



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



MAURO JUNIO DE VASCONCELOS PEREIRA

**Contribuição ao estudo de polifenoloxidase e
ascorbato oxidase de polpa de *Passiflora
edulis* (maracujá-amarelo) visando o
processamento industrial de suco.**

Araraquara
2012

MAURO JUNIO DE VASCONCELOS PEREIRA

Contribuição ao estudo de polifenoloxidase e ascorbato oxidase de polpa de Passiflora edulis (maracujá-amarelo) visando o processamento industrial de suco.

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

Orientadora: **Prof^a Dr^a Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira**

Coorientadora: **Dr^a Kátia Maria da Silva Cerqueira Leite**

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

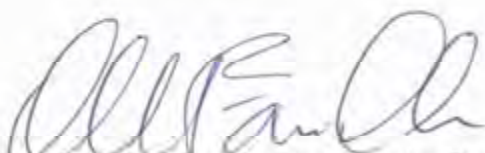
P436c	<p>Pereira, Mauro Junio de Vasconcelos</p> <p>Contribuição ao estudo de polifenoloxidase e ascorbato oxidase de polpa de <i>Passiflora edulis</i> (maracujá-amarelo) visando o processamento industrial de suco / Mauro Junio de Vasconcelos Pereira. - Araraquara : [s.n], 2012</p> <p>107 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira</p> <p>Coorientador: Kátia Maria da Silva Cerqueira Leite</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Frutas tropicais. 3. Parâmetros cinéticos. 4. Enzimas. I. Título.</p>
-------	--

MAURO JUNIO DE VASCONCELOS PEREIRA

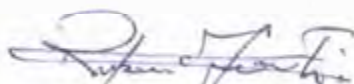
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 20 de janeiro de 2012.

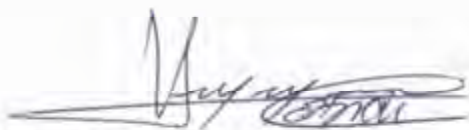
BANCA EXAMINADORA



Prof.^ª Dr.^ª Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Rubens Monti
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Hamilton Cabral
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

Dedico esta dissertação à minha família, principalmente a meus Pais, Leila e José Mauro e ao meu Irmão Talmo, que sempre estiveram ao meu lado; Aos meus Avós pela experiência de vida e ao meu filho Heitor pela razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Minha eterna gratidão à minha orientadora, **Profª Drª Olga Maria Mascarenhas Faria Oliveira**, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação e principalmente pelo bom convívio nestes anos de trabalho. Com ela tive a oportunidade de enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas e sugestões nos meus relatórios, artigos, entre outros;

Meus agradecimentos à minha coorientadora, **Drª Kátia Maria da Silva Cerqueira Leite**, por ter me acolhido com tanta paciência e carinho. Por ter sido uma guia em meio à escuridão que se tornou em alguns momentos a minha pesquisa. Por ter sido firme e prestativa nos momentos cruciais. Por seu conhecimento. Por sua amizade.

À meus pais, **José Mauro e Leila**, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de esperança; sempre repetindo palavras essenciais – como, por exemplo, amor, crença, compreensão, alegria – infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Ao meu amado filho **Heitor**, presente para toda vida, anjinho abençoado, pureza de coração, linda jóia rara, razão do meu viver, Heitor se conseguiu ler até aqui trate de terminar de ler rsrs.

À minha família, em especial a avós **Talma** (*in memoriam*) e **Maria José, Walteir e Jerônima**, e a meu irmão **Talmo** pelo incentivo e apoio que sempre me deram, não medindo esforços para que eu pudesse alcançar meu objetivo.

À minha namorada **Rochele**, minha companheira de vida. Meu eterno amor. Ainda não foram inventadas palavras que possam traduzir o sentimento que habita em mim. Não há palavras que possam explicar a gratidão que tenho por seu amor, carinho, compreensão, paciência, estímulo, esforço, troca, aconchego. Não há gestos possíveis que possam expressar tamanha vontade de te ter ao meu lado, sempre.

Aos colegas do grupo de Enzimologia: **Ângela, Danielli, Danilo, Juliana, Kamila, Michelle, Omar, Ricardo e a Vanessa**. Tantas vozes, tantos momentos, tanta amizade e apoio nas mais diversas ocasiões.

Ao técnico do laboratório **Waldenir Aparecido Nunes Menezes**, pela colaboração e amizade.

Aos amigos, **Ana Paula, Eliane, Fernanda Cupertino, Fernanda Zanolli, Flávia, Larissa (Lari), Messias, Rodrigo, Susilaine e Thiago**. Não há como expressar a minha gratidão pela oportunidade de conviver com vocês

À todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química.

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

Às funcionárias da Seção Técnica de Pós-graduação, **Adélia, Ana Paula, Célia, Patrícia (in memoriam), Sandra e Wennia** e da Biblioteca por todo apoio necessário durante esses anos.

À Indústria e Comércio de Conservas Alimentícias Predilecta LTDA, e ao Diretor **Sr. Antônio Carlos Tadiotti**, por ter acreditado no potencial deste trabalho e pelo apoio financeiro a esta pesquisa, fator determinante para o sucesso da mesma.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e recursos concedidos.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas em inesquecíveis, o meu reconhecido e carinhoso.
Muito obrigado!

*"Nunca poderemos ser suficientemente gratos a Deus, nossos pais e a nossos mestres."
(Aristóteles)*

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ...”

Martin Luther King

RESUMO

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) pode ser consumido ao natural ou industrializado, e seu suco destaca-se entre os produzidos de frutas tropicais, tendo excelente aceitação, representando uma boa porcentagem dos sucos exportados, onde o Brasil é um dos principais exportadores. Uma das características importantes do suco é a cor, constituindo uns dos índices de qualidade no mercado de sucos, podendo ocorrer alteração da cor durante o processamento e armazenamento, o que pode implicar em não aceitação por parte do consumidor final. Isso pode ocorrer principalmente devido a reações bioquímicas de escurecimento e a alterações bioquímicas moleculares que resultam em *flavors* indesejáveis, perda de nutrientes, e formação de pigmentos de coloração marrom. Então o controle do escurecimento durante o armazenamento e processamento de frutos é muito importante para a preservação da aparência natural dos mesmos. Deste modo as enzimas polifenoloxidase (EC: 1.10.3.1; PPO) e a ascorbato oxidase (EC: 1.10.3.3; AO) podem ser responsáveis pelo escurecimento enzimático que fornece alteração de cor. O objetivo desse trabalho é estudar a PPO, a AO e sua influência no processo de escurecimento da fruta maracujá. Os resultados principais desse estudo foi que o pH ótimo de ensaio da PPO foi de 6,0 e da AO de 5,0, e suas temperaturas ótimas de 50°C (PPO) e 45°C (AO). Nos estudos de inativação térmica a PPO e a AO apresentaram valores de D a 95°C de 5,11 min e de 1,94 min, respectivamente. As enzimas apresentaram inibição a cisteína 833 mmol/L, metabissulfito de sódio 33,5 mmol/L; EDTA 12,5 mmol/L; sacarose 200 mmol/L; ácido cítrico 250 mmol/L e ácido ascórbico 200 mmol/L. As constantes cinéticas dessas enzimas foram $k_M = 0,04225$ mol/L e $V_{max} = 0,04225$ UA.min⁻¹ para PPO e $k_M = 0,24729$ mmol/L e $V_{max} = 1,1955$ mmol/L. min⁻¹ para AO. Os valores de energia de ativação calculados foram de $E_a = 663,00$ J.mol⁻¹(PPO) e $E_a = 308,54$ J.mol⁻¹ (AO).

Palavras chaves: ascorbato oxidase; polifenoloxidase; parâmetros cinéticos; extração e purificação de enzimas; maracujá amarelo.

ABSTRACT

The yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) can be consumed fresh or processed, and its juice stands out among those produced tropical fruit, with excellent reception, representing a large percentage of juice exported, where Brazil is one of the leading exporters. An important feature is the color of the juice, making each of the indices of quality in the juice market, change in color may occur during processing and storage, which may not imply acceptance by the consumer. This can occur mainly due to biochemical reactions dimming molecular and biochemical changes that result in undesirable flavors, loss of nutrients, and formation of brown pigments. Then the control browning during storage and processing of fruits is very important to preserve the natural look of them. Thus the enzyme polyphenol oxidase (EC: 1.10.3.1, PPO) and ascorbate oxidase (EC: 1.10.3.3; AO) may be responsible for enzymatic browning that provides color change. The objective of this paper is to study the PPO, AO and its influence in the process of darkening of the passion fruit. The main results of this study was to test the optimum pH of PPO was 6.0 and 5.0 AO, and their optimum temperatures of 50°C (PPO) and 45°C (AO). In studies of thermal inactivation and PPO and AO had values of D at 95°C for 5.11 min and 1.94 min, respectively. The enzymes were inhibited cysteine 833 mmol/L; sodium metabisulfite 33,5 mmol/L; EDTA 12,5 mmol/L; sucrose 200 mmol/L; citric acid 250 mmol/L; ascorbic acid 200 mmol/L. The kinetic constants of these enzymes were $k_M = 0,04225$ mol/L and $V_{max} = 0,04225$ UA.min⁻¹ for PPO and $k_M = 0,24729$ mmol/L e $V_{max} = 1,1955$ mmol/L. min⁻¹ for AO. The activation energy values were calculated $E_a = 663,00$ J.mol⁻¹ (PPO) and $E_a = 308,54$ J.mol⁻¹ (AO).

Keywords: ascorbate oxidase, polyphenol oxidase, the kinetic parameters, extraction and purification of enzymes; yellow passion fruit

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Frutos de maracujá amarelo azedo (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg.)	21
Figura 2	- Atividade cresolase e catecolase da polifenoloxidase.	25
Figura 3	- Diferentes estados de oxidação de fenóis decorrentes da atividade de catecolase de PPOs.	26
Figura 4	- Estrutura da enzima Polifenoloxidase.	28
Figura 5	- Mecanismo de reação das atividades de monofenolase e difenolase da PPO	30
Figura 6	- Reação catalisada pela Ascorbato oxidase.	31
Figura 7	- Estrutura da enzima Ascorbato oxidase	33
Figura 8	- Processo de desnaturação enzimática.	37
Figura 9	- Procedimento para obtenção do Pó-cetônico de polpa de maracujá	42
Figura 10	- Procedimento para extração de PPO a partir do Pó-cetônico de polpa de maracujá	43
Figura 11	- Curva padrão da Soro Albumina Bovina (BSA).	47
Figura 12	- Composição dos frutos de maracujá em porcentagem de massa.	57
Figura 13	- Atividade da PPO em função do pH utilizando catecol como substrato. Condições de ensaio descritas anteriormente.	59
Figura 14	- Atividade da AO em função do pH utilizando Ac. Ascórbico como substrato. Condições de ensaio descritas anteriormente.	60
Figura 15	- Efeito da temperatura na atividade PPO	61
Figura 16	- Efeito da temperatura na atividade AO	62
Figura 17	- Estabilidade térmica da enzima PPO.	63
Figura 18	- Estabilidade térmica da enzima AO	64
Figura 19	- Gráfico de inativação térmica ($\ln \left(\frac{AE}{AE_0} \right)$ versus t) da polifenoloxidase.	65

Figura 20	- Gráfico de inativação térmica ($\ln\left(\frac{AE}{AE_0}\right)$ <i>versus</i> t) da Ascorbato oxidase	66
Figura 21	- Cálculo do valor de Z (valor em °C para que ocorra a redução de um ciclo logarítmico em D) da inativação térmica da polifenoloxidase.	67
Figura 22	- Cálculo do valor de Z (valor em °C para que ocorra a redução de um ciclo logarítmico em D) da inativação térmica da polifenoloxidase.	68
Figura 23	- Efeito do pH (2,6 a 5,0) na estabilidade da PPO utilizando catecol (0,12 mol/L) pH 6,0 a 25°C.	69
Figura 24	- Efeito do pH (6,0 a 9,0) na estabilidade da PPO utilizando catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 a 25°C.	70
Figura 25	- Efeito do pH (2,6 a 5,0) na estabilidade da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C.	71
Figura 26	- Efeito do pH (6,0 a 9,0) na estabilidade da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C.	71
Figura 27	- Efeito da concentração de NaCl na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C.	72
Figura 28	- Efeito da concentração de Na ₂ SO ₄ na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C.	73
Figura 29	- Efeito da concentração de KCl na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C	74
Figura 30	- Efeito da concentração de K ₂ SO ₄ na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .	75
Figura 31	- Efeito da concentração de MgCl ₂ na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C	76
Figura 32	- Efeito da concentração de MgSO ₄ na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .	77

- Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade da enzima PPO
- Figura 33** - (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,00 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C . 78
- Efeito da concentração de Cisteína na atividade da enzima PPO
- Figura 34** - (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C 79
- Efeito da concentração de Metabissulfito de sódio na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .
- Figura 35** - 80
- Efeito da concentração de EDTA na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .
- Figura 36** - 81
- Efeito da concentração de Sacarose na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .
- Figura 37** - 82
- Efeito da concentração de ácido cítrico na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .
- Figura 38** - 83
- Efeito da concentração de ácido ascórbico na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .
- Figura 39** - 84
- Efeito da concentração de Catecol na atividade da enzima PPO (0,1mL), pH 6,0 a 25°C .
- Figura 40** - 85
- Efeito da concentração de ácido ascórbico na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .
- Figura 41** - 86
- Representação gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk da polifenoloxidase.
- Figura 42** - 88
- Representação gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk da ascorbato oxidase.
- Figura 43** - 88
- Representação gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Eadie-Hofstee da polifenoloxidase.
- Figura 44** - 89

Figura 45	- Representação gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Eadie-Hofstee da ascorbato oxidase.	89
Figura 46	- Representação gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Langmuir (Hanes-Woolf) da polifenoloxidase	90
Figura 47	- Representação gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Langmuir (Hanes-Woolf) da ascorbato oxidase	90
Figura 48	- Representação gráfica da linearização da equação de Arrhenius da polifenoloxidase	91
Figura 49	- Representação gráfica da linearização da equação de Arrhenius da ascorbato oxidase	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Padrões de identidade e qualidade do suco de maracujá	23
Tabela 2	- Padrões de identidade e qualidade do suco tropical de maracujá	24
Tabela 3	- Condições experimentais para definição dos parâmetros cinéticos do modelo Michaelis-Menten	53
Tabela 4	- Condições experimentais para definição dos parâmetros de Arrhenius	55
Tabela 5	- Precipitação salina fracionada da PPO com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	58
Tabela 6	- Precipitação salina fracionada da AO com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	58
Tabela 7	- Valor de k e o Valor de D da inativação térmica da polifenoloxidase.	66
Tabela 8	- Valor de k e o Valor de D da inativação térmica da ascorbato oxidase.	67
Tabela 9	- Parâmetros do modelo de Michaelis-Menten ajustados de acordo com diferentes métodos para enzima polifenoloxidase.	87
Tabela 10	- Parâmetros do modelo de Michaelis-Menten ajustados de acordo com diferentes métodos para enzima ascorbato oxidase.	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 O BRASIL E AS FRUTAS TROPICAIS	17
2.2 MARACUJÁ.....	20
2.3 BEBIDAS A BASE DE MARACUJÁ	22
2.4 ENZIMAS	24
2.4.1 Polifenoloxidase	25
2.4.2 Ascorbato oxidase	31
2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE AFETAM A CINÉTICA ENZIMÁTICA	34
2.5.1 Substrato	34
2.5.2 Temperatura	36
2.5.3. pH	37
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAL.....	41
4.1.1 Matéria-prima	41
4.1.2 Reagentes	41
4.2 OBTENÇÕES DAS FRUTAS	41
4.3 EXTRAÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE	41
4.3.1 Preparo da amostra concentrada	41
4.3.2 Obtenção do extrato concentrado	42
4.3.3 Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)	44
4.4 EXTRAÇÃO DA ASCORBATO OXIDASE	44
4.4.1 Preparo da amostra	44
4.4.2 Obtenção do extrato bruto	44
4.4.3 Tratamento com Amido	45
4.4.4 Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)	45
4.5 DETERMINAÇÃO DA UNIDADE DE ATIVIDADE (UA) ENZIMÁTICA.....	46
4.5.1 Polifenoloxidase (PPO)	46
4.5.2 Ascorbato oxidase (AO)	46
4.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO (MG/ML) E DA ATIVIDADE ESPECÍFICA (AE)	47
4.7 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO	48
4.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA	48

4.9 ESTUDOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA	48
4.10 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA.....	49
4.10.1 Valor de k	50
4.10.2 Valor de D	50
4.10.3 Valor de Z	50
4.11 ESTUDOS DA ESTABILIDADE FRENTE AO PH.	51
4.12 EFEITOS DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.	51
4.13 ESTUDO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS.....	52
4.14 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	52
4.14.1 Ajuste dos parâmetros cinéticos e integração da expressão de Michaelis-Menten	54
4.15 EFEITOS DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	55
4.15.1 Determinação dos parâmetros da equação de Arrhenius	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 OBTENÇÃO DO SUCO.....	57
5.2 EXTRAÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE.....	58
5.3 EXTRAÇÃO DA ASCORBATO OXIDASE	58
5.3.1 Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)	58
5.4 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO	59
5.5 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA	61
5.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA	62
5.7 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA.....	65
5.7.1 Valor de Z	67
5.8 ESTUDOS DA ESTABILIDADE FRENTE AO PH.	68
5.9 EFEITOS DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	72
5.9.1 Efeito do NaCl e Na₂SO₄ na atividade enzimática.....	72
5.9.2 Efeito do KCl e K₂SO₄ na atividade enzimática.....	74
5.9.3 Efeito do MgCl₂ e MgSO₄ na atividade enzimática	76
5.9.4 Efeito do CaCl₂ na atividade enzimática.....	77
5.10 ESTUDO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS.....	78
5.11 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	85
5.12 EFEITOS DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	91
5.12.1 Determinação dos parâmetros da equação de Arrhenius	91
6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	93
7. ANÁLISE E REFLEXÃO SOBRE O TRABALHO DESENVOLVIDO.....	94
REFERÊNCIAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, especialmente após o século XVI, iniciou sua participação no comércio internacional de frutas. Desde então, o cacau foi introduzido na Guiné, o maracujá na Índia, o abacaxi no Caribe e a jabuticaba na Austrália. Por outro lado, muitas frutas novas adaptaram-se aqui: uva, morango, ameixa, nectarina, pêssego, maçã, pêra, dentre outras (PRADO, 2009).

A diversidade de climas e microclimas fizeram do Brasil um país perfeito para a produção de frutas. Atualmente, é um dos três maiores produtores mundiais, ficando atrás apenas da China e Índia, com uma produção que supera os 41 milhões de toneladas ao ano (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS IBRAF, 2009).

O consumo de frutas frescas e de seus derivados é crescente em todo o mundo devido a vários fatores que levam a modificações nos hábitos alimentares, como o maior cuidado com a saúde e aspectos nutritivos dos alimentos; às campanhas publicitárias sobre os benefícios de consumo de frutas e hortaliças; à tendência a desprendimento dos horários e costumes; à procura por ganho de tempo e por alimentos individualizados de fácil preparo (SIMARELLI, 2006).

Neste contexto, temos o maracujá, uma fruta tropical, difundida pelo mundo todo, cujo aroma faz do mesmo um popular e importante aditivo na composição de “*blends*” de sucos tropicais. Flavonoides, glicosídeos, alcaloides, compostos fenólicos e compostos voláteis são considerados como fitoconstituintes majoritários em espécies de maracujá.

O maracujá pode ser consumido ao natural ou industrializado, e seu suco destaca-se entre os produzidos de frutas tropicais, tendo excelente aceitação entre os consumidores, representando uma boa porcentagem dos sucos exportados. Estima-se que 60% da produção sejam vendidas *in natura* e o restante é destinada ao processamento industrial, principalmente de suco como principal produto. Além disso, destinada para a obtenção de produtos como sorvetes, *mousses*, bebidas alcoólicas entre outras (SANDI et al., 2003 a).

Como já mencionado, o suco de maracujá é consumido e apreciado em todo o mundo, não só pelo seu sabor, mas, também, por ser fonte natural de carboidratos, carotenóides, vitaminas, minerais entre outros componentes

importantes. Uma mudança apropriada na dieta em relação à inclusão de componentes encontrados em frutas e suco de frutas pode ser importante na prevenção de doenças e para uma vida mais saudável (PINHEIRO et al., 2006).

Mesmo com a grande produção de sucos de frutas, segundo a SEAGRI (2008), a participação do Brasil na exportação deste produto vem caindo, devido à forte concorrência e a qualidade do produto para países como a Colômbia, Peru e Equador. Assim, são justificados os investimentos em tecnologias, desenvolvimento de processos visando qualidade da produtividade e concorrência internacional. 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* (SANDI et al., 2003 a) devem ser efetuados com o objetivo de melhoria do processamento industrial de frutas, na obtenção de sucos ou néctares de alta qualidade. Justifica-se tal reflexão visto o fato que durante o processamento da polpa de maracujá (obtenção de suco), este pode ocasionar alterações no sabor e no aroma principalmente na etapa de pasteurização, as quais são intensificadas durante o armazenamento (SANDI et al., 2003 b).

Uma das características importantes do suco é a cor, constituindo uns dos índices de qualidade no mercado de sucos cítricos. Pode ocorrer alteração da cor durante o processamento e armazenamento do suco, o que pode implicar em não aceitação por parte do consumidor final. Isso pode ocorrer principalmente devido a reações bioquímicas de escurecimento, alterações bioquímicas moleculares, resultando em *flavors* indesejáveis, perda de nutrientes, e formação de pigmentos de coloração marrom (EVANGELISTA, 1998).

As reações enzimáticas são muito importantes em alimentos, delas depende não só a formação de compostos altamente desejáveis, mas podem também, ter consequências indesejáveis. As reações enzimáticas ocorrem não só no alimento natural, mas também durante seu processamento (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Quando um consumidor vai comprar um produto o primeiro impacto na qualidade é a aparência visual (EVANGELISTA, 1998). O controle do escurecimento enzimático durante o armazenamento e processamento de frutos é muito importante para a preservação da aparência natural dos mesmos.

Três componentes devem estar presentes para que a reação de escurecimento enzimático ocorra: enzima, substrato e oxigênio. No caso de

ausência ou bloqueio da participação de um destes na reação (seja por agentes redutores, diminuição de temperatura ou variação de pH), a velocidade de reação diminui significativamente. Sendo o escurecimento enzimático uma reação oxidativa, ele pode ser retardado utilizando-se agentes químicos que sejam capazes de bloquear ou reverter a reação de oxido-redução. Essas substâncias atuam diretamente sobre a enzima, ou sobre os intermediários da reação de formação do pigmento, ou sobre o produto formado (ARAÚJO, 1995).

Deste modo as enzimas polifenoloxidase (EC: 1.10.3.1; PPO) e a ascorbato oxidase (AO, EC: 1.10.3.3), podem ser responsáveis por tais alterações. As reações de escurecimento catalisadas pela PPO presente no suco/frutas, podem gerar produtos que por si só ou através de reações secundárias, alteram a cor do produto final (cor escura). A AO catalisa a reação reversível, de ácido L-ascórbico (Vitamina C) para ácido L-dehidroascórbico na presença de oxigênio molecular (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002). Essas reações comprometem significativamente a qualidade do suco.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com o intuito de manter a pesquisa bibliográfica sobre o assunto do presente trabalho atualizada e também, sempre que possível, complementando, foi realizada uma pesquisa na área da literatura quanto aos trabalhos que possuíam informações que melhor pudessem contribuir para o embasamento teórico e experimental, como também, que resultassem no aprofundamento e ampliação dos temas propostos neste estudo, objetivando assim, aproveitar da melhor forma os recursos concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O estudo de reações de escurecimento enzimático que ocorrem no processamento industrial de suco de maracujá e das enzimas polifenoloxidase (PPO, EC: 1.14.18.1) e a ascorbato oxidase (AO, EC: 1.10.3.3), são bastante promissores, sobretudo ao se considerar as possibilidades de aplicação dos dados obtidos nessa pesquisa no melhoramento do processo industrial de extração, estabilização e armazenagem de suco de maracujá, podendo melhorar significativamente a qualidade do produto final.

Os artigos resumidos a seguir mostram que as pesquisas sobre a polifenoloxidase (PPO, EC: 1.14.18.1) e a ascorbato oxidase (AO, EC: 1.10.3.3), apesar de ter tido início na década de 1980, ainda necessita de estudo complementares.

2.1 O BRASIL E AS FRUTAS TROPICAIS

O Brasil é o país das frutas. A terra antiga desse país continental é naturalmente pródiga de delícias que nascem com facilidade em árvores, arbustos, trepadeiras, palmeiras, bromélias e cactos de toda variedade. São milhares de plantas endêmicas que geram frutos tão variados como o buriti, mandacaru, a pitanga, o caju, a sapucaia, o açaí, o ingá, o guaraná, o cupuaçu, o pequi, a jabuticaba, entre outras. Encontram-se ainda, por aqui muitos outros frutos originários da quente e úmida floresta tropical amazônica e das ilhas caribenhas, que se espalharam naturalmente pelo continente americano por meio da ação conjunta de animais e comunidades nativas humanas. Nessa categoria estão o abacate, o cacau, a pupunha, a goiaba, o mamão, a pinha, o maracujá e a graviola, entre outros (SILVA; TASSARA, 2005).

O Brasil é um dos maiores países produtores de frutas do mundo, com vantagens sobre os demais pela sua própria natureza, condições climáticas, sol forte e constante e abundância de água. O Brasil produz frutas doces e de altíssima qualidade ao longo de quase todo o ano. Inclusive aquelas de climas temperados, como maçã e a uva. Essa condição natural, aliado ao desenvolvimento da pesquisa e de modernas tecnologias de produção, que envolvem a seleção e o aprimoramento de cultivares, o controle de pragas, a aceleração de ciclo produtivo, entre outras, permitirá que o país se torne, em breve, no maior pomar comercial do planeta (SILVA; TASSARA, 2005).

As frutas são consideradas as principais fontes de minerais necessários na dieta humana. Análises químicas mostraram que as frutas apresentam, em geral, teores de nutrientes maiores do que encontrados em outras partes vegetais, conforme verificado na literatura. Desta forma, pode-se considerar que as frutas analisadas podem ser úteis como fontes alternativas de alimento ou como ingredientes para obtenção de preparações processadas. Foi determinada a composição centesimal de 7 elementos minerais com importância nutricional (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Zn) em 7 tipos diferentes de cascas de frutas: abacate, abacaxi, banana, mamão, maracujá, melão e tangerina, cultivadas na pesquisa realizada no Estado do Rio Grande do Norte (GONDIM et al., 2005).

As frutas contêm diferentes fitoquímicos, muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes que podem estar relacionadas com o retardo do envelhecimento e com a prevenção de certas doenças como o câncer, acompanhado de doenças-crônicas-inflamatórias, doenças cardíacas, pulmonares e problemas associados com o envelhecimento (SIQUEIRA et al., 1997; LIMA et al., 2002).

Dentre os fitoquímicos com ação antioxidantes presentes nas frutas tropicais os que têm recebido maior atenção por sua possível ação benéfica ao organismo, estão a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), os carotenóides, os flavonóides e os polifenóis (BARREIROS et al., 2006). Frente à ação antioxidante exibida, as frutas podem ser apontadas como boas fontes de antioxidantes naturais que podem ser mais efetivas e econômicas do que o uso de suplementos dietéticos na proteção do organismo contra os danos oxidativos, portanto, o seu consumo deve ser estimulado (MELO; VILAS BOAS, 2007).

As ações fisiológicas exercidas pelos polifenóis já foram relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, entre outras, principalmente em função da elevada capacidade antioxidante (BREIER, 2010).

As frutas além de serem deliciosas ainda exercem papéis importantíssimos no nosso organismo, pois são fontes de água, fibras (celulose), diversas vitaminas, sais minerais, frutose ou levulose (que são os açúcares naturais das frutas), carboidratos, gorduras e proteínas, de uma maneira bem equilibrada, sendo que a maioria das frutas é de baixas calorias e com preços acessíveis as mais variadas classes econômicas, além de sabores e aromas deliciosos.

O consumo insuficiente de frutas é um fator de risco relacionado à causa de doenças crônicas não transmissíveis para a população. Esses alimentos são importantes para uma dieta saudável, pois são fontes de micronutrientes, fibras e de outros componentes com propriedades funcionais. As frutas têm baixa densidade energética, o que favorece a manutenção saudável do peso corporal (FIGUEIREDO, JAIME e MONTEIRO, 2008).

Estudos científicos demonstram que o consumo de pelo menos 3 porções diárias de frutas contribuem com a promoção da saúde e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) e na manutenção do peso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Levy-Costa et al. (2005) em estudo sobre a distribuição e evolução da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil entre os anos de 1974 e 2003 verificaram que frutas e hortaliças correspondiam a apenas 2,3% das calorias totais da dieta, ou seja, aproximadamente um terço do recomendado pela Organização Mundial de Saúde. Jaime et al. (2007) constataram que menos da metade dos indivíduos no Brasil consomem frutas diariamente e menos de um terço da população relata o consumo diário de hortaliças.

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que o baixo consumo de hortaliças e frutas apresenta-se entre os cinco principais fatores de risco para a carga global de doença e que muitas mortes no mundo são devido a uma alimentação inadequada. Evidências epidemiológicas mostram associação inversa entre o consumo de hortaliças e frutas e o risco de doenças cardiovasculares e determinados tipos de câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

De acordo com as evidências apresentadas pelo Relatório Mundial da Saúde 2003, estima-se que até 2,7 milhões de vidas poderiam ser salvas anualmente em todo o mundo, se o consumo de hortaliças e frutas fosse adequado (GOMES, 2007).

Comportamentos alimentares podem não somente influenciar o estado de saúde presente, como também determinar se mais tarde em sua vida o indivíduo irá desenvolver ou não alguma doença como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (FIGUEIREDO; JAIME; MONTEIRO, 2008).

Portanto, a alimentação é fundamental para uma vida saudável. Quando bem nutrido, o corpo desenvolve melhor suas funções vitais e a expectativa de vida aumenta. No Brasil, de acordo com uma pesquisa do Ministério da Saúde, as pessoas precisam incorporar alimentos mais nutritivos ao seu cardápio. Embora a recomendação de frutas e hortaliças seja conhecida por quase toda população, ainda não é uma unanimidade no cardápio diário dos brasileiros (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Aumentar o consumo de frutas, legumes e verduras tem sido um dos principais desafios da atualidade para a saúde pública, de acordo com Kraisid Tontisirin, Diretor da Divisão de Alimentação e Nutrição da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*). Segundo o mesmo, há uma série de razões, diferenciadas entre as populações, que levam ao não-consumo de frutas, legumes e verduras - preço, conveniência, sabor e estigma, para citar algumas. A evidência científica tem demonstrado e sustentado o consumo de frutas, legumes e verduras como altamente recomendado e, cada vez mais, instituições nacionais de saúde e agricultura, representantes da indústria e de organizações internacionais, incluindo a FAO, têm trabalhado para acessar esses obstáculos e discutir formas de promover o consumo de frutas, legumes e verduras ao redor do mundo (GOMES, 2007).

2.2 MARACUJÁ

O maracujá-amarelo pertence à família Passifloraceae e gênero *Passiflora* composto por 24 subgêneros e 465 espécies, das quais 150 a 200 são nativas do Brasil (CUNHA et al., 2002). Entre as espécies, cerca de 70 produzem frutas que podem ser aproveitadas como alimento (CUNHA et al., 2004).

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) (Figura 1).

O suco, com aroma e sabor bastante agradável é bem aceito nos diversos centros consumidores (LIMA et al., 2002). A importância é dada pelo valor medicinal e alimentício, apresentando elevados teores de fósforo, potássio, vitaminas A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), C (ácido ascórbico) e niacina (MATSUURA; FOLEGATTI, 2002). Além disso, o mesocarpo possui um alto teor de pectina e a semente contém óleo, carboidratos, proteínas e minerais (MATSUURA; FOLEGATTI, 2004). Entretanto, o valor econômico e social da cultura, encontra-se associado à alimentação humana na forma de suco, doce, geléia, sorvete e licor (CANÇADO JÚNIOR et al., 2000).



Figura 1 - Frutos de maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)

Fonte: http://forum.iogos.uol.com.br/olhem-esse-maracuja- t_121901

O maracujazeiro pode ser cultivado na maioria das regiões tropicais e subtropicais com altitude entre 100 a 900 m, temperatura média em torno de 23 a 25°C umidade relativa baixa e ausência de frio e geada (MANICA, 1981). No Brasil, é cultivado em escala variável no Nordeste, pelas condições favoráveis ao desenvolvimento, aonde nos últimos anos vem ganhando significativo impulso através de aumento da área plantada e de novas tecnologias geradas (RUGGIERO, 2000).

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).

2.3 BEBIDAS A BASE DE MARACUJÁ

De acordo com Cabral (2005), 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. 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).

a) Suco

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.

É proibida a adição de aromas e corantes artificiais e não será permitida a associação de açúcares e edulcorantes hipocalóricos e não-calóricos.

O suco não poderá conter substâncias estranhas à fruta ou parte do vegetal de sua origem, excetuadas as previstas na legislação específica.

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”.

No rótulo da embalagem ou vasilhame do suco será mencionado o nome da fruta, ou parte do vegetal, de sua origem da parte comestível do Maracujá (*Passiflora* spp.), através de processo tecnológico adequado.

Ainda segundo Brasil (2000), o suco de maracujá deve obedecer às características sensoriais abaixo:

Cor: de amarela a alaranjado

Sabor: próprio e ácido

Aroma: Próprio

O suco de maracujá deve apresentar os padrões de identidade e qualidade de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Padrões de identidade e qualidade do suco de maracujá.

Características	Mínimo	Máximo
Sólidos solúveis em °Bx, a 20°C	11,00	-
Acidez total em ácido cítrico (g/100g)	2,5	-
Açúcares totais (g/100g)	-	18,00

Fonte: BRASIL (2000).

O Suco de maracujá deverá obedecer aos Padrões de Identidade e Qualidade fixados para suco de fruta.

a.1) Suco integral

Suco integral é o suco sem adição de açúcar e na sua concentração natural, sendo vedada o uso de tal designação para o suco reconstituído (BRASIL, 2003).

a.2) Suco reconstituído

Suco reconstituído é o 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" (BRASIL, 2003).

a.3) Suco concentrado

Suco concentrado é o suco que for parcialmente desidratado, devendo mencionar no rótulo o percentual de sua concentração (BRASIL, 2003).

a.4) Suco Tropical

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2003), suco tropical é o 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.

O suco tropical classifica-se em:

- Suco Tropical de (nome da fruta): é o suco originado da fruta em si.
- Suco Tropical Misto de (nomes das frutas): é o suco obtido de duas ou mais frutas. É opcional a designação: "Misto".

É vedada a designação de "Suco Tropical" ao suco que não necessite de água na sua elaboração e que não seja proveniente de fruta de origem tropical.

Define-se suco tropical de maracujá como a bebida não fermentada, obtida pela dissolução, em água potável, da polpa do maracujá (*Passiflora*, ssp), por meio de processo tecnológico adequado.

Ainda segundo Brasil (2003), o suco tropical de maracujá deve obedecer às características sensoriais abaixo:

- **Cor:** variando de amarela a alaranjada;
- **Sabor:** próprio;
- **Aroma:** próprio.

O suco tropical de maracujá deve apresentar os padrões de identidade e qualidade de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Padrões de identidade e qualidade do suco tropical de maracujá.

Características	Não adoçado		Adoçado	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Polpa de maracujá (g/100g)	50,00	-	12,00	-
Sólidos solúveis em °Bx, a 20°C	6,00	-	11,00	-
Acidez total em ácido cítrico (g/100g)	1,25	-	0,27	-
Açúcares totais (g/100g)	-	9,00	8,00	-

Fonte: BRASIL (2003)

O Suco Tropical de Maracujá deve obedecer aos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais, fixados para o Suco Tropical.

2.4 ENZIMAS

Assim como todas as frutas tropicais, o maracujá-amarelo possui diversas enzimas endógenas, dentre estas a Polifenoloxidase (PPO, EC: 1.14.18.1) e a Ascorbato Oxidase (AO, EC: 1.10.3.3) são de grande interesse no processamento do suco de maracujá-amarelo. A PPO catalisa a hidroxilação de monofénóis

conduzindo a formação de di-fenóis e, ou oxidação de di-fenóis para formar quinonas. Em seguida, por condensação de quinonas são formadas as melanoidinas que são pigmentos escuros. A AO catalisa a reação reversível, de ácido L-ascórbico (Vitamina C) para ácido L-dehidroascórbico na presença de oxigênio molecular (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

Apesar da evidência da presença de polifenoloxidasas e de Ascorbato oxidase no maracujá e da importância deste fator para a qualidade do produto industrializado, a literatura é ainda bastante escassa no que tange ao estudo das enzimas em maracujá. (MAYER; HAREL, 1979).

2.4.1 Polifenoloxidase

Polifenoloxidasas (PPOs) são enzimas que catalisam duas reações distintas: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenóis (atividade de cresolase, tirosinase ou monofenol monooxigenase – EC: 1.14.18.1) e a oxidação (desidrogenação) desses compostos para respectivas *o*-quinonas (atividade de catecolase ou difenol oxigênio oxidoreductase – EC: 1.10.3.2). As catecol oxidases podem catalisar a oxidação dos *o*-difenóis em *o*-quinonas usando a atividade catecolase (MAYER e HAREL, 1979). As lacases, por sua vez, catalisam reações de oxidação, dimetilação e polimerização de compostos fenólicos. (MAYER, 1987). Adicionalmente, a atividade cresolase pode converter monofenóis em *o*-difenóis (MAYER; HAREL, 1979; RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 1992) (Figura 2).

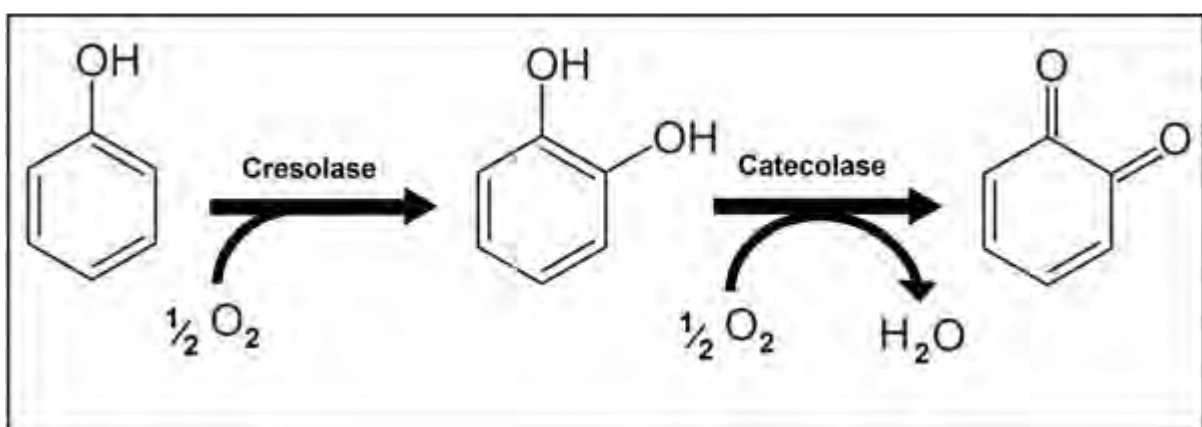


Figura 2- Atividade cresolase e catecolase da polifenoloxidase. Adaptado de PRIGENT, (2005).

A atividade da catecolase leva à formação de diferentes estados de oxidação de fenóis (Figura 3). A forma fenólica permite a ligação com proteínas por interação hidrofóbica e por ponte de hidrogênio. Estes tipos de ligação têm baixa energia, sendo reversíveis. Por outro lado, a forma iônica (fenolato) e quinonas interagem covalentemente com proteínas, com energia entre 100 e 1000 kJ/mol, sendo irreversíveis (APPEL, 1993).



Figura 3 - Diferentes estados de oxidação de fenóis decorrentes da atividade de catecolase de PPOs (PRIGENT, 2005).

PPOs são enzimas codificadas por genes nucleares e, apesar de estarem localizadas em plastídeos (HUNT et al., 1993) e separadas de seus substratos, os compostos fenólicos, que estão localizados principalmente nos vacúolos, têm atividade só quando liberados no rompimento celular. Em decorrência disso é que surge o que se acredita ser o principal papel dessas enzimas em plantas, ou seja, uma forma de defesa contra microorganismos, insetos e mamíferos herbívoros (MAYER; HAREL, 1991; HARBORNE, 1991; APPEL, 1993; STEFFENS et al., 2007). Outras considerações sobre a função fisiológica de PPOs ainda não foram confirmadas (VAUGHN et al., 1988; THYGESEN et al., 1995; THIPYAPONG et al., 1997). Devido à sua alta afinidade por oxigênio, tem sido proposto que PPOs podem atuar na fotofosforilação pseudocíclica (tendo oxigênio comoceptor final de elétrons, ao invés de NADP⁺) e regular o nível de oxigênio plastídico (Vaughn, 1988; TREBST; DEPKA, 1995). PPOs são normalmente encontradas em uma variedade de tecidos e órgãos, e maior atividade é encontrada em tecidos em estádios iniciais

de desenvolvimento, onde também a quantidade de fenóis é alta (Mayer; Harel, 1991).

A questão de isoformas de PPO é também um ponto que deve ser considerado, uma vez que este parâmetro vem sendo bastante utilizado para estabelecer relações genéticas entre plantas, pelo padrão de bandas separadas em eletroforese. Em muitas plantas nas quais têm sido detectadas múltiplas formas de PPO, por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) ou focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF), não é seguro afirmar que o número observado de bandas é produto do mesmo número de genes. A razão disto é que PPO reage prontamente com quinonas e também sofre proteólise sem perder atividade (STEFFENS et al., 2007) Assim, em um mesmo gel podem ser observadas diferentes bandas, que na verdade poderiam ser de uma mesma proteína que sofreu alterações(ex: ação de proteases). Harel et al. (1973) demonstraram que parte da suposta multicplidade de formas de PPO poderia ser reproduzida com proteases obtidas comercialmente. Desta forma, talvez em vários trabalhos, parte das isoformas fossem artefatos de isolamento e purificação, gerados por alquilação com quinonas e proteólise parcial. Recentemente, um grupo espanhol mostrou em banana que a eliminação de fenóis dos extratos gerava apenas uma banda de atividade, ao contrário do que se tinha observado em trabalhos anteriores com PPO nesta planta (SOJO et al., 1998)

Porém, muitas plantas parecem possuir pequena família multigene de PPOs, que são expressas em diferentes tempos (estádios de desenvolvimento) ou tecidos específicos. Em tomateiro demonstrou-se que a PPO é codificada por sete genes bastante conservados (THIPYAPONG et al., 1997). Usando sondas específicas capazes de reconhecer PPO A/C, PPO B, PPO D e PPO E/F, estes autores mostraram que sempre existia a predominância de uma isoforma em determinado tecido e/ou em determinado estágio de desenvolvimento da planta.

Embora o sítio ativo da enzima, caracterizado por um centro cúprico dinuclear (Cu^{+2}), seja uma característica invariável, as PPO, que além de plantas, podem também ser encontradas em animais e fungos, mostram uma variabilidade considerável quanto à sequências de aminoácidos, o tamanho, glicosilação e ativação entre as espécies (Figura 4) (CENI, 2005). Assim, a maioria das PPO de plantas e fungos existe em múltiplas formas como formas imaturas, formas maduras e latentes, e formas ativas (FARIA et al., 2007).

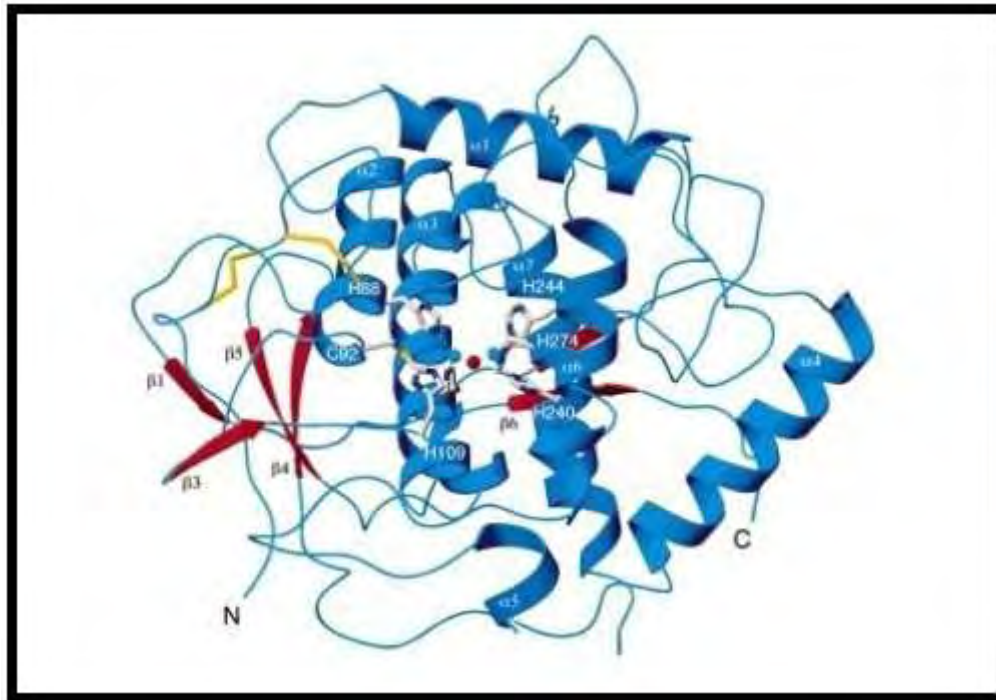


Figura 4 - Estrutura da enzima Polifenoloxidase (KLABUNDE et. al,1998). Fonte: http://www.nature.com/nsmb/journal/v5/n12/full/nsb1208_1084.html.

A massa molar das polifenoloxidases varia de 57 a 62 kDa, com exceção da PPO dos cogumelos (ex: *Agaricus bisporus*) que apresenta 128 kDa, possuindo duas cadeias maiores com 43-45 kDa cada, onde estão os sítios ativos, e duas menores com 13 kDa cada (ARAÚJO, 1995).

O papel fisiológico da polifenoloxidase (PPO) em plantas tem sido relacionado à resistência ao ataque de insetos e microorganismos. Aparentemente, o dano causado pelo rompimento celular seria o responsável por este papel, ou seja, a liberação da enzima dos plastídeos e seu posterior contato com seus substratos, os fenóis liberados do vacúolo. Como resultado da oxidação dos fenóis seriam produzidas quinonas, compostos que são bastante reativos e que se ligariam irreversivelmente a proteínas. As quinonas podem atuar de duas formas na resistência. A primeira, diminuindo a qualidade da proteína da própria planta, pois o complexo proteína-quinona é menos digerível pelo trato digestivo de insetos, fazendo com que os mesmos tenham menor aproveitamento do nitrogênio e o comprometimento do crescimento. A segunda possibilidade é a ligação direta das quinonas com proteínas do trato digestivo dos insetos, diminuindo a sua funcionalidade.

Em relação a insetos, um exemplo bastante convincente do papel de PPO na resistência é o trabalho de Felton et al. (1994), que demonstraram que a ligação de quinonas, formadas durante o ataque de lagartas de *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua* em tomateiro, com proteínas do próprio tecido vegetal levava à diminuição da qualidade nutritiva do tecido. Ou melhor, uma vez formado, o complexo quinona-proteína passa a não ser digerido eficientemente pelo inseto, causando menor desenvolvimento das lagartas. Além disso, foi observado que a secreção bucal das lagartas induzia aumento de atividade da PPO. Recentemente, por comparação de expressão de determinados genes de resistência, mostrou-se que o dano causado por lagartas se alimentando em plantas induzia maior expressão de genes do que o dano simulado (KORTH; DIXON, 1997).

Apesar dos trabalhos indicando que variedades resistentes têm maior atividade constitutiva de PPO ou que ocorre maior aumento da atividade da enzima em tecidos infectados, ainda não foi oferecida uma prova definitiva do seu envolvimento na resistência.

Correlação positiva entre PPO e resistência a *Pseudomonas syringae* pv. tomato foi encontrada na avaliação de 20 variedades de tomateiros (BASHAN et al., 1985). Após a infecção houve aumento maior de PPO nas variedades resistentes. Maior atividade constitutiva também foi encontrada em tubérculos de batatas resistentes a *Fusarium sambucinum*, além de também ter sido observado aumento após a infecção pelo patógeno (RAY; HAMMERSHMITZ, 1998). O mesmo foi notado para um híbrido entre *Nicotiana glutinosa* e *Nicotiana debneyi*, quanto à resistência a *P. syringae* pv. tabaci, *P. syringae* pv. syringae, *Peronospora tabacina*, *Cercospora nicotianae*, *Chalara elegans* e *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (GOY et al., 1992). Folhas de cafeeiro resistente à ferrugem alaranjada também apresentaram maior atividade de PPO após a infecção por *H. vastatrix* (MAXEMIUC-NACCACHE; DIETRICH, 1985).

Admite-se que o mecanismo de oxidação fenóis por polifenoloxidase possa ser modelado através da cinética de Michaelis-Menten (SANCHEZ-FERRER et al., 1995; HALAOULI et al., 2006). De acordo com o mecanismo molecular da ação da PPO (figura 5), existem três formas dessa enzima, met-PPO (Cu^{+2}), deoxy-PPO (Cu^{+1}) e oxy-PPO (Cu^{+2}).

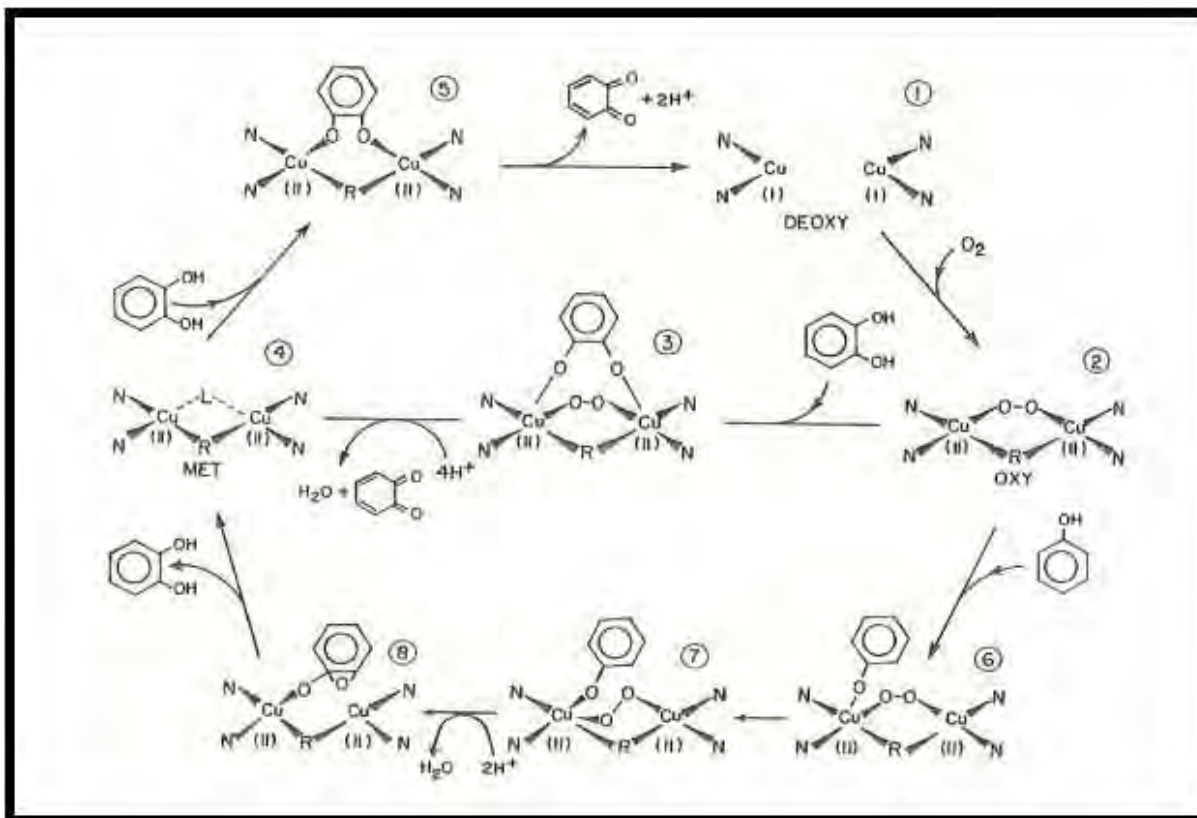


Figura 5 - Mecanismo de reação das atividades de monofenolase e difenolase da PPO. (reproduzido de ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

Acredita-se que met-PPO seja a forma latente da enzima (HIMMELWRIGHT et al., 1980; SOLOMON; BALDWIN; LOWERY, 1992). Ela é reduzida a deoxy-PPO via oxidação de uma molécula de catecol a *o*-benzoquinona. Na oxidação de monofenóis o sítio ativo da enzima combina com o oxigênio formando uma oxy-PPO intermediária. Os substratos monofenólicos podem reagir somente com a oxy-PPO formando um complexo ternário PPO-O₂-monofenol. A formação do difenol é seguida pela liberação da enzima na forma met que está pronta para outra volta no ciclo. Na via de oxidação de difenóis, substratos difenólicos não reagem somente com a oxy-PPO, mas também com a met-PPO; esta é inicialmente reduzida à forma deoxy, com a oxidação de uma molécula de *o*-difenoil que combina com o oxigênio formando a oxy-PPO, que forma o complexo difenol-PPO. Depois da oxidação do catecol a *o*-benzoquinona, a enzima é reduzida à forma met (YORUK; MARSHALL, 2003).

2.4.2 Ascorbato oxidase

O ácido ascórbico ou vitamina C foi inicialmente, isolado e purificado de paprica, possivelmente devido à alta concentração deste cido. O conteúdo de cido L-ascórbico alto  característico de tecidos vegetais, e o Ascorbato é reconhecido como uma das moléculas antioxidantes mais importante tanto no metabolismo normal de plantas como no metabolismo de células animais (GARCÍA-PINEDA et al., 2004).

O cido ascórbico, presente em sucos de frutas naturais, oxida-se rapidamente, e em sucos comercializados a oxidação desse ácido depende da concentração e tipo de antioxidante utilizado, bem como das características da embalagem e condições de armazenamento dos produtos (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

A ascorbato oxidase (AO) catalisa a oxidação reversível do ácido ascórbico para dehidroascórbico com a concomitante redução de quatro elétrons do oxigênio para gua. Esta reação está representada na Figura 6.

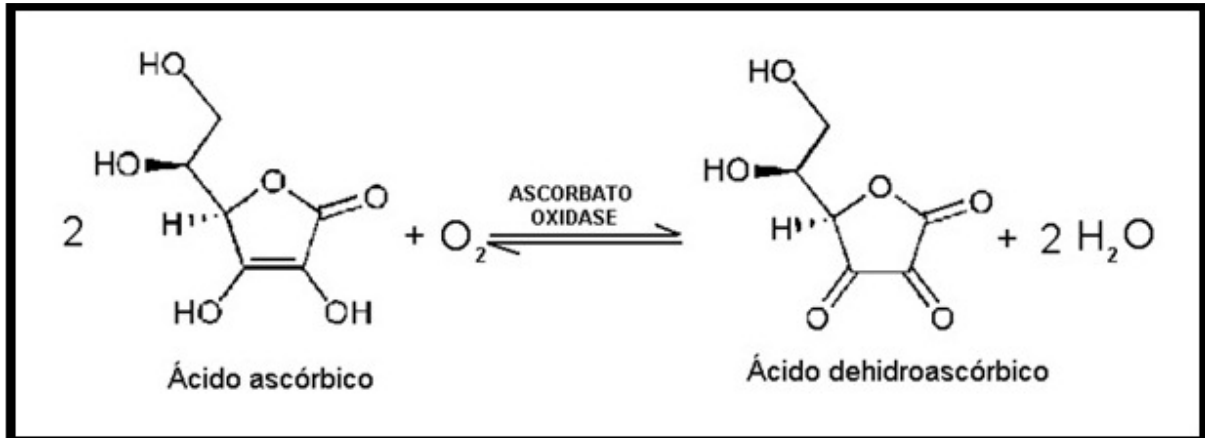


Figura 6 - Reação catalisada pela Ascorbato oxidase.

A reação enzimática pode ser facilmente detectada pela diminuição do coeficiente de extinção do cido L-ascórbico a 245 nm (λ máxima na qual os produtos da reação não absorvem) ou pelo consumo do oxigênio, polarograficamente. Pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio podem ser produzidas como subproduto da reação, causando desnaturação enzimática. Este fenmeno é denominado de reação de inativação. (CARVALHO JUNIOR et al., 1981).

A enzima Ascorbato oxidase (EC: 1.10.3.3) tem sido extraída de diversos vegetais como: melão, abóbora, pepino, uva, laranja, pimenta, tomate, pimentão e carambola. Estudos de purificação e expressão genica foram realizados, porém, sua função biológica ainda é pouco conhecida. Sabe-se que extrações, feridas e outras condições de tensão ou estresse da planta estão relacionados com a modificação dos níveis de ácido ascórbico (GARCÍA-PINEDA et al., 2004).

Kato e Esaka (2000) propuseram que a AO pode ter um papel importante no crescimento da planta, na divisão celular e na regulação da membrana. Também, a enzima pode ter uma função durante respostas estresse modificando os níveis de ácido ascórbico.

A Ascorbato oxidase é uma enzima dimérica, contém cobre como cofator e catalisa a redução de quatro elétrons de dois oxigênios para água, usando preferivelmente a molécula do ácido ascórbico como substrato. Esta enzima pertence à família das oxidases azuis multicobres que incluem lacases (EC: 1.10.3.2) em plantas e microrganismos, e ceruloplasminas (EC: 1.16.3.1) em animais (SANTAGOSTINI et al., 2004).

As oxidases azuis multicobres formam um subgrupo de cupro-proteínas, que são classificadas de acordo com suas propriedades espectroscópicas dos seus íons metálicos (Cu), dividindo-as em três grupos, cobre tipo 1 ou T1, tipo 2 ou T2 e tipo 3 ou T3 (SAID; PEITRO, 2004). O cobre T1 é responsável pela intensa coloração azul da AO, enquanto o cobre T2 pela transferência de elétrons para O₂ (GUPTA et al., 2004). Dois íons de cobre T3 são ligados através de uma ponte OH e acredita-se de atuar como receptores de elétrons (MESSERSCHMIDT et al., 1992). Este último pode ainda formar o arranjo trinuclear T2/T3 (SAID; PIETRO, 2004). AO de plantas são homodímeros com cada subunidade contendo um cobre Tipo T1 e um T2/T3 arranjo trinuclear (MESSERSCHMIDT et al., 1992).

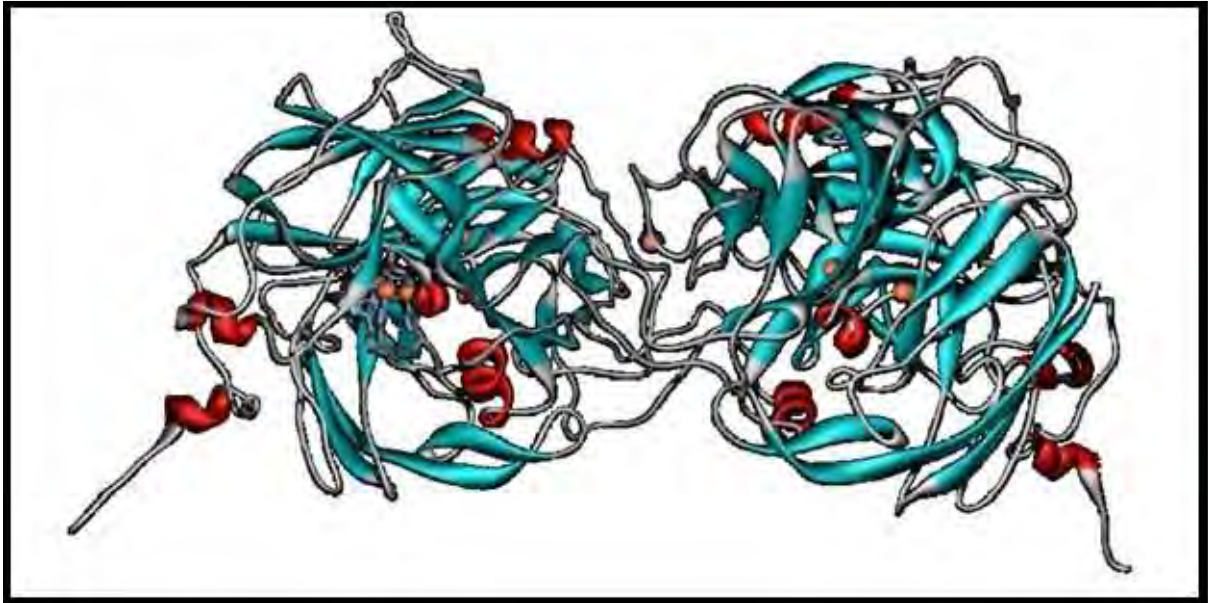


Figura 7 - Estrutura da enzima Ascorbato oxidase (Protein Data Bank/PDB:1AOZ).

Ascorbato oxidase, isolada de plantas pertencentes à família *Cucurbitaceae*, foi caracterizada quanto às propriedades físico-químicas, como massa molar, ponto isoelétrico, pH ótimo e temperatura ótima para cada espécie vegetal. Baseado em análise cristalográfica da Ascorbato oxidase de abobrinha (*Curcubita pepo medulosa*), foi observado que todos os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação com o cobre estão situados em quatro regiões ricas em histidina, a qual exibe uma sequência de notável homologia com as oxidases multicobres (SUGINO et al., 2002).

A estrutura da Ascorbato oxidase consiste de duas subunidades idênticas com 552 resíduos de aminoácidos e formadas por três domínios, predominantemente em estado β -conformacional e foram encontradas poucas formas helicoidais (MESSERSCHMIDT et al., 1990). A enzima apresenta uma molécula espectroscopicamente muito complexa porque cada monômero contém 23 resíduos de tirosina e 14 resíduos de triptofano (DI VENERE et al., 1998).

A enzima AO extraída da *Cucurbita maxima* e da *Cucurbita pepo condensata* possuem massa molar de 150 kDa (CARVALHO et al., 1981) e a extraída da *Cucurbita pepo medulosa* tem massa molar de 140 kDa (MARITANO et al., 1996). AO é constituída de duas subunidades idênticas ligadas por duas pontes dissulfeto, cada subunidade tem uma massa molar de 70 kDa (SUGINO et al., 2002).

A atividade da AO de *Cucurbita maxima* demonstrou seguir a lei de Michaelis-Menten, que depende da ligação como o ácido ascórbico e como o oxigênio (CARVALHO et al., 1981). AO de *C. maxima* é considerada relativamente resistente ao calor, pois sua atividade permaneceu quase inalterada quando foi incubada a 0-40 °C por 30 min, mas a atividade foi completamente perdida após 1 min a 100°C (CARVALHO et al., 1981). A ascorbato oxidase dimérica, extraída de pepino, demonstrou ser a forma mais resistente à inativação térmica (AMON; MARKAKIS,1973). Todavia, não foram realizados até agora estudos termodinâmicos sistemáticos, com este sistema enzimático.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS QUE AFETAM A CINÉTICA ENZIMÁTICA

No presente estudo pretende-se correlacionar a taxa de uma reação enzimática com alguns dos fatores que a afetam, em especial a concentração de substrato e a temperatura. Embora a concentração de enzimas e de oxigênio sejam parâmetros importantes em uma investigação enzimática (ARAÚJO, 1995; LIMA et al., 2002), os mesmos não serão estudados neste trabalho. A dependência da atividade enzimática da Polifenoloxidase e da Ascorbato oxidase com o pH será também investigada. Neste contexto, nesta seção é apresentada uma breve descrição do efeito da concentração de substrato, da temperatura e do pH sobre a cinética enzimática.

2.5.1 Substrato

A velocidade das reações enzimáticas, as quais geralmente são descritas pelo modelo de Michaelis-Menten (LEHNINGER et al., 2006), é caracterizada por uma razão entre dois polinômios de 1ª ordem com dois parâmetros ajustáveis (Equação 1).

$$v_0 = \frac{k_{cat}[E][S]_0}{k_M + [S]_0} = \frac{v_{max}[S]_0}{k_M + [S]_0} \quad (1)$$

Na equação, v_{max} representa a velocidade máxima de reação, enquanto que k_M equivale à concentração de substrato necessária para que se obtenha metade da velocidade máxima possível.

Resumidamente, pode-se dizer que um diagrama da velocidade no tempo zero em função da concentração de substrato inicial é frequentemente representado por uma hipérbole (MARTINEZ e DUVNJAK, 2006) com crescimento da velocidade com o aumento da $[S]_0$.

Da expressão de Michaelis-Menten com $[S] = [S]_0$ é possível notar que quando a concentração inicial de substrato é muito superior ao parâmetro k_M a velocidade inicial de reação é equivalente à velocidade máxima (Equação 2). Isto faz com que a reação comporte-se como uma equação de ordem zero, ou seja, (a velocidade da reação é independente da concentração do substrato).

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]_0}{k_M + [S]_0} = \frac{v_{max}[S]_0}{k_M \ll [S]_0} = \frac{v_{max}[S]_0}{[S]_0} = v_{max} \quad (2)$$

Entretanto, como já mencionado, quando a concentração inicial de substrato for igual ao valor do parâmetro k_M a velocidade inicial de reação será igual à metade da velocidade máxima (Equação 3). Deste modo, a utilização de concentrações de substrato iguais ao valor do parâmetro k_M fará com que se obtenham velocidades iniciais que correspondem à metade da velocidade máxima.

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]_0}{k_M + [S]_0} = \frac{v_{max}[S]_0}{[S]_0 + [S]_0} = \frac{v_{max}[S]_0}{2[S]_0} = \frac{v_{max}}{2} \quad (3)$$

De forma análoga aos casos representados pelas Equações (2) e (3), quando a concentração inicial de substrato for muito inferior ao parâmetro k_M admite-se a simplificação representada pela Equação (4). Nesta situação, a cinética enzimática é representada por uma equação de primeira ordem, sendo a velocidade diretamente proporcional à concentração de substrato.

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]_0}{k_M + [S]_0} = \frac{v_{max}[S]_0}{k_M \gg [S]_0} = (v_{max}/k_M)[S]_0 \quad (4)$$

2.5.2 Temperatura

A maioria das reações se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Um aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões reativas por unidade de tempo.

As enzimas são estruturas complexas, cuja atividade catalítica provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada que justapõe os grupamentos específicos dos aminoácidos de tal modo a formar sítios estéreo-específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. A estrutura terciária de uma enzima é mantida principalmente por um grande número de ligações não covalentes fracas. Em termos práticos, uma molécula de enzima é uma estrutura delicada e frágil. Se a molécula absorve energia demais, a estrutura terciária rompe-se e a enzima ficará desnaturada (Figura 8), isto é, perderá a atividade catalítica. Logo, à medida que a temperatura cresce, é esperado um aumento na velocidade de reação, resultante do aumento das colisões entre enzima e substrato, é minimizado devido ao aumento da velocidade de desnaturação (LEHNINGER et al., 2006).

Embora o aumento da temperatura possa provocar um rompimento da estrutura tridimensional da enzima, provocando sua desnaturação, para a determinação da temperatura ótima de reação os ensaios serão conduzidos em uma faixa de temperatura onde este efeito é pouco acentuado.

Basicamente a máxima temperatura dos ensaios será definida a partir de dados da literatura (MARTINEZ; DUVNJAK, 2006). Sabe-se que os substratos frequentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor, presumivelmente porque a ligação com o substrato estabiliza a estrutura tridimensional da enzima, logo o tipo de substrato deve interferir na faixa de temperatura na qual o fenômeno de desativação enzimática ocorre de forma predominante. Neste sentido, a faixa de

temperatura escolhida para os ensaios experimentais desta investigação será baseada em dados da literatura que envolvem o mesmo substrato aqui utilizado.

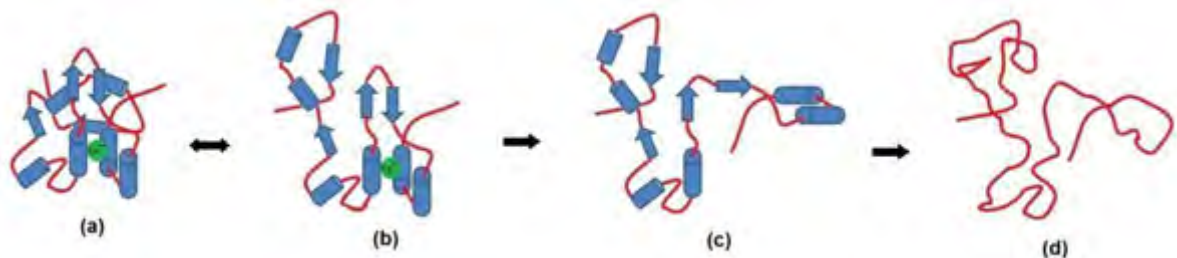


Figura 8 - Processo de desnaturação enzimática. (a) Estrutura tridimensional nativa estabilizada por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas. Estrutura desestabilizada pelas vibrações térmicas (pode ter atividade, às vezes maior que a nativa, se a estrutura for mais flexível). (c) Estrutura nativa tridimensional totalmente rompida (estrutura secundária mantida, mas provavelmente sem atividade). (d) Rolo aleatório. Fonte: MITCHELL, (2008).

Em um intervalo de temperatura caracterizado por um efeito desprezível da desnaturação enzimática sobre a reação, a expressão de Arrhenius (Equação 5) frequentemente representa satisfatoriamente a variação de velocidade com a temperatura.

$$k = A_0 \exp \left[\frac{-E_a}{RT} \right] \quad (5)$$

Onde: k constante de velocidade; A_0 constante pré-exponencial ou fator de frequência; E_a Energia de ativação (KJ.mol^{-1}); R constante dos gases ($8,314472 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$); T Temperatura em Kelvin (K).

Sendo assim, o parâmetro v_0 do modelo de Michaelis-Menten (Equação 1) poderá ser correlacionado a temperatura através da Equação 6.

$$v_0 = A_0 \exp \left[\frac{-E_a}{RT} \right] \quad (6)$$

2.5.3. pH

O efeito do pH na estabilidade e atividade da enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema. Os sítios ativos das enzimas são frequentemente compostos por grupos ionizáveis, estes devem se encontrar numa forma iônica adequada para que mantenham a conformação do sítio ativo e liguem-se aos substratos catalisando a reação (LEHNINGER et al.,2006).

O efeito do pH na estabilidade está relacionado com o papel dos grupos dissociáveis na estabilidade da estrutura tridimensional da enzima. Quando a enzima encontra-se em seu pH ótimo para a estabilidade, existirão grupos carregados e neutros que trabalham em conjunto de forma a manter a conformação da enzima estável. Com a mudança de pH, grupos que anteriormente eram carregados, podem se tornar neutros, e então a contribuição destas ligações é perdida. Além disso, grupos dissociáveis que eram neutros no pH ótimo podem ficar carregados, podendo causar repulsão dentro da molécula, desestabilizando-a.

Adicionalmente, a estabilidade de uma enzima ao pH também pode depender de fatores como (a) temperatura, (b) força iônica, (c) natureza química do tampão, (d) concentração de vários conservantes (glicerol, compostos sulfidrílicos), (e) concentração de íons metálicos contaminantes, (f) concentração de substratos ou cofatores da enzima, e (g) concentração da enzima.

As enzimas contêm muitas cadeias laterais ácidas/básicas que, como citado anteriormente, podem ser protonadas ou não, dependendo do pH do meio reacional. Na catálise, portanto, o “estado de protonação” dos grupos envolvidos poderá determinar se a enzima está ativa ou não. Analogamente, o estado de ionização do substrato também pode afetar a velocidade da reação. Aspectos como estes podem afetar a conformação da enzima, e conseqüentemente a atividade.

A análise das reações com substrato pode ser mais complexa, pois as constantes de dissociação do complexo enzima-substrato podem ser diferentes das constantes de dissociação da enzima livre. Desta forma, a atividade catalítica pode ser restrita a uma pequena faixa de pH, na qual os experimentos são conduzidos. O pH ótimo de atuação da enzima pode ser determinado através da curva na qual a enzima possui maior atividade. A curva é obtida pela taxa de consumo de substrato

em um determinado tempo, em valores de pH indicados. Então, determina-se o melhor pH para um determinado experimento.

3. OBJETIVOS

Considerando que diversos estudos comprovam o efeito benéfico da ingestão de frutas tropicais associado à influência das enzimas polifenoloxidase e ascorbato oxidase no escurecimento enzimático o presente trabalho objetivou avaliar as características cinético-enzimáticas das enzimas e suas consequências no processamento industrial do suco de maracujá, utilizando as seguintes metodologias:

- i) Obtenção e preparo das amostras;
- ii) Montagem da metodologia para obtenção dos extratos concentrados das enzimas PPO e AO;
- iii) Análises gráficas do comportamento cinético das reações enzimáticas;
- iv) Determinação das condições ótimas de ensaio, pH e temperatura;
- v) Determinação do conteúdo protéico total da amostra;
- vi) Estudos de estabilidade térmica e frente ao pH;
- vii) Efeitos de íons metálicos;
- viii) Estudo de inibidores específicos;
- ix) Determinação dos parâmetros cinéticos, PPO e AO, utilizando diferentes análises gráficas (v_{max} e k_M);
- x) Determinação da energia de reação, E_a de Arrhenius

Todos os objetivos de acordo com o cronograma do projeto de pesquisa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-prima.

A matéria-prima do presente estudo foi o suco integral de maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.).

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de pureza analítica.

4.2 OBTENÇÕES DAS FRUTAS

Foram utilizadas amostras de maracujá *in natura*, Todos os frutos foram fornecidos pela Indústria e Comércio de Conservas Alimentícias Predilecta LTDA, parceira deste projeto, sendo todos frutos sem nenhuma fitopatologia aparente e de formato ovóide. Os frutos maduros possuem casca fina, de cor amarelo-canário, polpa ácida, suco amarelo a amarelo-alaranjado.

Esses frutos foram cortados com faca de *inox* no sentido equatorial, sendo a polpa e a casca separadas e pesadas, posteriormente foi realizado a cálculo do rendimento de suco (RS) usando a equação (7), que consiste na porcentagem da massa total do suco em relação à massa total dos frutos.

$$RS_{\text{Maracujá}} = 100 \times \frac{\text{Massa Total}_{\text{suco}}}{\text{Massa Total}_{\text{frutos}}} \quad (7)$$

4.3 EXTRAÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE

A extração da PPO de suco de maracujá foi realizada seguindo algumas etapas importantes, relatadas a seguir individualmente pra melhor entendimento.

4.3.1 Preparo da amostra concentrada

A amostra de suco obtida anteriormente foi armazenada em temperaturas entre 0°C a -8°C, para que ocorra o congelamento total da amostra. A armazenagem nessas condições foi realizada com o intuito de conservar a polpa e minimizar o consumo de nitrogênio líquido a ser usado na etapa seguinte.

Com a amostra congelada deu-se início a metodologia utilizada para obtenção do pó-cetônico de suco de maracujá conforme o esquema apresentado na Figura 9 a seguir.

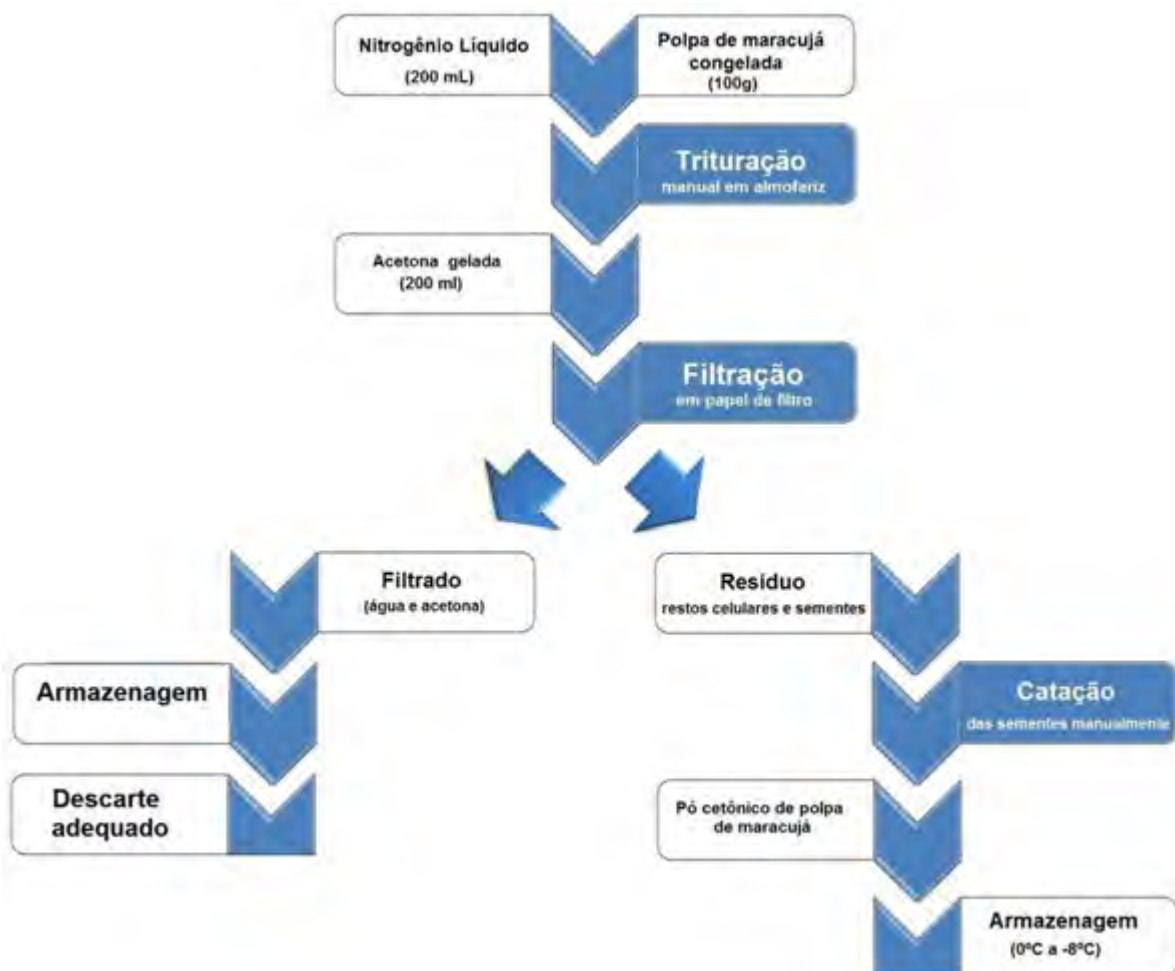


Figura 9 - Procedimento para obtenção do Pó-cetônico de suco de maracujá.

4.3.2 Obtenção do extrato concentrado

A obtenção do extrato enzimático a partir do pó-cetônico de suco de maracujá foi realizada de acordo com o método proposto por Lima et al (2001) com algumas

modificações; onde o pó cetônico foram adicionadas à solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 6,0, na proporção 1:20 (g/mL) contendo 3% Triton X-100 e 1% de polivinilpirolidona insolúvel (Polyclar AT), seguidas de homogeneização em liquidificador por 1 minuto a 4°C. O homogenato obtido foi mantido a 4°C sobre agitação por 60 minutos para realização da extração, após esse período o homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, desprezou-se então o resíduo precipitado. O sobrenadante foi filtrado através de camada dupla de gaze, constituindo-se assim o **Extrato bruto PPO** (Figura 10).

A extração da enzima foi acompanhada através da determinação da atividade enzimática (UA_{PPO}) e atividade específica (AE_{PPO}), de acordo como itens 4.5.1 e 4.6.

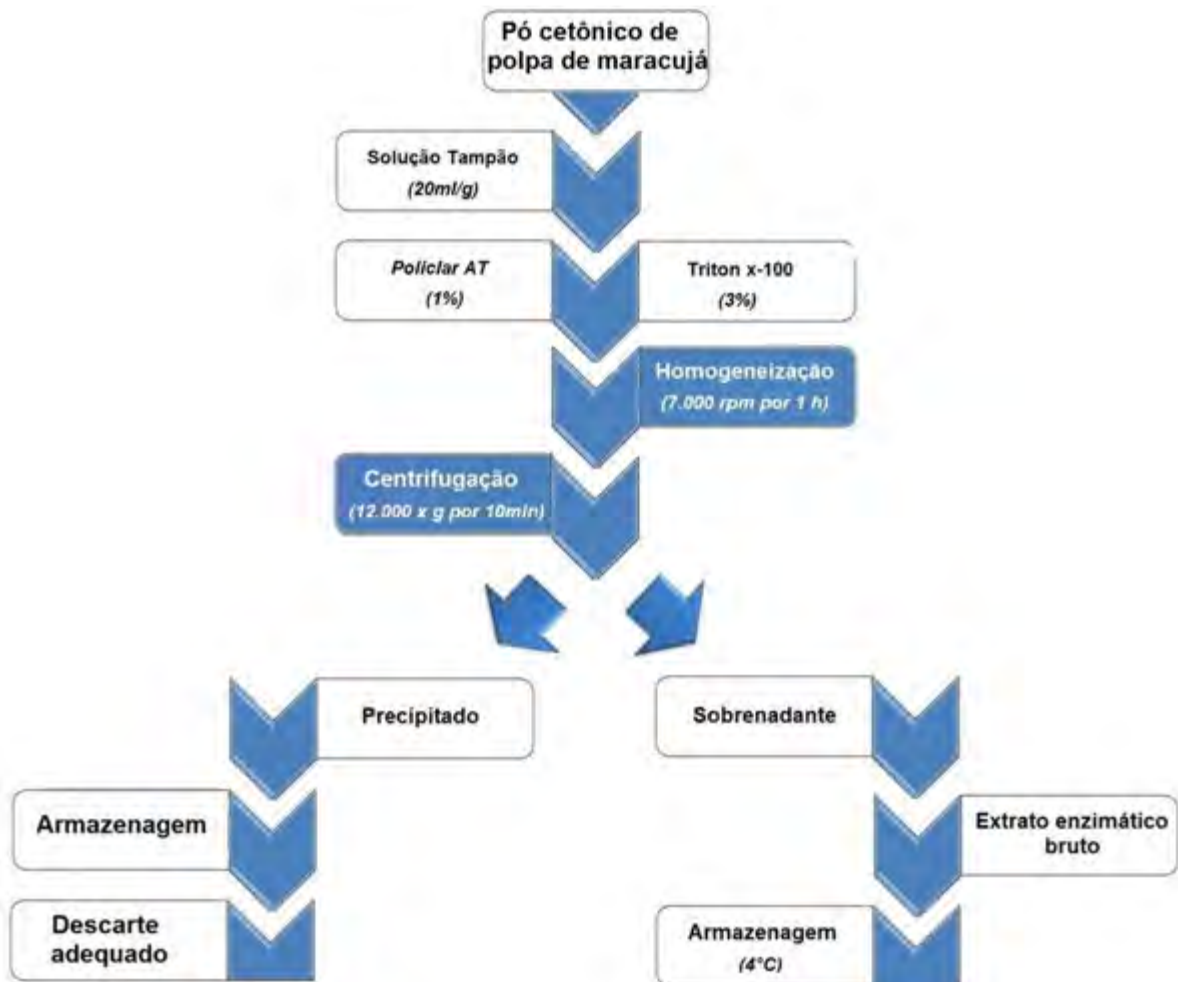


Figura 10 - Procedimento para extração de PPO a partir do Pó-cetônico de polpa de maracujá.

4.3.3 Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

Neste ensaio o extrato bruto foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), segundo o monograma de Dixon e Webb (1979). O fracionamento foi realizado inicialmente a 20% de saturação pela adição do sal ao **Extrato bruto PPO**, sob agitação lenta e constante e banho de gelo. Ao término da operação, o material permaneceu em repouso por 24 horas a 10°C. A seguir foi centrifugado, a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi pesado, ressuspensão na razão 1:2 (g/mL) em solução tampão fosfato de sódio e armazenado (-18°C), denominado **Extrato concentrado PPO (0-20%)**. Ao sobrenadante obtido foi adicionado novamente sulfato de amônio até 70% de saturação, que da mesma maneira permaneceu em repouso por aproximadamente 24 horas, sendo centrifugado, a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, onde o precipitado foi pesado, ressuspensão na razão 1:2 (g/mL) em solução tampão fosfato de sódio e armazenado (-18°C), denominado **Extrato concentrado PPO (20-70%)**.

O processo de precipitação com sulfato de amônio foi acompanhado através da determinação da atividade enzimática (**UA_{PPO}**) e atividade específica (**AE_{PPO}**), de acordo como itens 4.5.1 e 4.6.

4.4 EXTRAÇÃO DA ASCORBATO OXIDASE

A extração da AO de suco de maracujá foi realizada seguindo algumas etapas importantes, relatadas a seguir individualmente pra melhor entendimento.

4.4.1 Preparo da amostra

A amostra de suco obtida anteriormente no item 4.2 foi realizada a retirada das sementes através do uso de peneiras domésticas, e após a polpa livre de sementes foi mantida em temperaturas baixas que variaram entre 5°C a -8°C.

4.4.2 Obtenção do extrato bruto

Primeiramente, homogeneizou-se a suco de maracujá anteriormente preparada em liquidificador, utilizando-se para a extração da enzima, solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol/L, pH 5,0. O homogeneizado foi filtrado em gaze. O filtrado obtido (**Extrato bruto AO**) foi mantido em baixa temperatura, que variou entorno de 4°C e em seguida submetido às demais etapas de extração.

A extração da enzima foi acompanhada através da determinação da atividade enzimática (UA_{AO}) e atividade específica (AE_{AO}), de acordo como itens 4.5.2 e 4.6.

4.4.3 Tratamento com Amido.

Após a obtenção do **Extrato bruto AO**, a este foi adicionado amido na proporção de 1:2 (1g de amido por 2 mL de extrato). Após um repouso de três minutos, o amido foi removido por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante resultante uma nova quantidade de amido foi adicionada na mesma proporção anterior. Este procedimento foi realizado por três vezes, objetivando a redução do volume total, uma vez que o amido absorve parte da água contida no extrato e extrato final obtido foi denominado como **Extrato tratado AO**.

O tratamento com amido foi acompanhado através da determinação da atividade enzimática (UA_{AO}) e atividade específica (AE_{AO}), de acordo como itens 4.5.2 e 4.6.

4.4.4 Precipitação com sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$)

Neste ensaio o extrato bruto foi submetido ao fracionamento salino com sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), segundo o monograma de Dixon e Webb (1979). O fracionamento foi realizado inicialmente a 20% de saturação pela adição do sal ao **Extrato tratado AO**, sob agitação lenta e constante e banho de gelo. Ao término da operação, o material permaneceu em repouso por 24 horas. A seguir foi centrifugado, a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi pesado, ressuspenso na razão 1:2 (g/mL) em solução tampão fosfato de sódio e armazenado (-18°C), denominado **Extrato concentrado AO (0-30%)**. Ao sobrenadante obtido foi adicionado novamente sulfato de amônio até 80% de saturação, que da mesma maneira permaneceu em repouso por aproximadamente 24 horas a 10°C, sendo centrifugado, a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, onde o precipitado foi pesado, ressuspenso na razão 1:2 (g/mL) em solução tampão fosfato de sódio e armazenado (-18°C), denominado **Extrato concentrado AO (30-80%)**.

O processo de precipitação com sulfato de amônio foi acompanhado pela determinação da atividade enzimática (UA_{AO}) e atividade específica (AE_{AO}), de acordo como itens 4.5.2 e 4.6.

4.5 DETERMINAÇÃO DA UNIDADE DE ATIVIDADE (UA) ENZIMÁTICA

4.5.1 Polifenoloxidase (PPO)

A atividade enzimática foi determinada através do método espectrofotométrico, para isso foi utilizado o espectrofotômetro UV/VIS, da Diode Array HP 8453E, com controle da temperatura e um meio reacional composto por 0,1 mL de solução de enzima, 0,9 mL de catecol 0,4 mol/L em água do tipo *Mili-Q*, e 2,0 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 6,0, a 25°C em uma cubeta de 1 cm de caminho ótico, contra um branco constituído por 2,9 mL de solução tampão e 0,1 mL de solução de enzima. A velocidade da reação foi seguida em 420 nm, com leituras a cada 0,5 segundos por 60 segundos, onde a unidade de atividade enzimática – UA_{PPO} - foi definida como a quantidade de **Extrato enzimático** (mL) que provoca um aumento na absorvância de 0,001 unidades por minuto nas condições de ensaio descritas.

4.5.2 Ascorbato oxidase (AO)

A atividade enzimática foi determinada através do método espectrofotométrico, para isso foi utilizado o espectrofotômetro UV/VIS, da Diode Array HP 8453E, com controle da temperatura e um meio reacional composto por 0,1 mL de solução de enzima, 2,0 mL de ácido ascórbico 10 mmol/L em água do tipo *Mili-Q* acidificada com HCl 3 mmol/L, e 0,9 mL de solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol/L, pH 6,0, a 25°C em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, contra um branco constituído por 1 mL de solução tampão e 2 mL de solução de ácido ascórbico. A velocidade da reação foi seguida em 245 nm, com leitura em 1 minutos, onde a unidade de atividade enzimática – UA_{AO} - foi correspondente à oxidação de 1mmol de ácido ascórbico/min/ml de enzima através da equação (8) (NAKAMURA et. al.,1968).

$$UA_{AO} = \frac{\Delta A_{245nm}(A_{245nm}Branco - A_{245nm}Teste) \times Vt \times fd}{10 \times 1 \times t \times Ve} \quad (8)$$

Onde:

- Vt – Volume total do meio reacional (ml)
- Ve – Volume da solução de enzima (ml)
- 10 – Coeficiente de extinção do ácido ascórbico ($\text{mmol}^{-1}\text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)

- 1 – Caminho óptico (cm)
- t – tempo da reação (min)
- fd- fator de diluição da enzima caso haja

4.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO (mg/mL) E DA ATIVIDADE ESPECÍFICA (AE)

Para acompanhar a extração da PPO e da AO, determinou-se quantitativamente a proteínas através do método de Bradford (1976) utilizando a Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão. Para realização do método, utilizou-se Kit comercial pra dosagem de proteínas Micropote (Lote MICA 07101, Doles, 2009).

As amostras de cada enzima (PPO ou AO) em cada etapa de extração foram diluídas de 1:2 a 1:5, em solução tampão de extração. As determinações foram realizadas em triplicatas, utilizando o espectrofotômetro (*HP/Agilent 8453 Diode Array UV/VIS*) a 610 nm. Para o cálculo, foi utilizada a equação ($A_{610nm} = 0,65305x[Proteína] - 0,0069$), obtido através da curva de calibração da BSA (Figura 11).

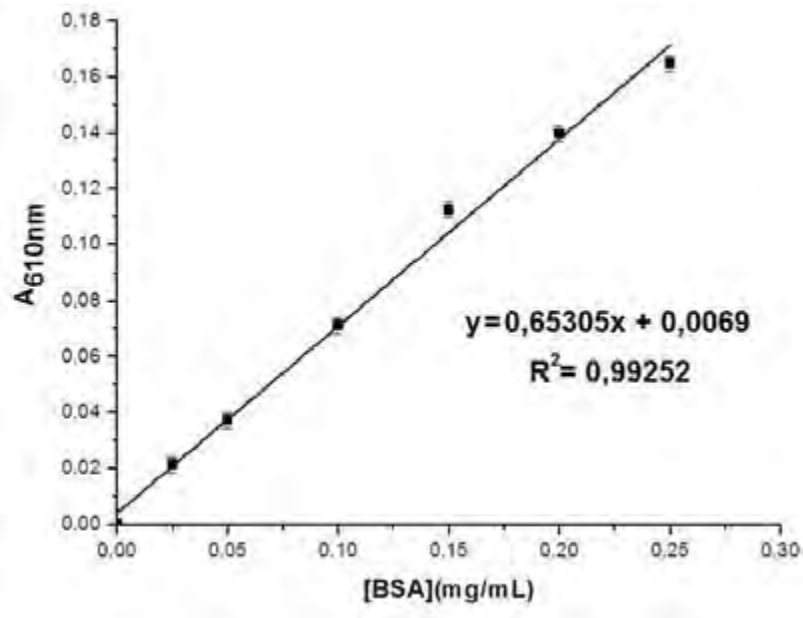


Figura 11- Curva padrão da Soro Albumina Bovina (BSA).

Para determinar a quantidade de proteína total (**Prot. Total**) dos extratos foi calculado pela multiplicação do valor da quantidade de proteína (mg/mL) pelo volume total dos extratos

Após a determinação do conteúdo protéico (mg/mL) e da atividade enzimática de cada amostra foi calculada a atividade específica da PPO ou da AO (AE_{PPO} ou AE_{AO}) pela equação (9).

$$AE_{PPO \text{ ou } AO} = \frac{UA_{PPO \text{ ou } AO}}{\text{Proteína (mg/mL)}} \quad (9)$$

4.7 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO

A determinação do pH ótimo da PPO e da AO foi realizada pela medida da atividade (UA_{PPO} e UA_{AO}) da enzima em estudo, variando-se os valores de pH do meio de reação entre 2,6 a 9,0, utilizando-se para este fim solução tampão citrato-fosfato na faixa de 2,6 a 5,0, 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 9,0 e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

A determinação da temperatura ótima da PPO e da AO foi realizada pela medida da Atividade (UA_{PPO} e UA_{AO}) da enzima em estudo, variando-se as temperaturas no meio de reação entre 25°C a 90°C, utilizando-se para este fim o espectrofotômetro (*HP/Agilent 8453 Diode Array UV/VIS*) com *Single Cell Cuvette* com controle da temperatura e os meios reacionais descritos anteriormente (4.4.1 e 4.4.2) utilizando o pH ótimo determinado experimentalmente (ver item 4.7); as demais condições de ensaio mantiveram constantes e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.9 ESTUDOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA

Os estudos de termoestabilidade de cada enzima nas condições de ensaios previamente estabelecidos variando apenas a temperatura e o tempo de estocagem. Para isso foram utilizados tubos de ensaio de tamanho e peso iguais, colocados em banho-maria em cada temperatura determinada variando-se o tempo de estocagem.

Para isso Alíquotas foram retiradas em tempos definidos, estocadas em banho de gelo por no mínimo 30 minutos, e a atividade catalítica residual foi posteriormente determinada, nas condições ótimas de ensaio (4.5.1 e 4.5.2) utilizando o pH e temperatura (4.7 e 4.8), sendo comparada com a atividade da amostra enzimática não tratada. As temperaturas e os tempos de estocagem foram: 55°C, 65°C; 75°C; 85°C e 95°C (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 20 minutos). Todos os experimentos foram feitos em triplicata

4.10 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA

Os parâmetros cinéticos D (Tempo de redução decimal), k (Constante de velocidade de inativação) e Z (Fator de dependência da temperatura) foram calculados para a polifenoloxidase e para a ascorbato oxidase usando o modelo proposto por Luíz, Hirata e Clemente (2007).

Para realizar os cálculos primeiramente foi proposto que a cinética de inativação térmica de enzimas seja uma reação irreversível de primeira ordem representada na equação (10):

$$V_i = \frac{dAE}{dt} = -kAE \quad (10)$$

Em que V_i é a velocidade de inativação térmica numa dada temperatura, AE é a atividade enzimática específica na temperatura e no tempo de referência, t é o tempo em minutos e k a constante específica de inativação em min^{-1} . Separando variáveis, pode-se chegar à seguinte expressão:

$$\frac{dAE}{AE} = -kdt$$

Podendo ser integrada, com os limites $AE = AE_0$ para $t = 0$, e $AE = AE$ para $t = t$

$$\int_{AE_0}^{AE} \frac{dAE}{AE} = \int_0^t -k \cdot dt$$

Dando como resultado

$$\ln\left(\frac{AE}{AE_0}\right) = -k \cdot t \quad (11)$$

Após a definição da equação 11 acima, foi plotado o gráfico de inativação térmica ($\ln\left(\frac{AE}{AE_0}\right)$ *versus* t), onde AE é a atividade enzimática específica na temperatura utilizada (55°C, 65°C; 75°C; 85°C e 95°C), AE_0 atividade enzimática específica sem tratamento e t é o tempo em minutos de exposição a essas temperaturas, que foram 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 20 minutos.

4.10.1 Valor de k

A Constante de velocidade de inativação (k) pode ser facilmente definida matematicamente como sendo o coeficiente angular da equação encontrada na linearização dos dados experimentais plotado no gráfico de inativação térmica.

4.10.2 Valor de D

O valor D ou Tempo de Redução Decimal é o intervalo de tempo à uma determinada temperatura constante de tratamento para uma redução de 90% da atividade enzimática, inicialmente presente na amostra ou seja é o valor de t (em minutos) onde a razão $\frac{AE}{AE_0}$ seja 0,1 (um décimo). Substituindo esse valor na equação 12 e fazendo os ajustes necessários o valor de D foi calculado pela seguinte equação:

$$D = \frac{\ln(0,1)}{-k} \quad (12)$$

4.10.3 Valor de Z

A relação entre tempos de processo a diferentes temperaturas para um mesmo nível de inativação enzimática é definida através da curva de resistência térmica. A curva é representada pelo logaritmo decimal do tempo de redução decimal (D) ou de seus múltiplos ($t = n \times D$) em função da temperatura de referência. Para o modelo

de curva de resistência térmica semi-logarítmica, o intervalo de temperatura necessário para a redução de 90% do tempo de redução decimal (valor D) é denominado valor Z (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1995).

O Valor de Z , empregado nos métodos de cálculos de resistência relativa de uma enzima a diferentes temperaturas, é numericamente igual à temperatura ($^{\circ}\text{C}$) requerida para a curva de resistência térmica atravessar um ciclo logarítmico. Da inclinação da curva pode obter-se a seguinte equação 13:

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\text{Log}(D_{T_2}/D_{T_1})} \quad (13)$$

Onde T_2 e T_1 serão as temperaturas de tratamento e D_{T_2} e D_{T_1} seus respectivos valores de D .

4.11 ESTUDOS DA ESTABILIDADE FRENTE AO pH.

Assim, o pH de estabilidade foi determinado incubando-se as enzimas PPO e AO (0,1 mL) em 1 mL de solução tampão citrato-fosfato na faixa de 2,6 a 5,0, 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 9,0. Alíquotas de 0,1 mL foram retiradas: 30 minutos, 1 dia, 1 semana e 1 mês a 25°C . O pH foi ajustado ao valor inicial, pela adição de solução de HCl (0,1mol/L) ou NaOH (0,1mol/L), e o volume completando a 1mL. Para cada estocagem num dado pH foi determinadas as atividades da PPO e da AO nas condições ótimas de ensaio previamente descritas e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.12 EFEITOS DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Extrato de PPO foi incubada na presença de íons metálicos ou compostos orgânicos, em solução tampão fosfato de sódio pH 6,0 a 25°C por 5 minutos. A atividade foi determinada como descrito anteriormente. Foram utilizados os seguintes sais: NaCl, KCl, MgSO_4 , Na_2SO_4 , K_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 . A atividade da PPO e da AO sem a presença dos referidos sais foi considerada padrão, 100% e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.13 ESTUDO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS

Investigação de inibidores específicos, como um método alternativo para a inativação de enzimas em processo industrial. Foram testados alguns inibidores, partindo-se de inibidores encontrados na literatura para as enzimas em estudo:

- Metabissulfito de sódio (0 a 133 mmol/L);
- Sacarose (0 a 66 mmol/L);
- Cisteína (0 a 1333 mmol/L);
- EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (0 a 199 mmol/L);
- Ácido Cítrico (0 a 199 mmol/L);
- Ácido ascórbico (0 a 199 mmol/L);

Determinando-se o IC_{50} (Concentração do inibidor que leva a 50% de inibição) e todos os experimentos foram feitos em triplicata nas condições previamente estabelecidas, ou seja, o pH 6,0 a 25°C .

4.14 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A influência da concentração de substrato em cinética enzimática classicamente envolve a determinação de velocidades iniciais para diferentes valores de $[S]_0$ em concentrações constantes de enzima. Este procedimento é adotado porque nas velocidades iniciais, fatores complicantes, como reversibilidade da reação, inibição pelo produto e inativação da enzima, são evitados (CORNISH-BOWDEN, 1995).

Resumidamente, as condições de operação utilizadas para estudo do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de oxidação do catecol (Sigma-Aldrich) pela Polifenoloxidase e da oxidação do ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) pela Ascorbato oxidase.

Tabela 3 - Condições experimentais para definição dos parâmetros cinéticos do modelo Michaelis-Menten

Ascorbato oxidase		Polifenoloxidase	
Ensaio	mmol.L ⁻¹ de Ácido ascórbico	Ensaio	mol.L ⁻¹ de Catecol
AO₁	0,03	PPO₁	0,016
AO₂	0,06	PPO₂	0,025
AO₃	0,09	PPO₃	0,033
AO₄	0,12	PPO₄	0,041
AO₅	0,15	PPO₅	0,050
AO₆	0,18	PPO₆	0,058
AO₇	0,21	PPO₇	0,066
AO₈	0,27	PPO₈	0,075
AO₉	0,33	PPO₉	0,083
AO₁₀	0,39	PPO₁₀	0,091
AO₁₁	0,45	PPO₁₁	0,100
AO₁₂	0,51	PPO₁₂	0,108
AO₁₃	0,57	PPO₁₃	0,116
AO₁₄	0,63	PPO₁₄	0,125
AO₁₅	0,69	PPO₁₅	0,133
AO₁₆	0,75	PPO₁₆	0,141
AO₁₇	0,81	PPO₁₇	0,150
AO₁₈	0,93	PPO₁₈	0,158
AO₁₉	1,05	PPO₁₉	0,166
AO₂₀	1,29		
AO₂₁	1,53		
AO₂₂	1,77		
AO₂₃	2,01		

Nos ensaios descritos na tabela anterior, a concentração de enzima em 100 μL de aproximadamente 0,849 mg de proteína. mL^{-1}), a temperatura ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) e o pHs foram mantidos fixos (pH 6,0 para PPO e pH 5,0 para AO). As atividades enzimáticas foram acompanhadas utilizando as metodologias descritas anteriormente no item 4.5.1 para a Polifenoloxidase e o item 4.5.2 para a Ascorbato Oxidase e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.14.1 Ajuste dos parâmetros cinéticos e integração da expressão de Michaelis-Menten

Os procedimentos usuais para cálculo dos parâmetros v_{max} e k_M da Equação (1) envolvem a linearização da expressão de Michaelis-Menten através dos métodos denominados de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Langmuir (Hanes-Woolf), o que resulta nas Equações (14), (15) e (16), respectivamente.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{k_M}{[S]_0 v_{max}} + \frac{1}{v_{max}} \quad (14)$$

$$\frac{v_0}{[S]_0} = \frac{v_{max}}{k_M} - \frac{v_0}{k_M} \quad (15)$$

$$\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{k_M}{v_{max}} + \frac{v_0}{v_{max}} \quad (16)$$

Observa-se que dados de v_0 em função de $[S]_0$ são suficientes para obtenção dos parâmetros do modelo cinético. Na presente investigação foram obtidos pares ordenados destas variáveis nas condições dos ensaios da Tabela 3. Os ajustes lineares foram feitos por mínimos quadrados. A determinação de v_{max} e k_M também foi feita por ajuste não-linear, a partir da Equação (1), utilizando o algoritmo de Levenberg–Marquardt (LM).

É preciso salientar que as equações que serão apresentadas são expressões simplificadas que desconsideram inibições pelo produto e desnaturação enzimática.

4.15 EFEITOS DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da temperatura na oxidação enzimática do catecol pela polifenoloxidase e do ácido ascórbico pela Ascorbato oxidase foi estabelecido fixando-se a concentração inicial de substrato (catecol 0,12 mmol/L e ácido ascórbico 0,10 mmol/L) e enzima (100 μ L com aproximadamente 0,849 mg de proteína. ml^{-1}) nos seguintes experimentos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições experimentais para definição dos parâmetros de Arrhenius.

Ascorbato oxidase		Polifenoloxidase	
Ensaio	Temperatura	Ensaio	Temperatura
AO₁	25°C	PPO₁	25°C
AO₂	35°C	PPO₂	30°C
AO₃	45°C	PPO₃	35°C
AO₄	46°C	PPO₄	40°C
AO₅	48°C	PPO₅	45°C
AO₆	50°C		

Nos ensaios descritos na tabela anterior, a concentração de enzima (100 μ L com aproximadamente 0,849 mg de proteína. ml^{-1}) e o pHs foram mantidos fixos (pH 6,0 para PPO e pH 5,0 para AO). As atividades enzimáticas foram acompanhadas utilizando as metodologias descritas anteriormente no item 2.4.1 para a Polifenoloxidase e o item 2.4.2 para a Ascorbato Oxidase e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.15.1 Determinação dos parâmetros da equação de Arrhenius

O fator de frequência (A_0) e a energia de ativação (E_a) da expressão de Arrhenius podem ser obtidos pela equação 17, que foi obtida aplicando o logaritmo

natural na equação 5, e após o ajuste linear da equação através dos resultados de $\ln v_0$ versus $\frac{1}{T}$ (experimentos **AO**₁ a **AO**₆, **PPO**₁ a **PPO**₅ da Tabela 4) na concentração inicial de substrato igual a catecol 0,12 mmol/L e ácido ascórbico 0,10 mmol/L (observe Equação 17).

$$\ln v_0 = \ln A_0 - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad (17)$$

O parâmetro A_0 , que corresponde à interseção da reta com o eixo vertical em $\frac{1}{T} = 0$ (na temperatura infinita), é denominado **fator pré-exponencial** ou “fator de frequência”. O Parâmetro E_a , que é obtido a partir do coeficiente angular da reta ($-\frac{E_a}{R}$), é chamado de **energia de ativação**. Os dois parâmetros são denominados de **parâmetros de Arrhenius** e R é a constante universal dos gases perfeitos ($8,314472 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO SUCO

Foram escolhidos 70 frutos, pesando no total 16.212 gramas ($\pm 231,6$ g/fruto). Obtendo 5.938 gramas de suco, 9.623 gramas de casca e 651 gramas foram perdidas durante o processo.

Após a pesagem, a suco e a casca foram embaladas e mantidas em temperaturas inferiores à 0°C até serem utilizadas. A proporção de suco encontrada nos frutos de 36% condiz com a descrita na literatura de 30-40% (FERRARI et al; 2004), como detalhada na Figura 12.



Figura 12 - Composição dos frutos de maracujá em porcentagem de massa.

A partir de suco de maracujá extraído e congelado (5.938 g) e através do método de obtenção do pó-cetônico de suco de maracujá, detalhado no item 4.2.1, foram obtidos 186,50 g (3,2%) de pó-cetônico (proteínas e restos celulares), 889 g (15%) de sementes e 4.862,5 g (81,8%) de componentes solúveis, esses dados correlacionam-se muito bem com a composição centesimal do suco de maracujá apresentado pelo núcleo de estudos e pesquisa em alimentação em 2006, onde foi relatada a presença de 2% de proteínas e 82,9% de Umidade.

5.2 EXTRAÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE

5.2.1 Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

Tabela 5 - Precipitação salina fracionada da PPO com (NH₄)₂SO₄

Fração	Precipitado (g)	Extrato enzimático concentrado (mL)	Atividade total (UA)	Proteína total (mg)	AE (UA/mg de proteína)
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0-20%	1,673	3,346	1.552	57,27	27,09
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-70%	3,455	6,910	10.786	237,44	45,42

Os dados experimentais referentes às etapas de precipitação salina fracionada, resumidos na tabela 5 mostram que a polifenoloxidase apresentou atividade em 0-20% e 20-70% de saturação, porém observou-se que a atividade é maior apenas em 20-70% de saturação.

Assim optou-se em realizar a precipitação salina fracionada utilizando apenas a fração de 20-70% de saturação, eleita como a mais adequada ao estudo em questão. Acredita-se que na fração 0-20% ocorra a precipitação da pectina e outras biomoléculas, que podem influenciar a atividade da polifenoloxidase.

5.3 EXTRAÇÃO DA ASCORBATO OXIDASE

5.3.1 Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

Tabela 6. Precipitação salina fracionada da AO com (NH₄)₂SO₄

Fração	Precipitado (g)	Extrato enzimático concentrado (mL)	Atividade total (mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	Proteína total (mg)	AE (mmol. L ⁻¹ .min ⁻¹ / mg de proteína)
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0-30%	3,280	6,560	1.968,00	88,32	22,28
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30-80%	1,484	2,968	4.748,80	32,89	144,38

Os dados experimentais referentes às etapas de precipitação salina fracionada, resumidos na tabela 6 mostram que a ascorbato oxidase apresentou atividade em 0-30% e 30-80% de saturação, porém observou-se que a atividade específica é maior em 30-80% de saturação.

Assim optou-se em realizar a precipitação salina fracionada utilizando apenas a fração de 30-80% de saturação, eleita como a mais adequada ao estudo em questão. Acredita-se que na fração 0-30% ocorra a precipitação da pectina e outras biomoléculas, que podem influenciar na atividade.

5.4 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO

O pH ótimo de atividade da polifenoloxidase de maracujá (Figura 13) encontrado foi de 6,0, compatível como a maioria das polifenoloxidase de vegetais, cujo valores de pH se encontram no intervalo entre 5,0 e 7,0 (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

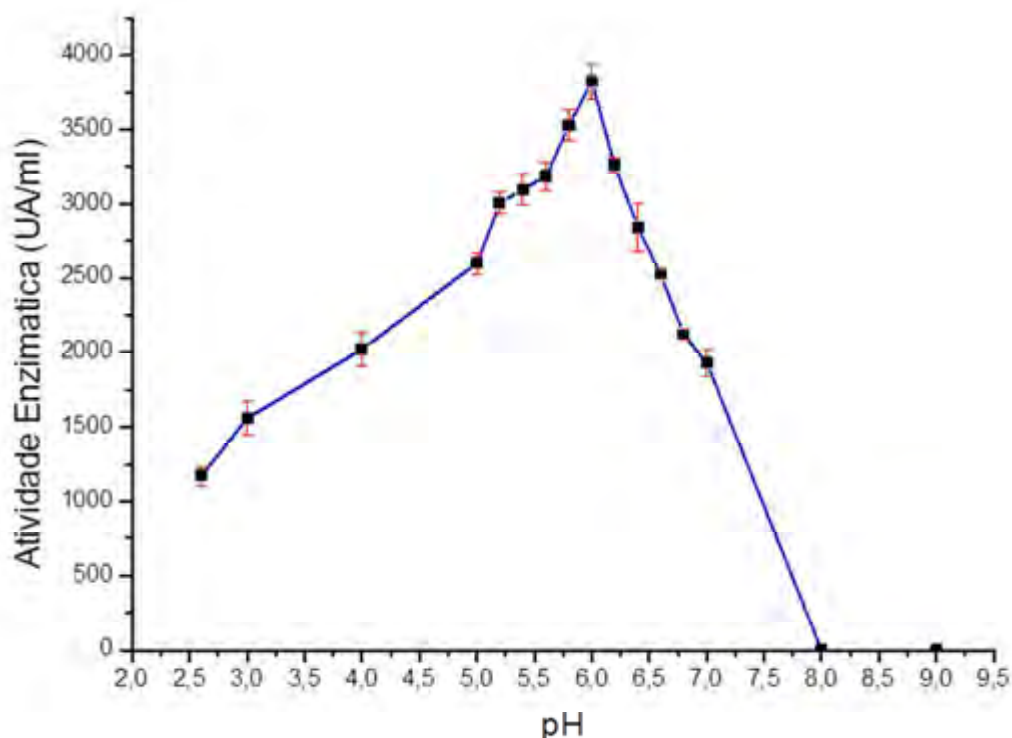


Figura 13 - Atividade da PPO em função do pH. Meio reacional: PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), solução tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,0 a

25°C. UA calculada para 1 mL de extrato concentrado da enzima. n=3.

Assim, foram encontrados valores semelhantes para café num intervalo de 6,0 e 7,0; de 6,5 para folhas de espinafre, de 6,8 de batata (LIMA, 2001). Para valores de pH abaixo de 4,0 a atividade enzimática da PPO em estudo cai 40% em relação ao pH ótimo e em valores de pH acima de 8,0, a referida enzima perde rapidamente sua atividade catalítica.

O valor de pH que apresentou maior atividade da ascorbato oxidase foi o pH 5,0 na solução tampão citrato-fosfato, o qual apresentou aproximadamente 170 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 14). Esta solução tampão é recomendada pela literatura para ser utilizada na metodologia de determinação da atividade da ascorbato oxidase.

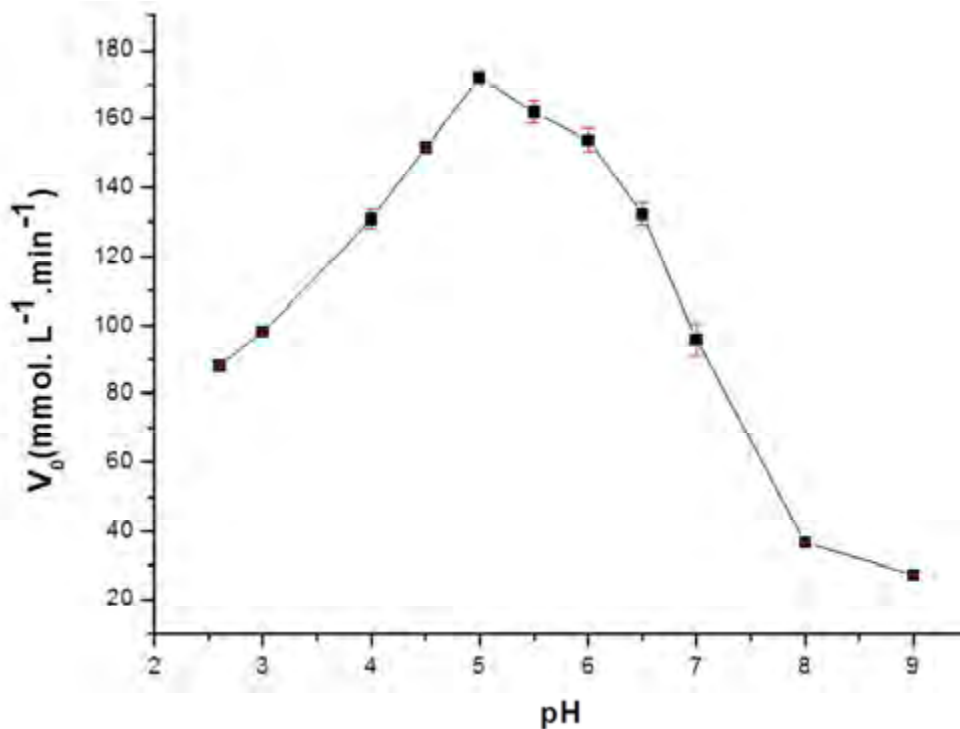


Figura 14 - Atividade da AO em função do pH. Meio reacional: AO (0,1mL), Ác. ascórbico (10 mmol/L), solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol/L pH 6,0 a 25°C. n=3.

Estes resultados corroboram com os apresentados por Carvalho et.al. (1981), que obtiveram a faixa de pH 5,0 a 7,0 como ótima para ascorbato oxidase de *Cucurbita maxima*, entretanto os autores reportaram a ocorrência de apenas

25% de atividade enzimática a pH 3,0. A atividade da ascorbato oxidase neste pH de aproximadamente de 60% em relação ao pH ótimo nos nossos estudos. Vale ressaltar a característica naturalmente ácida da amostra em estudo.

Os resultados obtidos no presente trabalho também foram semelhantes aos descritos para ascorbato oxidase oriunda de outras fontes, tais como, a Ao de *Cucurbita pepo medullosa* apresentou atividade ótima a pH 6,0 (MACCARRONE et al., 1993) e AO de *Citrus unshi* possui pH ótimo igual 5,5 (NAZAMID et al., 1994).

5.5 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

O efeito da temperatura na atividade enzimática pode ser observado na Figura 15 à temperatura que proporcionou maior valor de atividade da PPO de polpa de maracujá-azedo foi 50°C.

A temperatura ótima da polifenoloxidase varia de acordo com a fonte da enzima. Vámos-Vigyázó (1981) relata a temperatura ótima de 40°C para PPO de marmelo, 56° para de maçã, 45°C para de pêra.

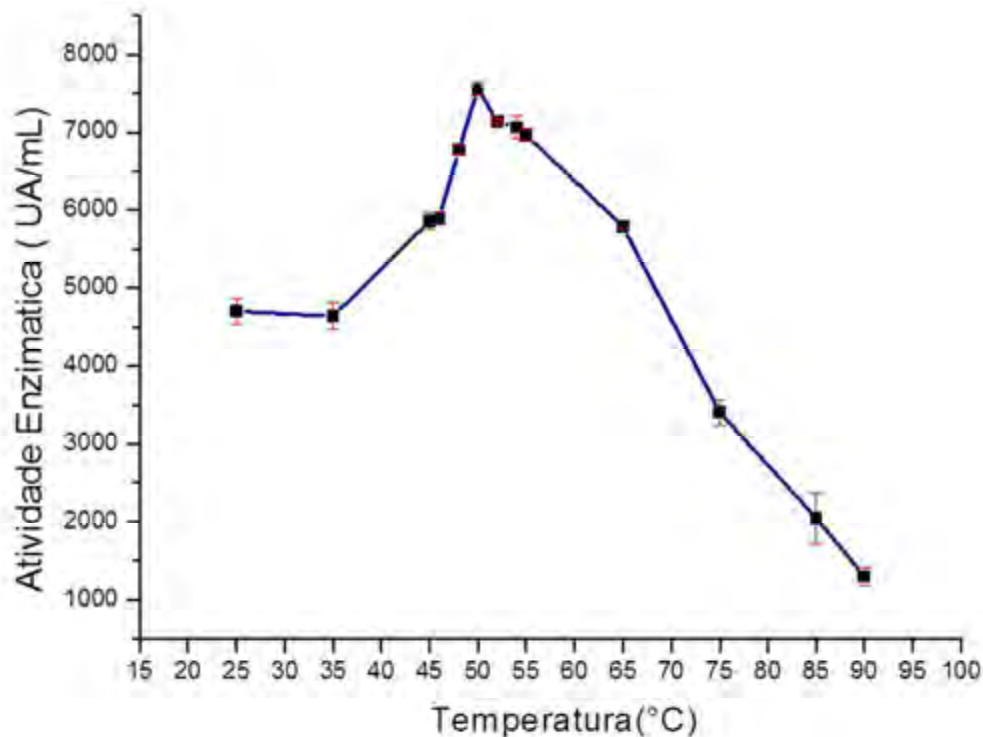


Figura 15 -

Efeito da temperatura na atividade PPO. Meio reacional: PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), solução tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,0 a 25°C. UA calculada para 1 mL de extrato concentrado da enzima (n=3).

O efeito da temperatura na atividade enzimática da ascorbato oxidase pode ser observado na Figura 16. A temperatura que proporcionou maior valor de atividade da ascorbato oxidase foi 45°C.

A temperatura ótima da ascorbato oxidase varia de acordo com a origem da enzima, mas apresenta faixa de 30 a 45°C, por exemplo, Murao et al. (1991) relataram a temperatura ótima de 45°C para ascorbato oxidase de *Acremonium sp.*

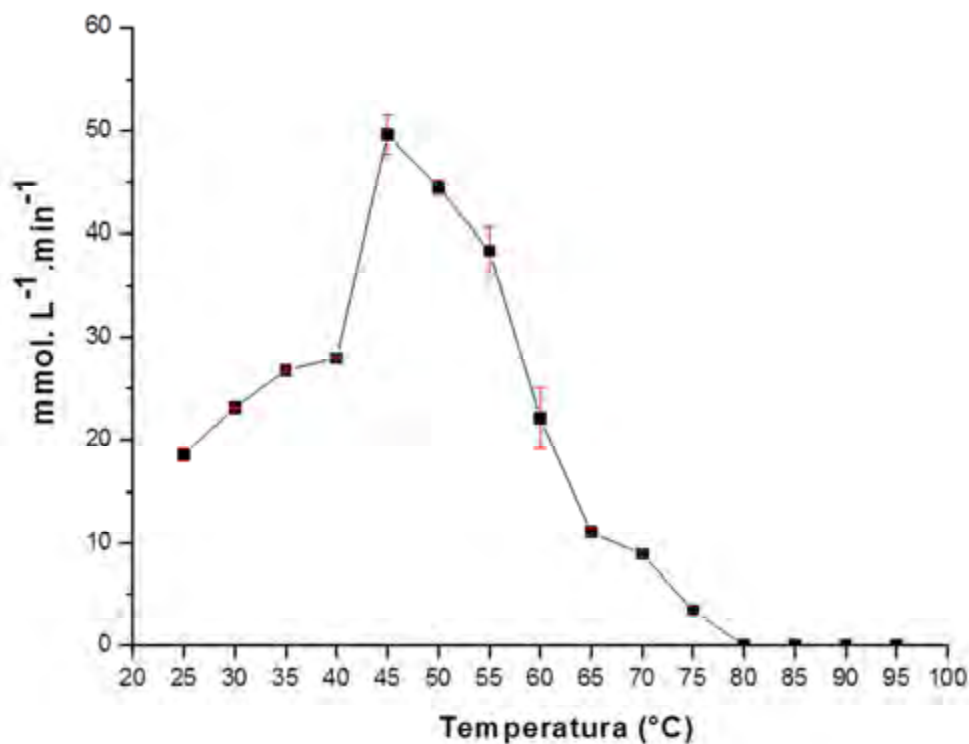


Figura 16 - Efeito da temperatura na atividade AO. Meio reacional: AO (0,1mL), Ác. ascórbico (10 mmol/L), solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol/L pH 6,0 a 25°C (n=3).

5.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA

Das técnicas utilizadas para inativar a PPO e assim evitar o problema do escurecimento enzimático em sucos, o tratamento térmico é o mais frequentemente empregado. Entretanto, o tratamento térmico pode afetar o *flavor* de sucos, principalmente se forem requeridas altas temperaturas.

Assim, foi verificada a estabilidade térmica da PPO, determinando-se a atividade em varias temperaturas e diferentes tempos de estocagem.

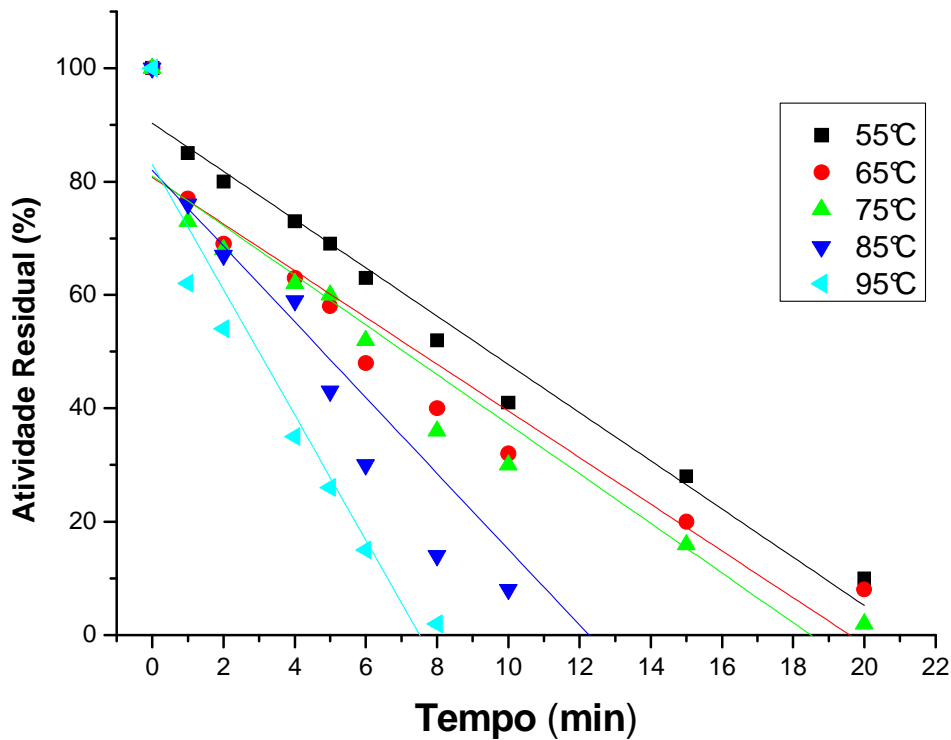


Figura 17 - Estabilidade térmica. Incubação da enzima em várias temperaturas por 1, 5, 10, 20 minutos, em tampão fosfato 50 mmol/L pH 6,0.

A PPO, quando submetida a temperatura acima da temperatura ótima (50°C), foi possível observar uma redução de atividade relação ao ponto inicial (Figura 17).

Com a finalidade de comparação foi calculado pra cada temperatura o tempo necessário pra que ocorra a diminuição da atividade em 50% em relação à atividade inicial. Onde a 55°C é necessário 10,2 min, a 65°C de 8,2 min, a 75°C de 7,8 min, a 85°C de 5,8 min e a 95°C de 3,9 min.

É importante destacar que em todas as temperaturas estudadas teve uma significativa redução de atividade em função do tempo esses dados sugerem que o tratamento térmico pode ser utilizado como alternativa pra redução da atividade da PPO de maracujá, porém estudos complementares devem ser realizados para confirmar se nessas temperaturas não ocorram alterações significativas no *flavors* e propriedades nutricionais.

A Figura 18 apresenta a estabilidade da ascorbato oxidase frente à diferentes temperaturas em diferentes tempos. Verifica-se que a ascorbato oxidase de Maracujá amarelo azedo, não se apresentou estável a temperaturas superiores a sua temperatura ótima.

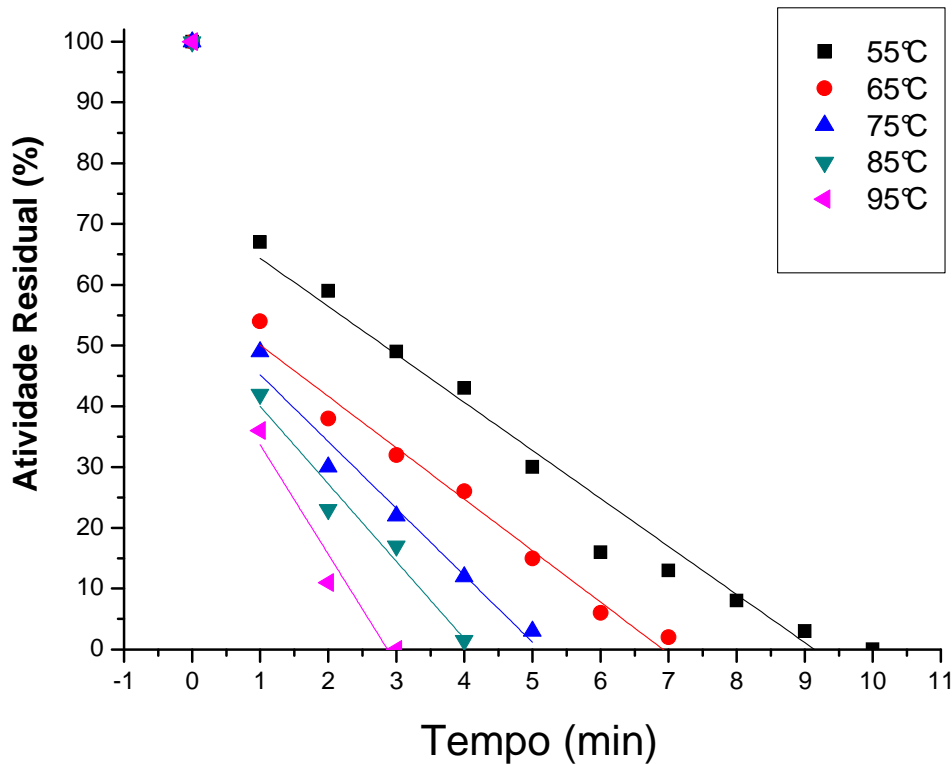


Figura 18 - Estabilidade térmica. Incubação da enzima AO em várias temperaturas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 20 minutos, em tampão Citrato-fosfato 50 mmol/L pH 5,0.

A AO, quando submetida à temperatura acima da temperatura ótima (45°C), foi possível observar uma redução de atividade relação ao ponto inicial (Figura 18).

Com a finalidade de comparação foi calculado pra cada temperatura o tempo necessário pra que ocorra a diminuição da atividade em 50% em relação à atividade inicial. Onde a 55°C é necessário 2,7 min , a 65°C de 1 min, a 75°C, a 85°C e a 95°C é necessário mesmo de 1 min de exposição.

5.7 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA

A partir das porcentagens de atividades residuais, foi plotado o gráfico de inativação térmica ($\ln\left(\frac{AE}{AE_0}\right)$ versus t) da polifenoloxidase (Figura 19) e da ascorbato oxidase (Figura 20) onde foi possível ser determinar experimentalmente nas temperaturas 55°, 65°, 75°C, 85°C e 95°C, os valores de k e o Valor de D serão apresentados na Tabela 7.

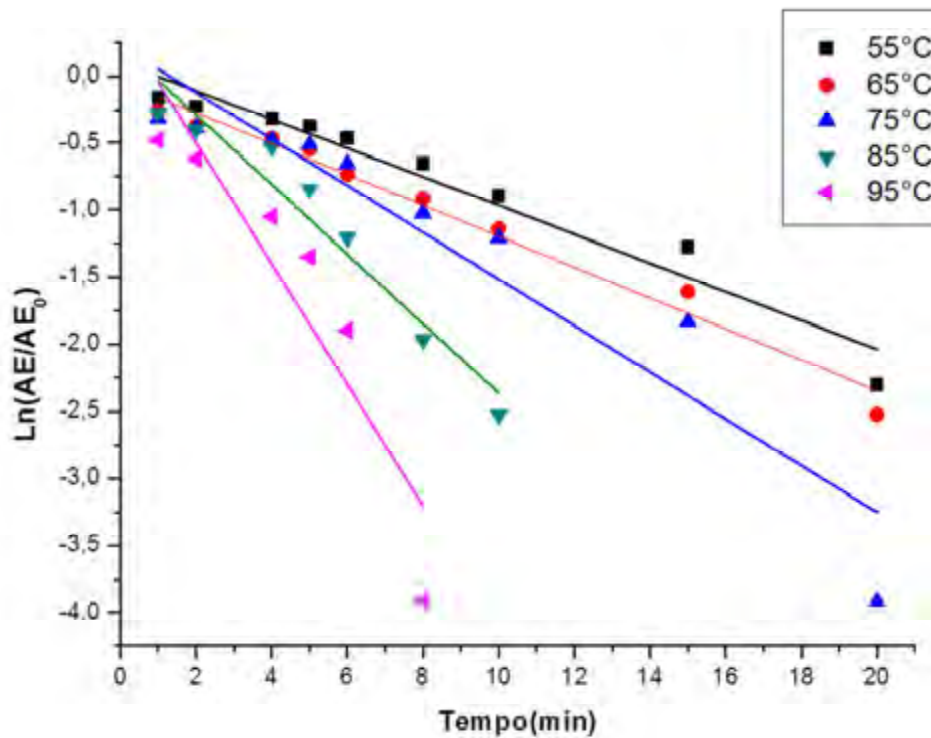


Figura 19 - Gráfico de inativação térmica ($\ln\left(\frac{AE}{AE_0}\right)$ versus t) da polifenoloxidase.

Tabela 7 – valor de k e o Valor de D da inativação térmica da polifenoloxidase.

Temperatura	Eq. da reta ($\ln\left(\frac{AE}{AE_0}\right)$ versus t)	Valor de k	Valor de D
55°C	$y = - 0,1070 t + 0,1053$	0,1070	21,51 min
65°C	$y = - 0,1151 t + 0,0431$	0,1151	20,00 min
75°C	$y = - 0,1738 t + 0,2257$	0,1738	13,24 min
85°C	$y = - 0,2595 t + 0,49751$	0,2595	8,87 min
95°C	$y = - 0,4506 t + 0,0965$	0,4506	5,11 min

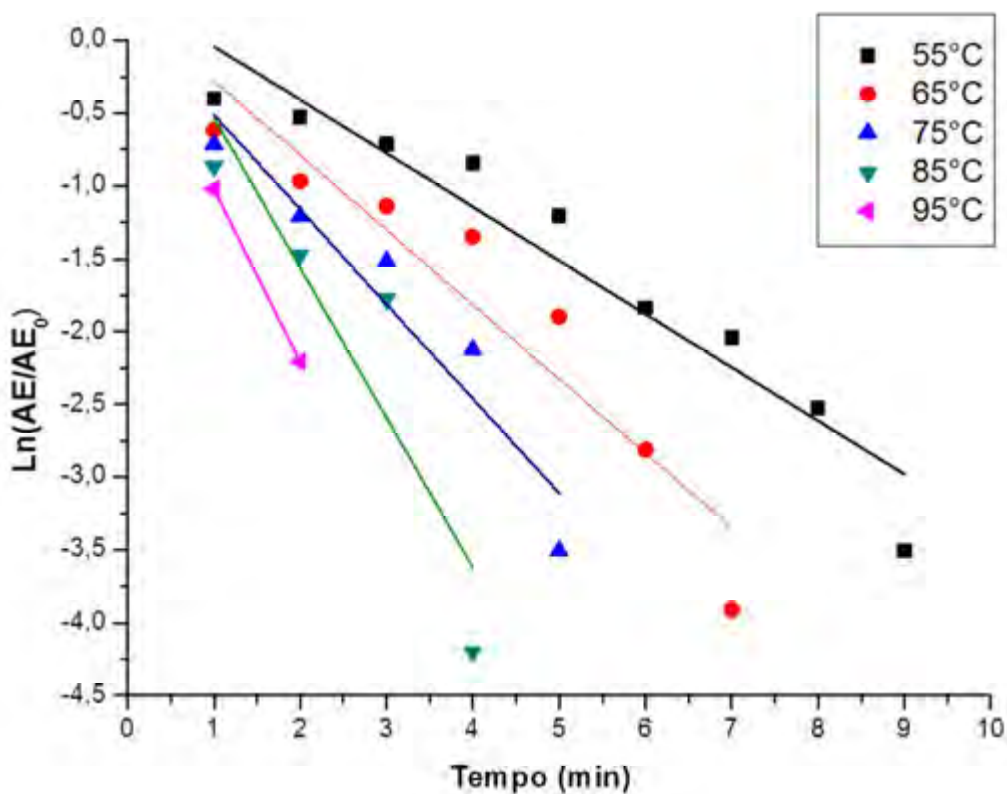


Figura 20 - Gráfico de inativação térmica ($\ln\left(\frac{AE}{AE_0}\right)$ versus t) da Ascorbato oxidase.

Tabela 8 – valor de k e o Valor de D da inativação térmica da ascorbato oxidase.

Temperatura	Eq. da reta ($\ln\left(\frac{AE}{AE_0}\right)$ versus t)	Valor de k	Valor de D
55°C	$y = - 0,3676 t + 0,32791$	0,3676	6,26 min
65°C	$y = - 0,5120 t + 0,23486$	0,5120	4,49 min
75°C	$y = - 0,6502 t + 0,13916$	0,6502	3,54 min
85°C	$y = - 1,0298 t + 0,49751$	1,0298	2,23 min
95°C	$y = - 1,1856 t + 0,16397$	1,1856	1,94 min

5.7.1 Valor de Z

A partir dos valores de D, calculou-se o valor de Z de PPO (62,50°C) e da AO (75,70°C), conforme indicado na (Figura 21 e 22) . Através do gráfico dos valores de D, pode-se sugerir que a inativação térmica foi do tipo linear. Se verdadeiro isto sugere, possivelmente, um sistema enzimático constituído por apenas uma parte termolábil (NATH,1995).

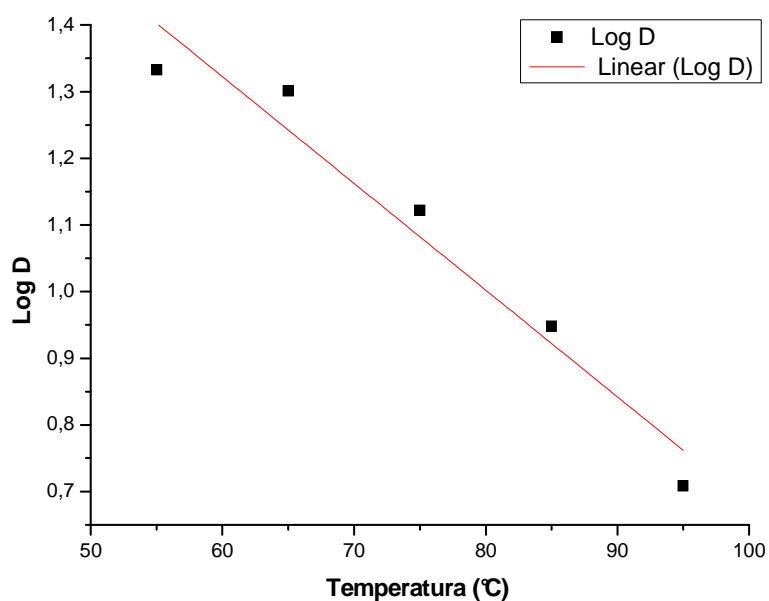


Figura 21- Cálculo do valor de Z (valor em °C para que ocorra a redução de um ciclo logarítmico em D) da inativação térmica da polifenoloxidase. $\text{Log D} = - 0,0160T + 2,2835$. $R^2 = 0,93367$.

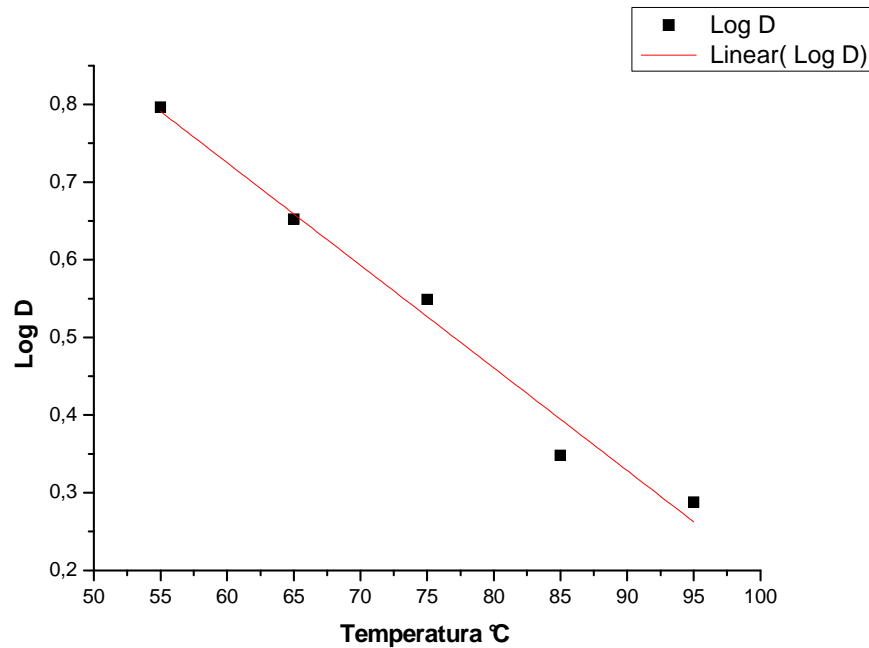


Figura 22- Cálculo do valor de Z (valor em °C para que ocorra a redução de um ciclo logarítmico em D) da inativação térmica da polifenoloxidase. $\text{Log D} = -0,01321T + 1,5179$. $R^2 = 0,97486$.

5.8 ESTUDOS DA ESTABILIDADE FRENTE AO pH.

A PPO foi mais estável quando incubada em pH próximo ao pH ótimo de atividade. Nota-se que houve diminuição de atividade em todos os pH em todos os tempos de armazenagem, Destaca-se a diminuição considerável da atividade da PPO quando incubada no pH 2,6 logo nas primeiras 24 horas, atividade estabilizada a partir das 48 horas de incubação (Figura 23).

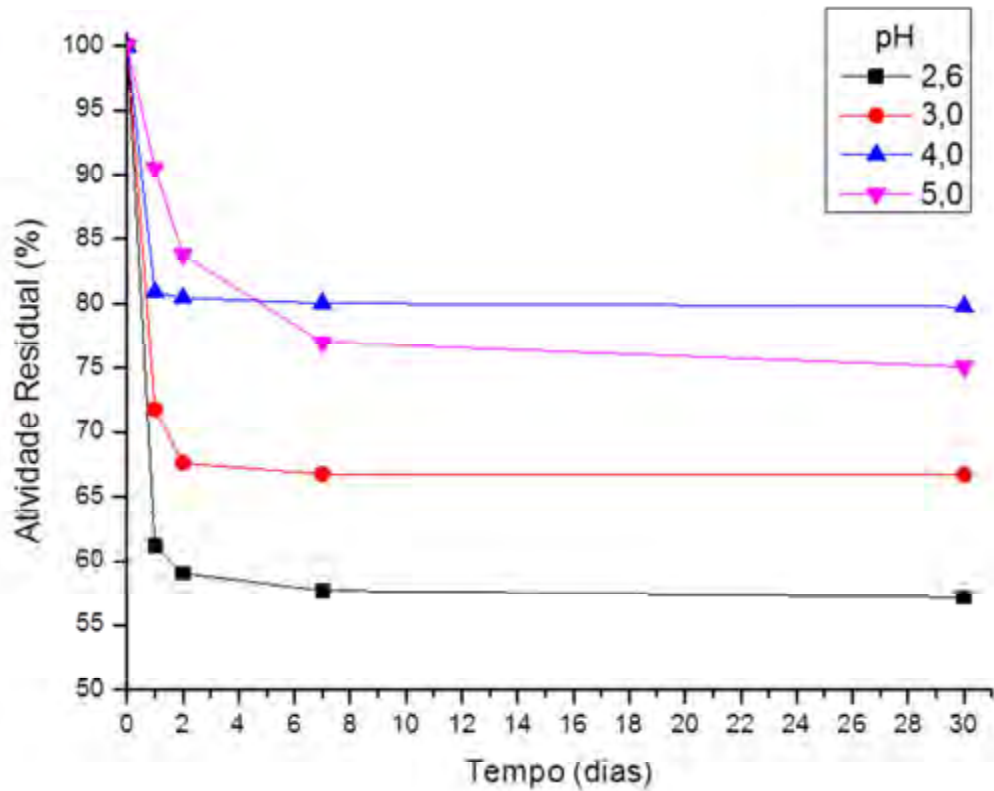


Figura 23 - Efeito do pH (2,6 a 5,0) na estabilidade da PPO. Meio reacional: PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), solução tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,0 a 25°C. UA calculada para 1 mL de extrato concentrado da enzima (n=3).

Destaca-se também a diminuição considerável da atividade da PPO quando incubada no pH 9,0 logo nas primeiras 24 horas, atividade estabilizada a partir das 48 horas de incubação (Figura 24).

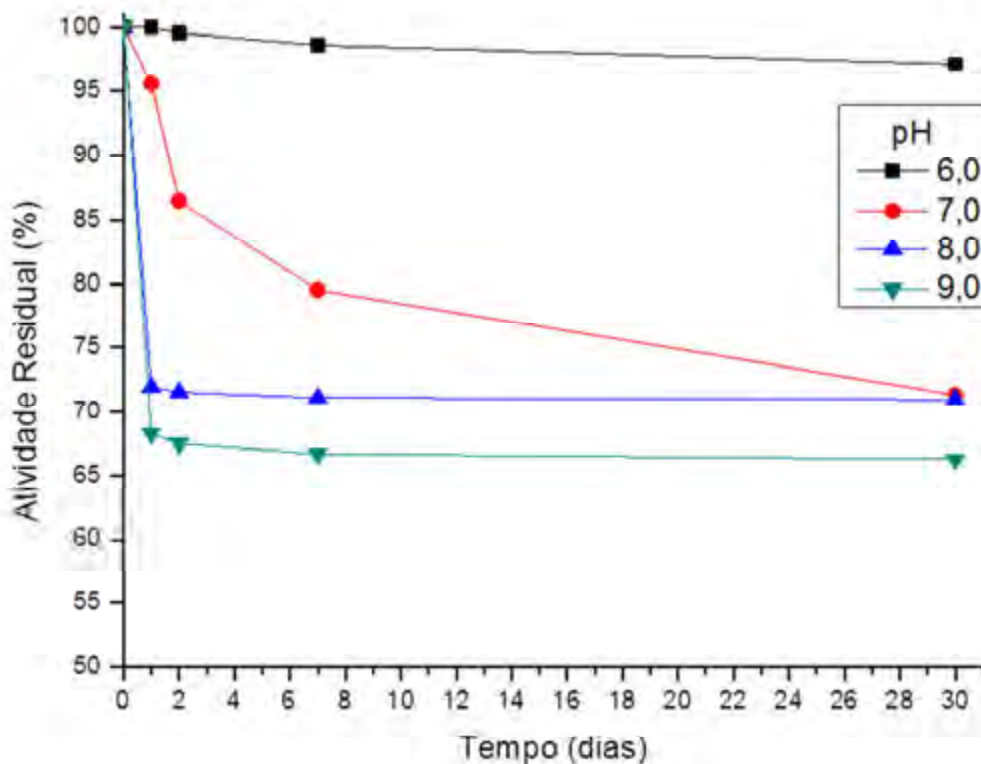


Figura 24 - Efeito do pH (6,0 a 9,0) na estabilidade da PPO. Meio reacional: PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), solução tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,0 a 25°C. UA calculada para 1 mL de extrato concentrado da enzima (n=3).

A AO demonstrou ser mais estável quando incubada em pH próximo ao pH ótimo de atividade. Nota-se que houve diminuição de atividade em todos os pH em todos os tempos de armazenagem, Destaca-se a diminuição considerável da atividade da PPO quando incubada no pH 2,6 logo nas primeiras 24 horas, onde a ocorreu uma diminuição da atividade em quase 50% (Figura 25).

Destaca-se também a diminuição considerável da atividade da AO quando incubada no pH 9,0 logo nas primeiras 24 horas, atividade estabilizada a partir das 48 horas de incubação (Figura 26).

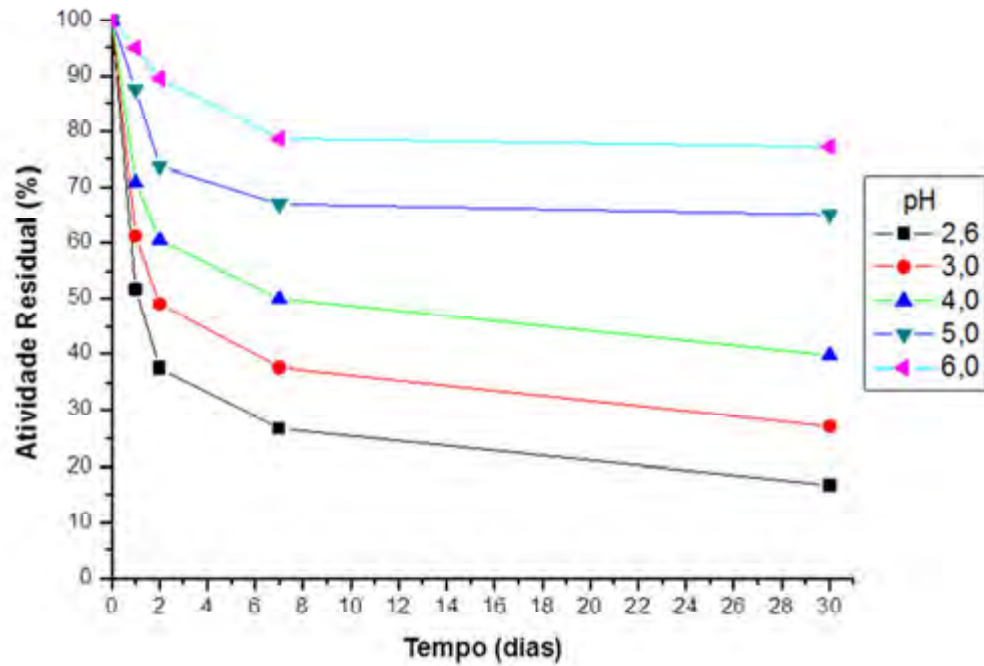


Figura 25 - Efeito do pH (2,6 a 6,0) na estabilidade da AO. Meio reacional: AO (0,1mL), Ác. ascórbico (10 mmol/L), solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol/L pH 6,0 a 25°C (n=3).

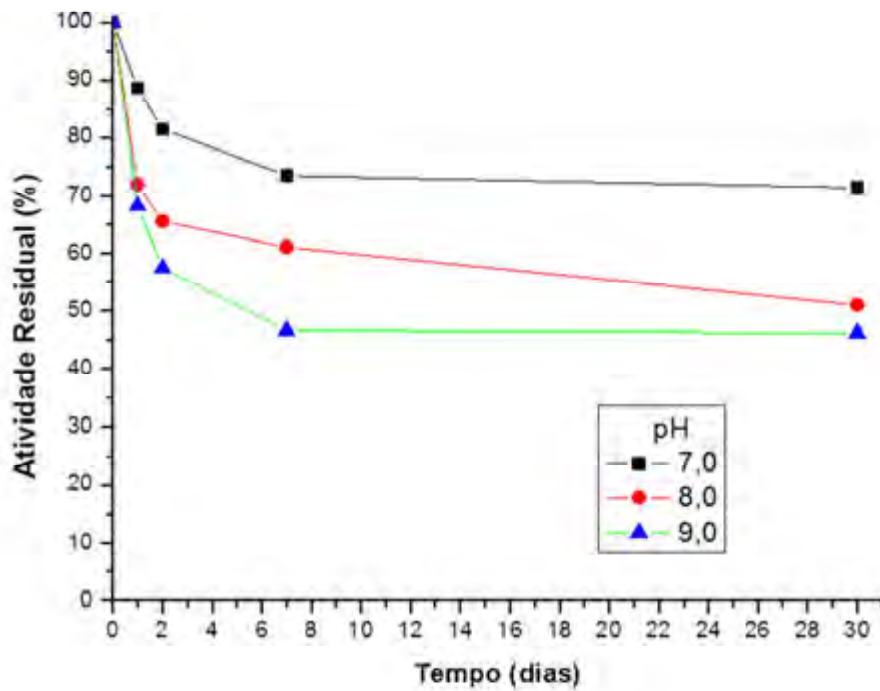


Figura 26 - Efeito do pH (7,0 a 9,0) na estabilidade da AO. Meio reacional: AO (0,1mL), Ác. ascórbico (10 mmol/L), solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol/L pH 6,0 a 25°C (n=3).

5.9 EFEITOS DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.9.1 Efeito do NaCl e Na₂SO₄ na atividade enzimática

Observou-se que a partir da concentração de 100 mmol/L uma diminuição significativa na atividade da PPO e da AO (Figura 27), em relação à ausência do sal, sendo que a PPO apresentou uma diminuição menor da atividade em concentrações superiores a 200 mmol/L.

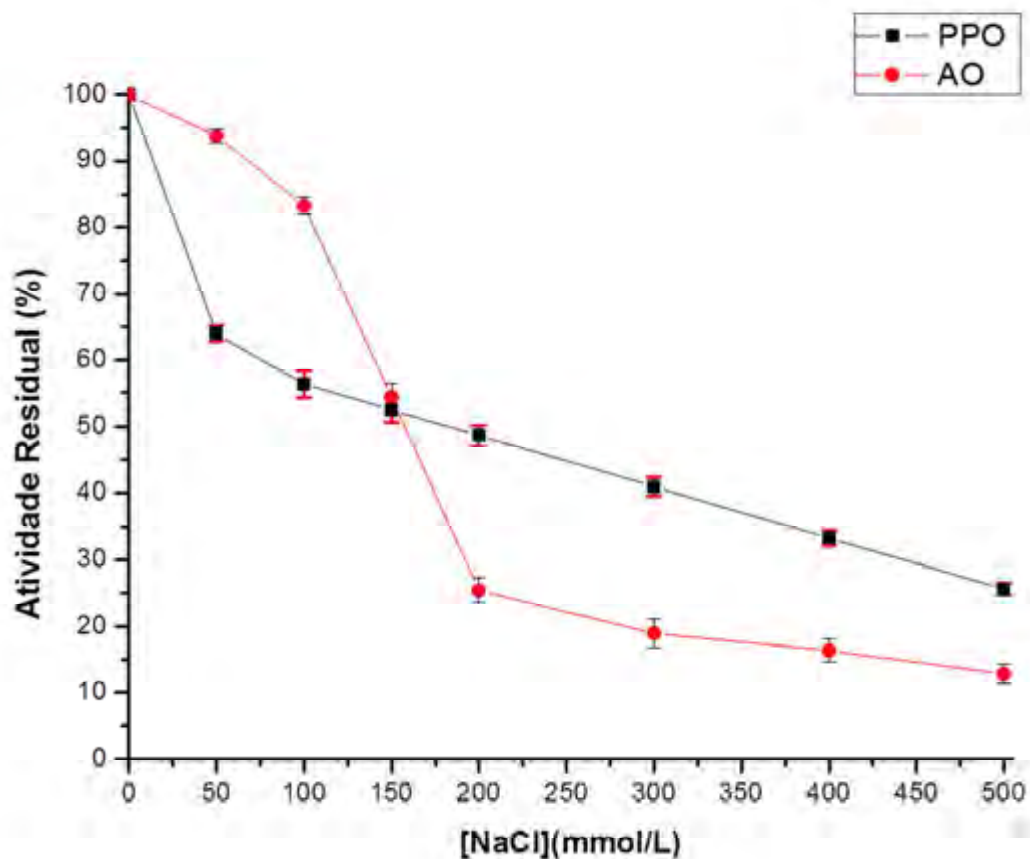


Figura 27 - Efeito da concentração de NaCl na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C.

No estudo do efeito da concentração de Na_2SO_4 no meio de reação, observou-se um efeito semelhante ao NaCl , onde nas concentrações de 12,50 mmol/L à 37,50 mmol/L (Figura 28). A PPO e a AO sentiu maior efeito de Na_2SO_4 quando expostas a concentrações superiores a 50 mmol/L.

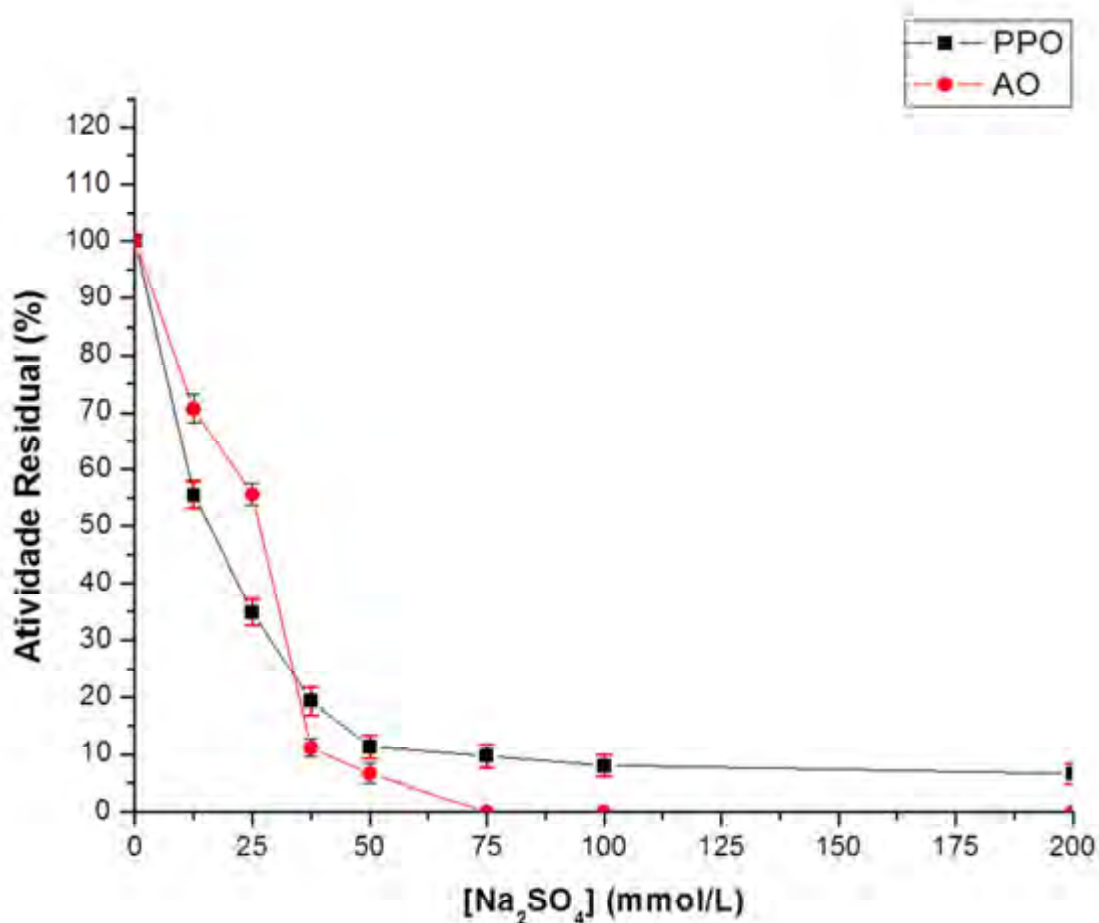


Figura 28 - Efeito da concentração de Na_2SO_4 na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C.

5.9.2 Efeito do KCl e K₂SO₄ na atividade enzimática

Variando-se a concentração de KCl no meio reacional, observou-se a atividade mínima com 50 mmol/L do sal (Figura 29). Em todas as concentrações estudadas pode-se observar um pequeno decréscimo na atividade da PPO e da AO.

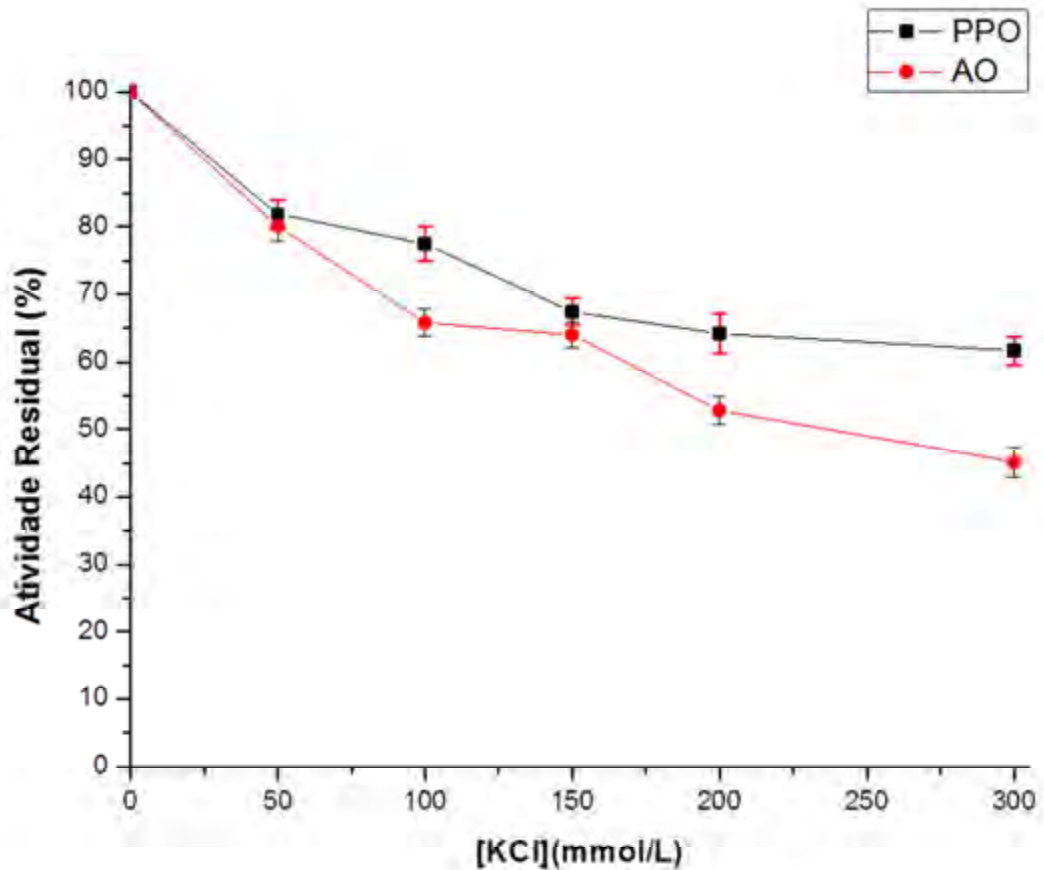


Figura 29 - Efeito da concentração de KCl na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C

No caso da variação da concentração de K_2SO_4 , observou-se o uma inibição significativa em baixas concentrações que se manteve a partir de 75 mmol/L (Figura 30).

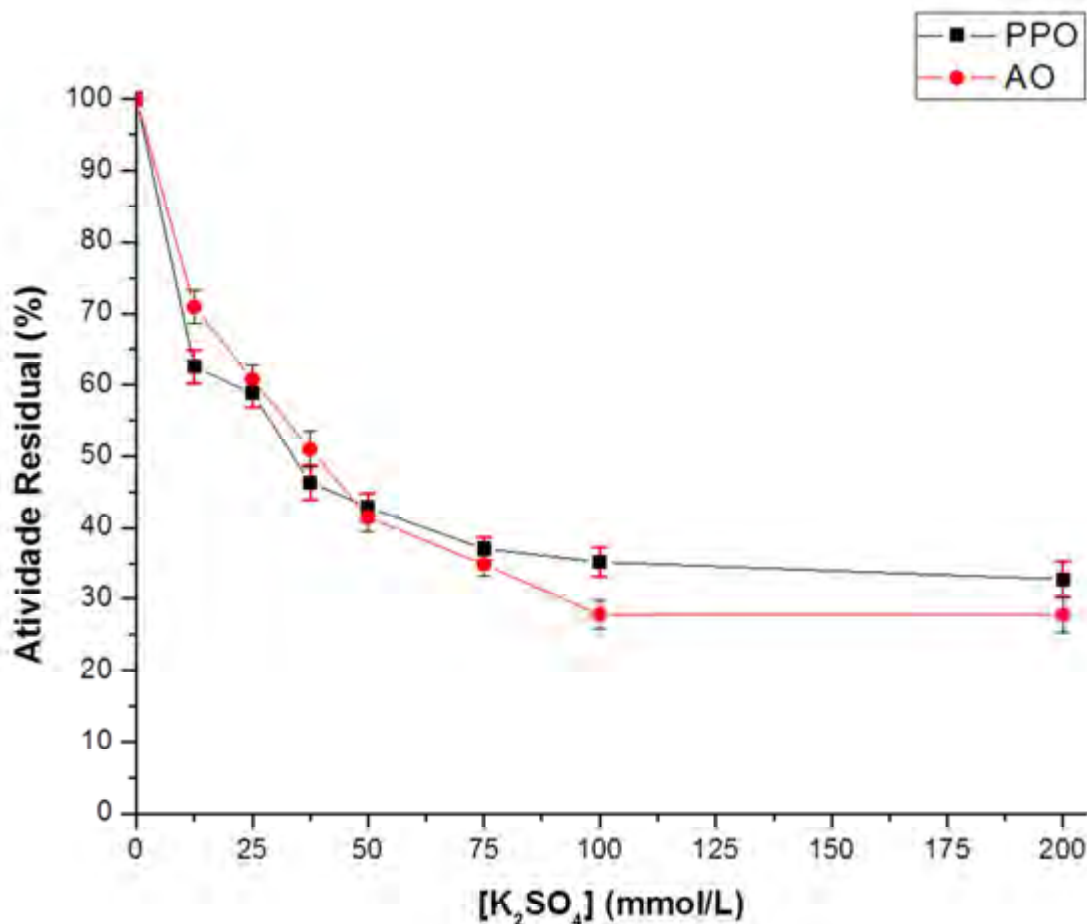


Figura 30 - Efeito da concentração de K_2SO_4 na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .

Pode-se notar que apenas com a troca do cátion monovalente, Na^+ para K^+ , houve alterações na resposta cinética frente à variação da concentração dos mesmos, quando se usa o mesmo ânion: NaCl e KCl (Figuras 27 e 28, respectivamente), Na_2SO_4 e K_2SO_4 (Figuras 29 e 30, respectivamente). Sabe-se que os íons Na^+ e K^+ , em sistemas biológicos, formam complexos relativamente fracos, uma vez que eles tem a possibilidade de difundir-se rapidamente como íons simples (SILVA e WILLIAMS,1993).

5.9.3 Efeito do $MgCl_2$ e $MgSO_4$ na atividade enzimática

No estudo do efeito da variação da concentração do $MgCl_2$, observou-se decréscimo de atividade até a concentração em 100 mmol/L do referido sal (Figura 31) nas outras concentrações apresentou redução pouco significativa na atividade da PPO e da AO.

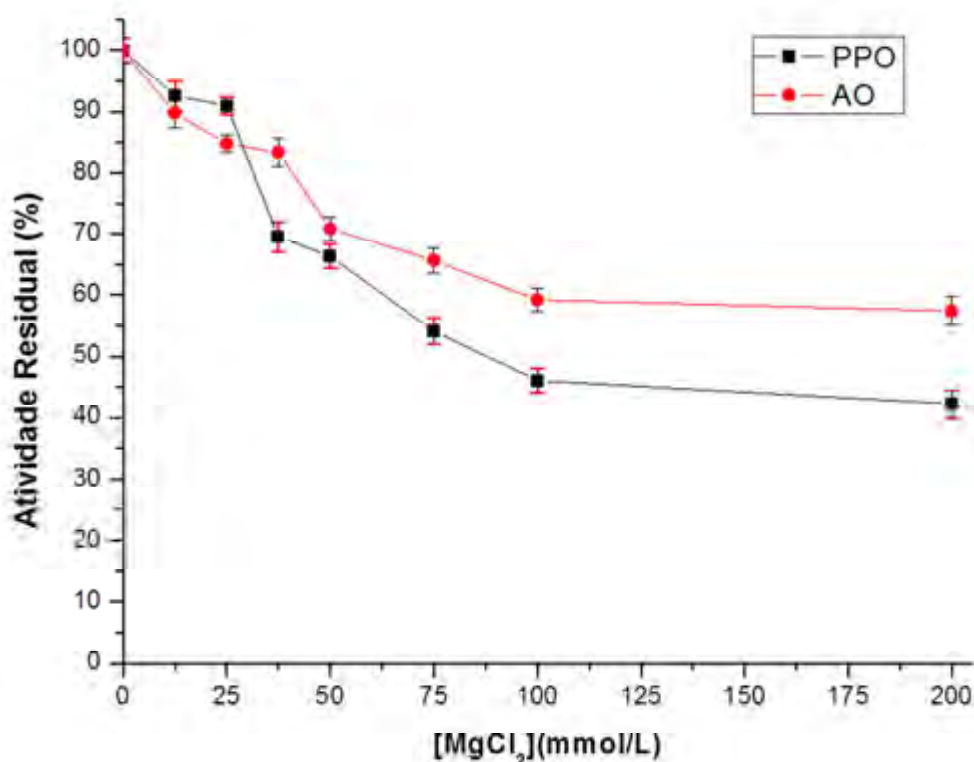


Figura 31 - Efeito da concentração de $MgCl_2$ na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C

Variando-se a concentração do $MgSO_4$ no meio reacional, observou-se que houve aumento da atividade da PPO em algumas concentrações, com 113% de atividade máxima em 37,5 mmol/L (Figura 32) o efeito contrario foi observado em relação a atividade da AO uma vez que nessa concentrações ocorreu um discreta diminuição da atividade.

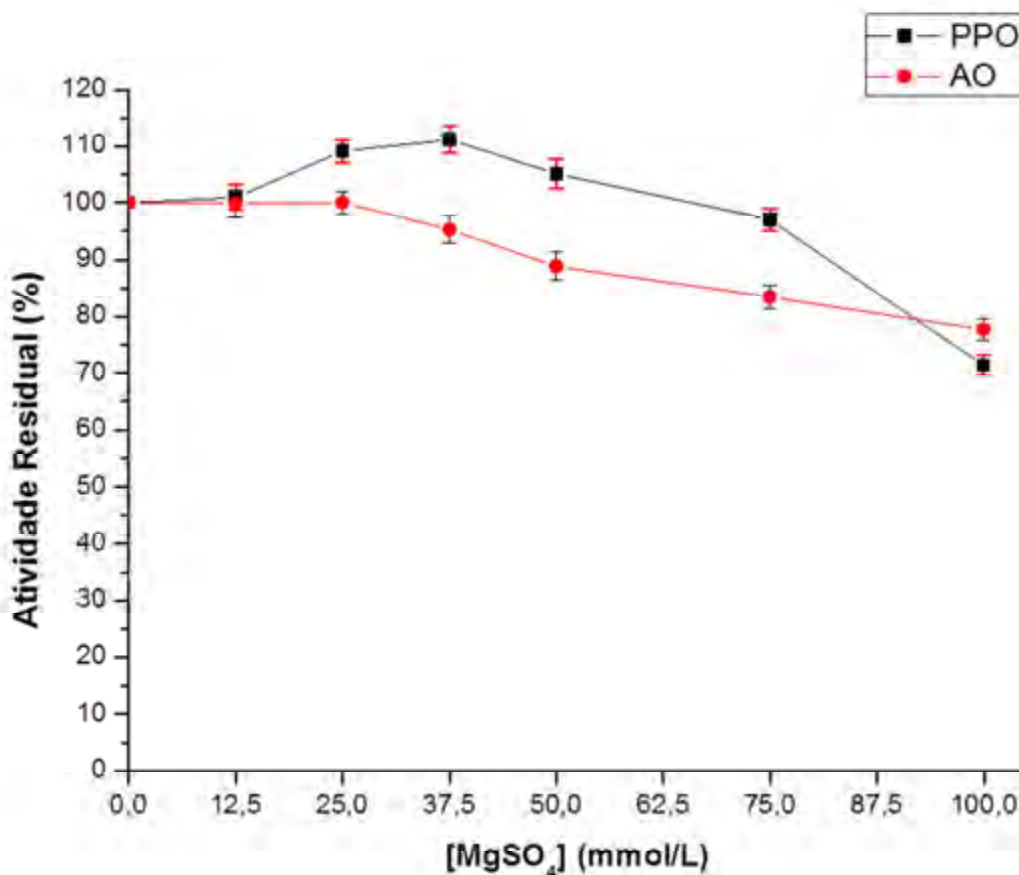


Figura 32 - Efeito da concentração de MgSO₄ na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .

5.9.4 Efeito do CaCl₂ na atividade enzimática

No estudo da variação da concentração de CaCl₂ no meio de reação, observou-se um atividade próxima da ausência mesmo quando exposta a 25 mmol/L, a partir dessa concentração houve um inibição crescente até 75 mmol/L onde estabeleceu um pequeno patamar (Figura 33).

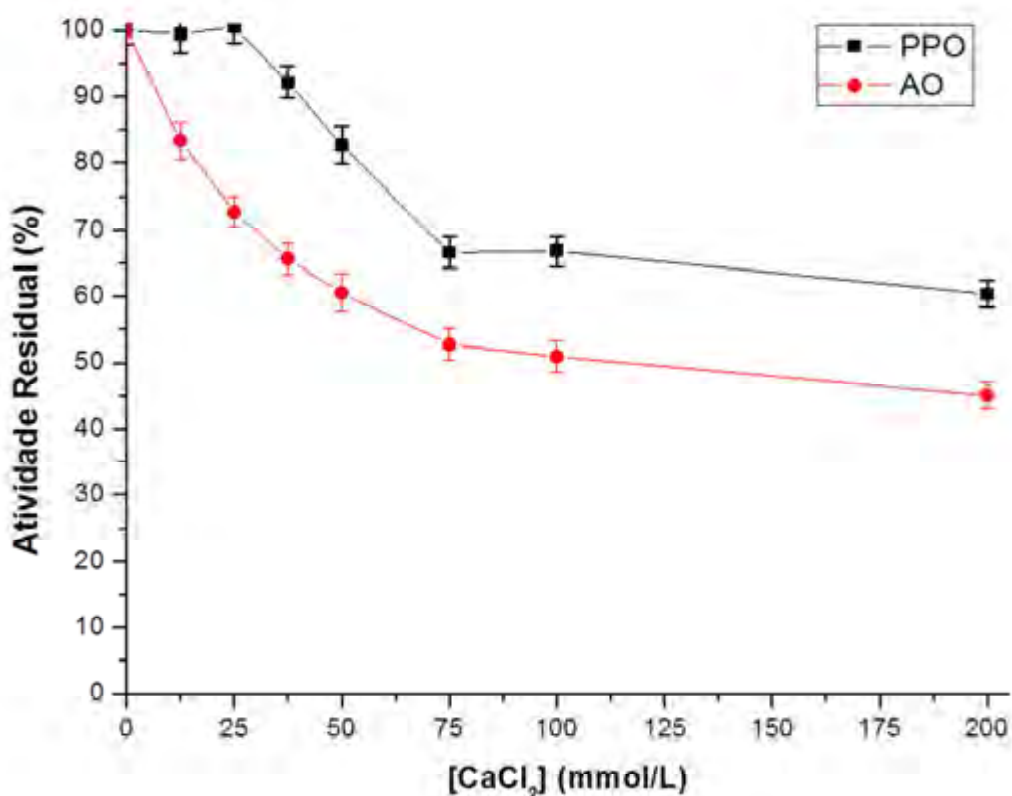


Figura 33 - Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,00 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .

5.10 ESTUDO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS

várias formas de inibição da PPO e da AO são conhecidas, agentes antioxidantes, quelantes e até compostos que seriam substratos preferenciais em relação aos presentes no próprio alimento, muito embora os métodos utilizados pelas indústrias sejam relativamente poucos. A seleção do inibidor a ser utilizado, sendo ele antioxidante e outros conservantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e

armazenamento e o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento. Além disso, na escolha de um antioxidante deve-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais. (SANTOS, 2009).

Nesse contexto foi testada a cisteína que afetou moderadamente a atividade da enzima conforme Figura 34. Onde se pode notar que houve inibição de 50% da atividade da PPO em 998 mmol/L, e 1.485 mmol/L para AO, em relação à atividade na ausência de cisteína.

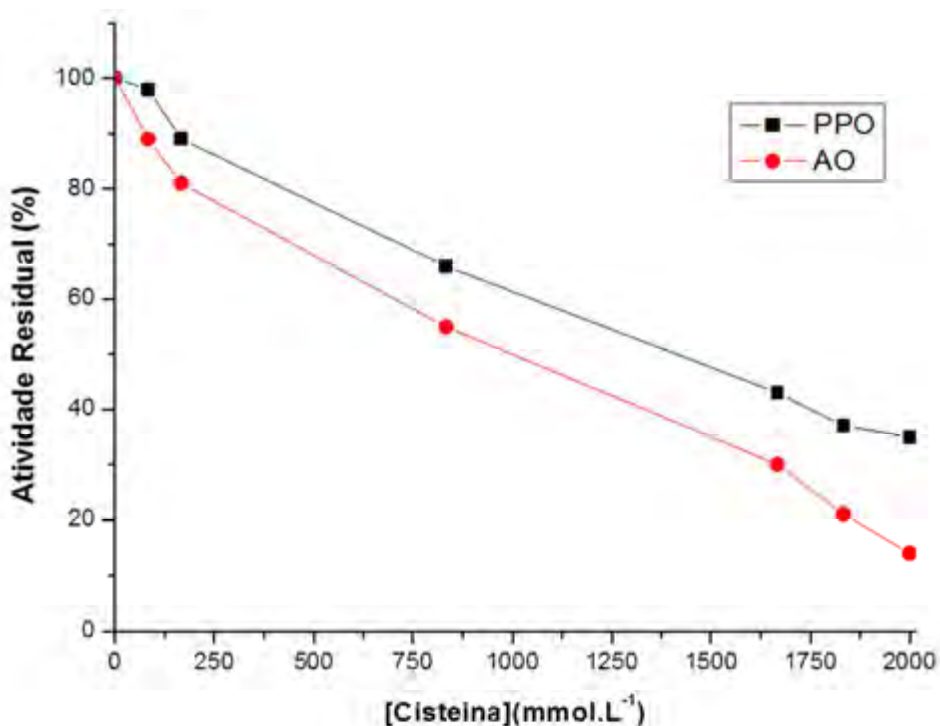


Figura 34 - Efeito da concentração de Cisteína na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .

A cisteína é um aminoácido que contém um grupo tiol, com ação redutora; seu poder de inibição do escurecimento varia de acordo com a razão de concentração cisteína/fenólico. Três diferentes mecanismos de atuação de cisteína são propostos: redução das o-quinonas a o-dihidroxifenóis; inibição direta da atividade da polifenoloxidase e reação com o-quinonas dando origem a compostos incolores cis-quinona. Entretanto a aplicação de cisteína pode levar à indesejável formação de pigmentos amarelos, violetas ou róseos (MELO; VILAS BOAS, 2007).

O efeito inibidor do Metabissulfito de sódio apresentado na Figura 35 demonstra que a inibição de 50% na atividade da PPO ocorreu quando exposta a 33,5 mmol/L e da AO quando exposta 49,8 mmol/L.

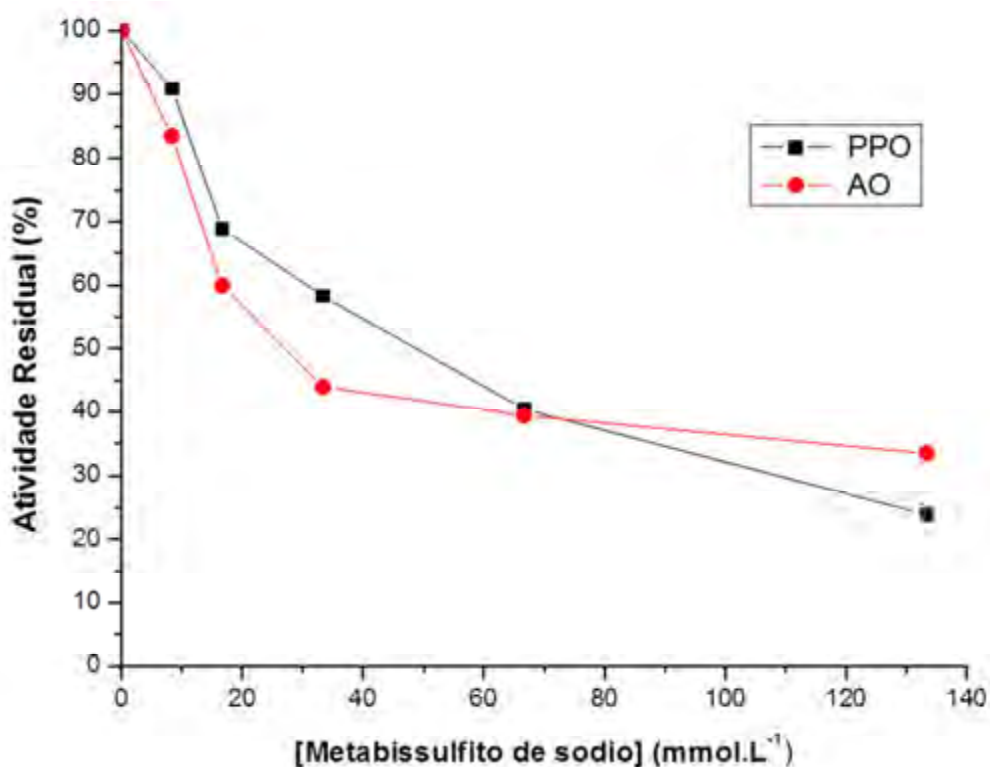


Figura 35- Efeito da concentração de Metabissulfito de sódio na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) está entre os agentes quelantes mais comumente utilizados na indústria de alimentos, se ligando a íons metálicos, como o cobre, fundamental para a ativação da polifenoloxidase, retardando o efeito dessa enzima.

O efeito inibidor do EDTA apresentado na Figura 36 demonstra que a inibição de 50% na atividade da PPO e da AO ocorreu quando exposta a 12,5 mmol/L e 22,4 mmol/L respectivamente.

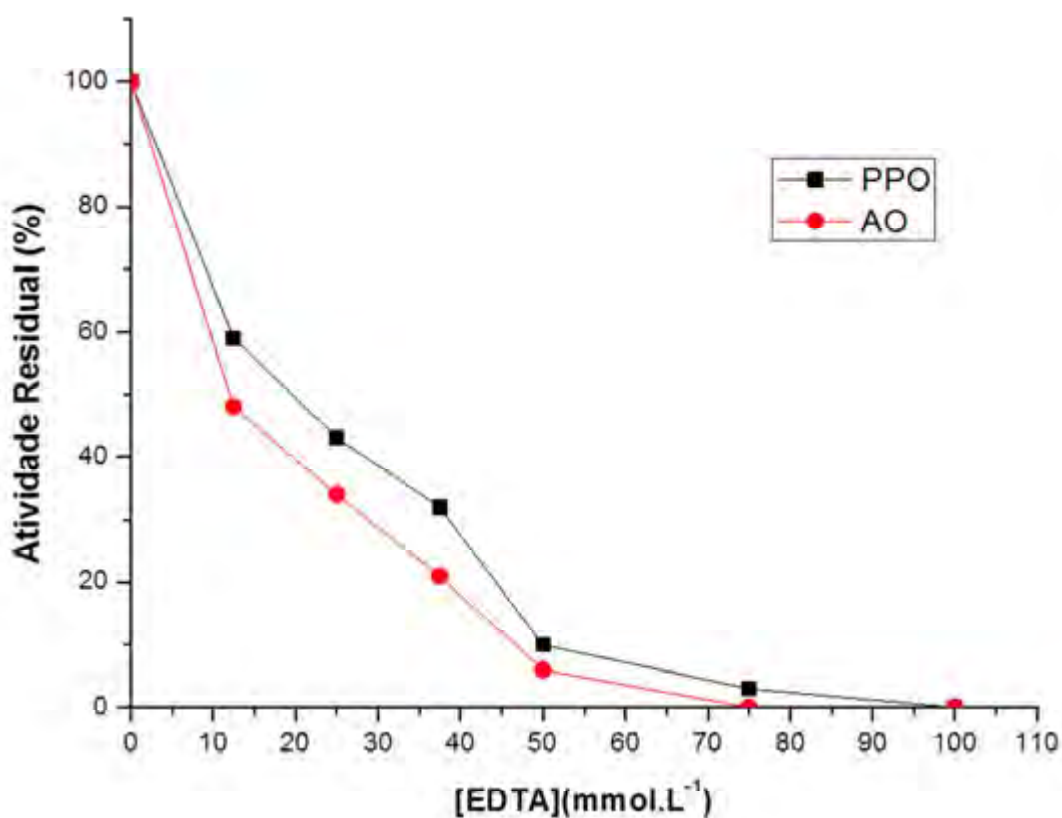


Figura 36 - Efeito da concentração de EDTA na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .

Entre os outros compostos testados, a sacarose, o ácido cítrico e o ácido ascórbico foi a mais eficiente no ponto de vista industrial uma vez que já são bastante utilizados na indústria de alimentos, esses compostos apresentaram uma inibição de 50% (200 mmol/L de Sacarose, 250 mmol/L de ácido cítrico e 100 mmol/L de ácido ascórbico) da atividade da PPO e da AO em relação a sua ausência (Figura 37,38 e 39 respectivamente).

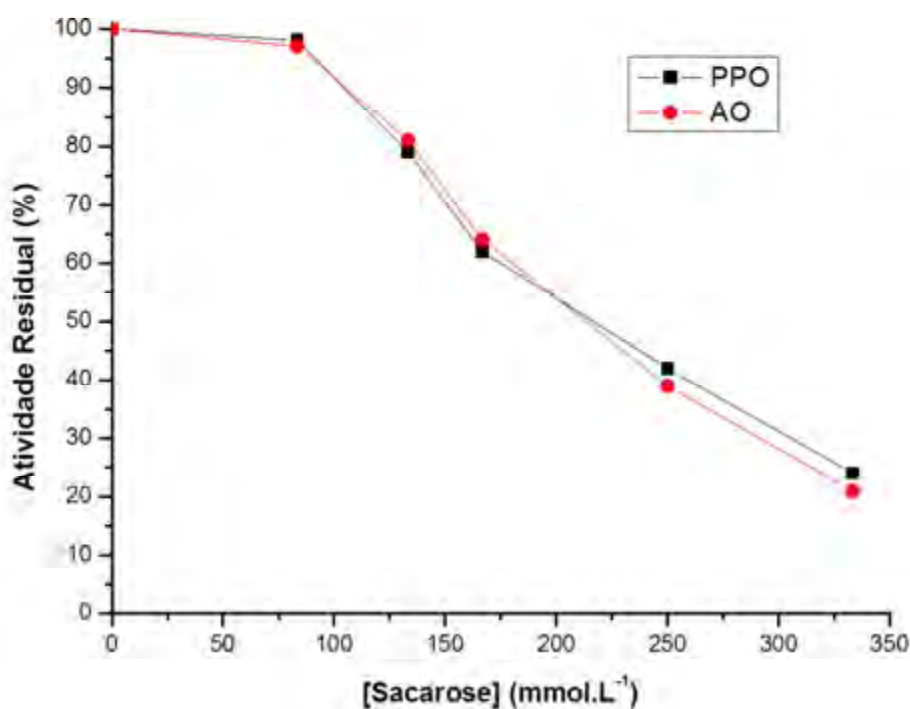


Figura 37 - Efeito da concentração de Sacarose na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .

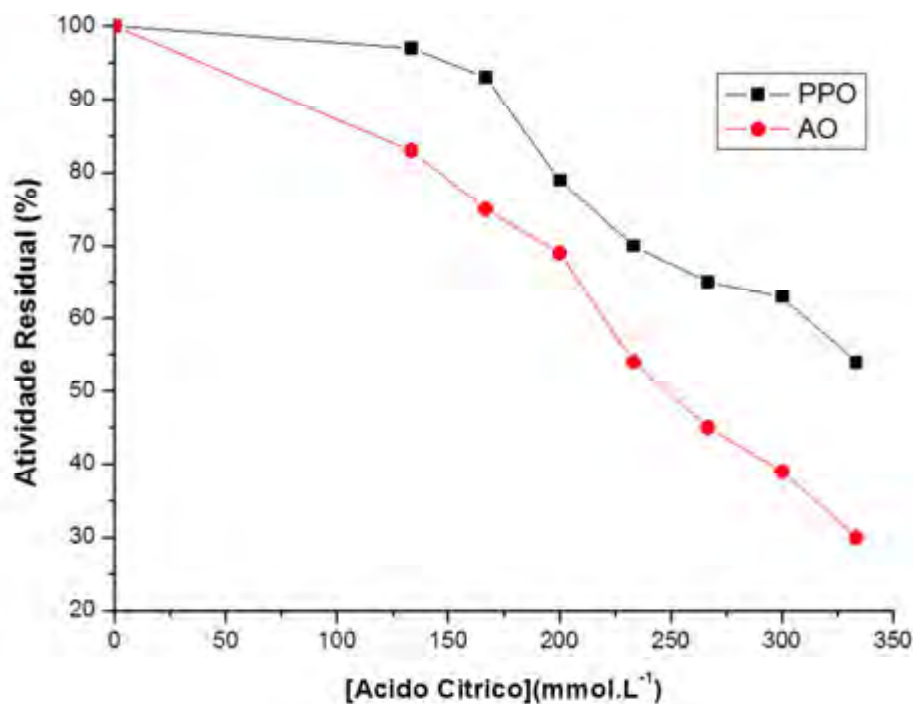


Figura 38 - Efeito da concentração de ácido cítrico na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,0 e da AO utilizando ácido ascórbico (10 mmol/L) pH 5,0 a 25°C .

Endo et al. (2008) reporta ao uso do ácido cítrico como alternativa ideal para minimizar o escurecimento enzimático. Segundo os autores, a ação do ácido cítrico na inibição do escurecimento enzimático ocorre através da diminuição do pH do meio ou interação com íons Cu^{+2} presentes no sitio catalítico da PPO e da AO.

O ácido ascórbico é reconhecido por sua ação redutora e contribuição nutricional (vitamina C). O ácido ascórbico e seus vários sais neutros são os principais antioxidantes para o uso em frutas e hortaliças e seus sucos, visando prevenir escurecimento e outras reações oxidativas. Um dos modos de atuação indicados na literatura, a vitamina C reduz as o-quininas formadas pela ação da PPO liberando os fenóis, antes de aparecerem os pigmentos escuros no suco (SAPERS; MILLER, 1998).

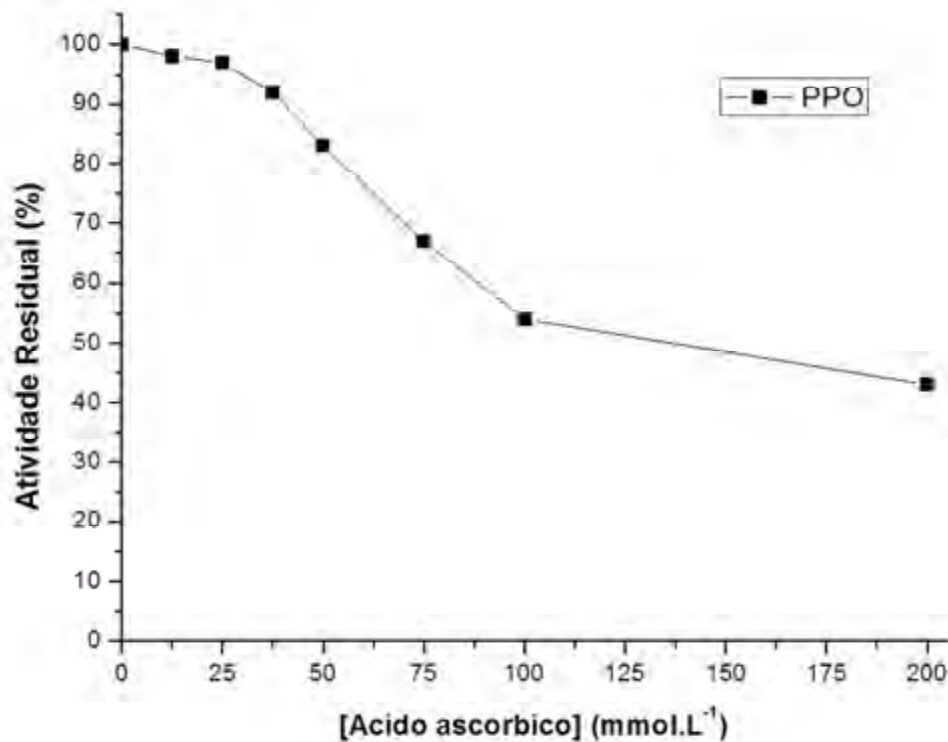


Figura 39 - Efeito da concentração de ácido ascórbico na atividade da enzima PPO (0,1mL), Catecol (0,12 mol/L), pH 6,

5.11 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.11.1 Ajuste dos parâmetros cinéticos e integração da expressão de Michaelis-Menten

Em seguida, os dados de velocidade inicial em função das concentrações iniciais de substrato obtidos pela Equação (1) são apresentados na Figura 40 e 41.

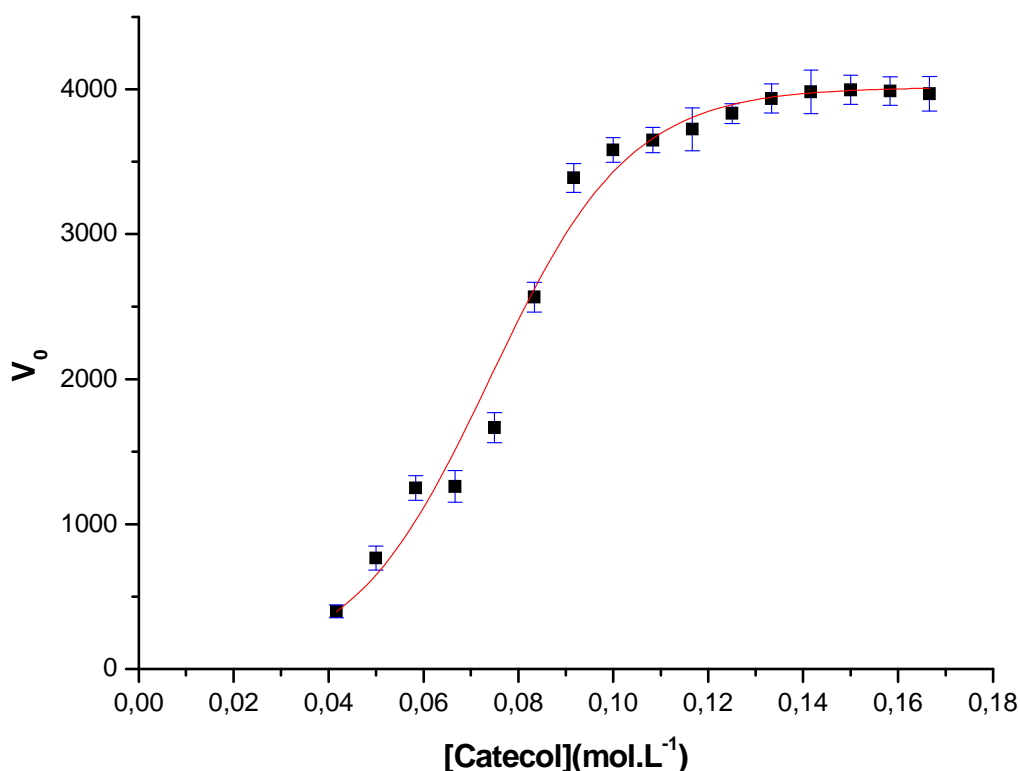


Figura 40 - Efeito da concentração de Catecol na atividade da enzima PPO. Meio reacional: PPO (0,1mL), Catecol (0,016- 0166 mol/L), solução tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,0 a 25°C. UA calculada para 1 mL de extrato concentrado da enzima (n=3).

O comportamento cinético da PPO ($V_0 \times [\text{catecol}]$) indica uma pré-estabelecimento de complexo ou de interações necessárias para ocorrer a oxidação do catecol pela enzima (concorda com a proposta de mecanismo sugerida por Zawistowki et al. 1991).

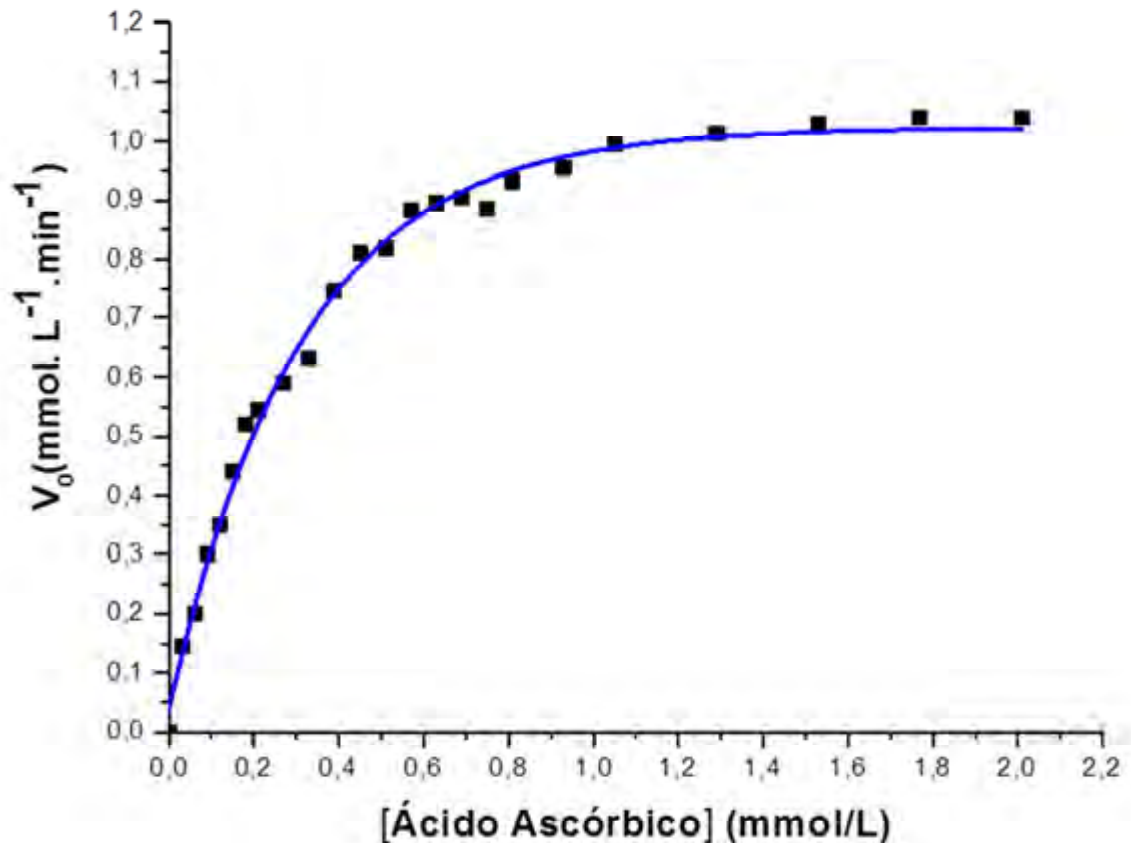


Figura 41 - Efeito da concentração de ácido ascórbico na atividade da enzima AO. Meio reacional: AO (0,1mL), Ác. ascórbico (0,03-2,01 mmol/L), solução tampão citrato/ácido cítrico 25 mmol/L pH 6,0 a 25°C (n=3).

Os mesmos foram utilizados para estimativa dos parâmetros da Equação de Michaelis-Mentem através de regressão não linear e também envolvendo os diferentes métodos de linearização apresentados no capítulo anterior.

A Tabela 8 e 9 apresenta os valores numéricos de KM e $vmax$ obtidos através destas diferentes metodologias adotados para estimativa dos parâmetros reportados na Tabela 3, os quais têm efeito significativo sobre os valores obtidos. Em função desta questão algumas características dos métodos de linearização serão brevemente discutidas.

Tabela 8 - Parâmetros do modelo de Michaelis-Menten ajustados de acordo com diferentes métodos para enzima polifenoloxidase.

Métodos	R ²	K _M (mol/L)	V _{máx} (ua.min ⁻¹)
Lineweaver-Burk	0,96871	0,04744	5.238,31
Eadie-Hofstee	0,99657	0,04490	5.150,16
Langmuir (Hanes-Woolf)	0,99851	0,04225	5.082,66
Não-Linear	0,99403	0,07366	4.033,31

Tabela 9 - Parâmetros do modelo de Michaelis-Menten ajustados de acordo com diferentes métodos para enzima ascorbato oxidase.

Métodos	R ²	K _M (mmol/L)	V _{máx} (mmol/L. min ⁻¹)
Lineweaver-Burk	0,97414	0,218	1,109
Eadie-Hofstee	0,94757	0,253	1,202
Langmuir (Hanes-Woolf)	0,99733	0,247	1,196
Não-Linear	0,99313	0,207	1,023

O método de Lineweaver-Burk, embora muito conhecido, não é considerado o melhor método de linearização (CORNISH-BOWDEN, 1995). Em geral, sua baixa confiabilidade é atribuída a aglomeração de pontos em determinadas faixas de concentração inicial de substrato e ao aumento desigual da incerteza experimental envolvida na determinação das concentrações iniciais de substrato. Pelo menos um destes aspectos é claramente observado na Figura 42 e Figura 43, a qual evidencia uma distribuição não uniforme de pontos no intervalo de concentrações investigado.

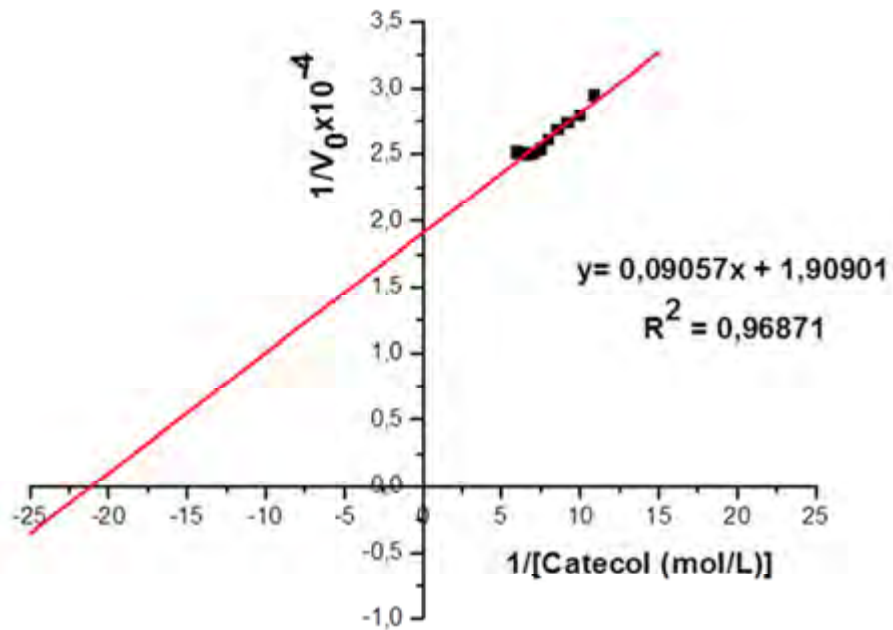


Figura 42 - Análise gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk da polifenoloxidase.

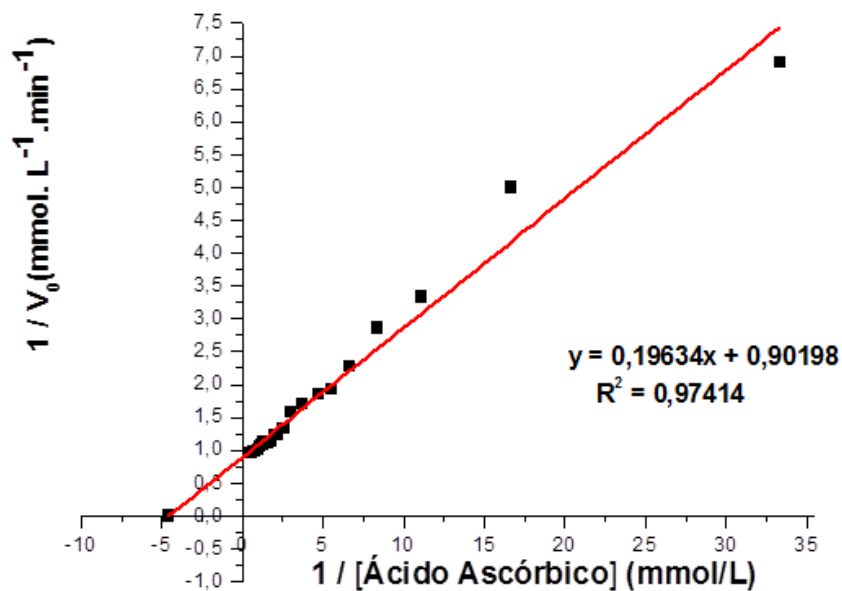


Figura 43 - Análise gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk da ascorbato oxidase.

Embora o método de Eadie-Hofstee represente um avanço em relação ao procedimento de Lineweaver-Burk, pois gera uma distribuição mais uniforme de pontos (observar Figura 44 e 45), a distorção nos erros experimentais é mantida, todavia não evidenciada nesta investigação, o que reduz a precisão do método (CORNISH-BOWDEN,1995).

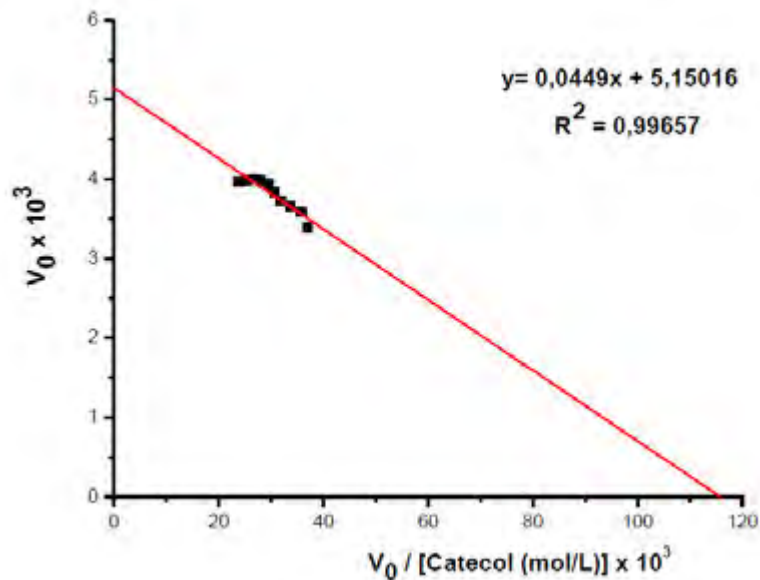


Figura 44 - Análise gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Eadie-Hofstee da polifenoloxidase.

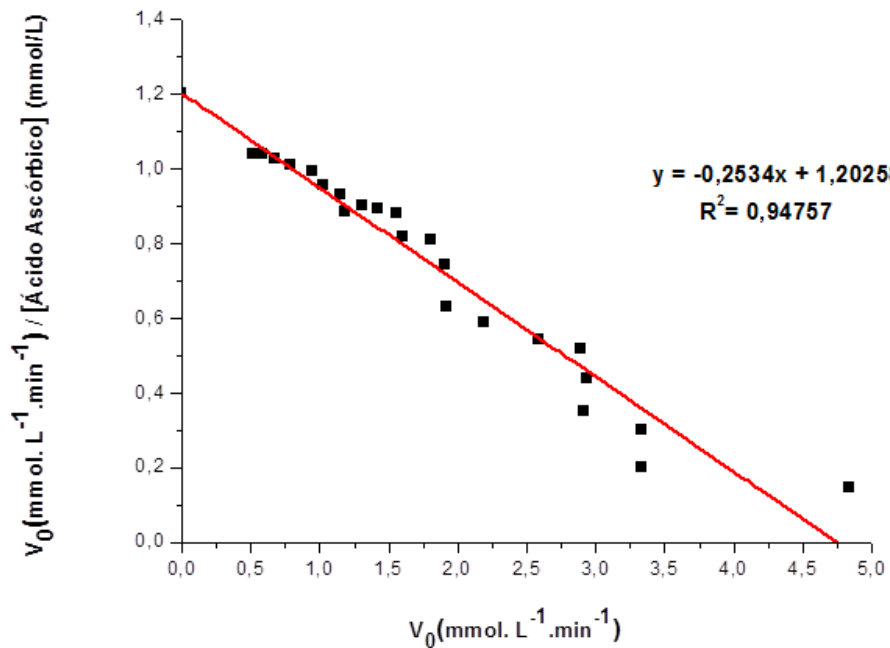


Figura 45 - Análise gráfica da linearização da equação de Michaelis-Menten por Eadie-Hofstee da ascorbato oxidase.

Nos gráficos (Figura 45 e 46) que representa a linearização por Langmuir (Hanes-Woolf) a distribuição dos pontos é espaçada e uniforme. Neste caso, estes pontos não apresentam um peso indevido na regressão linear. Por esta razão, e também por diminuir a propagação de erros devido a incertezas nas medidas das variáveis primárias, o método é extensivamente sugerido na literatura (ex.: MOSER, 1985).

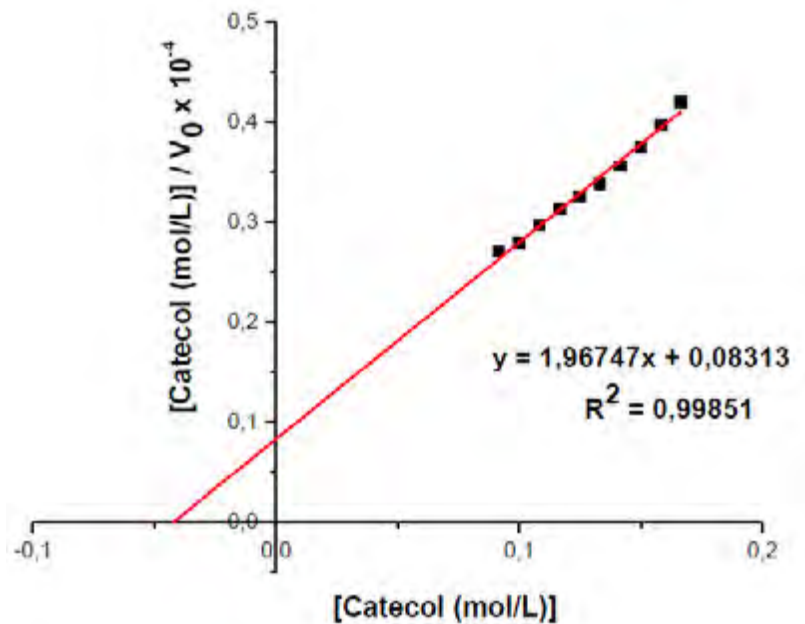


Figura 46 - Análise gráfica da linearização da equação de MichaelisMenten por Langmuir (Hanes-Woolf) da polifenoloxidase.

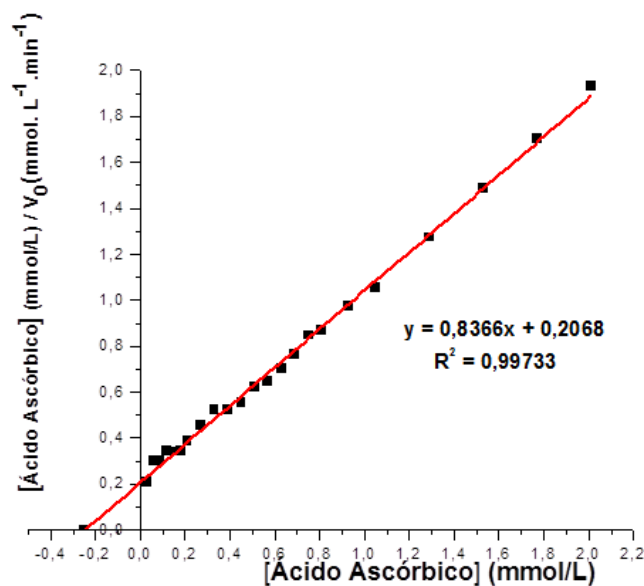


Figura 47 - Análise gráfica da linearização da equação de MichaelisMenten por Langmuir (Hanes-Woolf) da ascorbato oxidase.

5.12 EFEITOS DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.12.1 Determinação dos parâmetros da equação de Arrhenius

Através dos valores das velocidades iniciais de reação, determinadas a partir de resultados de concentração de Catecol no caso da PPO e de Ácido ascórbico no caso da AO em função do tempo nas condições dos ensaios da Tabela 4, podem ser encontrados os parâmetros da equação de Arrhenius, os quais são importantes para análise do efeito de temperatura sobre a conversão do substrato.

Nas Figuras 48 e 49, é apresentado um diagrama envolvendo o logaritmo natural das velocidades iniciais em função do inverso da temperatura. O fator de frequência ($A_0 = 25,98$ UA) e a energia de ativação da ($E_a = 663,00$ J.mol⁻¹) da polifenoloxidase e o fator de frequência ($A_0 = 12,66$ mmol.L⁻¹.min⁻¹) e a energia de ativação da ($E_a = 308,54$ J.mol⁻¹) da foram ajustados aos resultados reportados nestas figuras.

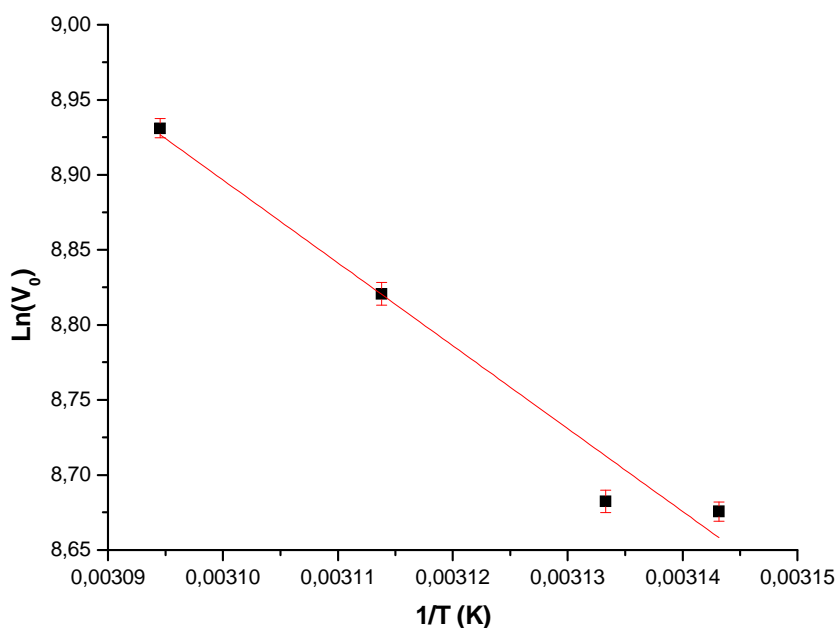


Figura 48 - Análise gráfica da linearização da equação de Arrhenius da polifenoloxidase. $\text{Ln}(v_0) = -5512,52T + 25,98$ $R^2 = 0,9680$.

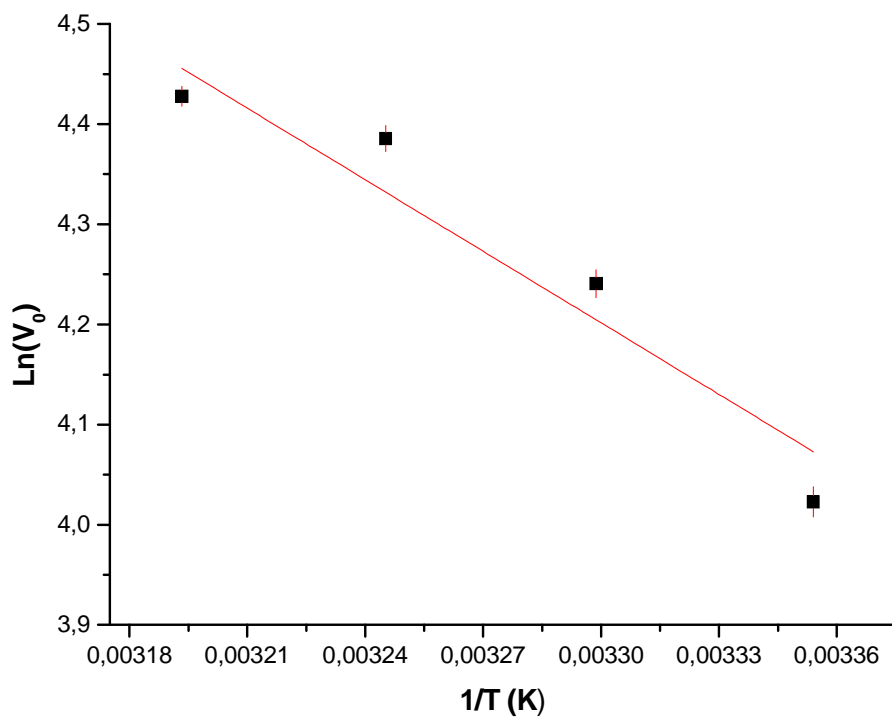


Figura 49- Análise gráfica da linearização da equação de Arrhenius da ascorbato oxidase. $\ln(v_0) = -2565,39T + 12,66$, $R^2 = 0,8976$.

6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados do presente trabalho podem ser resumidos em:

- A PPO de maracujá apresentou um pH ótimo de 6,0 temperatura ótima de 50°C , utilizando catecol como substrato.
- A AO de maracujá apresentou um pH ótimo de 5,0 temperatura ótima de 45°C , utilizando ácido ascórbico como substrato .
- Os estudos de inativação térmica da PPO apresentaram valores de D a 55°C de 21,51 min; a 65°C de 20,00 min; a 75°C a 13,24°C; a 85°C de 8,86 min e a 95°C de 5,11 min.
- Os estudos de inativação térmica da AO apresentaram valores de D a 55°C de 6,26 min; a 65°C de 4,49 min; a 75°C a 3,54 min; a 85°C de 2,23 min e a 95°C de 1,94 min.
- As enzimas AO e PPO apresentaram inibição a Cisteína 833 mmol/L, Metabissulfito de sódio 33,5 mmol/L; EDTA 12,5 mmol/L; sacarose 200 mmol/L; ácido cítrico 250 mmol/L e ácido ascórbico 200 mmol/L.
- A enzima PPO apresentou $k_M = 0,04225 \text{ mol/L}$ e $V_{\max} = 0,04225 \text{ UA.min}^{-1}$.
- A enzima AO apresentou $k_M = 0,24729 \text{ mmol/L}$ e $V_{\max} = 1,1955 \text{ mmol/L. min}^{-1}$.
- Os valores de energia de ativação da (Ea = 663,00 J.mol⁻¹) da polifenoloxidase e a energia de ativação da (Ea = 308,54 J.mol⁻¹) da Ascorbato oxidase.

7. ANÁLISE E REFLEXÃO SOBRE O TRABALHO DESENVOLVIDO

Em vista da grande importância que a ingestão de frutas tropicais representa para saúde humana, vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de elucidar quais as substâncias presentes nas frutas que possivelmente estejam envolvidas na promoção da saúde, prevenção das doenças crônicas não transmissíveis e também na manutenção do peso. Dentre os fitoquímicos com ação antioxidantes presentes nas frutas, estão a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), os carotenóides, os flavonóides e os polifenóis. Essas substâncias já foram vastamente pesquisadas e elucidadas, porém, no que se refere à oxidação dessas substâncias por enzimas, tais como polifenoloxidase e ascorbato oxidase presentes no maracujá amarelo azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) ainda a muito a ser estudado.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência das enzimas polifenoloxidase e ascorbato oxidase no escurecimento enzimático, reação que provavelmente esteja relacionada com perda de característica e de qualidade do suco, tais como cor, odor, sabor e textura, que ocorrem durante o processamento industrial do suco.

No intuito de minimizar o escurecimento enzimático provocado por pela polifenoloxidase e ascorbato oxidase foi realizado neste trabalho metodologias das quase foram possíveis conhecer o comportamento cinético das enzimas envolvidas, tais como determinação do pH e da temperatura ótimas de ensaio; estabilidade térmica e frente ao pH; efeitos de íons metálicos; estudo de inibidores específicos; determinação dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten e de Arrhenius.

Os resultados obtidos sugerem que a inibição ocasionada pela exposição das enzimas a temperaturas altas e a pHs alcalinos, são significativos no ponto de vista acadêmico no entanto não satisfaz completamente os interesses industriais. No que se trata a inativação térmica dessas enzimas o estudo demonstrou a necessidade de altas temperaturas por um período de tempo superior a 1 min, o que demanda um gasto energético muito alto, elevando o custo/ benefício que não é de interesse da indústria, além que em altas temperaturas ocorrem à perda de certos fitoconstituintes de importância nutracêutica. Ao avaliar a inibição por exposição a diferentes pHs obtivemos inibição bastante significativa quando exposto a pH

alcalinos, contudo por se tratar de um suco com características ácidas (pH 2,6-3,6) qualquer alteração do pH estará em desacordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2003).

Outro resultado importante foi obtido na investigação de inibidores específicos, como um método alternativo para a inativação de enzimas em processo industrial. Foram testados alguns inibidores, partindo-se de inibidores encontrados na literatura para as enzimas em estudo: metabissulfito de sódio; sacarose; cisteína; EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); ácido cítrico; ácido ascórbico; os inibidores demonstraram serem bastante promissores e com uma grande vantagem em relação à inibição térmica, uma vez que não necessitaria alteração na planta industrial.

Portanto, conclui-se que a inibição enzimática da polifenoloxidase e da ascorbato oxidase é mais facilmente obtida quando é adicionado no suco determinado inibidor químico, entretanto não podemos descartar totalmente o uso da temperatura como forma de inibição, a pesquisa deve-se focar no uso concomitantemente de várias formas de inibição, possibilitando assim uma inibição total, como baixo custo, alta aplicabilidade, conservação e manutenção das características nutricionais e uma aceitabilidade por parte do mercado consumidor.

REFERÊNCIAS

- AMON, A.; MARKAKIS, P. Properties of ascorbate oxidase isozymes. **Phytochemistry**, Michigan, v. 12, n. 9, p. 2127-2132, Sept. 1973.
- AGRIANUAL. **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2007. 394 p.
- APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemistry Ecology**, Beltsville, v. 19, n. 7, p. 1521-1552, July 1993.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1995. 247 p.
- BAHIA. Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. **Cultura – Maracujá**. Salvador. Disponível em: <www.seagri.ba.gov.br/Maracuja.htm#Aspectos%20Gerais> Acesso em: 24 jun. 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, jan./fev. 2006.
- BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS Y. Detection of cutinases and pectic enzymes during infection of tomato by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Phytopathology**, v. 75, n. 8, p. 940-945, Jan. 1985.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 223 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 11 mar. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do 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. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Desequilíbrio alimentar**: população tem cardápio pouco saudável. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/15_08_desequilibrio_alimentar.pdf> Acesso em: 24 mar. 2011.
- BREIER, A. C. **Ação neuroprotetora dos polifenóis resveratrol e daidzeína e a expressão do gangliosídeo GM1 em um modelo de cultura organotípica de hipocampo de rato submetido à privação de oxigênio-glicose**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Instituto de Ciências Básicas da saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- 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**, Belo Horizonte, v. 21, n. 206, p.10-17, set./out. 2000.
- CARVALHO JUNIOR, L.B.; LIMA, C. J.; MEDEIROS, P.H. Ascorbate oxidase from *Cucurbita máxima*. **Phytochemistry**, v.20, n. 10, p. 2423-2424, Jan. 1981.
- CENI, G. **Oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hill)**: extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2005.
- 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.
- CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of enzyme kinetics**. 2nd ed. London: Portland Press, 1995. 516 p.
- CUNHA, M. A. P.; BAROSA, L. V.; FARIA, L. V. Botânica. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A.P. (Ed.). **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2004. p.15-35.
- CUNHA, M. A. P.; BAROSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá produção**: aspectos técnicos. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2002. 104 p.
- DI VENERE, A.; MEI, G.; GILARDI, G.; ROSATO, N.; DE MATTEIS, F.; MCKAY, R.; GRATTON, E.; FINAZZI-AGRÒ, A. Resolution of the heterogeneous fluorescence in multi-tryptophan proteins: ascorbate oxidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 257, n. 2, p. 337-343, Oct. 1998.
- DIXON, M.; WEBB, E. L. Enzyme Kinetic. In: _____. **Enzymes**. New York: Academic Press, 1979. Cap. 4, p. 201-220.

- DURIGAN, J. F.; SIGRIST, J. M. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; VIEIRA, G. 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.
- ENDO, E.; SOARES, N. F. F.; SANTOS, D. A. A.; BORGES, S. V.; FONTES, E. A. F.; GONÇALVES, M. J. P. C. Uso de filmes ativos na conservação da batata minimamente processada. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 19, n. 2, p. 349-360, abr./jun. 2008.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 652 p.
- FARIA, R. O; MOURE, V. R.; AMAZONAS, M. A. L.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 3. p. 287-294, Sept. 2007.
- FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Analytical use of vegetal tissue and crude extract as enzymatic source. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 445-464, maio 2002.
- FELTON, G. W.; SUMMERS, C. B.; MUELLER, A. J. Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa hopper. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 3, p. 639-650, Mar. 1994.
- FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá: aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, abr. 2004.
- FIGUEIREDO, I. C. R.; JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verdura em adultos da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 5, p. 30-36, Out. 2008.
- GARCÍA-PINEDA, E.; CASTRO-MERCADO, E.; LOZOYA-GLORIA, E. Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) ascorbato oxidase during elicitor and wounding stress. **Plant Science**, v.166, n. 2, p. 237-243, Feb. 2004.
- GOMES, F. S. Frutas, legumes e verduras: recomendações técnicas versus constructos sociais. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 6, p. 18-24, nov./dez. 2007.
- GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, out./dez. 2005.
- GOY, P. A.; FELIX, G.; METRAUX, J. P.; MEINS, F. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive levels of β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 11-21, July 1992.

GUPTA, S.; MUKHERJEE, A.; NETHAJI, M.; CHAKRAVARTY, A. R. An angular trinuclear copper(II) complex as model for the active site of multicopper oxidases. **Polyhedron**, v. 23, n. 4, p. 643-647, Feb. 2004.

HALAOULI, S.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C.; HAMDI, M.; LAMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 219-232, Jan. 2006.

HARBONE, J. B. The chemical basic of plant defense. In: PALO, R.T.; ROBBINS, C.T. (Eds.). **Plant defenses against mammalian herbivory**. Boca Raton: CRC Press, 1991. Cap. 3, p.45-59,

HAREL, E., MAYER, A.M.; LEHMAN, E. Multiple forms of vitis-vinifera catechol oxidase. **Phytochemistry**, v.12, n. 11, p. 2649-2654, Nov. 1973.

HIMMELWRIGHT, R. S.; EICKMAN, N. C.; LUBIEN, C. D.; LERCH, K.; SOLOMON, E. I. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 102, n. 24, p. 7339-7344, Nov. 1980.

HUNT, M.D.; EANNETTA, N. T.; YU, H.; NEWMAN, S. M.; STEFFENS, J. C. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. **Plant Molecular Biology**, v. 21, n. 1, p. 59-68, Aug. 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Produção brasileira de frutas 2009**. Jaboticabal: IBRAF, 2009. Disponível em: < [http://www.ibraf.org.br/estatisticas/ Produção Brasileira de Frutas 2009.pdf](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Produção%20Brasileira%20de%20Frutas%202009.pdf)>. Acesso em: 12 jul. 2011.

JAIME, P. C.; MONTEIRO C. A. Frutas e legumes ingeridos por adultos brasileiros. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 19-24, set. 2005.

JAIME, P. C.; MACHADO F. M. S.; WESTPHAL, M. F.; MONTEIRO, C. A. Educação nutricional e consumo de frutas e hortaliças: ensaio comunitário controlado. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.1, p.154-157, 2007.

KATO, N.; ESAKA, M. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than wild-type protoplasts. **Planta**, v. 210, n. 6, p. 1018-1022, May 2000.

KORTH, K. L.; DIXON, R. A. Differential transcript accumulation near wound sites in response to insector mechanical damage. **Plant Physiology**, v. 115,n. 4, p. 1299-1305, Dec. 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

- LEITE, K. M. S. C.; ASSIS, S. A.; TADIOTTI, A. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Evaluation of guava during different phases of the industrial processing. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 2, p.1-8, Feb. 2009.
- LEVY-COSTA, R. B.; SICHIERI, R.; PONTES, N. S.; MONTEIRO C. A. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 4, p. 30-40, ago. 2005.
- LIMA, A.; BORGES, A. L.; SANTOS FILHO, H. P.; SANTOS, L. B.; FANCELLI, M.; SANCHES, N. F. **Instruções práticas para o cultivo do maracujazeiro**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPQMF, 1994. 49 p.
- LIMA, D. C. **Contribuição ao estudo de polifenoloxidasas de tubérculos: "mandioca e mandiocinha"**. 2002. 106 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, C. A. A. Purificação da enzima polifenoloxidase (pfo) de polpa de pinha (*annona squamosa* L.) madura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p. 98-104, jan./abr. 2001.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, 594 p.
- LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, jun./jul. 2002.
- LUÍZ, R. C.; HIRATA, T. A. M.; CLEMENTE, E. Cinética de inativação da polifenoloxidase e peroxidase de abacate (*Persea americana* MILL.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1766-1773, nov./dez. 2007.
- MACHADO, F. M. S.; SIMÕES, A. N. Análise custo-efetividade e índice de qualidade da refeição aplicados à estratégia global da OMS. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 1, p. 21-26, fev. 2005.
- MANICA, I. **Fruticultura tropical: 1. Maracujá**. São Paulo: Ceres, 1981. 160 p.
- MARITANO, S.; KOHZUMA, T.; SUZUKI S.; MARCHESINI, A. Stability of ascorbate oxidase extracted from *Cucurbita pepo*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 349-351, Feb. 1996.
- MARTINEZ, E.; DUVNJAK, Z. Enzymatic degradation of chlorogenic acid using apolyphenoloxidase preparation of the white-rot-fungus trametes versicolor ATCC 42530. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1835-1841, Sept. 2006.
- MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S. **Maracujá: pós-colheita**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2002. 51 p. (Frutas do Brasil, 23).

- MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S. Processamento. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 305-324.
- MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea Arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffe rust.). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 8, n. 2, p. 185-190, fev. 1985.
- MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. **Phytochemistry**, v. 26, n. 1, p. 11-20, Jan. 1987.
- MAYER, A. M.; HAREL, E. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In: FOX, P.F. (Ed.) **Food enzymology**. London: Elsevier Applied Science, 1991. p. 373-398.
- MAYER, A. M.; HAREL, E. Review: polyphenol oxidase in plants. **Phytochemistry**, v. 18, n. 2, p.193-215, Feb.1979.
- MEDINA, C. J.; GARCIA, J. C. C.; TOCCHINI, R. P.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V. A.; CANTO, W. L. **Maracujá: da cultura ao desenvolvimento e processamento**. São Paulo: ITAL, 1980. 207 p.
- MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 821-828, maio/jun. 2007.
- MELO, E. de A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 193-201, abr./jun. 2008.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, jul. 2006.
- MESSERSCHMIDT, A.; LADENSTEIN, R.; HUBER, R, R.; BOLONGNESI, M.; AVIGLIANO, L.; PETRUZZELLI, R.; ROSSI, A.; FINAZZI-AGRÓ, A. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 224, p.179-205,1992.
- MOSER, A. Rate equations for enzyme kinetics. In: REHM, H. J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH, 1985. V. 2, p. 199-226.
- 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.
- NATH, S. A rapid method for determining kinetic parameters of enzymes exhibition nonlinear thermal inactivation behavior. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 106-110, Jan. 1995

- PINHEIRO, A. R. de O.; GENTIL, P. C. **A Iniciativa de Incentivo ao consumo de Frutas, Verduras e Legumes (f,l&v):** uma estratégia para abordagem intersectorial no contexto da Segurança Alimentar e Nutricional (CONSEA – Brasil). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005. 3 p.
- PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M. do; SOUSA, P. H. M. de; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológicas de sucos de frutas intregrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 98-103, jan./mar. 2006.
- PRADO, A. **composição fenólica e atividade antioxidante de frutos tropicais.** 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- PRIGENT, S. V. E. **Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties.** 2005. 105 f. Ph.D. Thesis, Wageningen University, Netherlands, 2005.
- RAY, H.; HAMMERSCHMIDT, R. Responses of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 53, n. 2, p. 81-92, Aug. 1998.
- RODRIGUEZ-LOPEZ J. N.; MUNÓZ J.; GARCIA-MOLINA, F.; VARON, R.; GARCÍARUIZ P. A.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; TUDELA J. Kinetic characterization of the oxidation of chlorogenic acid by polyphenol oxidase and peroxidase. Characteristics of the *o*-Quinone. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 920-928, Jan. 2007.
- RUGGIERO, C. Situação atual da cultura do maracujazeiro no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 206, p. 5-9, set./out. 2000.
- SAID, S. PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412 p.
- SÁNCHEZ-FERRER, A.; RODRIGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CANÓVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 1247, n. 1, p. 1-11, Feb. 1995.
- SANDI D.; CHAVES, J.; PARREIRAS, J.; SOUZA, A. de; SILVA, M. da. Avaliação da qualidade sensorial de suco de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* var. *favicarpa*) 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.; CHAVES, J.; PARREIRAS, J.; DE SOUZA, A.; DA SILVA, M. Correlações entre características físico-químicas e sensoriais em suco de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* var. *favicarpa*) durante o armazenamento. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 355-361, set./dez. 2003b.

- SANTAGOSTINI, L.; GUILLOTTI, M.; GIOIA, L.; FANTUCCI, P.; FRANZINI, E.; MARCHESINI, A.; MONZANI, E.; CASELLA, L. Probing the location of the substrate binding site of ascorbate oxidase near type 1 copper: an investigation through spectroscopic, inhibition and docking studies. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 5, p. 881-892, May 2004.
- SANTOS, I. R. C dos. **Escurecimento enzimático em frutos**: polifenoloxidase de atemóis (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- SAPERS, G. M.; MILLER, R. L. Browning inhibition in fresh-cut pears. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 342-346, 1998.
- SILVA, J. J. R.; WILLIAMS, J. P. **The biological chemistry of elements**: the inorganic chemistry of life. Oxford: Clarendon Press, 1993. 27 p.
- SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas Brasil Frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, 2005. 321 p.
- SIMARELLI, M. Frutas do Brasil. **Frutas e Derivados**. v. 1, abr. 2006 .136 p.
- SIQUEIRA, F. M.; OETTERER, M.; REGINATO-D'ARCE, M. A. B. Nutrientes antioxidantes. **Boletim SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 192-199, mar. 1997.
- SOJO, M. M.; NUNEZ-DELICADO, E.; GARCÍA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A. Partial purification of banana polyphenol oxidase using triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, n. 12, p. 4924-4930, Dec. 1998.
- SOLOMON, E. I.; BALDWIN, M. J.; LOWERY, M. D. Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 4, p. 521-542, June 1992.
- STEFFENS, L. M.; FOLSOM, A. R.; CUSHMAN, M.; JACOBS, D.R. Jr.; ROSAMOND W.D. Greater fish, fruit, vegetables intakes are related to lower incidence of venous thromboembolism. **Circulation**, v. 115, n. 2, p. 188-195. Jan. 2007
- SUGINO, M.; KAJITA, S.; BANNO, K.; SHIRAI, T.; YAMANE, T.; KATO, M.; KOBAYASHI, T.; TSUKAGOSHI, N. Upward shift of the pH optimum of *Acremonium* ascorbate oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1596, n. 1, p. 36-46, Apr. 2002.
- THIPYANPONG, P.; JOEL, D. M.; STEFFENS, J. C. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. **Plant Physiology**, v. 113, n. 3, p. 707-718, Mar. 1997.
- THYGESEN, P. W.; DRY, I. B.; ROBINSON, S. P. Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. **Plant Physiology**. v. 109, n. 1, p. 525-531, Jan. 1995.

TREBST, A.; DEPKA, B. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. **Photosynthesis Research**. v. 46, n. 1, p. 41-44, June 1995.

VAMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and a vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, n.1, p. 49-127, Jan. 1981.

VAUGHN, K. C.; DUKE S. O. Function of polyphenol oxidase in higher-plants. **Physiologia Plantarum**, v. 60, n. 1, p. 106-112, Jan. 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva, 2003. 148 p. (WHO-Technical Report Series, 916).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. Geneva, 2002. 248 p.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical proprieties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, n. 1, p. 361-422, Jan. 2003.