

Tabela 9. Conteúdo de proteína total nos híbridos da cultivar maracujá-amarelo. Condições de ensaio: 200 µL de extrato, 800 µL do solvente, 4 mL do reagente de biureto, repouso por 5 minutos, T = 25°C. (n=3).

Híbrido	Proteína (g/100g de polpa liofilizada)			
	Extrato Aquoso		Extrato Etanólico	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
FB200	4,5	0,0029	1,7	0,0003
FB300	5,8	0,0046	1,6	0,0003
BRS Ouro Vermelho	3,7	0,0021	1,4	0,0008
BRS Gigante Amarelo	4,2	0,0030	1,5	0,0002
BRS Sol do Cerrado	4,7	0,0007	1,6	0,0002

Figura 28 – Comportamento da extração etanólica e aquosa das proteínas totais dos híbridos.



Semelhante ao que foi visto na quantificação de compostos fenólicos, os resultados obtidos também mostraram diferenças entre os dados em relação ao tipo de meio utilizado no procedimento extrativo, se aquoso ou etanólico. Portanto a extração aquosa foi mais eficiente que a extração etanólica.

Interessante observar que uma pequena parcela das proteínas (ou peptídeos) das amostras solubiliza em etanol devido, provavelmente, a sua interação hidrofóbica.

IV. 8. Determinação da capacidade antioxidante

Importante informar que, na literatura científica, até o momento, não foram encontrados dados sobre a atividade antioxidante nos híbridos em estudo.

IV.8.1. Captura do cátion radical ABTS^{•+}

A capacidade de captura do radical ABTS^{•+} do extrato aquoso e etanólico das amostras estão expostos na tabela 11 e figura 29.

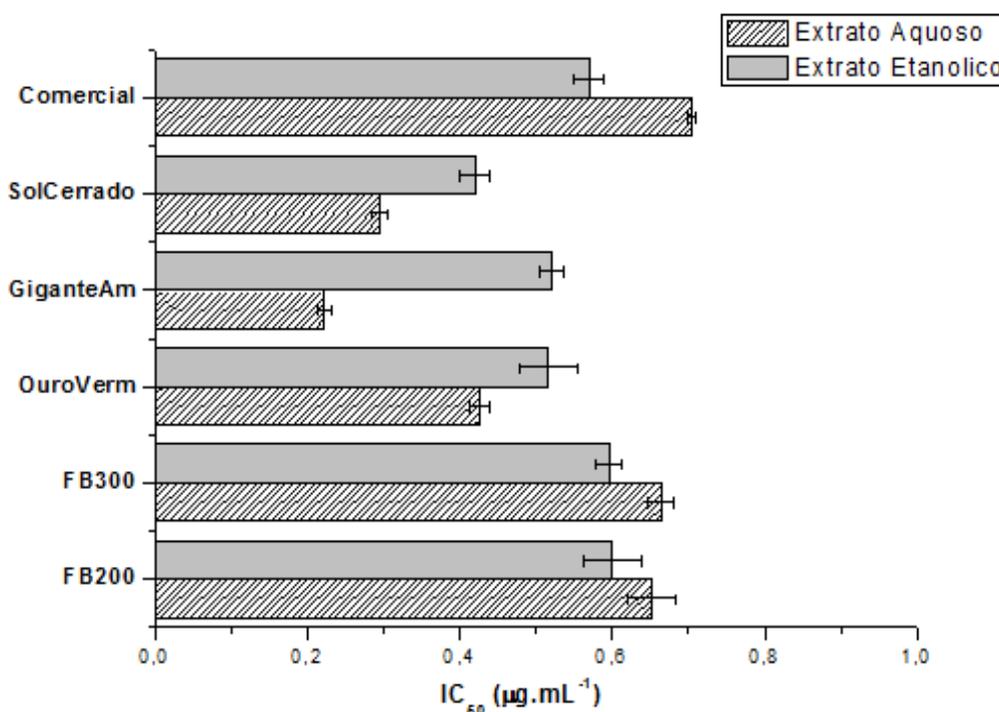
Tabela 11. Capacidade antioxidante dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo e do maracujá amarelo azedo comum. Condições de ensaio: 100 µL da solução de ABTS^{•+}, Volumes variáveis de extrato (0,01 g/mL), solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4) para completar o volume para 300 µL. Repouso por 15 minutos, leitura a 734nm no espectrofotômetro de placa Biotek, T = 25°C. (n=3)

Híbrido	ABTS ^{•+} - IC ₅₀ (µg/mL)			
	Extrato Aquoso		Extrato Etanólico	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
FB200	0,651	0,0309	0,600	0,0387
FB300	0,664	0,0170	0,595	0,0166
BRS Ouro Vermelho	0,425	0,0127	0,516	0,0373
BRS Gigante Amarelo	0,221	0,0090	0,520	0,0164
BRS Sol do Cerrado	0,295	0,0104	0,419	0,0200
Comercial	0,705	0,0055	0,569	0,0196

O extrato aquoso apresentou a seguinte sequência, em ordem crescente de valores, para a capacidade antioxidante (IC₅₀): BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, FB200 e FB300. A capacidade antioxidante do maracujá amarelo azedo comercial também foi mensurada e mostrou menor

capacidade diante os híbridos estudados. O extrato etanólico apresentou comportamento semelhante, apresentando a seguinte ordem de IC₅₀ (crescente): BRS Gigante Amarelo, BRS Ouro Vermelho, BRS Sol do Cerrado, FB300 e FB200. O extrato etanólico do maracujá comum mostrou uma atividade antioxidante intermediária frente aos demais híbridos.

Figura 29 – Capacidade antioxidante dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo e do maracujá amarelo azedo comum, via radical ABTS^{•+}.



Percebe-se que tanto o extrato aquoso quanto etanólico apresentaram melhor atividade antioxidante (menor IC₅₀) para as amostras dos híbridos BRS Gigante Amarelo, BRS Ouro Vermelho e BRS Sol do Cerrado.

Como pode ser visto, o híbrido BRS Gigante Amarelo está entre os híbridos estudados que apresentou maior capacidade antioxidante, ou seja, menor valor de IC₅₀, e o híbrido FB200 está entre os que apresentaram menor capacidade antioxidante.

IV.8.2. Ensaio com HOCl e TMB

O ensaio com HOCl e TMB foi realizado visto que é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) formada no ser humano, via sistema enzimático, por células de defesa. Os resultados do ensaio com as amostras dos híbridos e a amostra comercial do maracujá amarelo azedo constam na tabela 12 e na figura 30.

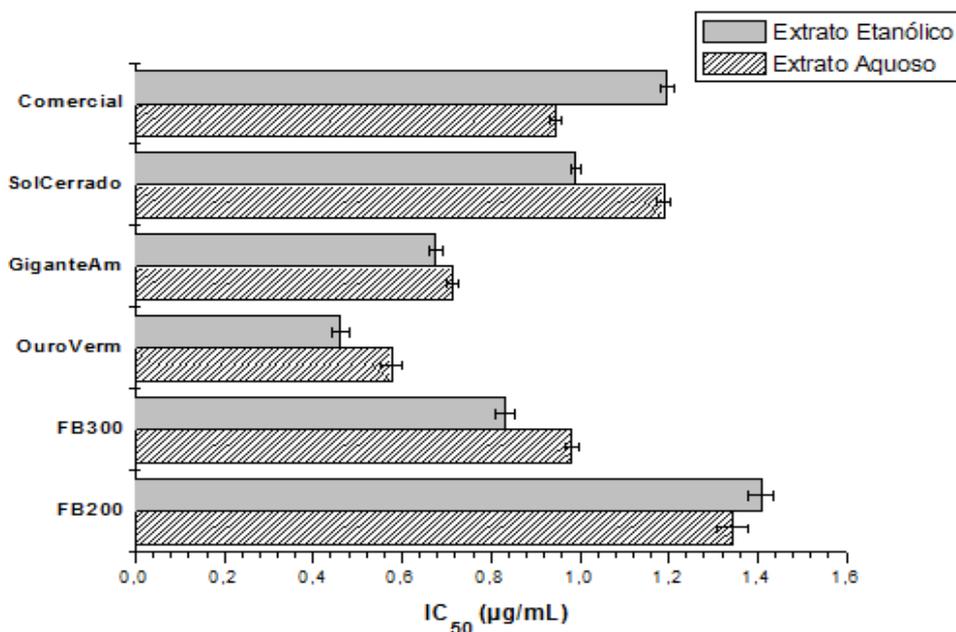
Tabela 12. Capacidade antioxidante dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo e do maracujá amarelo azedo comum. Condições de ensaio: solução de HOCl, volumes variáveis de extrato (0,01 g/mL), solução tampão fosfato de sódio 50mmol.L⁻¹ (pH 7,4) para completar o volume para 240 µL, repouso por 15 minutos no escuro, solução de TMB e repouso por 5 minutos; leitura a 652nm no espectrofotômetro de placa Biotek, T = 25°C. (n=3).

Híbrido	HOCl e TMB - IC ₅₀ (µg/mL)			
	Extrato Aquoso		Extrato Etanólico	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
FB200	1,345	0,0348	1,408	0,0278
FB300	0,982	0,0168	0,832	0,0210
BRS Ouro Vermelho	0,576	0,0250	0,461	0,0199
BRS Gigante Amarelo	0,713	0,0127	0,676	0,0159
BRS Sol do Cerrado	1,189	0,0152	0,991	0,0121
Comercial	0,944	0,0126	1,196	0,0157

Mais uma vez, o híbrido BRS Gigante Amarelo está entre os híbridos que tem maior capacidade antioxidante e o híbrido FB200 entre os menores.

Nessa análise houve diferença na capacidade antioxidante entre os híbridos e a amostra comercial, tanto nos extrato aquoso como no etanólico. Porém, não houve muita diferença entre os solventes onde os híbridos e a amostra comercial apresentaram praticamente os mesmos valores. A sequencia, em ordem crescente de valores, para o IC₅₀, via ensaio do HOCl/OCl⁻-TMB foi: BRS Ouro Vermelho, BRS Gigante Amarelo, amostra Comercial, FB300, BRS Sol do Cerrado e FB200.

Figura 30 – Capacidade antioxidante dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo e do maracujá amarelo azedo comum pelo ensaio do HOCl e TMB.



IV.9. Correlações entre duas análises dos híbridos

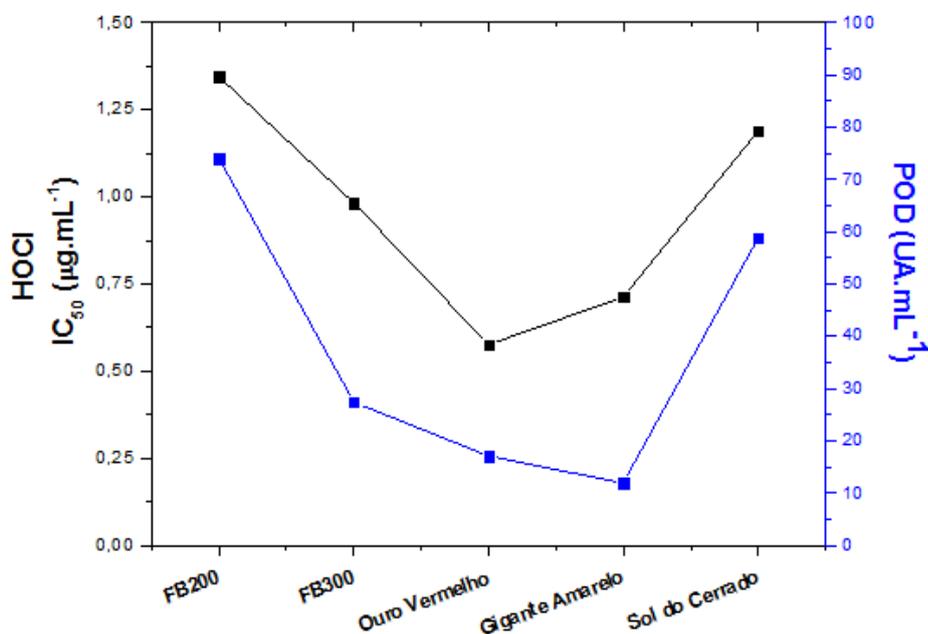
Foram feitas análises estatísticas pelo método do Coeficiente de Pearson. O coeficiente de correlação linear de Pearson (r) é uma estatística utilizada para medir a força, a intensidade ou o grau de relação linear entre duas variáveis aleatórias. O sinal do coeficiente de correlação linear de Pearson expressa o sentido da correlação, e sua intensidade é representada por um valor numérico que oscila entre -1 e 1.

Tabela 13. Coeficientes de correlação linear de Pearson

Coeficiente	Correlação	Coeficiente	Correlação
$r = 1$	Perfeita positiva	$-0,1 < r < 0$	Ínfima negativa
$0,8 \leq r < 1$	Forte positiva	$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada positiva	$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca positiva	$-1 < r \leq -0,8$	Forte negativa
$0 < r < 0,1$	Ínfima positiva	$r = -1$	Perfeita negativa
0	Nula		

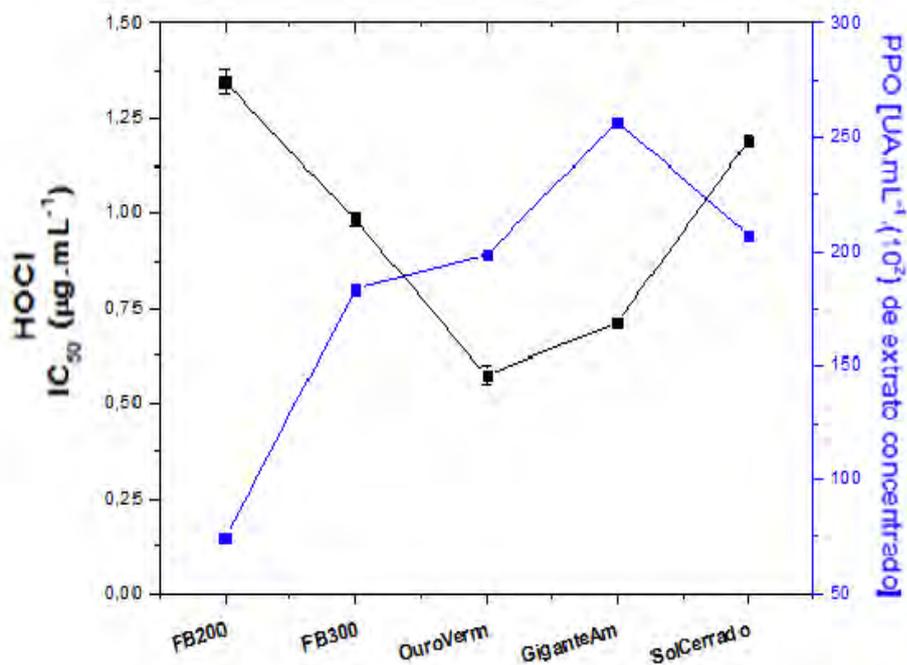
Nas amostras estudadas observou-se que estas apresentaram correlação “forte positiva”, apresentando o coeficiente $r = 0,944$, relacionando a atividade enzimática da peroxidase (POD) ($\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1}$) e a capacidade antioxidante via ensaio do HOCl.

Figura 31 – Correlação entre os parâmetros Atividade enzimática da Peroxidase (POD) ($\text{UA}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a capacidade antioxidante, via ensaio de HOCl e TMB.



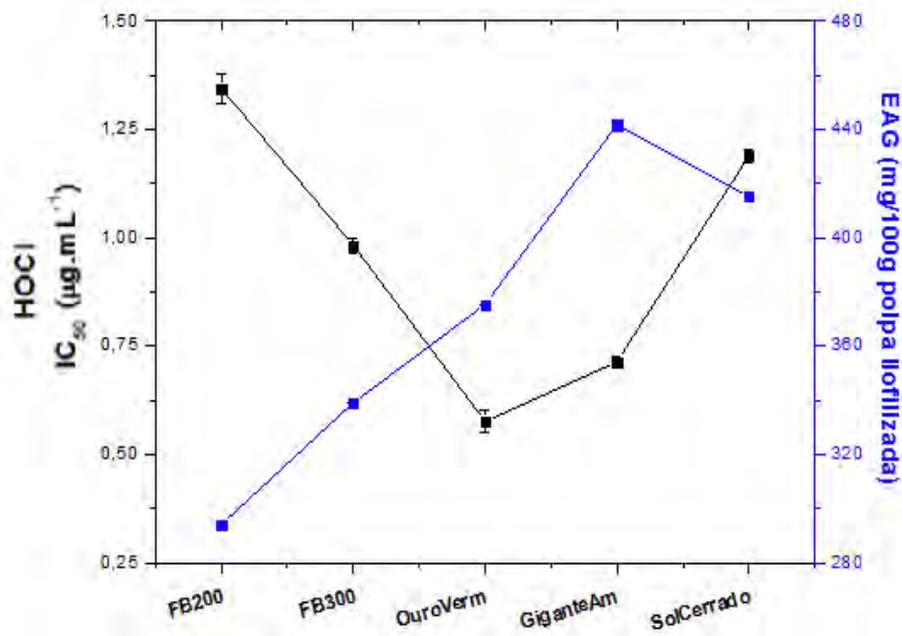
Correlação também é vista entre a variável atividade enzimática da PPO e a atividade antioxidante via ensaio com HOCl e TMB. Com visto na figura (32) o híbrido que apresenta menor atividade enzimática da PPO é o híbrido que apresenta uma menor atividade antioxidante, visto que ele apresenta o maior IC₅₀.

Figura 32 – Correlação entre os parâmetros Atividade enzimática da Polifenoloxidase (PPO) ($\text{UA}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a capacidade antioxidante, via ensaio de HOCl e TMB.



Comportamento semelhante é notado entre a variável conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante via ensaio com HOCl e TMB. Isso é válido pois o conteúdo de compostos fenólicos está diretamente relacionado a atividade enzimática da PPO.

Figura 33 – Correlação entre os parâmetros Atividade Conteúdo de compostos fenólicos (EAG) e a capacidade antioxidante, via ensaio de HOCl e TMB.



Em relação ao conteúdo de compostos fenólicos e o conteúdo de flavonóides nos híbridos estudados, a análise correlação de Pearson apresentou o coeficiente $r = 0,984$ que indica uma correlação “forte positiva”. Isso se deve ao fato de que os compostos fenólicos, que se comportam como antioxidantes no meio biológico de frutas e vegetais, constituem uma ampla classe de compostos como ácidos fenólicos, flavonóides e tocoferóis. (JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2000).

Seguindo esse contexto foi observada também uma correlação “forte negativa” (Coeficiente de correlação de Pearson $r = - 0,955$) entre a atividade antioxidante, via radical ABTS, e o conteúdo de compostos fenólicos, ou seja, quanto maior o conteúdo de compostos fenólicos maior é a capacidade antioxidante da amostra (mensurada pelo IC₅₀).

Figura 34 – Correlação entre os parâmetros conteúdo de compostos fenólicos e conteúdo de flavonóides dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo.

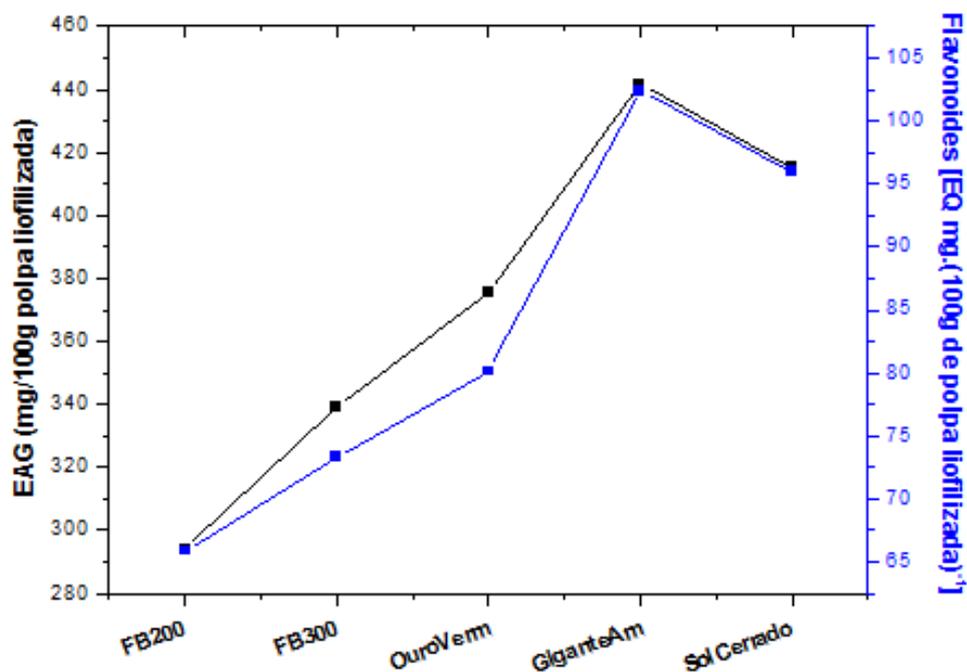
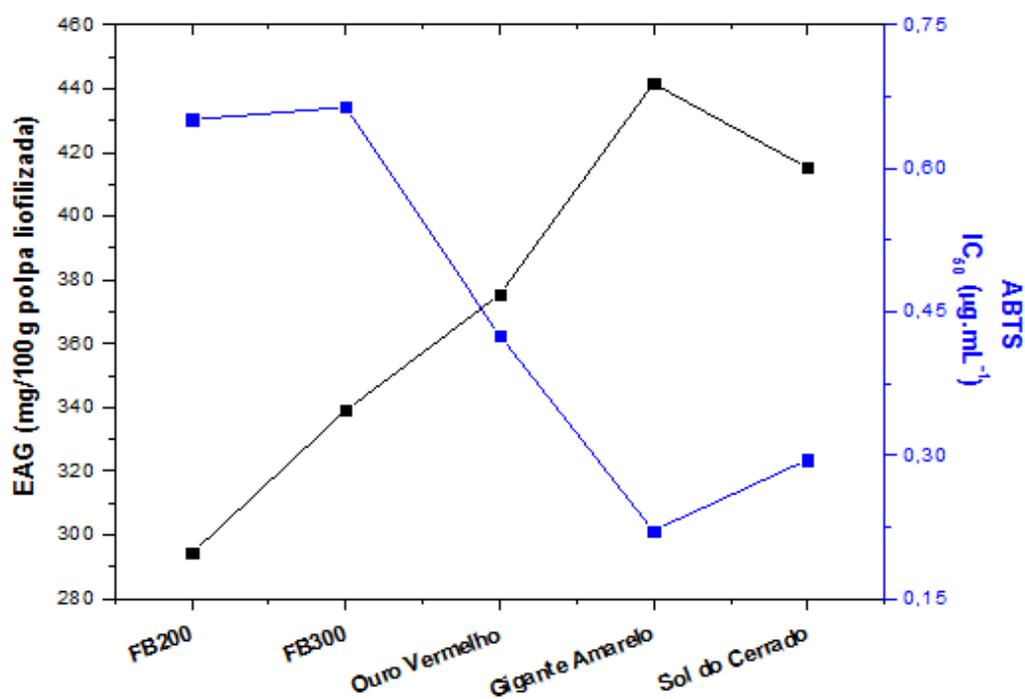
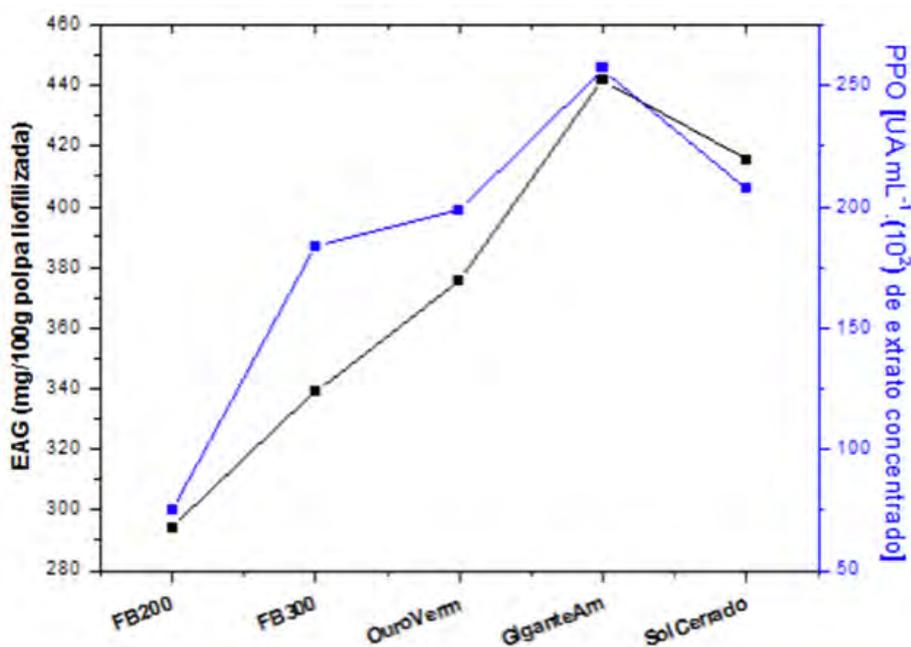


Figura 35 – Correlação entre os parâmetros conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, via captura do radical ABTS^{•+}, dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo.



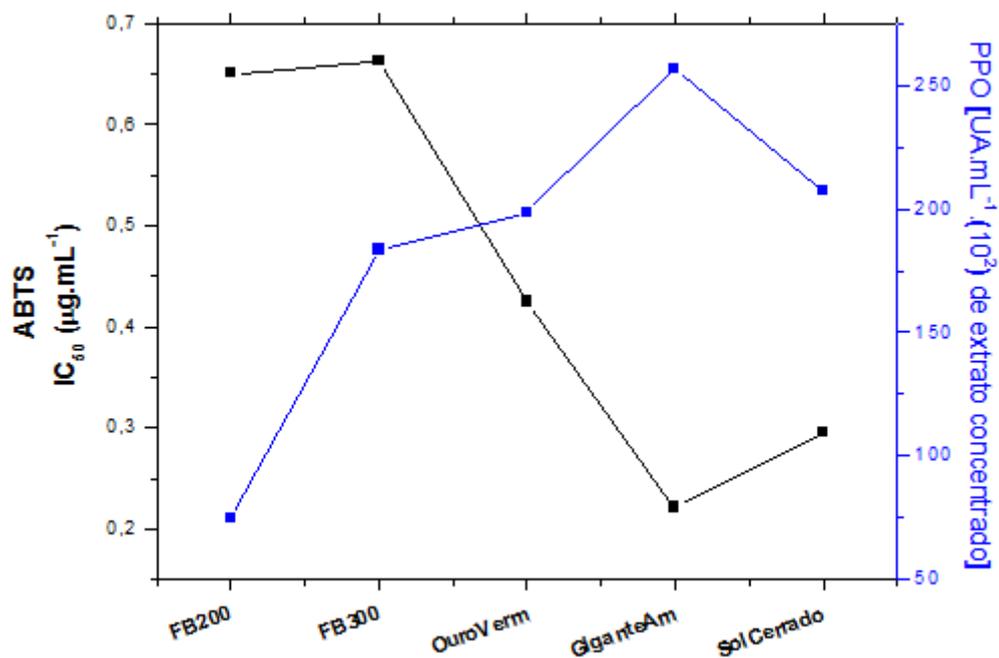
Observação semelhante foi verificada entre os teores de atividade da PPO ($\text{UA}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a capacidade antioxidante da captura do radical ABTS (figura 36), ou seja, relacionando esses parâmetros é visto que as atividades são proporcionais, já que, quanto maior a atividade enzimática menor é a atividade antioxidante, sendo o contrário também válido. Uma possível explicação é que a atividade da enzima PPO está relacionada com a quantidade de compostos fenólicos no meio e estes estão envolvidos na atividade antioxidante das amostras. Isso pode ser visto no gráfico – que mostra a correlação entre a atividade da enzima PPO e o conteúdo de compostos fenólicos (equivalente Ácido Gálico) cujo coeficiente, pela análise da Correlação de Pearson mostrou um valor de $r = 0,927$ indicando uma correlação “forte positiva”.

Figura 36 – Correlação entre os parâmetros Atividade enzimática da Polifenoloxidase (PPO) ($\text{UA}\cdot\text{mL}^{-1}$) e o conteúdo de compostos fenólicos (EAG [$\text{mg}\cdot(100\text{g de polpa liofilizada})^{-1}$]) dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo.



Para melhor visualização dos dados, também foi feito um gráfico relacionando os parâmetros PPO e ABTS (figura 37) e mostra que o valor do coeficiente de correlação foi de $r = -0,788$, indicando uma correlação “moderada negativa”.

Figura 37 – Correlação entre os parâmetros Atividade enzimática da Polifenoloxidase (PPO) ($\text{UA}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a capacidade antioxidante, via captura do radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$, dos híbridos da cultivar maracujá-amarelo.



Como já foi mencionado, podemos ver na figura 37 que o híbrido que apresenta uma maior atividade enzimática da PPO é o híbrido que apresenta o maior IC_{50} , portanto ele tem uma menor atividade antioxidante e o inverso, nesse caso também é válido.

V. Considerações finais

Como visto nesse trabalho, o maracujá é uma fruta com grande potencial de aplicação tecnológica, principalmente no processamento industrial de polpa para suco e néctar. Nas análises feitas nos híbridos objeto de estudo, os resultados podem ser resumidos em:

- Os híbridos apresentaram características físicas distintas, com rendimento de polpa variando de 28,8 a 39%;
- A atividade da enzima PME foi maior no híbrido FB300, seguido do FB200, BRS Ouro Vermelho, BRS Sol do Cerrado e do BRS Gigante Amarelo;
- Na atividade enzimática da POD o híbrido FB200 foi o que apresentou maior atividade, seguido do BRS Sol do Cerrado, FB300, BRS Ouro Vermelho e BRS Gigante Amarelo;
- Em relação a enzima PPO o híbrido que apresentou maior atividade foi o BRS Gigante Amarelo, e o FB200 menor atividade;
- A enzima AO foi menos ativa no híbrido BRS Ouro Vermelho e mais ativa no híbrido FB200;
- O híbrido BRS Gigante Amarelo apresentou maior teor de vitamina C seguido do BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, FB200 e FB300;
- Em relação aos fenóis, no extrato aquoso, o híbrido BRS Gigante Amarelo apresenta maior conteúdo seguido do BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, FB300 e FB200;
- O conteúdo de proteína, extrato aquoso, foi maior no híbrido FB300 e menor no híbrido BRS Ouro Vermelho;
- O híbrido BRS Gigante Amarelo apresentou maior conteúdo de flavonóides totais, seguido do BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, FB300 e FB200;
- A capacidade antioxidante via captura do cátion radical ABTS, em ordem crescente de IC_{50} , foi: BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, FB300 e FB200;
- A capacidade antioxidante via ensaio do HOCl/OCl⁻ e TMB, em ordem crescente de IC_{50} , foi: BRS Ouro Vermelho, BRS Gigante Amarelo, FB300, BRS Sol do Cerrado e FB200.

O estudo bioquímico dos diferentes híbridos da cultivar maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) – FB200, FB300, BRS Ouro Vermelho, BRS Gigante Amarelo e BRS Sol do Cerrado – foi de grande valia e pode ser usado na escolha de um híbrido que melhor atenda as necessidades de processamento e obtenção de produtos industriais em conjunto com outros estudos que venham a somar mais informações pertinentes.

Este trabalho evidenciou, também, a potencialidade do maracujá como uma fruta funcional, pois, devido aos promissores teores de compostos bioativos, podem oferecer vários benefícios à saúde humana.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 13th ed. Washington, DC, 1984. p. 627-845.

BENASSI, M. T. **Análise dos efeitos de diferentes parâmetros na estabilidade de vitamina C em vegetais processados**. 1990. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução Normativa nº 12, de 04 de setembro de 2003. Padrões de identidade e qualidade para suco tropical de maracujá e padrões de identidade e qualidade para néctar de maracujá. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 set. 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 11 mar. 2011.

BRASIL. Decreto n. 6871 de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei n.8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a padronização e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 20, 4 jun. 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>. Acesso em 11 mar. 2011

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção de frutas sobe 19% em oito anos**. 2011. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/03/17/producao-brasileira-de-frutas-sobe-19-em-oito-anos>>. Acesso em: 16 fev. 2012.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 126, n. 1, p. 482-488, 1985.

CABRAL, L. M. C. Suco de maracujá. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. Cap.13, p. 293-309.

CANÇADO JÚNIOR, F. L.; ESTANISLAU, M. L. L.; PAIVA, B. M. Aspectos econômicos da cultura do maracujá. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 206, p. 10-17, set./out. 2000.

CARDELLO, H. M. A. B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangífera indica* L.) Var. haden, durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 211-217, maio/jul. 1998.

CARDELLO, L.; LOURENÇO, E. J. Efeitos de mercuriais na atividade da pectinametilsterase de Berinjela (*Solanum melongena* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 6, p. 25-37, 1995.

CASTALDO, D. et al. Orange juice and concentrates stabilization by a proteic inhibitor of pectin methylesterase. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1632-1634, 1991.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998.

CLETO, F. V. G.; CONSOLINI, F. Legislação brasileira de bebidas. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. Cap. 1, p. 1-20.

COSTA, M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1183-1187, 2004.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 15-19, maio 2010.

DIXON, M.; WEBB, E. L. Enzyme kinetic. In: _____. **Enzymes**. New York: Academic Press, 1979. Cap. 4, p.47.

DURIGAN, J. F. et al. Qualidade e tecnologia pós-colheita do maracujá. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2004. p. 281-303.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção brasileira de maracujá em 2010**. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja_Brasil_2010.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2012.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.

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

GAMA, L. Embrapa lança novos híbridos de maracujazeiro-azedo. **Agrosoft Brasil**, 19 maio 2008. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/100840.htm>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. S.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, n. 177, p. 751-766, 1949.

HANDWERK, R. L. Approaches to the citrus browning problem. A review. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 231-236, 1988.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A. et al. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1686-1690, 2000.

JOLIE, R. P. et al. Carrot pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: study of activity, stability and inhibition. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 601-609, 2009.

KERTESZ, Z. I. Pectic enzymes. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1955. v. 1, p. 1581.

KLABUNDE, T. et al. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 12, p. 1084-1090, 1998.

LEITE, K. M. da S. C. et al. Evaluation of guava during different phases of the industrial processing. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 2, p. 1-8, 2009.

LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá produção**: aspectos técnicos. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2002. 104 p.

LIMA, A. et al. **Instruções práticas para o cultivo do maracujazeiro**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPQMF, 1994. 49 p.

MÄKINEN, K. K.; TENUOVO, J. Observations on the use of guaiacol and 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as peroxidase substrates. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 100-108, 1982.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.

MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S. **Maracujá**: pós-colheita. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2002. 51 p. (Frutas do Brasil, 23).

MAYER, A. M.; HAREL, E. Review: polyphenol oxidase in plants. **Phytochemistry**, v. 18, n. 2, p.193-215, Feb.1979.

MEDINA, C. J. et al. **Maracujá**: da cultura ao desenvolvimento e processamento. São Paulo: ITAL, 1980. 207 p.

NAKAMURA, T.; MAKINO, N.; OGURA, Y. Purification and properties of ascorbate oxidase from Cucumber. **The Journal of Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 189-195, Feb. 1968.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Fruticultura**: análise da conjuntura agropecuária safra 2010/2011. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2011_12.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2012.

PEREIRA, M. J. V. **Contribuição ao estudo de polifenoloxidase e ascorbato oxidase de polpa de Passiflora edulis (maracujá-amarelo) visando o processamento industrial de suco**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

PONSONI, E. J. **Implicação da nicotina sobre a atividades da peroxidase salivar**. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

RAMOS, A. T. et al. Uso de Passiflora edulis f. flavicarpa na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 592-597, 2007.

SANDI, D. et al. Avaliação da qualidade sensorial de suco de maracujá-amarelo (Passiflora edulis var. flavicarpa) submetido a pasteurização e armazenamento. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 141-158, jan./jun. 2003a.

SANDI, D. et al. Correlações entre características físico-químicas e sensoriais em suco de maracujá amarelo (Passiflora edulis var. flavicarpa) durante o armazenamento. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 355-361, set./dez. 2003b.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

STADLER, Z. **Determinação do teor de vitamina C em alimentos**. 1999. 27 f. Monografia (Especialização em Ensino de Química Experimental para o 2ª Grau) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO)**. 4. ed. revista e ampliada, 2011. 161 p. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4-versao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2011.

VELLOSA, J. C. R. et al. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 447-453, 2007.

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. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

VIVEIROS FLORA BRASIL. **Produtos**: sementes de maracujá. Disponível em: <http://www.viveiroflorabrasil.com.br/site/?page_id=1168>. Acesso em: 9 jan 2013.

WANG, H. et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. **Food Chemistry**, v.106, p. 888-895, 2008.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase e polifenoloxidase em polpa de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 705-708, jul./set. 2006.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 459-471, 2010.

ZGLICZYNSKI, T. J. M. et al. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.