

Tatyana Patrício de Albuquerque Sousa

Caracterização parcial da peroxidase dos frutos de aceroleira (*Malphigia emarginata* DC), clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação.

João Pessoa-PB

2010

Tatyana Patrício de Albuquerque Sousa

Caracterização parcial da peroxidase dos frutos de aceroleira (*Malphigia emarginta* DC), clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em cumprimento as exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos na área de concentração em Química e Bioquímica dos Alimentos.

ORIENTADOR: Prof^o Dr^o Heinz Johann Holschuh

João Pessoa-PB

2010

S275c Sousa, Tatyana Patrício de Albuquerque.

Caracterização parcial da peroxidase dos frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC), clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação / Tatyana Patrício de Albuquerque Sousa. - - João Pessoa : [s.n.], 2010.

52 f.

Orientador: Heinz Johann Holschuh.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CT.

1.Tecnologia de alimentos. 2.Acerola - Maturação. 3.Termoestabilidade.
4.Peroxidase.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

Tatyana Patrício de Albuquerque Sousa

Caracterização parcial da peroxidase dos frutos de aceroleira (*Malphigia emarginta* DC), clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em cumprimento as exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos na área de concentração em Química e Bioquímica dos Alimentos.

Aprovada em ____/____/____

Profº Drº Heinz Johann Holschuh
Orientador

Profª PhD Marta Suely Madruga
Membro Interno

Profª Drª Maria Inês Sucupira Maciel
Membro Externo

Profº Drº Pushkar Singh Bora
Suplente

*A Deus pelo dom da vida, por sempre me fortalecer e guiar-me
diante de todos os seus sonhos e planos concedidos a mim.*

Dedico.

Aos meus amados pais, *Pedro* e *Ivaneide*, a minha amada Tia *Inailda* e amados irmãos *Bruno*, *Poly* e *Carol* por todo amor e dedicação no decorrer da minha história.

Ao meu amado noivo *André* por todo amor, cumplicidade e companheirismo em todos os momentos.

Também a minha amiga *Christine Maria Carneiro Maranhão* pela amizade, companheirismo e experiências vivenciadas.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo supremo dom da vida, por tudo que tenho e sou, por Ele ser meu guia e a razão de todo meu agir, pelo amor eterno, fiel e incondicional para comigo. Obrigada, Jesus por me conceder mais uma vitória e por toda oportunidade de crescer. Sem Ti não sou nada. Cumpra em mim sempre o Teu querer e que a cada dia eu queira mais e mais está ao Teu lado, Senhor. Também à Maria Santíssima, pela sua constante intercessão e proteção.

Aos meus queridos pais Pedro e Ivaneide, minha fonte de inspiração e motivação; por todo amor dedicado no decorrer da minha história. Agradeço a Deus pelos pais que tenho, pois são verdadeiros exemplos de vida para mim.

A minha Titia Inailda minha eterna gratidão por toda sua dedicação e incentivo em todos os momentos da minha vida. Agradeço a Deus pelo dom da sua vida e pelo presente que temos em nosso lar, pois és um anjo enviado por Deus para toda formação cristã em nossa família.

A minha amada família: Bruno, Paty, Matheus, Thiago, Poly, Heráclito, Heráclito Filho, Léo e Vovó Maria (*in memoriam*) por fazerem parte da minha alegria de viver no decorrer da minha história. Agradeço a Deus pelo dom da vida de todos. Amo muito vocês. Carol obrigada pela paciência de sempre me ouvir, fortalecendo-me com suas lindas palavras de sabedoria.

Ao meu amado noivo que com muito amor sempre esteve ao meu lado no decorrer desta caminhada. Agradeço a Deus pelo dom da tua vida e por seres um presente precioso para mim. Obrigada Lindão pela grande ajuda que deste na minha pesquisa e na da minha amiga Cris, pois foi um anjo enviado por Deus para nós em todos os momentos. Muito obrigada por todo amor, dedicação, incentivo, paciência e pelas lindas palavras que me deste sempre quando minhas forças já estavam se esgotando. Saiba que te amo e te admiro muito a cada dia.

Ao meu sogro Sebastião, minha amada sogra Cilêda e família por todo amor, carinho, apoio e orações ao longo desta etapa.

À minha amiga, Cris pelos momentos difíceis e alegres que passamos juntas, pela troca de conhecimentos e pelas lições de vida. Agradeço a Deus ao longo do mestrado pelo maravilhoso presente que foi a sua amizade. A palavra de Deus diz aquele que descobriu um amigo achou um tesouro e és, para mim, um tesouro, uma jóia rara a qual admiro muito. Amo você, minha amiga nascida pela fé e se Deus quiser estarás sempre no meu coração e orações. Obrigada por tudo.

Ao meu orientador, Prof Dr. Heinz Johann Holschuh por toda orientação, paciência e dedicação. Muito obrigada.

Às estagiárias Taliana, Cibele, Havana, Lidi, Raquel e Mayara, por toda ajuda e dedicação nas análises laboratoriais. Que Deus abençoe cada vez mais vocês, pois são pessoas muito especiais. Tali e Bel não tenho palavras para agradecer tamanho amor,

dedicação que vocês tiveram para comigo em um dos momentos mais difíceis das análises que exigiram muito de nós. Jamais irei esquecer a presença de vocês chegando de madrugada comigo e sendo verdadeiros anjos enviados por Deus. Muito obrigada por persistirem e irem até o fim. Agradeço a Deus pela vida de cada uma e peço que Ele as abençoe, pois são de grande potencial.

À minha amiga Fabíola pela grande missão que teve como anjo para que eu estivesse aqui. Agradeço a Deus pelo dom da sua vida, pelos momentos difíceis e alegres que passamos juntas desde da graduação.

A CAPES pelo incentivo a pesquisa e concessão da bolsa de estudo.

Ao corpo docente da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB, pela realização do mestrado.

Ao professor Pushkar Singh Bora por todo apoio, disponibilidade em me auxiliar na elaboração deste trabalho e pela consideração em participar na minha qualificação. Muito obrigada.

À professora Marta Suely Madruga pelas sugestões e pela disponibilidade em me auxiliar na elaboração deste trabalho. Obrigada professora, por mais uma vez está presente na minha defesa e por todo apoio e consideração. Admiro-a muito

À professora Maria Inês Sucupira Maciel por todo apoio, disponibilidade em me auxiliar na elaboração deste trabalho e pela consideração em participar na minha defesa. Muito obrigada.

Ao professor Ânoar Abbas El-Aouar por todo apoio, disponibilidade em me auxiliar na elaboração dos resultados estatísticos em superfície de resposta. Muito obrigada por todos seus ensinamentos e orientação.

À professora Silvanda por todo apoio e por gentilmente ter concebido no início os reagentes para os testes preliminares da minha pesquisa. Muito obrigada.

À professora Janeeyre e a representante dos discentes do mestrado, Fátima por todo apoio, força no decorrer desta etapa. Muito obrigada por tudo.

Aos amigos Joyce, Larissa, Gerciane, João Paulo e Pedro Rafael que foram pessoas fundamentais também na realização deste trabalho. Agradeço a Deus pela vida de vocês. Obrigada por tudo.

À família de Cris, Seu Osvaldo, Dona Maria, Gisele e Marco por todo amor, carinho, amizade, ajuda e orações ao longo desta etapa. Vocês são verdadeiros presentes de Deus na minha vida e estarão sempre no meu coração. Obrigada por tudo.

A seu Humberto, proprietário da Fazenda Morimitzu , no Município de Alhandra/PB e Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA) na pessoa de Cerciane, por fornecerem as acerolas permitindo a realização deste trabalho. Muito obrigada por todo apoio e atenção. Vocês são excelentes empresários, pois foram verdadeiros contribuintes para ciência.

A seu “Manezinho”, funcionário da Fazenda, que sempre nos recebeu com muita gentileza e carinho. Muito obrigada.

Ao Técnico do Laboratório, Gilvandro, pela atenção e apoio nas horas mais delicadas dos experimentos. Um excelente profissional e uma admirável pessoa.

Aos funcionários: Eunice, Cândido, Claudionor, Juliana, June, Chico, Nely pela atenção no decorrer desta etapa. Obrigada Dona Eunice pela força e oração.

A seu Pedro, motorista da UFPB, que nos levava para Alhandra e para Emepa/PB. Muito obrigada pela atenção e gentileza.

Aos meus amigos do mestrado e doutorado, Katarina, Aline, Rosana, Cristiane, Salete, Ana Débora, Ingrid, Júlio, Naara, Fátima, Kassandra, Elk, Kátia, Rita, Ruth, Ana Paula, Huan, Sandrinha, Mariane, Thayse, Julianne, Adriana, Claudinha, Ana Raquel, Izis, Suênia, Ana Carla, Érika, Wilma, Alessandra, Naiara... por fazerem presentes ao meu lado com gestos e palavras de carinho. Muito obrigada.

Ao meu Grupo de oração DESPERTAI e as irmãs da Capela Santa Zita por fazerem presentes através de orações e palavras de fé. Muito obrigada.

À Socorro, secretária da minha casa que muitas vezes acordava de madrugada não me deixando sair sem a minha melhor refeição. Obrigada pela paciência e amor no momento que mais precisei.

A Humberto e à Vanessa, secretários do Programa de Pós-Graduação, pela ajuda na preparação dos documentos. Muito obrigada.

A todos que de forma direta ou indireta, não citados, também contribuíram e torceram para que eu concluísse mais uma vitória da minha vida.

Que Deus nos abençoe hoje e sempre.

Deus é Fiel!!!

*Posso, tudo posso naquele que me fortalece nada e ninguém no mundo vai me fazer
desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos deixar-me guiar
nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar...
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim, vou persistir e mesmo nas
marcas daquela dor do que ficou vou me lembrar....e realizar o sonho mais lindo que
Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer e mesmo quando a visão se turva e coração só
chora,mas na alma a certeza da vitória
Eu vou sofrendo..., mas seguindo enquanto tantos não entendem vou cantando minha
história,
profetizando que eu posso tudo posso... em Jesus!*

“Tudo posso Naquele que me conforta.” (Fl 4, 13).

“Deus não escolhe os capacitados, mas capacitam seus escolhidos.”

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1. ACEROLA	04
3.1.1. ORIGEM E ASPECTOS BOTÂNICOS	04
3.1.2. ASPECTOS ECONÔMICOS	06
3.1.3. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL	07
3.1.4. VARIEDADES	07
3.2. DESENVOLVIMENTO E FISIOLOGIA DA MATURAÇÃO DO FRUTO	09
3.2.1. COLHEITA E PÓS-COLHEITA DA ACEROLA	12
3.2.2. TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS DURANTE O AMADURECIMENTO	13
3.3. ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO	13
3.4. ENZIMAS	15
3.4.1. ASPECTOS GERAIS	15
3.4.2. A PEROXIDASE E OS ALIMENTOS	16
3.4.2.1. ESTRUTURA DA PEROXIDASE	17
3.4.2.2. ATIVIDADE CATALÍTICA DA PEROXIDASE	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. MATÉRIA-PRIMA	22
4.2. MÉTODOS	23
4.3. TESTES PRELIMINARES- PILOTO	23
4.4. EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS	24
4.5. DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO	24
4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE (POD)	24
4.7. QUANTIFICAÇÕES DE PROTEÍNAS	25

4.8.	DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMOS	25
4.9.	ESTABILIDADE TÉRMICA	27
4.10.	INATIVAÇÃO TÉRMICA	28
4.11.	RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	28
4.12.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO	30
5.1.	TESTES PRELIMINARES-PILOTO	30
5.2.	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U.mg ⁻¹ proteína) DO CLONE OKINAWA.	30
5.3.	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U.mg ⁻¹ proteína) DO CLONE EMEPA.	32
5.4.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U), TEOR DE PROTEÍNA (mg.mL ⁻¹) E ATIVIDADE ESPECÍFICA (AE) DA POD DA ACEROLA EM TRÊS ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO NOS CLONES OKINAWA E EMEPA.	33
5.5.	DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMOS	34
5.6.	ESTABILIDADE TÉRMICA	36
5.7.	INATIVAÇÃO TÉRMICA	38
5.8.	RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	40
6.	CONCLUSÃO	42
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	APÊNDICE	52

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Aspectos botânicos da aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> DC.) (I): Planta, (II): Flores , (III): Fruto maduro e (IV) : Sementes em três estágios de maturação.	06
Figura 2. Frutos de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> DC.) em três estágios de maturação do clone “Okinawa”.	09
Figura 3. Frutos de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> DC.) em três estágios de maturação do clone “Emepa”.	09
Figura 4. Etapa do ciclo vital dos frutos.	10
Figura 5. Diferentes estágios do ciclo vital dos frutos relacionados com as mudanças na intensidade respiratória para frutos climatéricos e não-climatéricos.	11
Figura 6. Escurecimento enzimático nos frutos de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> DC.) em três estágios de maturação.	14
Figura 7. Estrutura da peroxidase de raiz forte – HRP	18
Figura 8. Mecanismo geral da peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio usando o guaiacol como doador de prótons e elétrons.	20
Figura 9. Frutos de aceroleira (<i>Malpighia emarginata</i> DC.) em três estágios de maturação.	23
Figura 10. Superfície de resposta da influência da Temperatura e do pH na atividade da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa.	35
Figura 11. Curvas de contorno para influência da Temperatura e do pH na atividade da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa.	36
Figura 12. Superfície de resposta da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa após o tratamento térmico nas temperaturas (30°, 50° e 70°C) e tempos (0, 12 e 24horas).	37
Figura 13. Curvas de contorno da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa após o tratamento térmico nas temperaturas (30°, 50° e 70°C) e tempos (0, 12 e 24horas).	38
Figura 14. Superfície de resposta da atividade residual da POD em extratos	39

enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa após o tratamento térmico nas temperaturas (70°, 80° e 90°C) e tempos (0, 2 e 4 minutos).

- Figura 15.** Curvas de contorno da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa após o tratamento térmico nas temperaturas (70°, 80° e 90°C) e tempos (0, 2 e 4 minutos). 40
- Figura 16.** Gráfico de recuperação da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa submetidos ao tratamento térmico nas temperaturas (70°, 80° e 90°C) e tempos (0, 2 e 4 minutos) após vinte e quatro horas de permanência à temperatura ambiente. 41

LISTA DE TABELAS

		Páginas
Tabela 1.	Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo (pH e temperatura).	26
Tabela 2.	Planejamento fatorial completo, valores codificados e originais das variáveis de estudo (tempo e temperatura) em horas.	27
Tabela 3.	Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo (tempo e temperatura) em minutos.	28
Tabela 4.	Determinação de teor de ácido L-ascórbico e da atividade enzimática da POD.	30
Tabela 5	Tabela da atividade específica (U.mg^{-1} proteína) da peroxidase em acerola do clone Okinawa em três estágios de maturação	31
Tabela 6	Tabela da atividade específica (U.mg^{-1} proteína) da peroxidase em acerola do clone Emepa em três estágios de maturação.	32
Tabela 7	Atividade enzimática (U), teor de proteína (mg.mL^{-1}) e atividade específica (AE) da POD da acerola nos clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação.	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

AE -	Atividade Específica
POD -	Peroxidase
PPO -	Polifenoloxidase
U -	Atividade Enzimática

RESUMO

Acerola é um fruto tropical de potencial econômico e nutricional, considerando seu alto conteúdo de vitamina C. Durante o amadurecimento ocorrem processos de alterações químicas e bioquímicas incluindo atividades enzimáticas. A peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO) são as principais enzimas responsáveis pela deterioração da qualidade de muitos frutos. O objetivo deste trabalho foi determinar atividade enzimática e algumas propriedades da peroxidase da acerola nos clones “Okinawa” e “Emepa” em três estágios de maturação. Em ambos os clones a atividade enzimática (U), e atividade específica (AE) foram determinadas. Apenas no clone “Okinawa” também foram determinados pH e temperatura ótimos e estabilidade térmica da POD, por questões climáticas não houve disponibilidade de frutas do clone Emepa. Os dados foram submetidos à estatística descritiva, teste de normalidade seguido de ANOVA e t-Student, completando com a análise de superfície de resposta nos ensaios de pH e temperatura ótimos e da estabilidade térmica. Observou-se que Unidades de POD e AE foram superiores ($p < 0,05$) no clone “Okinawa” em relação à “Emepa” em todos os estágios de maturação. Na análise de superfície, a peroxidase apresentou atividade máxima em tampão fosfato pH= 6,5 a T= 45°C. Nos estudos de estabilidade e inativação térmica, observou-se perda acentuada da atividade com aumento de tempo e temperatura. A inativação total não foi atingida, sugerindo a presença de isoenzimas termorresistentes, no entanto 50% da atividade máxima foram atingida com 80°C e 4 minutos. Após 24 horas de repouso da enzima, recuperação da atividade foi observada a 90°C em todos os tratamentos. A 80°C houve diminuição da atividade da peroxidase, demonstrando pequena recuperação nos tratamentos de menor tempo. A 70°C não houve recuperação da peroxidase. Tais informações são pré-requisitos para novas tecnologias que possam prolongar a vida de prateleira dos frutos.

Palavras-chave: acerola, maturação, peroxidase, termoestabilidade, recuperação.

ABSTRACT

Acerola is a tropical fruit of economic and nutrition potential, considering its high vitamin content C. During the ripeness processes including chemical and biochemical enzymatic activities. The peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) have been considered the main enzymes responsible for deterioration of quality in many fruits. The aim of this study was to determine enzymatic activity and some properties of peroxidase in the clones of acerola “Okinawa” and “Emepa” in three stages of maturation. In both clones the enzymatic activity (U) and specific activity (AE) were determined. Only the clone “Okinawa” were also determined pH and temperature optima and thermal stability of POD, by climate issues no availability of fruits Emepa clone. Data were subjected to descriptive statistics, normality test followed by ANOVA and t-Student test, completing the analysis of response surface in the pH and temperature optima and thermal stability. It was observed that POD and AE Units were higher ($p < 0.05$) in clone “Okinawa” in relation to “Emepa” at all stages of maturation. In surface analysis, peroxidase showed maximum activity in phosphate buffer pH = 6.5 at $T = 45^{\circ}\text{C}$. In studies of stability and thermal inactivation, there was marked loss of activity with increasing time and temperature. The total inactivation was not achieved, suggesting the presence of heat resistant isoenzymes, however 50% of maximum activity was achieved at 80°C and 4 minute. After 24 hours of rest of the enzyme, recovery of enzymatic activity was observed at 90°C in all treatments. At 80°C decreased the activity of peroxidase, showing modest recovery in the shorter treatments. At 70°C there was no recovery of peroxidase. Such information is a prerequisite for new technologies that can prolong the shelf life of fruits

Key Words: acerola, ripening, peroxidase, thermostability, recovery.

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura no Brasil ocupa uma área de 2,3 milhões de hectares, com uma produção que atingiu 35 milhões de toneladas no ano de 2006, contribuindo significativamente para o PIB nacional (SIMARELLI, 2006). De acordo com o Ministério da Agricultura, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, participando com 12,35% da produção total em 2005. No entanto, a maior parte da produção destina-se ao mercado interno e uma pequena parcela é vendida no mercado internacional. Atualmente, o país participa com cerca de 2% das exportações mundiais de frutas (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2008).

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de acerola no mundo. Existem plantios comerciais em praticamente todos os estados brasileiros. Contudo, é na região nordestina, por suas condições de solo e clima, onde a acerola melhor se adapta se destacando como a região de maior produção de acerola (*Malpighia emarginata* DC.), com aproximadamente 22.500 toneladas. Segundo Oliveira e Filho (2006) o estado da Paraíba está entre os dez maiores produtores de acerola no Brasil com 400 mil hectares implantados nas mais diversas regiões fisiográficas, o que a condiciona como uma fruta com uma expressão econômica considerável no agronegócio, principalmente no contexto da agricultura familiar. No estado da Paraíba, o maior plantio de acerola encontra-se no município de Alhandra (PB), seguido de Cabedelo, Santa Rita, Sapé e Guarabira (CARVALHO, 2000; ALVES, 1996; PAIVA et al., 1999; EMBRAPA, 2009; OLIVEIRA e FILHO, 2006; CHAVES, 2004).

A acerola é nutricionalmente importante, devido ao seu alto teor de ácido ascórbico, sendo um produto amplamente utilizado na indústria farmacêutica e de alimentos. Entretanto, além do alto teor de ácido ascórbico, estão presentes na composição da acerola, quantidades expressivas de pró-vitamina A, ferro, cálcio, fósforo, riboflavina e niacina (MATSUURA et al., 2003; ASSIS et al., 2001).

O potencial da acerola como fonte natural de vitamina C é grande, assim como a sua capacidade de aproveitamento industrial (ALVES, 1999). A partir do início da década de 90, uma super oferta de acerola vem justificando estudos direcionados ao desenvolvimento de novos produtos que, na maioria das vezes, concentram-se na fruta *in natura* e na polpa, que são as suas maiores formas de consumo (SOARES FILHO e OLIVEIRA, 2003).

Uma série de mudanças físicas, físico-químicas, químicas e bioquímicas acontece durante o desenvolvimento dos frutos. O conhecimento da estrutura da parede celular é importante para a tecnologia pós-colheita e para a definição de procedimentos na transformação industrial de produtos vegetais. A definição de uma estratégia para promover um amadurecimento uniforme do fruto para consumo *in natura* depende do conhecimento das reações bioquímicas que ocorrem nesses componentes da célula (GONÇALVES et al., 2006).

A perda de grande parte da produção de frutas e hortaliças pode ser atribuída à ação de enzimas durante a pós-colheita. A polifenoloxidase (PPO; EC 1.10.3.1) e a peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) estão presentes em um grande grupo de frutas e vegetais e fazem parte das enzimas oxiredutases, que promovem uma variedade de reações, principalmente a peroxidase. A investigação desse grupo de enzimas tem sido de grande importância para a tecnologia de alimentos. (CLEMENTE, 1998; VAMOS-VIGYAZO, 1981; CLEMENTE, 1993).

De acordo com Valderrama e Clemente (2004), a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO) têm sido consideradas como as principais enzimas responsáveis pela deterioração da qualidade em muitos frutos e derivados, além de participarem de um grande número de reações oxidativas e de biodegradação, tais como: mudança de cor, degradação da clorofila ou auxinas, oxidação de fenóis, oxidação do ácido indol acético (AIA) e biossíntese de lignina. Muitos destes fatores também podem ser associados ao *flavor*, cor, textura e qualidade nutricional dos alimentos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi efetuar uma caracterização parcial da peroxidase dos frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC), clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação.

2 OBJETIVOS

1. GERAL

- ✓ Determinar a atividade enzimática e algumas propriedades da peroxidase dos clones Okinawa e Emepa de aceroleira em três estágios de maturação.

2. ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair a enzima peroxidase dos frutos dos clones Okinawa e Emepa de aceroleira em três estágios de maturação.
- ✓ Determinar as atividades específicas da peroxidase durante os três estágios de maturação desses frutos.
- ✓ Verificar em que estágio de maturação a atividade da enzima peroxidase foi maior.
- ✓ Verificar qual o clone obteve maior atividade enzimática.
- ✓ Determinar pH e temperatura ótimas de reação da peroxidase no estágio de maturação de maior atividade enzimática no clone Okinawa.
- ✓ Determinar estabilidade de pH e temperatura da peroxidase no estágio de maturação de maior atividade enzimática no clone Okinawa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ACEROLA

3.1.1 ORIGEM E ASPECTOS BOTÂNICOS

A aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) teve sua origem nas Antilhas e, posteriormente, dispersou-se para outras regiões do mundo, estabelecendo-se particularmente em ecossistemas tropicais e subtropicais do continente americano (DE ROSSO e MERCADANTE, 2005). No Brasil, a acerola é conhecida há mais de 60 anos (NETO et al., 1995).

Segundo Marino (1986), a Universidade Federal Rural de Pernambuco introduziu a aceroleira no Estado de Pernambuco, em 1955, porém, em São Paulo, ela já era conhecida há mais de cinquenta anos, sendo encontrada em chácaras, sítios e fazendas, em plantios sem finalidade comercial ou industrial. Entretanto, o cultivo de acerola teve um acelerado crescimento nos últimos 20 anos e, atualmente, com o aumento da procura por alimentos naturais, a acerola teve um grande impulso no seu consumo (MOURA et al., 2007).

A classificação botânica da acerola tem sido controversa. Apesar da adoção do nome *Malpighia emarginata*, pelo Conselho Internacional de Recursos Genéticos Vegetais em 1986, essa denominação ainda é pouco utilizada, visto que, inicialmente, ela foi classificada como *M. puniceifolia* e *M. glabra*. Entretanto, Asenjo (1980) reporta que os nomes *M. glabra* e *M. puniceifolia* são sinônimos, porém, aplicados a uma espécie diferente de aceroleira, devendo-se à espécie o nome de *Malpighia emarginata* D.C. Nogueira (1997), estudando as expressões fisiológicas da aceroleira enviou diversas amostras para o Dr. Willian R.Anderson, especialista na família Malpighiaceae, que constatou tratar-se de uma única espécie, *M. emarginata* D.C., utilizada corretamente para designar aceroleira.

A acerola pertence à família *Malpighia*, é um arbusto glabro, de tamanho médio, com 2 a 3 m de altura, com os ramos densos e espalhados. As folhas são ovatas a elítico-lanceoladas, com 2,5 a 7,5 cm de comprimento, opostas, com pecíolos curtos, pequenos, de coloração verde-escura e brilhante na face superior e verde pálida na face inferior (NEVES, 2007). De acordo com Lima et al (2006), o conhecimento dos teores de nutrientes nas folhas é uma medida efetiva para acompanhar a evolução do estado

nutricional da cultura e para organizar estratégias eficientes de manejo da adubação mineral visando altas produtividades.

As flores são perfeitas, com pedúnculo longo e pouco mais de 1cm de diâmetro, de coloração rosa-esbranquiçada à vermelha. São dispostas em cachos de 3 a 5 flores nas axilas dos ramos em crescimento (NEVES, 2007). Lopes et al. (2002) em estudo da estimativa da taxa de cruzamento da aceroleira, com base em dados isoenzimáticos, concluíram que a aceroleira demonstra ser uma espécie predominantemente alógama, devido à grande variabilidade fenotípica observada nos pomares, o que sugere a ocorrência de recombinação. Segundo esses autores, a autofecundação de botões florais em condições experimentais promove uma menor fixação de frutos quando comparado ao cruzamento manual e a polinização natural.

A aceroleira tem floração durante todo o ano e após três ou quatro semanas se dá sua frutificação. A formação do fruto se processa rapidamente entre 22 e 25 dias. O fruto da aceroleira é uma drupa, carnosa, variando na forma, tamanho e peso. Nela, o epicarpo (casca externa) é uma película fina; o mesocarpo é a polpa e o endocarpo é constituído por três caroços unidos, com textura pergaminácea, que dão ao fruto o aspecto trilobado. Cada caroço pode conter no seu interior uma semente, com 3 a 5 mm de comprimento de forma ovóide e com dois cotilédones. A coloração dos frutos maduros pode variar entre vermelha, roxa ou amarela. As sementes são pequenas, não albuminadas e de tamanhos variáveis, proporcionais ao tamanho do fruto e, conseqüentemente, ao do "caroço" (NEVES, 2007). Além disso, as sementes apresentam baixa porcentagem de germinação, e dependendo do grau de maturação do fruto podem levar meses para germinarem (Figura 1) (COSTA et al., 2003).

A aceroleira se desenvolve melhor em temperaturas médias de 26°C, com chuvas variando de 1200 a 1600mm. Chuvas excessivas provocam formação de frutos aquosos, menos ricos em açúcares e em vitamina C (NEVES, 2007; SILVA et al., 1999).

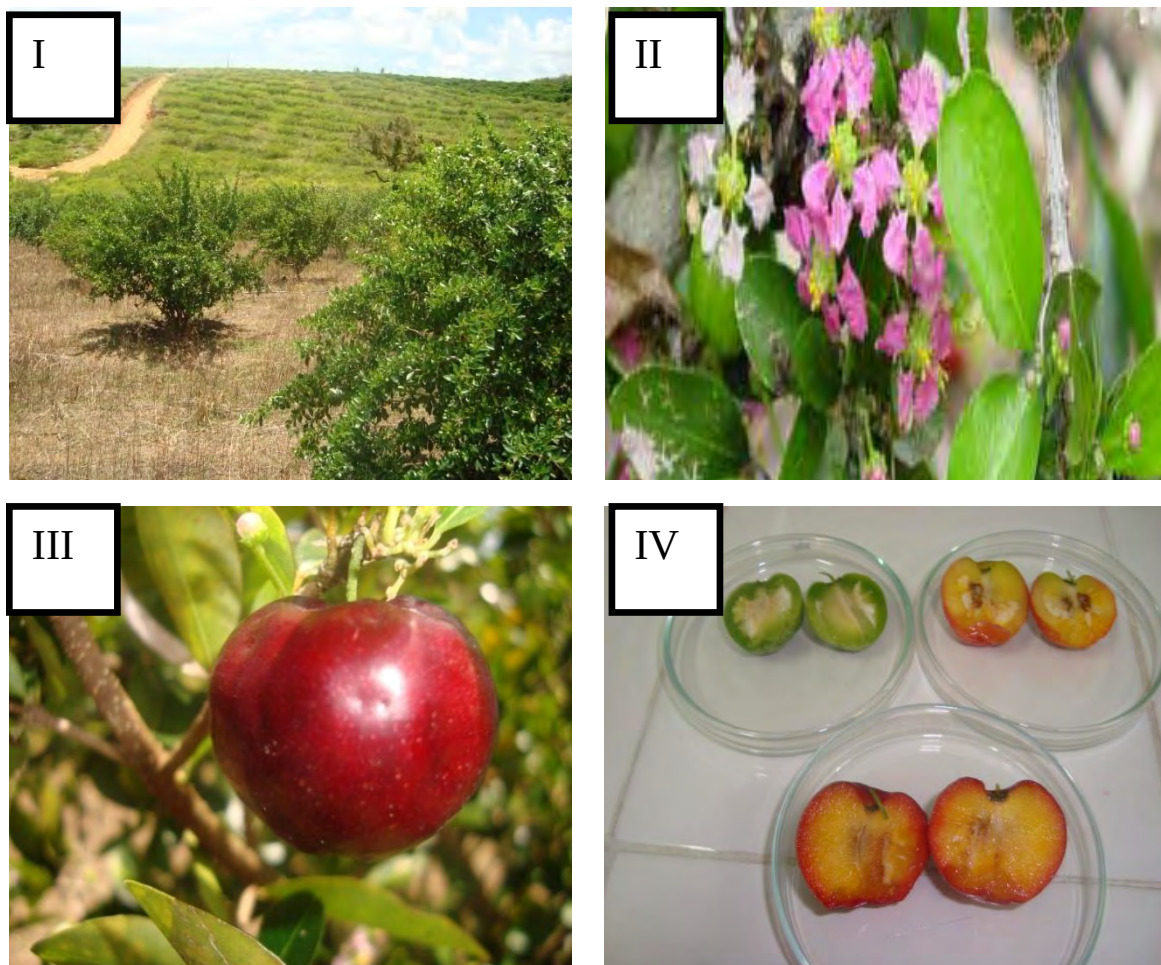


Figura 1: Aspectos botânicos da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) (I): Planta, (II): Flores , (III): Fruto maduro e (IV) : Sementes em três estágios de maturação.

Foto: Autoria própria.

3.1.2 ASPECTOS ECONÔMICOS

A importância econômica de uma cultura pode ser avaliada sob vários aspectos, dentre eles, as formas de aproveitamento da matéria-prima obtida; o volume produzido e comercializado; a área plantada e até mesmo os esforços e as atividades de pesquisa, tudo isso demonstrando de maneira direta a maior ou menor demanda de tecnologia para produzir a cultura. O cultivo da acerola, cuja importância econômica se acentua de forma persistente, tem despertado grande interesse entre os produtores e consumidores, tanto brasileiros como estrangeiros, em virtude principalmente do aumento da procura por essa fruta, seja para o consumo *in natura*, seja para o aproveitamento sob a forma de subprodutos (ALVES e MENEZES, 1995; GOMES, 2000).

O aproveitamento da acerola inclui, dentre outros produtos, a elaboração de polpas, sucos, compotas, doces em massa, geléias, licores e refrigerantes (MANICA, 2003).

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), pelo seu inegável potencial como fonte natural de vitamina C, com conteúdo de ácido ascórbico variando de 695 a 4827mg100 mL⁻¹ de polpa e sua grande capacidade de aproveitamento industrial, têm atraído o interesse dos fruticultores e passou a ter importância econômica em várias regiões do Brasil (NOGUEIRA et al., 2002; MEZADRI et al., 2006). O cultivo da acerola no Brasil teve um forte incremento nos últimos 20 anos, tendo se consolidado como uma importante alternativa econômica para a Região Nordeste, proporcionando também um impulso para a agroindústria de polpa de fruta congelada (PETINARI e TARSITANO, 2002).

3.1.3 IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL

A acerola é conhecida como fonte natural de vitamina C, devido ao alto teor que possui, justificando o seu lugar privilegiado diante do mercado consumidor brasileiro e por ser rica em antocianinas e carotenóides, sendo amplamente consumida em virtude de suas propriedades antioxidantes (FREITAS et al., 2006).

No campo da saúde, a acerola é particularmente indicada nos casos de escorbuto, como preventivo e curativo, e como coadjuvante nas anorexias de várias causas, restrições dietoterápicas prolongadas, infecções de longa duração, gripes, resfriados, lesões hepáticas, afecções pancreáticas, dispepsia, vômitos insidiosos, úlceras do trato digestivo, nas alterações do mecanismo da coagulação sangüínea, nas hemorragias capilares, estados de intoxicação por antibióticos e também para o tratamento de pessoas com câncer. O consumo diário de 2 a 4 acerolas é suficiente para atender às necessidades normais do organismo humano (MARINO, 1986; BLISKA e LEITE, 1995).

3.1.4 VARIEDADES

As variedades de acerola podem ser classificadas em doces, semi-doces e ácidas, sendo que sua diferenciação ocorre em função dos teores de sólidos solúveis totais e acidez total titulável nos frutos maduros (RITZINGER, SOARES FILHO e OLIVEIRA,

2003). As variedades doces, preferidas para o consumo *in natura*, caracterizam-se por apresentar valores de sólidos solúveis totais elevados (iguais ou superiores a 11°Brix), e valores de acidez total titulável iguais ou inferiores a 1% de ácido málico (LASKOWSKI e BAUTISTA, 1998). As variedades ácidas, mais utilizadas para a industrialização, apresentam sabor pouco agradável devido ao elevado teor de acidez (superior a 1% de ácido málico). Já as variedades semi-doces contém teores intermediários de sólidos solúveis totais e acidez total titulável, o que lhes confere aptidão tanto para a indústria quanto para o consumo ao natural.

A acerola apresenta grande variabilidade genética, contudo, os frutos provenientes de diferentes genótipos apresentam diferenças quanto a tamanho, coloração da casca e da polpa, composição físico-química, suculência, textura, aroma e sabor (RITZINGER, SOARES FILHO e OLIVEIRA, 2003).

De acordo com a Wikipédia (2010), no Brasil são cultivadas mais de 42 variedades de acerola, cujas principais são: Apodi (BRS 235) ; Cabocla ; Cereja (BRS 236) ; Frutacor (BRS 238) ; Okinawa ; Olivier ; Roxinha (BRS 237) ; Rubra ; Sertaneja.

As informações existentes na literatura a respeito do clone “Okinawa” e “Emepa” são muito escassas devido ao amplo domínio do mercado brasileiro, exercido por vários cultivares. Apesar da pouca literatura relatada sobre os clones “Okinawa” e “Emepa” sabe-se que os respectivos clones apresentam características interessantes como frutos pesados, relação sólidos solúveis acidez tituláveis desejáveis e elevado teor de vitamina C e de sólidos solúveis.

A aceroleira pode ser propagada tanto com o uso de sementes (propagação sexual), como pela estaquia e enxertia (propagação assexual ou vegetativa), sendo, assim, considerada uma planta de propagação bastante simples. O clone Okinawa foi originado da seleção por enxertia (propagação assexual ou vegetativa) e o clone Emepa foi originado da seleção de plantas individuais em progênie de polinização aberta da aceroleira onde essa progênie é resultado de trabalho de seleção de plantas realizadas em pomares comerciais (Figuras 2 e 3).



Figura 2: Frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) em três estágios de maturação do clone “Okinawa”.

Foto: Autoria própria.



Figura 3: Frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) em três estágios de maturação do clone “Emepa”.

Foto: Autoria própria.

3.2 DESENVOLVIMENTO E FISIOLOGIA DA MATURAÇÃO DO FRUTO

O ciclo vital de um fruto pode ser dividido nas fases de desenvolvimento, pré-maturação, maturação, amadurecimento e senescência. Estas fases abrangem os diferentes processos desde a formação até a morte do órgão. Entretanto, muitos processos se interrelacionam nessas fases, dificultando a clara distinção entre as mesmas (WATADA et al., 1984) como observado na Figura 4.

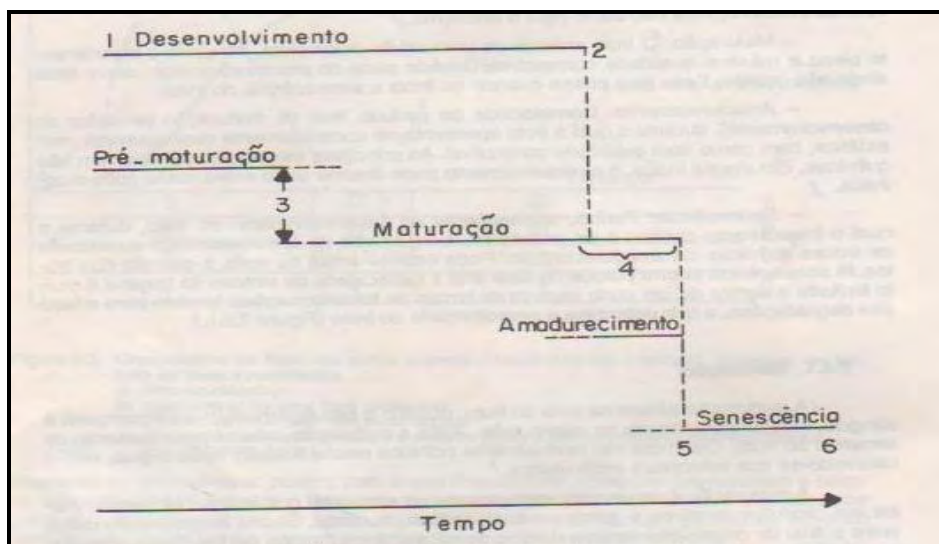


Figura 4: Etapa do ciclo vital dos frutos.

Fonte: Ryall e Lipton, (1979).

Para Chitarra e Chitarra (1990), na fase de maturação fisiológica do fruto, este emerge de fases incompletas, atingindo crescimento pleno e máxima qualidade comestível, com o fruto ainda na planta. O amadurecimento, por sua vez, corresponde ao período final da maturação, durante o qual, o fruto apresenta-se completamente desenvolvido, com aparência externa e qualidade interna para consumo. O período subsequente ao desenvolvimento do fruto é a senescência, durante a qual, o crescimento cessa, e os processos bioquímicos da senescência substituem as trocas químicas de amadurecimento, podendo ocorrer antes ou após a colheita dos frutos, ou mesmo durante a maturação.

Segundo Pantastico (1975) e Hulme (1971), os fenômenos relacionados com o amadurecimento incluem degradação das clorofilas a e b, degradação de pigmentos subjacentes e síntese de novos pigmentos, como os carotenóides, alterações de sabor, além da diminuição de acidez e adstringência, com elevação no teor de sólidos solúveis, mudanças na textura e conseqüente abscisão dos frutos, que são os outros fenômenos da maturação e senescência.

O processo de amadurecimento na fruta é acompanhado da síntese de proteínas e de novos mRNA junto com sabor e pigmentos. A síntese exige energia e carbono que são fornecidos ao tecido da fruta por um processo de respiração (SAMPAIO et al., 2007). Como um organismo vivo o fruto é um órgão de intensas trocas gasosas, principalmente, de respiração, que consiste na oxidação de açúcar ou amido para produção de energia (ATP).

Em função do padrão respiratório, os frutos, de uma maneira geral, podem ser classificados em dois grandes grupos, climatéricos e não-climatéricos (Figura 5). Os frutos não-climatéricos apresentam atividade respiratória que em geral declina após a colheita. Frutos deste padrão respiratório não são capazes de amadurecer quando colhidos imaturos, portanto, devem permanecer na planta mãe até o final da maturação, quando já atingiram a maturidade comestível ou comercial. Os frutos climatéricos, por sua vez, em determinada etapa de seu ciclo vital, apresentam um aumento rápido e acentuado na atividade respiratória, culminando com o amadurecimento imediato. Frutos desse padrão respiratório podem amadurecer na planta ou fora dela se colhidos na maturidade fisiológica (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

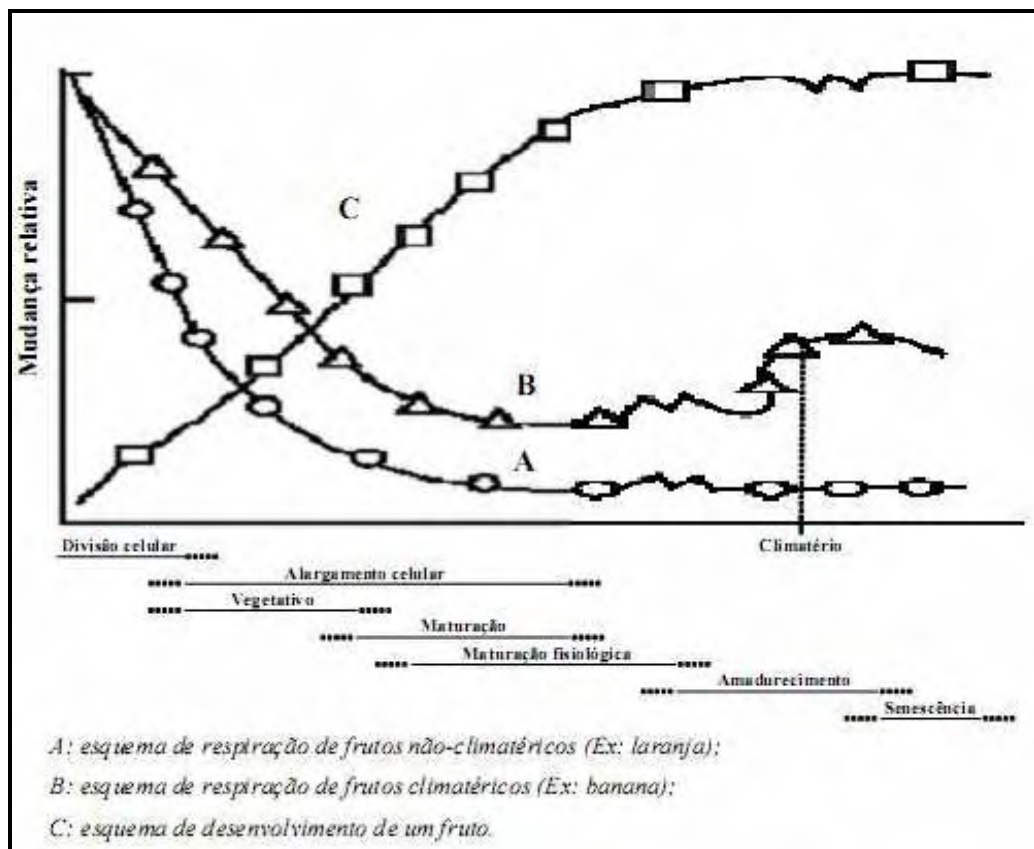


Figura 5: Diferentes estágios do ciclo vital dos frutos relacionados com as mudanças na intensidade respiratória para frutos climatéricos e não-climatéricos. **Fonte:** (BIALE, YOUNG, 1981).

Os sinais visíveis de amadurecimento são as transformações na coloração, textura, sabor e aroma, que tornam o fruto comestível. As reações de síntese de novos compostos metabólicos ocorrem juntamente com inúmeras reações catabólicas que levam à completa degradação do fruto. Estas reações podem promover o aumento da

sensibilidade dos frutos a danos mecânicos e aumentar a suscetibilidade a doenças (CHEN et al., 1980). O estágio de maturação em que os frutos são colhidos, determina o seu potencial de conservação pós-colheita e a qualidade, quando oferecidos ao consumidor. Frutos colhidos imaturos, além da baixa qualidade sensorial, são suscetíveis à desidratação e a desordens fisiológicas. Por outro lado, quando colhidos muito maduros, entram rapidamente em senescência (WILLS et al., 1998). O melhor estágio de colheita depende da interação das características fisiológicas intrínsecas a cada variedade e da tecnologia de conservação pós-colheita a ser empregada. (CHITARRA e CHITARRA, 1990).

A acerola é um fruto climatérico, com elevado pico da taxa respiratória ($900 \text{ mg. kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), mas com uma baixa taxa no pico de produção de etileno ($3 \mu\text{L C}_2\text{H}_4/\text{kg/h}$)⁻¹ (CARRINGTON e KING, 2002). A acerola muda de tonalidade com a maturação, passando do verde ao amarelo, laranja, vermelho ou roxo (PORCU e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003) devido, sobretudo, à degradação da clorofila e à síntese de antocianinas e carotenóides. A cor vermelha da acerola, no estágio maduro, decorre da presença de antocianinas (LIMA et al., 2002).

3.2.1 COLHEITA E PÓS-COLHEITA DA ACEROLA

É muito difícil determinar o ponto de colheita da acerola, já que a desuniformidade na floração provoca a presença de flores e frutos em diversos estádios de desenvolvimento. O fator determinante do ponto de colheita é o destino que se pretende dar aos frutos. No caso de congelamento ou processamento, os frutos deverão ser colhidos com coloração vermelho intensa, mas ainda firmes para suportar o manuseio. Neste estágio, o fruto apresenta elevado teor de açúcar, baixa acidez e menos teor de vitamina C, entretanto, ainda supera cerca de 20 a 30 vezes os frutos cítricos tidos como ricos em vitamina C. Os frutos podem ser colhidos no início da maturação (verde, verde amarelado ou até o início da pigmentação vermelha) quando se destina a fabricação de produtos em pó, cápsulas, concentrados para o enriquecimento de outros alimentos. A colheita deve ser efetuada duas a três vezes por semana, ou diariamente, dependendo do pique de produção, para evitar que caiam depois de determinado ponto de maturação. As acerolas destinadas a mercados consumidores distantes devem ser colhidas de uma só vez, já as vendidas para os mercados locais e indústrias processadoras devem ser colhidas maduras (NEVES, 2007).

Apesar da maior parte da produção encontrar-se vinculada ao setor agroindustrial, grande atenção deve ser dada à pós-colheita de hortifrutícolas, que em virtude da falta de boas práticas no manuseio, transporte, estocagem, associada à alta perecibilidade e falta de infra-estrutura para seu processamento e conservação, são responsáveis por elevadas perdas, chegando a atingir até 30% da produção. A acerola por possuir modelo climatérico de respiração apresenta problemas de comercialização *in natura*, chegando a atingir de 15 a 40% de perdas pós-colheita (COELHO et al., 2003; CHITARRA e CHITARRA, 2005).

3.2.2 TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS DURANTE O AMADURECIMENTO

O amadurecimento, de modo geral, proporciona maior doçura, pelo aumento nos teores de açúcares simples decorrentes de processos de biossínteses ou de degradação dos polissacarídeos existentes nos frutos, apesar do consumo de uma parte destes constituintes pela oxidação respiratória. O conteúdo e a composição de açúcares têm papel fundamental no sabor, sendo também indicadores do estágio de maturação dos mesmos.

As transformações dos frutos durante o amadurecimento são conseqüências de várias reações químicas e bioquímicas, ocorrendo variação entre cultivares, espécies e, até mesmo, entre frutos de uma mesma cultivar, dependendo das condições de produção ou de armazenamento (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A acerola passa por uma série de alterações durante os processos de maturação, amadurecimento e senescência (ALVES, 1993), destacando-se degradação da clorofila, aparecimento dos carotenóides, decréscimo na acidez, acentuada perda de vitamina C ao longo dessas etapas. Estas alterações podem acontecer quando o fruto está na planta ou após a colheita, podendo os frutos ser colhidos no início da maturação (verde, verde-amarelado ou até início da pigmentação vermelha), quando se destinam à produção de vitamina C.

3.3 ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

O escurecimento enzimático, com algumas exceções (café, coco, figos pretos e chá) é considerado um problema que diminui a qualidade das frutas e suas características nutricionais (MARQUÉS et al., 1995). Normalmente, ocorre em frutos e

vegetais durante o manuseio, processamento e estocagem após a colheita, sendo atualmente responsável por sérias perdas na indústria de alimentos (JANG et al., 2002; FRAIGNIER et al., 1995). Além disso, sabe-se que o escurecimento deteriora as propriedades sensoriais dos produtos, pois está associado às mudanças na cor, flavor e amolecimento, devido, provavelmente à ação de enzimas pécticas (MARTINEZ e WHITAKER, 1995).

Uma vez que as paredes das células e membranas celulares perdem sua integridade, a oxidação enzimática avança rapidamente (MARTINEZ e WHITAKER, 1995). No tecido intacto, os substratos fenólicos encontram-se separados das fenolases, por isso não ocorre o escurecimento. No entanto, observa-se o escurecimento nas superfícies de cortes das frutas e verduras de cor clara como, por exemplo, em maçã, banana e batata. A exposição da superfície de corte ao ar dá lugar a um rápido escurecimento, devido à oxidação enzimática dos fenóis a ortoquinonas, que por sua vez se polimerizam rapidamente para formar melaninas e pigmentos de cor escura (FENNEMA, 1993). Para tanto, três componentes são indispensáveis a este tipo de reação: a enzima, o oxigênio molecular e os substratos fenólicos. Dentre os compostos naturais mais susceptíveis a esse tipo de reação destacam-se o catecol, a tirosina, os ácidos clorogênico, cafeíco, gálico e ascórbico, a hidroquinona, a antocianidina, os flavonóides, etc. (MEDINA, 1980).

De acordo com Tomás-Barberán e Espín (2001), duas enzimas são relevantes na degradação oxidativa dos compostos fenólicos por causarem a produção de polímeros de coloração marrom (melaninas): a polifenoloxidase (PPO) e a peroxidase (POD).



Figura 6: Escurecimento enzimático nos frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) em três estágios de maturação.

Foto: Autoria própria.

Segundo Zhang et al (2001), a POD tem um aumento de sua solubilidade durante o período de maturação e pode estar envolvida com escurecimento enzimático desde que os difenóis funcionem como substratos reduzidos. Um aumento de sua atividade ocasiona conseqüências importantes dos pontos de vista nutricional e sensoriais tais como destruição da vitamina C e alterações de cor, *flavor* e textura de frutos frescos e processados, pois pode levar a descoloração de carotenóides e antocianinas, além de catalisar a degradação de ácidos graxos insaturados, com a conseqüente formação de compostos voláteis.

Desse modo, o controle da atividade da PPO e POD é de grande importância para tecnologia de alimentos uma vez que estas enzimas são responsáveis pelo escurecimento em frutas e vegetais e seus produtos processados. Todavia o papel dessas enzimas oxiredutases, durante a maturação tem sido extensivamente investigado por alguns pesquisadores.

3.4 ENZIMAS

3.4.1 ASPECTOS GERAIS

Enzimas são substâncias biocatalizadoras complexas, extremamente eficientes e altamente específicas, sintetizadas no interior das células vivas, mas que também exercem atividade fora delas. Como grande parte das proteínas sintetizadas são enzimas intracelulares citoplasmáticas, estas são obtidas e avaliadas somente através do rompimento da estrutura celular (BEILEN e LI 2002; HOONDAL et al., 2002).

A conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênios, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de Van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima dependem de sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, entre outros, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (LIMA et al., 2001).

As enzimas usualmente apresentam elevada especificidade por seus substratos e as reações ocorrem dentro de um curto espaço de tempo, o que torna os métodos enzimáticos práticos e com menor margem de erro que os métodos químicos. As determinações são, em geral, realizadas por espectrofotometria. As limitações, em alguns casos, baseiam-se no custo elevado para uso em análises de rotina, pela sua

instabilidade e dificuldade na purificação, bem como por serem métodos destrutivos e lentos (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A expressão da atividade de uma enzima é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB (Internacional Union of Biochemistry) considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um μmol de substrato por minuto em condições de ensaios definidas (LIMA et al., 2001).

3.4.2 A PEROXIDASE E OS ALIMENTOS

A peroxidase (POD; EC: 1.11.1.7) é encontrada em tecidos de vegetais e animais. Schönbein em 1855, usando extratos de plantas com peróxido de hidrogênio e guaiacol observou que um composto de coloração intensa era formado. Linossier em 1898 isolou esta enzima e chamou de *peroxidase*. A POD catalisa a oxidação pelo peróxido de hidrogênio de alguns substratos como mono e difenóis, polifenóis, aminofenóis, entre outros. É conhecida como uma enzima termoestável que pode ter sua atividade regenerada após tratamento térmico. Diversas são as fontes dessa enzima como pêssago, tomate, soja, rabanete, abobrinha, nabo e aspargo (CAMPA, A, 1991; BURNETTE, F. S., 1977; OUNGPIPAT, W.; ALEXANDER, P. W., 1995).

A peroxidase, classificada como uma enzima oxirredutora, participa de numerosos processos fisiológicos nas plantas, entre eles, perda de coloração, sabor, textura e nutrientes da fruta. No entanto, sua função não se restringe a aspectos negativos, sendo fundamental no desenvolvimento de sabor e cor de alimentos como o chá preto, diminuição do amargor e adstringência dos produtos do cacau e formação de aldeídos e aminoácidos (LIMA; PASTORE; LIMA, 2001).

As POD apresentam numerosas funções fisiológicas e, na forma de múltiplas isoenzimas aniônicas e catiônicas, atuam sobre diferentes substratos, em reações, tais como: oxidação de fenólicos e carotenóides, degradação de auxinas, de clorofila e de ácido ascórbico, bem como na biossíntese da lignina. Têm função relacionada aos processos de desenvolvimento e de senescência nos tecidos. A sua atividade aumenta significativamente após a colheita, quando uma gama de compostos torna-se suscetível à sua ação (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A peroxidase é considerada uma heme proteína que usa o peróxido de hidrogênio como substrato oxidante produzindo água. Dessa forma, promove uma série de reações, apresentando uma versatilidade não superada por qualquer outra enzima. A variedade de reações catalisadas ocorre porque ela não existe como uma única enzima, mas sim, é encontrada na forma de isoformas que podem ser facilmente identificadas por focalização isoeletrica (ROBINSON, 1991).

Baseado em seus pontos isoeletricos, as isoperoxidasas têm sido classificadas em grupos ácidas, neutras e básicas: as isoperoxidasas mais básicas (catiônica) geralmente têm pontos isoeletricos na escala de pH de 8,0 a 10,0, enquanto as isoperoxidasas ácidas (aniônica) têm pontos isoeletricos na escala de pH de 3,5 a 6,0 (ROBINSON, 1991).

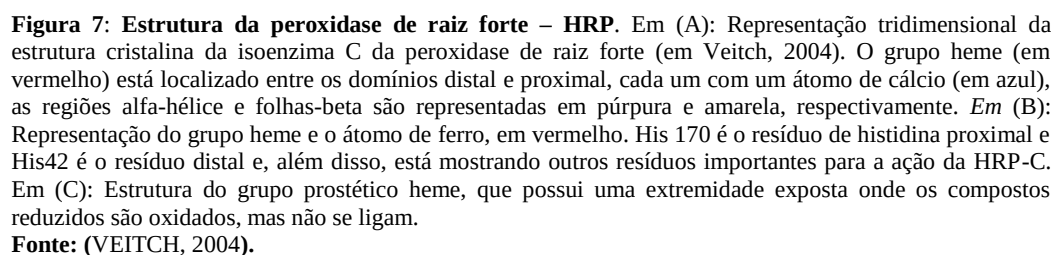
Na raiz forte, a isoenzima HRP-C e a isoenzima HRP-A possuem menos de 60% de identidade na sequência de aminoácidos. Enquanto a HRP-C é básica com *pI* 8,8 e possui cerca de 18% do PM (~43.000) como porção glicosilada, a HRP-A possui *pI* na faixa ácida (3,9), sendo altamente glicosilada (23% do peso molecular) (HINER et al., 2001).

As isoperoxidasas não diferem significativamente entre si, com peso molecular em torno de 40000 a 50000 Da. Visto que os pontos isoeletricos das isoenzimas para uma determinada espécie de planta variam consideravelmente de acordo com mudanças amplas no pH, é razoável esperar que as isoenzimas sejam substancialmente diferentes no conteúdo de aminoácidos (ROBINSON, 1991).

3.4.2.1 ESTRUTURA DA PEROXIDASE

Os estudos iniciais sobre peroxidase foram realizados usando a enzima extraída da raiz forte ou rábano silvestre (horseradish – HRP) e, até hoje, a maior parte das conclusões gerais sobre as peroxidases de plantas são fundamentadas nos estudos sobre a isoenzima HRP-C (HRP - isoenzima C). Esta isoforma é a enzima mais abundante da raiz forte, sendo muito utilizada para estudos estruturais, mas sua estrutura somente foi determinada por cristalografia em 1997 (GAJHEDE et al., 1997) e mais recentemente foram descritos os intermediários do ciclo catalítico (BERGLUND , 2002).

Resumidamente, segundo Welinder, esta glicoproteína possui 308 resíduos de aminoácidos, um grupamento ferriprotoporfirina IX (1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinil-6,6-ácido dipropiônico) ou ferro (III) protoporfirínico IX, usualmente chamado grupo heme ou grupamento hemina, e cadeias laterais de carboidratos. O peso molecular é próximo

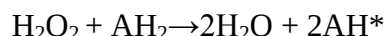


18

de ligação coaxial (localizado na parte do grupo heme descrito como distal) é desocupado no estado basal, mas disponível ao H_2O_2 durante a catálise. Em posição distal ao heme, aparece outra histidina (His42) e uma arginina (Arg38). Essa histidina é importante na catálise ácido-base, e a arginina auxilia na estabilização das cargas (VEITCH, 2004). A importância destes dois sítios foi confirmada por ensaios de mutagênese (KUMMER et al., 1996).

3.4.2.2 ATIVIDADE CATALÍTICA DA PEROXIDASE

A peroxidase é uma enzima de grande importância, que catalisa a oxidação de um grande número de estruturas aromáticas na presença de peróxidos, o que ocorre via grupo prostético heme. A reação geral catalisada pelas enzimas contendo grupamento heme foi descrita por Poulos e colaboradores em 1980 usando como modelo a enzima citocromo c (POULOS et al., 1980). A maior parte das reações catalisadas pela HRP-C e outras peroxidases pode ser resumida pela equação abaixo (VEITCH, 2004):



Onde AH_2 e AH^* representam o substrato redutor e seu produto na forma de radical, respectivamente. Os substratos típicos incluem fenóis aromáticos, ácidos fenólicos, indóis, aminas e sulfonatos. Existe uma série destes compostos que ocorrem naturalmente nos tecidos das plantas e que podem ser oxidados por pequenas quantidades de H_2O_2 (ROBINSON, 1991).

As peroxidases (doador: hidrogênio peróxido óxidoreductase, POD, EC 1.11.1.7) catalisam reações redox em vegetais, usando tanto o peróxido de hidrogênio como o oxigênio como aceptores de hidrogênio. O mecanismo de ação das POD é baseado na formação de complexo enzima- doador de hidrogênio. É encontrada no citoplasma (forma solúvel), na parede celular (forma insolúvel), membranas e organelas das células vegetais (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

A Figura 8 representa a oxidação de um elemento redutor (representado pelo guaiacol) pela peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio. Neste esquema podem ser identificados três estágios cíclicos: primeiramente, a enzima é oxidada e, posteriormente, reduzida em dois passos sequenciais, com transferência de um elétron a partir do guaiacol (CRITCHLOW e DUNFORD, 1973; HENRIKSEN, 1999). Esta

reação ocorre comumente para peroxidases, e pode ser utilizada para medir a concentração e a atividade de enzima mesmo na presença de misturas de substâncias. Para isto é necessário mensurar em espectrofotômetro a quantidade do produto reduzido formado, o tetraguaiacol, obtido a partir dos radicais formados pela ação da enzima.

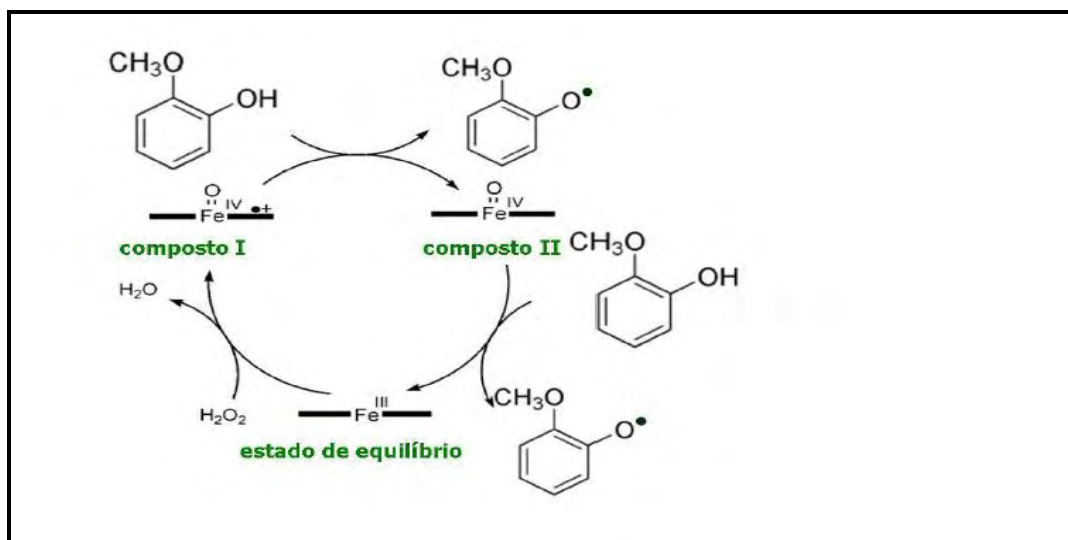


Figura 8: Mecanismo geral da peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio usando o guaiacol como doador de prótons e elétrons. Os Compostos I e II são intermediários no ciclo de catálise da enzima, que formam radicais que levam à produção do tetraguaiacol e água.

Fonte: (CRITCHLOW e DUNFORD, 1973; HENRIKSEN, 1999).

Sabendo que a acerola é um fruto altamente perecível tendo uma vida pós-colheita de no máximo três dias e por possuir modelo climatérico de respiração apresenta problemas de comercialização *in natura*, demonstrando descoloração e alterações de sabor. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), a peroxidase promove a oxidação de compostos fenólicos, de carotenóides entre outros. Portanto, a sua atividade relaciona-se com modificações nos atributos sensoriais (escurecimento, endurecimento, sabores estranhos) e no valor nutritivo (perda de atividade vitamínica do ácido ascórbico) dos produtos hortícolas. O ácido L-ascórbico como poderoso antioxidante, revertendo reações da POD, se perde, empobrecendo a fruta nutricionalmente. É interessante observar que a investigação desse grupo de enzimas tem sido de grande importância para a tecnologia de alimentos (Maciel *et al.*, 2007). Contudo o presente estudo foi verificar a presença e da atividade da peroxidase em três estágios de maturação de dois clones de aceroleira, Okinawa e Emepa. A acerola é carente de

informação com relação a essas transformações, no entanto, tais informações são importantes como pré-requisitos para novas tecnologias que possam melhorar a vida de prateleira dos frutos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

As acerolas do clone “Emepa” utilizadas como fonte de pesquisa foram fornecidas pela Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA/PB) - no município de João Pessoa-PB, enquanto que aqueles do clone “Okinawa foram colhidos na fazenda Morimtzu situado no município de Alhandra – PB. Os frutos foram colhidos manualmente, em três estágios de maturação e pré- selecionados nos locais da coleta, levando em conta a ausência de defeitos aparentes (manchas, doenças e danos) e uniformidade quanto ao tamanho. Foram coletados aproximadamente 500g de frutos de cada clone e de cada um dos três estágios de maturação, respectivamente. O acondicionamento dos frutos para o transporte foi realizado em caixa de isopor para 10 kg, quando os mesmos foram transportados imediatamente para o Laboratório de Bioquímica do DTQA/CT, da UFPB, campos I, localizado em João Pessoa-PB. Ao chegarem ao laboratório, os frutos foram submetidos à lavagem com água corrente, logo depois foram enxaguados com água destilada e finalmente secos ao ar e aí foram separados, triturados e refrigerados.

Os frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC) foram classificados de acordo com a coloração da casca (Figura 10), através de seleção visual, definindo-se três estágios de maturação:

- 1- Frutos totalmente verde (TV) : túrgido, firme, superfície lisa e brilhante;
- 2- Frutos verde alaranjado (VA) : com 50% da cor verde e 50% laranja, túrgido, pouco firme, superfície lisa e brilhante;
- 3- Frutos vermelhos (V) : pouco túrgidos, perda completa da firmeza, polpa líquida, superfície lisa e brilhante.



Figura 9: Frutos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) em três estágios de maturação.

Foto: Autoria própria.

4.2 MÉTODOS

Para fins de caracterização das amostras utilizadas nesta pesquisa foram realizadas: a extração das enzimas, determinação de teor de ácido L-áscorbico, determinação da atividade enzimática e quantificação das proteínas, determinação da atividade específica (AE) nos clones Okinawa e Emepa; determinação de pH e temperatura ótimas de reação da peroxidase como também a determinação da estabilidade de pH e temperatura da peroxidase no estágio de maturação de maior atividade enzimática apenas no clone Okinawa; por questões climáticas não houve disponibilidade de frutas do clone Emepa. As determinações foram realizadas em três repetições sendo cada repetição analisada em triplicata. Cada amostra foi obtida pela mistura das frutas no mesmo estágio de maturação coletado de várias árvores.

4.3 TESTES PRELIMINARES- PILOTO

Em análises preliminares verificamos que a peroxidase não demonstrou atividade enzimática através da metodologia adotada, que mede o aumento em absorbância da mistura reativa constituída de guaiacol e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato - citrato 0,05M pH 6,0. Adotamos então metodologia de eliminação do ácido L-ascórbico, concentrando o extrato enzimático através de liofilização (Liofilizador marca Terroni LS3000) seguido de diálise contra H₂O destilada durante 24 horas com duas trocas e em sequência mais duas trocas usando tampão fosfato 0,05M pH 6,0 durante mais 24 horas. Realizamos o ensaio piloto usando acerola nos estágios maduro, de vez e verde para verificar a eficiência do procedimento.

4.4 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

As acerolas nos três estágios de maturação foram trituradas separadamente em Centrífuga doméstica (marca Walita) e misturados com tampão fosfato 0,2 M, pH = 8,0, previamente resfriados a 4°C contendo 0,3M NaCl, 0,2M KCl e 1% de PVP. O pH da mistura foi ajustado a pH 7,0, através da adição de NaOH 1N. A proporção da mistura (fruto + tampão) foi de 1:1 (p·v⁻¹). Para a extração, a mistura foi mantida refrigerada a 4°C e sob leve agitação por 24 horas. O homogeneizado foi filtrado através de oito camadas de gazes e o extrato centrifugado por 30 minutos em 5.000 x g a temperatura de 4°C como descrito por Khan e Robinson (1994), na forma relatada por Holschuh (2000). O precipitado foi rejeitado. O sobrenadante (extrato bruto) foi submetido à liofilização e diálise e em seguida à determinação de atividade de POD, procedimentos estes adotados após realização do teste piloto.

4.5 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO

Foi obtido por titulometria usando a solução de DFI (2,6 dicloro-fenol-indofenol) até coloração róseo claro permanente, utilizando 1g de polpa diluída em 100 mL de ácido oxálico /acético. O ácido L-ascórbico foi determinado em duplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido L-ascórbico/100g de polpa de acordo com as normas analíticas da A.O.A.C (1990).

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE (POD)

O ensaio da POD foi realizado como descrito por Khan e Robinson (1994), na forma relatada por Holschuh (2000). A mistura da reação foi preparada em um tubo de ensaio constituído de 0,1mL do extrato diluído em tampão fosfato-citrato 0,05M, pH 6,0, 1,5 mL de guaiacol 1% e 0,4 mL de H₂O₂ 3% em tampão fosfato-citrato 0,05 M, pH 6,0 completando um total de 3,2mL, contra um branco no qual o H₂O₂ foi substituído por tampão. O tubo foi suavemente agitado e a atividade medida imediatamente a 470 nm em espectrofotômetro (marca Quimis, modelo Q 798U2VS). A atividade de POD na amostra foi calculada usando a parte linear da curva de absorbância determinada entre 0 e 5 minutos de reação. A linearidade da curva ocorreu, na maioria das determinações entre 1 e 3 minutos de reação. O cálculo da atividade foi

realizado de acordo com Khan e Robinson (1994). A unidade (U) da enzima foi definida como a atividade que ocasionou um aumento de 0,001 unidades de absorbância por mL e min. A atividade específica (AE) foi definida em $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

4.7 QUANTIFICAÇÕES DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas foi determinado conforme descrito por Lowry et. al. (1951). A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10min, com 2,5 ml de reagente cupro-alcálico, constituído de solução A (carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 M), solução B ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% em solução de tartarato de Na e K a 1%) na proporção de 50:1 (v/v), respectivamente. Em seguida foram adicionados 25 μl da solução diluída em H_2O (1:1) de Folin- Ciocalteu, ficando em repouso por 30 min a temperatura ambiente e a absorbância foi lida a 660 nm. A concentração de proteína foi deferida usando curva padrão de soro de albumina bovina (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO) nas concentrações de 5 a 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de extrato bruto.

4.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMOS

A influência da temperatura e do pH na atividade da peroxidase foi analisada na faixa de 40 a 70°C, com intervalo de 5°C e pH 4,0 a 7,0, com intervalo de 0,5 unidades de pH, ocorrendo as reações em soluções tampão com pH e temperatura indicados abaixo. As temperaturas foram controladas por meio de um banho com circulação de água. Para esse estudo foi feito um delineamento experimental composto rotacional para determinação do pH e Temperatura ótimos (27 ensaios) conforme a Tabela 1 utilizando um fatorial completo 2^2 , incluindo os pontos axiais e pontos centrais para avaliação do erro puro e adotando um modelo codificado de 2ª ordem apresentando a seguinte equação:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + e$$

Onde X_1 e X_2 representam a Temperatura e o pH, respectivamente, expressos em forma codificada; β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} e β_{12} representam os parâmetros a serem estimados –

coeficientes; Y representa as variáveis dependentes (respostas) dos dados experimentais, que no caso é a U .

Tabela 1. Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo (pH e temperatura).

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	4,5	45
2	1	-1	6,5	45
3	-1	1	4,5	65
4	1	1	6,5	65
5	-1,41	0	4,0	55
6	1,41	0	7,0	55
7	0	-1,41	5,5	40
8	0	1,41	5,5	70
9	0	0	5,5	50
1	-1	-1	4,5	45
2	1	-1	6,5	45
3	-1	1	4,5	65
4	1	1	6,5	65
5	-1,41	0	4,0	55
6	1,41	0	7,0	55
7	0	-1,41	5,5	40
8	0	1,41	5,5	70
9	0	0	5,5	50
1	-1	-1	4,5	45
2	1	-1	6,5	45
3	-1	1	4,5	65
4	1	1	6,5	65
5	-1,41	0	4,0	55
6	1,41	0	7,0	55
7	0	-1,41	5,5	40
8	0	1,41	5,5	70
9	0	0	5,5	50

4.9 ESTABILIDADE TÉRMICA

Amostras do extrato enzimático, contidas em tubos-teste (selecionadas para serem iguais no peso, no volume e no tamanho), foram incubadas em banho-maria a temperaturas (30, 50 e 70°C) durante 0, 12 e 24h. Após o tratamento de calor, os tubos foram refrigerados em “banho de gelo” por, no mínimo, 30 minutos e a atividade residual medida conforme metodologia indicada no item 4.6. Para esse ensaio foi feito um delineamento fatorial completo 2^2 para Estabilidade Térmica da Unidade de Atividade Enzimática (U) em função do tempo (horas) e da Temperatura (°C) (15 ensaios) conforme a Tabela 2, incluindo pontos centrais para avaliação do erro puro e adotando um modelo linear apresentando a seguinte equação:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_{1j} + \beta_2 x_{2j} + \beta_{12} x_{1j} x_{2j} + e_{ijr}$$

Onde X_1 e X_2 representam o tempo e a Temperatura, respectivamente, expressos em forma codificada; β_0 , β_1 , β_2 e β_{12} representam os parâmetros a serem estimados – coeficientes; Y representa as variáveis dependentes (respostas) dos dados experimentais, que no caso é a U.

Tabela 2. Planejamento fatorial completo, valores codificados e originais das variáveis de estudo (tempo e temperatura) em horas.

Ensaio	tempo (horas)	Temperatura (°C)	tempo (horas)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	0	30
2	1	-1	24	30
3	-1	1	0	70
4	1	1	24	70
5	0	0	12	50
1	-1	-1	0	30
2	1	-1	24	30
3	-1	1	0	70
4	1	1	24	70
5	0	0	12	50
1	-1	-1	0	30
2	1	-1	24	30
3	-1	1	0	70
4	1	1	24	70
5	0	0	12	50

4.10 INATIVAÇÃO TÉRMICA

A atividade residual do extrato enzimático da POD concentrada foi determinada após os seguintes tempos e temperaturas de incubação: 70, 80 e 90°C durante 0, 2 e 4 minutos seguindo a metodologia descrita no item 4.6. O delineamento experimental foi igual ao item anterior (4.9), resultando na Tabela 3.

Tabela 3. Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo (tempo e temperatura) em minutos.

Ensaio	tempo (minutos)	Temperatura (°C)	tempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	0	70
2	1	-1	4	70
3	-1	1	0	90
4	1	1	4	90
5	0	0	2	80
1	-1	-1	0	70
2	1	-1	4	70
3	-1	1	0	90
4	1	1	4	90
5	0	0	2	80
1	-1	-1	0	70
2	1	-1	4	70
3	-1	1	0	90
4	1	1	4	90
5	0	0	2	80

4.11 RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Após 24 horas de permanência do extrato enzimático à temperatura ambiente a atividade das amostras da inativação térmica foi reavaliada quanto à recuperação da sua atividade residual seguindo a metodologia descrita no item 4.6.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise descritiva dos dados obtidos para os dois clones de acerola Okinawa e Emepa, resultou em média aritmética e desvio padrão. Posteriormente, os testes de Shapiro Wilk e o teste de Bartlett, a fim de verificar se os dados apresentavam

distribuição normal e se tinham homocedasticidade. Como a hipótese de H_0 não foi rejeitada, então, procedemos ao estudo comparativo através de teste paramétrico ANOVA e t-Student. Essas análises foram realizadas com o auxílio do software R 2.9.1 (2009). As análises de superfície de resposta foram realizadas utilizando o programa STATISTICA 7.0 (2004) e utilizando o pacote estatístico R 2.10 (2010) para o ajustamento da regressão múltipla.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 TESTES PRELIMINARES-PILOTO

A Tabela 4 apresenta os resultados do teste piloto quanto à eliminação do ácido L-ascórbico e da determinação da atividade enzimática (U) da POD verificado em três estágios de maturação de acerola. Verificou-se que o teor de ácido L-ascórbico foi significativamente superior ($p < 0,05$) no estágio verde seguido do estágio de vez e maduro, como também no extrato bruto e após 24 horas, sendo que após diálise o maior teor residual foi no estágio de vez. A atividade enzimática (U) da POD só foi demonstrada após a diálise e significativa diminuição do ácido L-ascórbico, sendo maior no estágio verde.

Tabela 4: Determinação de teor de ácido L-ascórbico e da atividade enzimática da POD.

	Teor de Ácido L-ascórbico ($\text{mg} \cdot 100^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	Extrato bruto	Após 24 horas	Após Diálise
Madura	1691,96 ^{a,C} $\pm$ 39,43	676,64 ^{b,C} $\pm$ 45,47	5,22 ^{c,C} $\pm$ 17,17
De vez	2464,26 ^{a,B} $\pm$ 140,05	1071,05 ^{b,B} $\pm$ 103,81	23,39 ^{c,A} $\pm$ 36,24
Verde	3231,11 ^{a,A} $\pm$ 82,53	1436,98 ^{b,A} $\pm$ 88,45	5,72 ^{c,B} $\pm$ 14,0

	Atividade Enzimática (U)		
	Extrato bruto	Após 24 horas	Após Diálise
Madura	0,0	0,0	36,0 ^C $\pm$ 1,65
De vez	0,0	0,0	40,6 ^B $\pm$ 2,27
Verde	0,0	0,0	167,4 ^A $\pm$ 9,73

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha para o teor de ácido L-ascórbico diferem significativamente entre as etapas, pela Análise de Variância, com intervalo de confiança de 95%.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem significativamente para o teor de ácido L-ascórbico e da atividade enzimática entre os estágios de maturação, quando aplicado Análise de Variância, com intervalo de confiança de 95%.

5.2 ATIVIDADE ESPECÍFICA ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) DO CLONE OKINAWA.

A Tabela 5 apresenta a atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) da POD após liofilização e diálise, verificado nos três estágios de maturação de acerola, clone Okinawa.

Tabela 5. Tabela da atividade específica (U.mg⁻¹ proteína) da peroxidase em acerola do clone Okinawa em três estágios de maturação.

ESTÁGIO	VOLUME (mL)	PROTEÍNA (mg.mL ⁻¹)	PROTEÍNA TOTAL	RECUPERAÇÃO (%)	U	AE (U.mg ⁻¹ proteína)
VERDE						
Extrato Bruto	158	2,6	410,6	100	0,0	0,0
Extrato Concentrado	16	6,8	109,3	26,9	167,4	24,6
DE VEZ						
Extrato Bruto	158	3,3	524,1	100	0,0	0,0
Extrato Concentrado	16	8,5	135,8	26,3	87,7	10,4
MADURA						
Extrato Bruto	158	3,3	518,4	100	0,0	0,0
Extrato Concentrado	16	7,4	118,9	23	68,9	9,37

Os extratos brutos não demonstraram atividade enzimática medida através do aumento da absorbância a 470nm. Sabe-se que a acerola tem teor de ácido L-ascórbico conhecido como potente antioxidante e, portanto reverte a reação de oxidação da POD enquanto presente. O ácido L-ascórbico foi reduzido a um mínimo (Tabela 4) no extrato bruto junto com outras moléculas de pequeno peso molecular usando diálise após concentração do extrato bruto por liofilização. O teor de proteína foi determinado com a finalidade de verificar a quantidade recuperada como também para calcular a atividade específica da POD.

A atividade específica (U.mg⁻¹ proteína) da POD foi verificado nos três estágios de maturação de acerola, clone Okinawa. Observou-se a maior recuperação da atividade específica (U.mg⁻¹ proteína) da POD, respectivamente no estágio verde com 26,9 % de proteína recuperada e 24,6 U.mg⁻¹ proteína, em seguida estágio de vez com 26,3% de proteína recuperada e 10,4 U.mg⁻¹ proteína, e por último o estágio maduro com 23,0 % de proteína recuperada e 9,37 U.mg⁻¹ proteína.

5.3 ATIVIDADE ESPECÍFICA (U.mg⁻¹ proteína) DO CLONE EMEPA.

A Tabela 6 apresenta a atividade específica (U.mg⁻¹ proteína) da POD após liofilização e diálise, verificado nos três estágios de maturação de acerola, clone Emepa.

Tabela 6. Tabela da atividade específica (U.mg⁻¹ proteína) da peroxidase em acerola do clone Emepa em três estágios de maturação.

ESTÁGIO	VOLUME (mL)	PROTEÍNA (mg.mL ⁻¹)	PROTEÍNA TOTAL	RECUPERAÇÃO (%)	U	AE (U.mg ⁻¹ proteína)
VERDE						
Extrato Bruto	156	3	468,5	100	0,0	0,0
Extrato Concentrado	20	4,7	93,1	19,9	69,8	15
DE VEZ						
Extrato Bruto	156	2,7	414,8	100	0,0	0,0
Extrato Concentrado	20	5,5	109,2	26,5	40,61	7,4
MADURA						
Extrato Bruto	156	3,4	525,9	100	0,0	0,0
Extrato Concentrado	20	8,5	169,3	33	34,9	3,9

Como no clone Okinawa (Tabela 5) também no clone Emepa os extratos brutos não demonstraram atividade enzimática.

A atividade específica (U.mg⁻¹ proteína) da POD foi verificado nos três estágios de maturação de acerola, clone Emepa. Observou-se a maior recuperação da atividade específica (U.mg⁻¹ proteína) da POD, respectivamente no estágio maduro com 33,0 % de proteína recuperada em seguida estágio de vez com 26,5 % de proteína recuperada e, por último o estágio verde com 19,9 % de proteína recuperada. Em relação à atividade específica (U.mg⁻¹ proteína) observou-se a maior no estágio verde com 15,0 U.mg⁻¹ proteína , em seguida estágio de vez com 7,4 U.mg⁻¹ proteína , e por último o estágio maduro 3,9 U.mg⁻¹ proteína.

5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U), TEOR DE PROTEÍNA (mg.mL⁻¹) E ATIVIDADE ESPECÍFICA (AE) DA POD DA ACEROLA EM TRÊS ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO NOS CLONES OKINAWA E EMEPA.

A Tabela 7 ilustra a atividade enzimática, o teor de proteínas e a atividade específica da peroxidase (POD) nos extratos enzimáticos concentrados de acerola em três estágios de maturação dos clones Okinawa e Emepa. Quando analisada a atividade enzimática, o teor de proteínas e atividade específica da peroxidase (POD) observou-se que houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre os estágios de maturação da acerola e entre os clones Okinawa e Emepa, sendo constatados valores superiores de atividade enzimática e atividade específica da peroxidase no estágio verde em ambos os clones, respectivamente. Unidades de POD e atividade específica foram superiores em todos os estágios de maturação analisados no clone Okinawa, em relação ao clone Emepa. O teor de proteínas nos estágios verde e de vez foi maior no clone Okinawa em relação ao clone Emepa e no estágio maduro foi superior no clone Emepa comparada ao clone Okinawa.

Marin e Cano (1992) estudaram o comportamento da peroxidase em função da quantidade de proteínas durante o amadurecimento de manga, variedades Lippens e Smith e observaram que em ambos os casos ocorreu aumento na atividade da POD nos doze primeiros dias e constância no valor após este período, sendo que a quantidade de proteínas apresenta um comportamento oposto: decréscimo seguido de constância. Gonçalves et al (2006) e Luíz et al (2007) estudando atividade da POD, em diferentes estádios de maturação da fruta de figueira e da polpa de abacate, respectivamente verificaram a maior atividade da peroxidase nos frutos verdes. A maior atividade da POD na fase inicial de desenvolvimento dos frutos pode ser explicada pela sua função metabólica de proteger os tecidos vegetais contra os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio durante o metabolismo celular. Os resultados da literatura são semelhantes aos nossos resultados.

Tabela 7. Atividade enzimática (U), teor de proteína (mg.mL⁻¹) e atividade específica (AE) da POD da acerola nos clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação.

OKINAWA X EMEPA						
	U (mL)		Liofilizada Proteína (mg.mL ⁻¹)		AE (U.mg ⁻¹ de proteína)	
	OKINAWA	EMEPA	OKINAWA	EMEPA	OKINAWA	EMEPA
Verde	167,4 ^{a,A} ± 9,73	69,8 ^{b,A} ± 1,88	6,8 ^{a,B} ± 1,07	4,7 ^{b,C} ± 0,18	24,6 ^{a,A} ± 2,12	15,0 ^{b,A} ± 0,80
De vez	87,7 ^{a,B} ± 5,32	40,6 ^{b,B} ± 2,27	8,5 ^{a,A} ± 0,42	5,5 ^{b,B} ± 0,22	10,4 ^{a,B} ± 1,08	7,4 ^{b,B} ± 0,22
Madura	68,9 ^{a,C} ± 3,25	34,9 ^{b,C} ± 1,27	7,4 ^{b,A,B} ± 0,81	8,5 ^{a,A} ± 0,05	9,4 ^{a,C} ± 1,02	4,1 ^{b,C} ± 0,14

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha diferem significativamente entre as variedades, pelo teste t-Student, com intervalo de confiança de 95%.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna diferem significativamente entre os estágios de maturação, quando aplicado Análise de Variância, com intervalo de confiança de 95%.

5.5 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMOS

O modelo ajustado tem a seguinte equação:

$$U = -180,29 + 3,71 \cdot \text{temperatura} + 35,45 \cdot \text{pH} - 0,036 \cdot \text{temperatura}^2 - 2,81 \cdot \text{pH}^2.$$

Para tal modelo regressivo observou-se que as hipóteses de normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos padronizados foram aceitas hipóteses essas necessárias para validação do modelo. Foi observado que a não interação entre a temperatura e o pH foi bastante significativo vindo dessa forma a contribuir com o modelo proposto e apresentando um ótimo ajustamento onde o $R^2 = 0,98$. Segundo apresentado nas Figuras 10 e 11 observa-se que a peroxidase da acerola mostrou atividade máxima quando se utilizou em tampão fosfato pH= 6,5 e T= 45°C. Estes resultados são próximos aos obtidos por Holschuh (2000) que relatou que a peroxidase em carambola mostrou atividade máxima em tampão fosfato pH 5,5 e 6,0 e temperatura ótima na faixa de 50°C e, por Lamikanra e Watson (2000) citado por Brito (2005) que verificaram que a peroxidase em melão apresentou atividade ótima em pH na faixa de pH 6,0 a 7,0, a 30°C, e na faixa de pH 5,5 a 7,5, a 50°C. Maciel, Gouvêa e Pastore (2007) verificaram que a peroxidase em folha de “copaifera” (COP) apresentou atividade ótima em pH de 4,0 a 7,0 e temperatura de 5 a 45°C, com atividade máxima em pH 6,0 e 35°C. Zanatta, Zotarelli e Clemente (2006) encontraram atividade enzimática máxima da POD em polpa de goiaba em pH= 6,3. Wright e Nicell (1999)

encontraram atividade ótima em pH 6,4 para peroxidase de soja ambos relatando valores próximos aos nossos resultados.

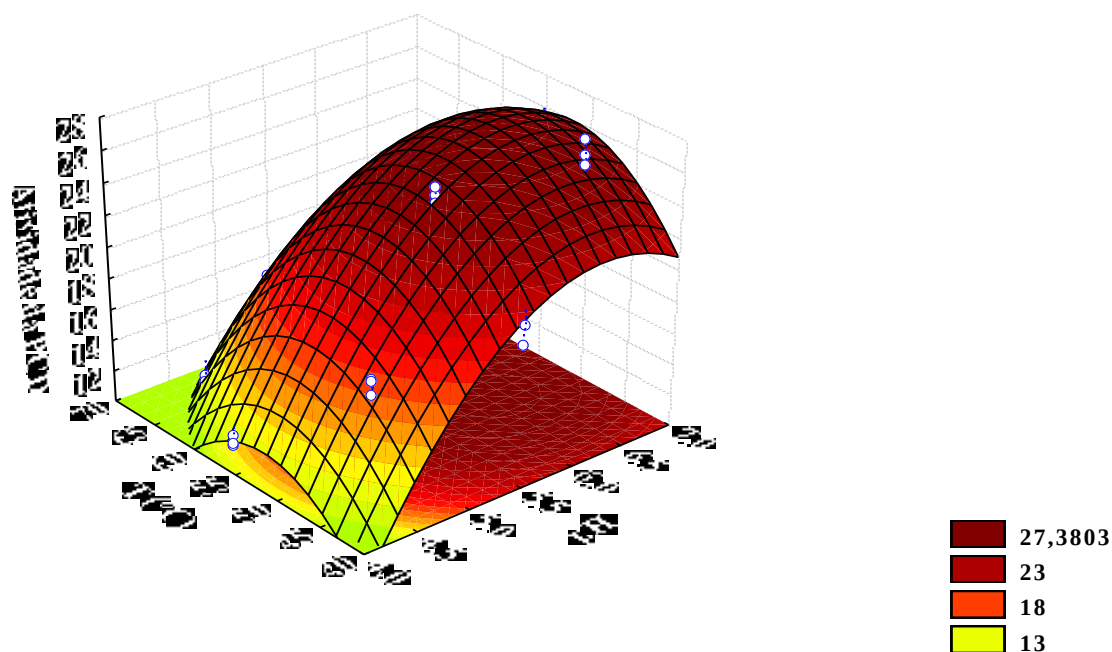


Figura 10: Superfície de resposta da influência da Temperatura e do pH na atividade da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa.

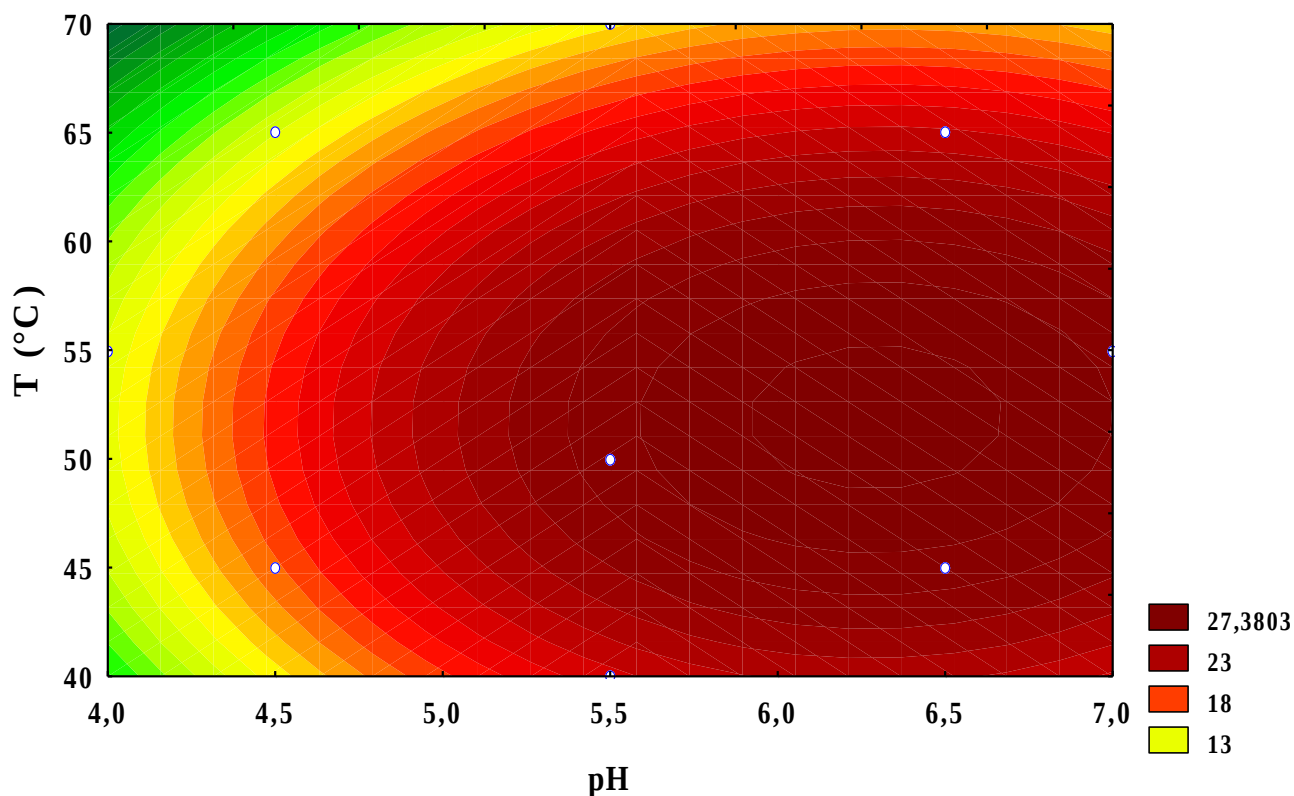


Figura 11: Curvas de contorno para influência da Temperatura e do pH na atividade da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa.

5.6 ESTABILIDADE TÉRMICA

O modelo ajustado tem a seguinte equação:

$$U = 18.62 + 0,60 \cdot \text{tempo} + 0,14 \cdot \text{temperatura} - 0,02 \cdot \text{temperatura} \cdot \text{tempo}$$

Para tal modelo regressivo observou-se que as hipóteses de normalidade, linearidade, homocedasticidade e independência dos resíduos padronizados foram aceitas hipóteses essas necessárias para validação do modelo. Foi observado que a interação entre o tempo e temperatura foi bastante significativo vindo dessa forma a contribuir com o modelo proposto e apresentando um ótimo ajustamento onde o $R^2 = 0,9815$. Segundo apresentado nas Figuras 12 e 13 observa-se que a peroxidase da acerola apresentou atividade máxima em temperatura mais alta ($T = 70^\circ\text{C}$) e em tempo mínimo (0 hora). No entanto a mesma mostrou-se estável quando submetida à temperatura de 30°C durante todos os tempos de tratamento, até 24 horas e apresentando valores próximos da temperatura de 50°C no tempo de 12 horas. Houve uma perda acentuada da atividade em temperatura mais alta ($T = 70^\circ\text{C}$) e em tempo máximo (24 horas). Maciel,

Gouvêa e Pastore (2007) verificaram que a enzima peroxidase em folhas de “copaifera” mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 50 °C e pH entre 4,5 e 9,0, por até 24 horas. Brito et al (2005) estudando a peroxidase de abacaxi cultivar IAC Gomo-de-Mel mostrou-se estável, após 30 minutos, em temperaturas inferiores a 50°C. Zanatta, Zotarelli e Clemente (2006) verificaram que a peroxidase na polpa de goiaba a temperaturas de 60, 65, 70, 75 e 80 °C por um período de 0 a 10 minutos apresentou um decréscimo da atividade enzimática com o aumento da temperatura e do tempo semelhante ao encontrado em peroxidase em maçã por Valderrama, Marangoni e Clemente (2001) submetidos a temperaturas de 60, 65, 70 e 75 °C por um período de 0 a 10 minutos. Galdino e Clemente (2008) observaram que a peroxidase de palmito quando submetida a temperaturas de 65, 70, 75 e 80 °C por períodos variando de 1 a 10 minutos apresentou uma considerável queda da atividade enzimática devido também ao aumento do tempo e da temperatura. Em ambos os casos a total inativação não foi atingida o que sugere a presença de isoenzimas termorresistentes. Estes resultados são próximos aos nossos resultados.

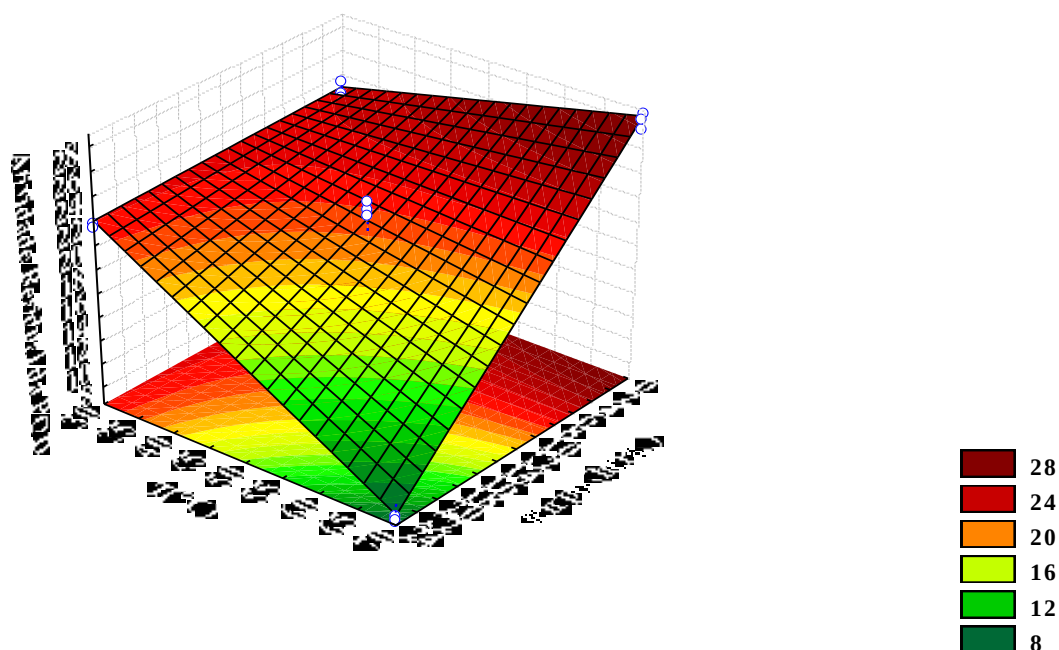


Figura 12: Superfície de resposta da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa após o tratamento térmico nas temperaturas (30°, 50° e 70°C) e tempos (0, 12 e 24horas).

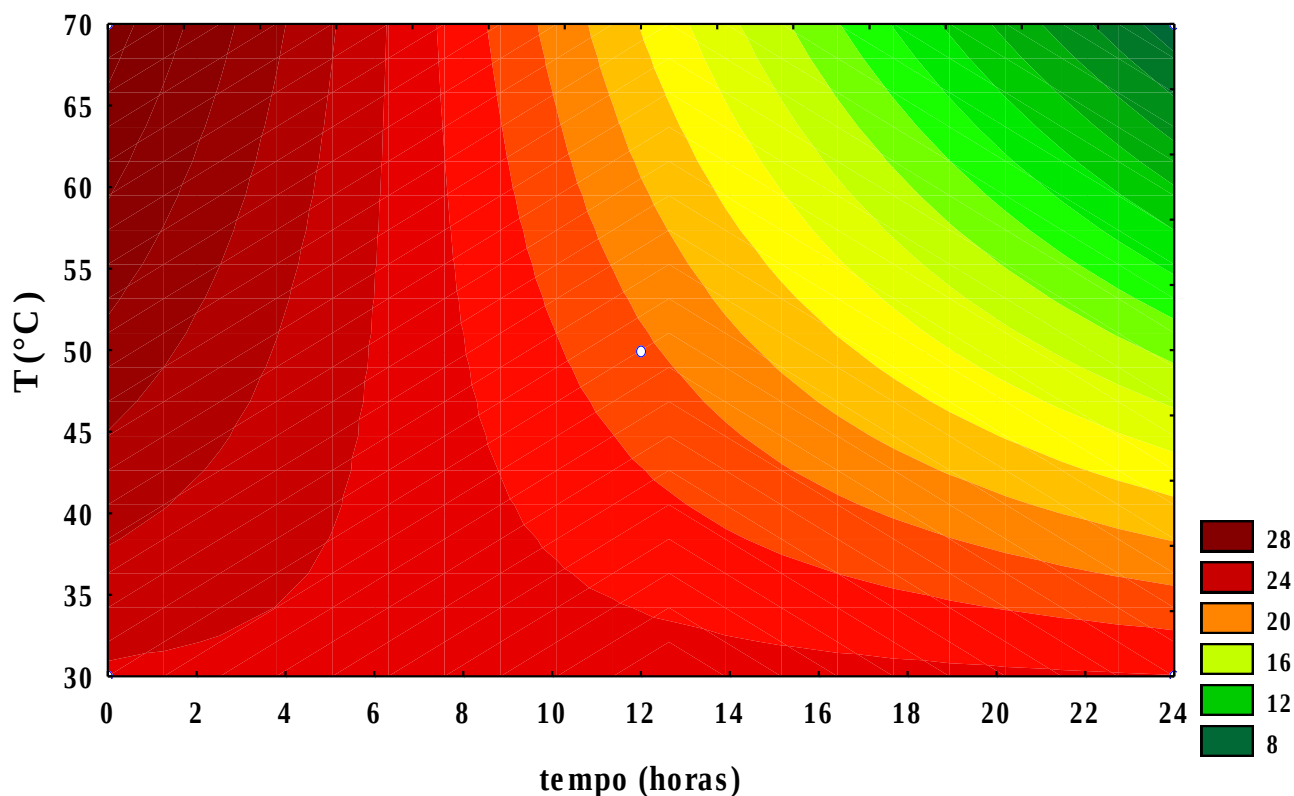


Figura 13: Curvas de contorno da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa após o tratamento térmico nas temperaturas (30°, 50° e 70°C) e tempos (0, 12 e 24 horas).

5.7 INATIVAÇÃO TÉRMICA

O modelo ajustado tem a seguinte equação:

$$U=50,61+5,15 \cdot \text{tempo}-0,31 \cdot \text{temperatura}-0,10 \cdot \text{temperatura} \cdot \text{tempo}.$$

Para tal modelo regressivo observou-se que as hipóteses de normalidade, linearidade, homocedasticidade e independência dos resíduos padronizados foram aceitas, hipóteses essas necessárias para validação do modelo. Foi observado que a interação entre o tempo e temperatura foi bastante significativo vindo dessa forma a contribuir com o modelo proposto apresentando um ótimo ajustamento onde o $R^2= 0,97$. Segundo apresentado nas Figuras 14 e 15 observa-se que a peroxidase da acerola apresentou atividade máxima na temperatura de 70 °C e em tempo mínimo de 0 minuto. A 70°C no tempo de 4 minutos houve uma perda da atividade da peroxidase da acerola e apresentou valores próximos da temperatura de 90°C no tempo de 0 minuto. A atividade da peroxidase da acerola mostrou-se ainda mais reduzida na temperatura de 80°C no tempo de 2 minutos quando comparada a temperatura de 70° e 90°C nos

tempos de 4 e 0 minutos, respectivamente. Houve uma perda acentuada da atividade em temperatura mais alta ($T=90^{\circ}\text{C}$) e em tempo máximo (4 minutos). A atividade residual da POD de 50% foi atingida a 80°C durante 4 minutos. Freitas et al (2008) estudando peroxidase em uvas das variedades (Benitaka e Rubi) verificaram que a atividade enzimática diminuiu com o tempo de exposição do extrato enzimático à temperatura de tratamento e também com o aumento da temperatura onde uma maior inativação enzimática foi obtida na temperatura de 85°C e com tempo de exposição de 10 minutos. No entanto, observaram que os tratamentos térmicos utilizados não foram suficientes para a total inativação das enzimas. Clemente e Mantovani (2010) estudando peroxidase em tomate *in natura* e extrato de tomate, submetidos a tratamentos térmicos a ($75, 80, 85$ e 90°C) por períodos de 1-12 minutos, verificaram que diminuição da atividade enzimática foi observada em 85 e 90°C , nos extratos enzimáticos obtidos a partir de polpa de tomate fresco, no entanto, nos purês de tomate a perda de atividade foi mais significativa. Em ambos os casos, mesmo com o aumento da temperatura e do tempo a total inativação não foi atingida o que sugere a presença de isoenzimas termorresistentes. Os resultados da literatura corroboram com os nossos resultados.

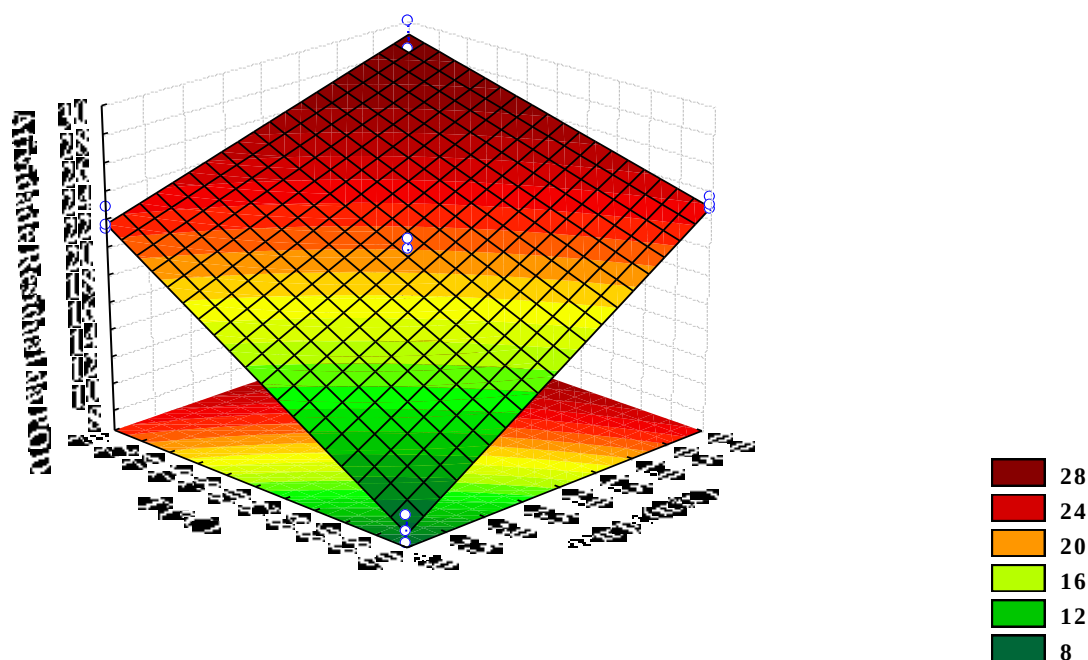


Figura 14: Superfície de resposta da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa após o tratamento térmico nas temperaturas (70° , 80° e 90°C) e tempos (0, 2 e 4 minutos).

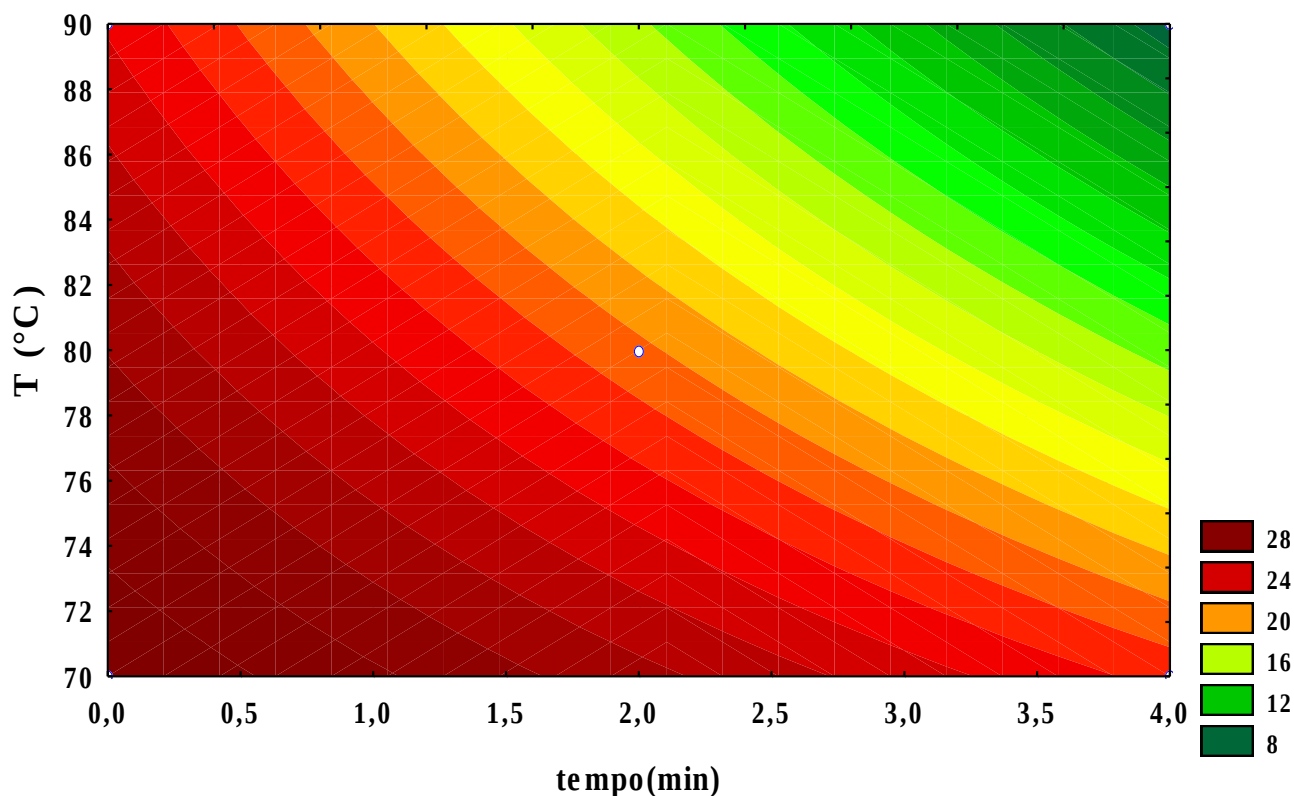


Figura 15: Curvas de contorno da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa após o tratamento térmico nas temperaturas (70°, 80° e 90°C) e tempos (0, 2 e 4 minutos).

5.8 RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O estudo de recuperação da atividade enzimática foi realizado 24 horas após os tratamentos de inativação térmica. Segundo apresentado na Figura 16 observa-se que os extratos enzimáticos concentrado da acerola depois de serem aquecidos nas temperaturas (70°, 80° e 90°C) e tempos (0, 2 e 4 minutos) para determinar a atividade enzimática residual ou o grau de inativação, foram deixados à temperatura ambiente durante as 24 horas subseqüentes, observando uma possível regeneração da atividade da peroxidase da acerola. A 90°C ocorreu aumento, isto é, recuperação da atividade enzimática em todos os tempos de tratamentos. A 80°C houve uma diminuição da atividade da peroxidase, demonstrando pequena recuperação dos tratamentos de menor tempo e perda nos tempos de 3 e 4 minutos. A 70°C não houve recuperação da atividade POD tratada em nenhum dos tempos de tratamento. Clemente, Roling e Moura (2000) estudando regeneração da peroxidase em repolhos a 70°C verificaram que a fração solúvel apresentou atividade, a qual sofreu um decréscimo com o tempo, porém a fração iônica manteve-se constante e praticamente inativa desde o princípio. Clemente e

Berbicz (2001) estudando regeneração da atividade da peroxidase extraída da laranja (*Citrus* spp.) observaram uma regeneração na peroxidase solúvel de até 15% da atividade inicial e não encontraram regeneração da atividade da peroxidase ligada ionicamente. Em ambos os casos demonstraram que a regeneração pode estar relacionada à presença de isoenzimas diferentes nas frações solúveis e iônicas que apresentam diferente termoestabilidade. Os resultados da literatura são próximos aos nossos resultados.

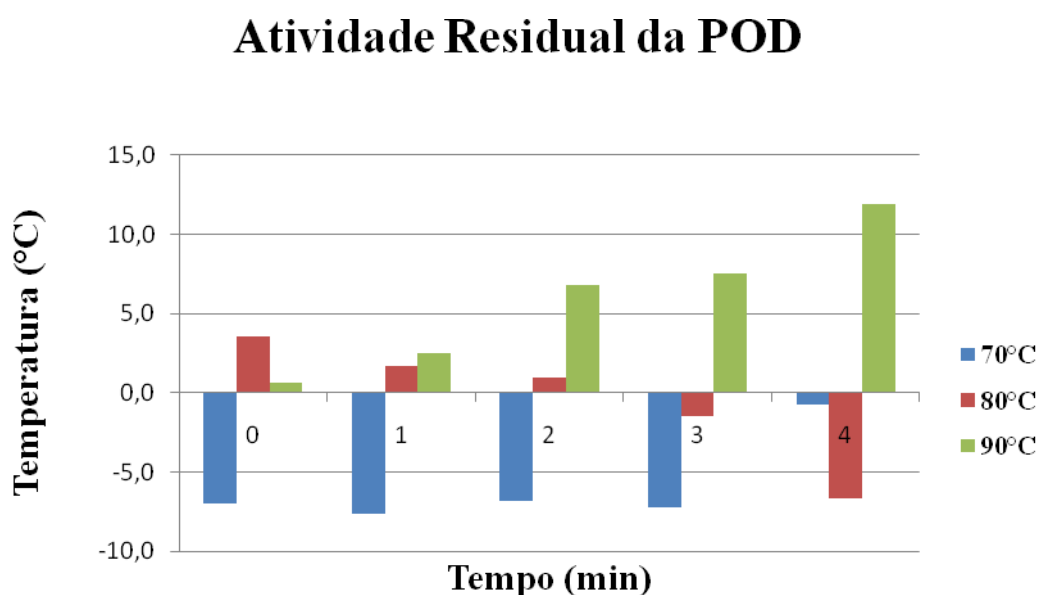


Figura 16: Gráfico de recuperação da atividade residual da POD em extratos enzimáticos concentrado da acerola no estágio verde do clone Okinawa submetidos ao tratamento térmico nas temperaturas (70°, 80° e 90°C) e tempos (0, 2 e 4 minutos) após vinte e quatro horas de permanência à temperatura ambiente.

6 CONCLUSÃO

- As Unidades de peroxidase e a atividade específica nos clones Okinawa e Emepa foram maiores no estágio verde de acordo com as funções que a peroxidase desenvolve neste estágio de desenvolvimento do fruto, sendo que o clone Okinawa apresentou maior atividade demonstrando que existem diferenças entre clones.
- No clone Okinawa a atividade máxima da peroxidase de acerola foi maior em tampão fosfato pH 6,5 a temperatura de 45°C.
- A peroxidase apresentou atividade máxima quando submetida à temperatura de 70°C e 0 hora. No entanto a mesma mostrou-se estável quando submetida à temperatura de 30°C durante todos os tempos de tratamento até 24 horas e apresentando valores próximos da temperatura de 50°C no tempo de 12 horas. Houve uma perda acentuada da atividade à temperatura de 70°C no tratamento de 24 horas, também no clone Okinawa.
- A peroxidase do mesmo clone sofreu perda acentuada de atividade a 90°C após 4 minutos, tendo atingido 50% de atividade residual a 80°C e 4 minutos de tratamento.
- A recuperação da atividade enzimática após 24 horas de repouso da peroxidase extraída do clone Okinawa foi observada em todos os tempos de tratamentos a 90°C, tendo sido observado pequena recuperação a 80°C nos tratamentos de menor duração. Não houve recuperação da atividade POD tratada à temperatura de 70°C em nenhum dos tempos de tratamento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. E. **Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.):** Fisiologia da maturação e armazenamento refrigerado sob atmosfera ambiente e modificada. 1993. 99 f. Dissertação(Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1993.

ALVES, R.E.; MENEZES, J.B. Botânica da aceroleira. In: **Simpósio Brasileiro sobre Acerola no Brasil**, 1. 1995, Vitória da Conquista. *Anais...* Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, p. 7-14, 1995.

ALVES, R.E. Características das frutas para exportação. In: GORGATTI NETTO, A.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.E. (Eds.). **Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.9-12, 1996.

ALVES, R. E. **Qualidade de Acerola Submetida a Diferentes Condições de Congelamento, Armazenamento e Aplicação Pós-colheita de Cálcio**. Lavras: ESAL, 1999. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 1999.

ANDRADE, L. R. M. Corretivos e fertilizantes para culturas perenes e semiperenes. In: SOUSA, D. M. G.; LOBATO, R. (Eds.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Brasília,DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 317-366, 2004.

ASENJO, C. F. Acerola. In: Nagy, S., Shaw, P. E. **Tropical and subtropical fruits: composition, properties and uses**. Westport. AVI. p. 341-74, 1980.

ASSIS, S. A., LIMA, D. C., OLIVEIRA, O. M. M. F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**, London, v.74, p.133-137, 2001.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST- A.O.A.C. **Official methods of analysis**, 15th ed. Arlington, AOAC, 1990. V.2, 109p.

BARROS NETO, B. de; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas, Editora da UNICAMP, 2003.

BEILEN, J.B.; LI, Z. Enzyme technology: na overview. **Current Opininnin Biotechnology**, v.13, p. 338-344, 2002.

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

BERGLUND, G. I.; CARLSSON, G. H.; SMITH, A. T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A. e HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, v. 417, p. 463–468. 2002.

BERTO, D. Bebidas não alcoólicas - Apelo saudável impulsiona consumo. **Food Ingredients**, n.24, p.32-34, 2003.

BIALE, J. B.; YOUNG, R. E. Respiration and ripening in fruits retrospect and prospect. In: FRIEND, J.; RHODES, M. J. C. **Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and vegetables**. London: Academic Press, p.1-39, 1981.

BURNETTE, F.S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: A review. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 1-5, 1977.

BLISKA, F.M.M.; LEITE, R.S.S.F. Aspectos econômicos e de mercado. In: **Simpósio Brasileiro sobre Acerola no Brasil**, Vitória da Conquista. *Anais...* Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, v. 1, p. 107-123, 1995.

BRAGA SOBRINHO, R.; BANDEIRA, C. T.; ALVES, R. E. **Acerola**: a cereja tropical. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Indicadores e estatísticas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: nov. 2008.

BRITO, C; SATO,H; SPIRONELLO,A; SIQUEIRA,W. Características da atividade da peroxidase de abacaxis (*ananas comosus* (L.) Merrill) da cultivar IAC Gomo-De Mel e do Clone IAC-1. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.25, n. 2, p. 244-249, 2005.

CAMPA, A.; Biological Roles of Plant Peroxidases: Know and Potential Function. **In Peroxidase in Chemistry and Biology**, Everse, K.; Grisham, M.B.; Eds.; CRC Press; New York, vol. II, pp. 25, 1991.

CARRINGTON, C.M.S.; KING, R.A.G. Fruit development and ripenig in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* D.C. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.92, n.1, p.1-7, 2002.

CARVALHO, R.A. **Análise econômica da produção de acerola no município de Tomé-Açu, Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p 21, 2000. (Documento, 49).

COSTA, L. C.; PAVANI, M. C. M. D.; MORO, F. V. PERECIN, D. Viabilidade de sementes de acerola (*malpighia emarginata* dc): Avaliação da vitalidade dos tecidos. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 532-534, 2003.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P.G.; ALMEIDA, F. A. C.; LEITE, J. C. A.; SILVA, F. L. H. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, [S.l]: v. 4, n. 2, 2004.

CHEN, P. M.; MELLENTIN, W. M.; RICHARDSON, D.G. A comparative study of “d” and “Bosc” pears in relation to maturity and postharvest life (Abstr.) **HortScience**, Alexandria, v.15, n.1, p.1. 1980.

CHITARRA, M.I.; CHITARRA, A.D. **Pós-colheita de frutos e hortaliças - Fisiologia e Manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE,1990.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, p.55-78, 2005.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, p.686-689, 2005.

CLEMENTE, E. **The characterization of isoperoxidases from orange**. England, p 202, 1993. Tese PhD in Food Science, Leeds, England, University of Leeds – Procter Food Science.

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

CLEMENTE, E; ROLING, M; MOURA, V. Termoestabilidade da peroxidase extraída da folha de repolho. **Acta Scientiarum**, Maringá v.22, n. 5 p.1157-1160, 2000.

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

CRITCHLOW, J. e DUNFORD, H. Kinetic Studies on Peroxidases. Em **Oxidases and Related Redox Systems, Vol. I**, King, T.; Mason, H. e Morrison, M. (ed.). University Park Press, Baltimore, MD. p. 1973. 355.

DE ROSSO, V. V., MERCADANTE, A. Z. (2005) Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 1073-1077, 2005.

EMBRAPA. Caracterização social e econômica da videira. Disponível em <http://www.cpatsa.embrapa.br/sistema_produção/spvideira/socioeconomica.htm>. Acesso em 20 de Fevereiro de 2009.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Editorial Acribia S. A. Zaragoza (España), 1095p, 1993.

FRAIGNIER, M. P.; MARQUÈS, L.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. J. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2375-2380, 1995.

FREITAS, C.A.S.; MAIA, G.A.; COSTA, J.M.C.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUSA, P.H.M.. Stability of carotenoids, anthocyanins and vitamin C presets in acerola sweetened tropical juice preserved by hotfill and aseptic process. **Ciência Agrotecnologia**. v.30, n.5, p 942, 2006.

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

GAJHEDE, M.; SCHULLER, D. J.; HENRIKSEN, A.; SMITH A. T. ; POULOS, T. L. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. **Nature Structural Biology**, v. 4, p. 1032 - 1038. 1997.

GOMES, J. E. ; PERECINI, D. .; MARTINS, A.B.G.; FERRAUDO, A.S. Análises de agrupamento e de componentes principais no processo seletivo em genótipos de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.1, p. 36-39, 2000.

GONÇALVES, C; LIMA, L; LOPES, P; PRADO, M. Caracterização física, físico-química, enzimática e de parede celular em diferentes estádios de desenvolvimento da fruta de figueira. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.26 n.1, p. 220-229, 2006.

GONZAGA NETO, L.; MATTUZ, B. H.; SANTOS, C. A. F. Caracterização agrônômica de clones de aceroleira (*Malpighia* spp) na região do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2,p. 110-115, 1999.

HENRIKSEN, A.; SMITH, A.T. e GAJHEDE, M. The structure of the horseradish peroxidase C-ferrulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274 n. 49, p. 35005-35011. 1999.

HINER, F.; HERNANDEZ-RUIZ, J.; RODRIGUEZ-LOPES, J. N.; ARNAO, A. N.P.; VÁRON, R.; GARCIA-CANÓVAS, S. e ACOSTA, M. The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: an example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, n. 6,p. 504-516. 2001.

HOONDAL, G.S.; TIWARI, R.P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology** 59, n.4-5 p. 409-418, 2002.

HOLSCHUCH, H.J. **Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.)**, p.90-159, 2000. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

HULME, A.C. (Ed.), **The biochemistry of fruits and their products**. London: Academic Press, 1971.

JANG, M. S.; SANADA, A.; USHIO, H.; TANAKA, M.; OHSHIMA, T. Inhibitory effects of 'Enokitake' mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 35, p. 697-702, 2002.

LAMIKANRA, O; WATSON, M.A. Cantaloupe melon peroxidase: Characterization and effects of additives on activity. **Nahrung-Food**, Berlim, v.44, n.3, p.168-172, 2000.

LASKOWSKI, L.E.; BAUTISTA, D. Evaluacion de características vegetativas, productivas y de calidad de la fruta de plantas de semeruco cultivadas en zonas aridas. **Agronomia Tropical**, Maracay, v.48, n.3, p.239-249, 1998.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol.3, 1ª ed, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 594p., 2001.

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 dos Alimentos**, Campinas, 2001.

LIMA, V. L. A. G DE; MÉLO, E. DE A; LIMA, L. DOS S; LIMA, D. E. DA S. Frozen acerola pulp: temperature effect on total anthocyanins and flavonols. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n. 3, p. 2002.

LIMA, R. L. S.; SIQUEIRA, D. L.; WEBER, O. B.; CECON, P. R. Teores de macronutrientes em mudas de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) em função da composição do substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1110-1115, 2006.

LOPES, R., PAIVA, J. R. **Aceroleira**. In: Bruckner, C.H. Melhoramento de Fruteiras Tropicais. Editora Universidade Federal de Viçosa/UFV. p. 63-99, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry** 193, p. 265-275, 1951.

LUCAS, A.P. Acerola: suco da saúde conquista o mundo inteiro. **Manchete Rural**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 69, p. 10-13, 1993.

LUÍZ, R. C., HIRATA, T. A. M.; CLEMENTE, E. Cinética de inativação da Polifenoloxidase e Peroxidase de abacate. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1766-1773, 2007.

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

KUMMER, U.; VALEUR, K. R.; BAIER, G.; WEGMANN, K. e OLSEN, L. F. Oscillations on the peroxidase-oxidase reaction: a comparison of different peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta – BBA**, v.1289, p. 397-403. 1996.

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

MARIN, M.; CANO, M. P. Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.3, p.690-692, 734, 1992.

MARINO NETTO, L. **Acerola, a cereja tropical**. São Paulo: Nobel, p 94, 1986.

MARQUÉS, L.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. J. Fruit polyphenol oxidase. New data on and old problem. In: LEE, C. Y.; WHITAKER, J. R. Enzymatic browning and its prevention. Washington, DC: **American Chemical Society**, p. 90-102, 1995.

MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science & Technology**. v.5, p. 195-200, 1995.

MATSUURA, F. C. A. U., Cardoso, R. L., Folegatti, M. I. S., Oliveira, J. R. P., Oliveira, J. A. B., Santos, D. B. Avaliações físico-químicas em frutos de diferentes genótipos de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal v.23 , n.3, p.602-606, 2003.

MEDINA, J. C. **Alguns aspectos tecnológicos das frutas tropicais e seus produtos**. Série Frutas Tropicais-10. ITAL, 296p, 1980.

MEZADRI, T. et al. El fruto de la acerola: composición, características productivas e importancia económica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.56, p.101-109, 2006.

MOURA, C. F. H., ALVES, R. E., FIGUEIREDO, R. W., PAIVA, J. R. Avaliações físicas e físico-químicas de frutos de clones de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.1, p.52-57, 2007.

MUSSER, R. S. Situação atual e perspectivas da acerola. In: SÃO JOSÉ, A. R. ALVES, R. E. **Acerola no Brasil: Produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, p. 46, 1995.

NETO, G. L. MELHORAMENTO GENÉTICO DA ACEROLEIRA. In: São José, A. R., Alves, R. E. (ed.) **Acerola no Brasil, produção e mercado**. Vitória da Conquista BA: UESB, p 160, 1995B.

NEVES, IVO PESSOA. Cultivo de acerola. **Dossiê técnico**. Rede de Tecnologia da Bahia – RETEC/BA, 2007.

NOGUEIRA, R. J. M. C. **Expressões Fisiológicas da Aceroleira (*Malpighia emarginata* D. C.) em condições adversas**. São Carlos, 207p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Carlos, 1997.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A. et al. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.463-470, 2002.

OUNGPIPAT, W.; ALEXANDER, P. W.; Southwell-Keely, P.; *Anal. Chim. Acta*, 309, 35, 1995.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; BARROS, L.M. Melhoramento genético da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) na Embrapa Agroindústria Tropical. In: **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido/ Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

PANTASTICO, E. R. B. Postharvest physiology handling and utilization of tropical and subtropical fruits and vegetables. **West Port**: Avi, 560p, 1975.

PETINARI, R. A.; TARSITANO, M. A. A. Análise Econômica da Produção de Acerola para Mesa, em Jales-SP: Um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p. 411-415, agosto, 2002.

POULOS, T. L.; FREER, S. T.; ALDEN, R. A.; EDWARDS, S. L.; SKOGLAND, U.; TAKIO, K.; ERIKSSON, B.; XUONG, N; YONETANI, T. e KRAUT, J. The Crystal Structure of Cytochrome c Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n 2, p.575-580. 1980.

PORCU, O. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Carotenóides em suco e polpa congelada de acerola. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 5.; DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO E A INOVAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS, 2003, Campinas, SP: **Resumos...** Campinas: Unicamp, 2003. CD-ROM.

RITZINGER, R.; SOARES FILHO, W.S.; OLIVEIRA, J.R.P. Variedades e melhoramento. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A.K.; OLIVEIRA, J.R.P. **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p 198, 2003.

ROBINSON, D. S. Peroxidase and catalase in foods. In: Oxidative enzymes in foods. ROBINSON, D. S. e ESKIN, N. A. M. E. (Eds.), Londres: **Elsevier Applied Science**, p.1-47, 1991.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamento**. 1ª Ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

RYALL, A. L.; LIPTON, W. J. Handling, transportation and storage of fruits and vegetables. Vegetables and melons, **Westport CT**, New England, v. 1, 1979.

SAMPAIO, S. A.; BORA, P. S.; HOLSCHUH, H. J.; SILVA, S. M. Postharvest respiratory activity and changes in some chemical constituents during maturation of yellow mombin (*Spondias mombin*) fruit. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 511-515, 2007.

SIMARELLI, M. Frutas do Brasil. **Frutas e Derivados**, v. 1, n. 1, p. 15-27, 2006.

SILVA, J. M. de M.; JUNQUEIRA, N. T. V. Cultura da aceroleira. In: __. **Incentivo à fruticultura no Distrito Federal**: manual de fruticultura. 2. ed. rev. Brasília: OCDF/COOLABORA, 1999. p. 79-86.

SOARES FILHO, W. S.; OLIVEIRA, J. R. P. Introdução. RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P. **A cultura da acerola**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 15-16, 2003.

SOFTWARE R 2.9.1 for Windows. **The Comprehensive R Archive Network**. Disponível em: <http://cran.r-project.org/bin/windows/base/>. Acessado em: Dez. 2009.

STATSOFT. **Statistica for windows**, Tulsa, USA, 2004.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 81, p. 853-879, mar. 2001. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 04 jun. 2009.

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

VALDERRAMA, P.; CLEMENTE, E. Isolation and thermostability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji. **Food Chemistry**. v. 87, p. 601-606. 2004.

VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Crit Ver. Food Science Nutrition**. Boca Raton/USA, v. 49, p. 127, 1981.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, n. 65, p. 249-259. 2004.

WATADA, A. E.; HERNER, R. C.; KADER, A. A.; ROMANI, R. J.; STABY, G. L. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. **HortScience**, v. 19, n. 1, p. 20-21, 1984.

WELINDER, K. G. Covalent Structure of the glycoprotein Horseradish peroxidase (EC. 1.11.1.7). **FEBS Letters**, v. 72, p. 19-23. 1976.

WELINDER, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, n. 2, p. 388-393. 1992.

WILLS, R.H.; McGLASSON, W.B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals. 4th ed. New York: CAB International, p. 262, 1998.

WIKIPÉDIA – A Enciclopédia Livre. Acerola. Disponível em <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Acerola>>. Acesso em: 07 abril. 2010.

WRIGHT, H.; NICELL, A. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 69-79, 1999.

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

ZHANG Z, PANG X, JI Z, JIANG Y Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. **Food Chemistry** V. 75 , p. 217–221, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Planejamento experimental

O planejamento dos experimentos consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura. Para tal, precisamos saber o que é que estamos procurando e utilizar técnicas apropriadas para este propósito como é o caso da metodologia da superfície de resposta (RSM) (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003).

O método do planejamento experimental é baseado na seleção de níveis (nível superior + e nível inferior -) para cada variável de entrada (variável independente) e na execução de experimentos para todas as possíveis combinações. Se n fatores (variáveis controladas pelo experimentador) estão envolvidos no estudo de um sistema, o planejamento necessita de $2n$ ensaios diferentes, que é o número mínimo para obtenção de um planejamento fatorial completo. Outros ensaios podem ser adicionados ao experimento na forma repetições a fim de se calcular o erro experimental. Com os resultados obtidos, podem-se calcular os efeitos principais e de interação das variáveis independentes sobre as respostas (variáveis dependentes), determinando quais os efeitos mais significativos para o processo em estudo.

APÊNDICE B – Estudo através do delineamento composto rotacional para Determinação do pH e Temperatura ótimos (27 ensaios):

Tabela B.1. Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo (pH e temperatura) e Unidade de Atividade Enzimática (U).

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	Unidade de Atividade Enzimática (U)
1	-1	-1	4,5	45	18,0
2	1	-1	6,5	45	26,8
3	-1	1	4,5	65	11,9
4	1	1	6,5	65	21,0
5	-1,41	0	4,0	55	11,9
6	1,41	0	7,0	55	24,0
7	0	-1,41	5,5	40	19,1
8	0	1,41	5,5	70	14,5
9	0	0	5,5	50	25,3
1	-1	-1	4,5	45	17,0
2	1	-1	6,5	45	27,7
3	-1	1	4,5	65	11,2
4	1	1	6,5	65	21,4
5	-1,41	0	4,0	55	12,5
6	1,41	0	7,0	55	25,3
7	0	-1,41	5,5	40	20,3
8	0	1,41	5,5	70	14,0
9	0	0	5,5	50	24,8
1	-1	-1	4,5	45	17,8
2	1	-1	6,5	45	26,2
3	-1	1	4,5	65	11,5
4	1	1	6,5	65	21,5
5	-1,41	0	4,0	55	12,0
6	1,41	0	7,0	55	25,5
7	0	-1,41	5,5	40	19,1
8	0	1,41	5,5	70	13,9
9	0	0	5,5	50	25,8

Gráfico B.1: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados da variável: Unidade de Atividade Enzimática (U).

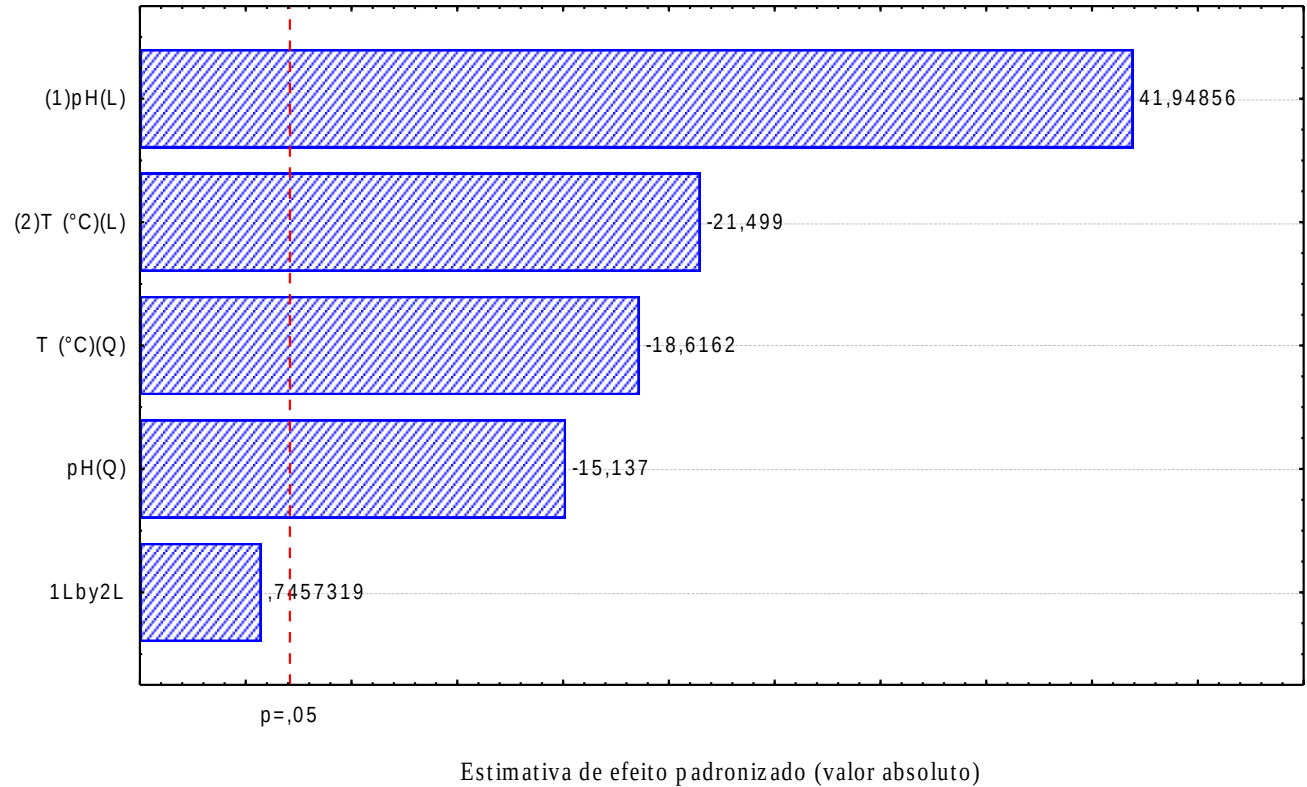
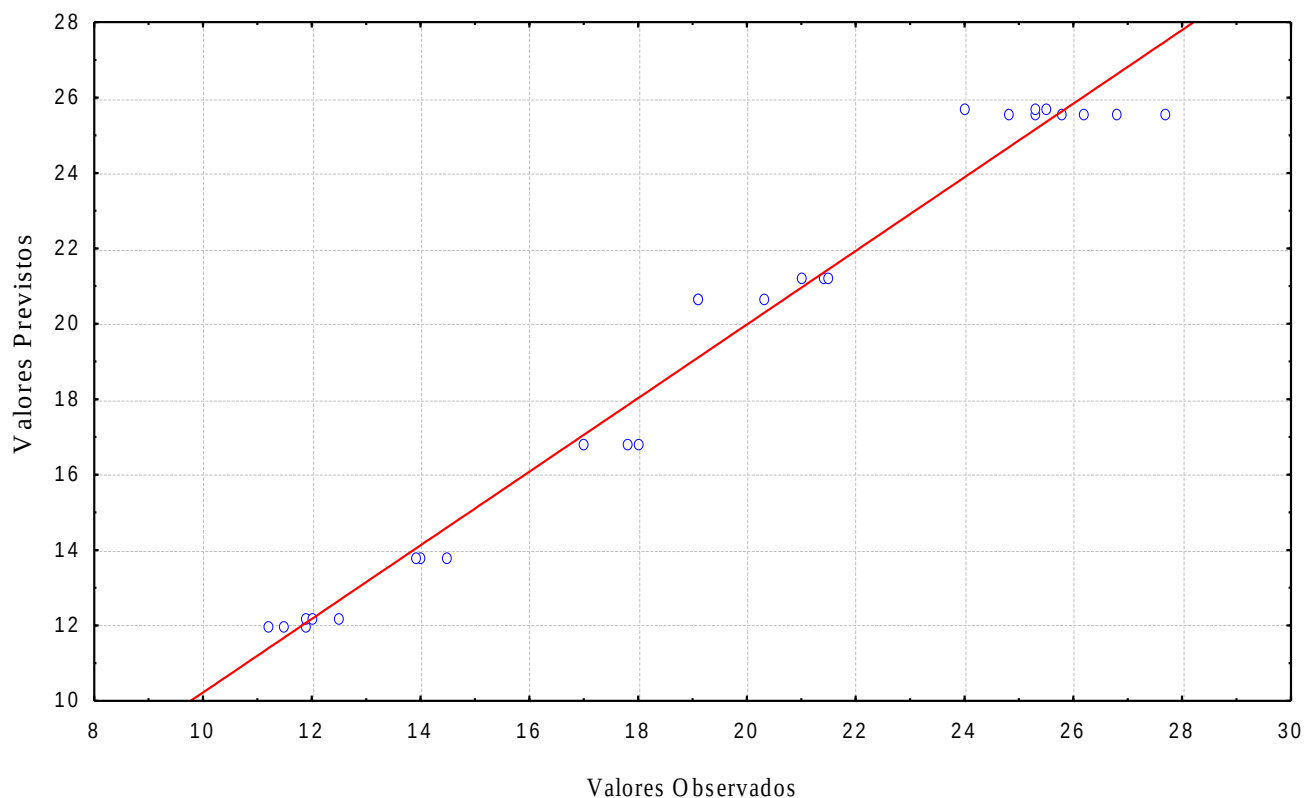


Gráfico B.2: Valores previstos x valores observados da variável: Unidade de Atividade Enzimática (U).



APÊNDICE C – Estudo através do delineamento fatorial completo para Estabilidade Térmica da Unidade de Atividade Enzimática (U) em função do tempo (horas) e da Temperatura (°C) (15 ensaios):

Tabela C.1. Planejamento fatorial completo, valores codificados e originais das variáveis de estudo (tempo e temperatura) e Unidade de Atividade Enzimática (U).

Ensaio	tempo (horas)	Temperatura (°C)	tempo (horas)	Temperatura (°C)	Unidade de Atividade Enzimática (U)
1	-1	-1	0	30	23,2
2	1	-1	24	30	21,8
3	-1	1	0	70	28,7
4	1	1	24	70	6,7
5	0	0	12	50	21,9
1	-1	-1	0	30	22,2
2	1	-1	24	30	21,5
3	-1	1	0	70	27,4
4	1	1	24	70	7,2
5	0	0	12	50	22,5
1	-1	-1	0	30	21,9
2	1	-1	24	30	21,5
3	-1	1	0	70	28,2
4	1	1	24	70	6,9
5	0	0	12	50	21,4

Gráfico C.1: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados da variável: Unidade de Atividade Enzimática (U).

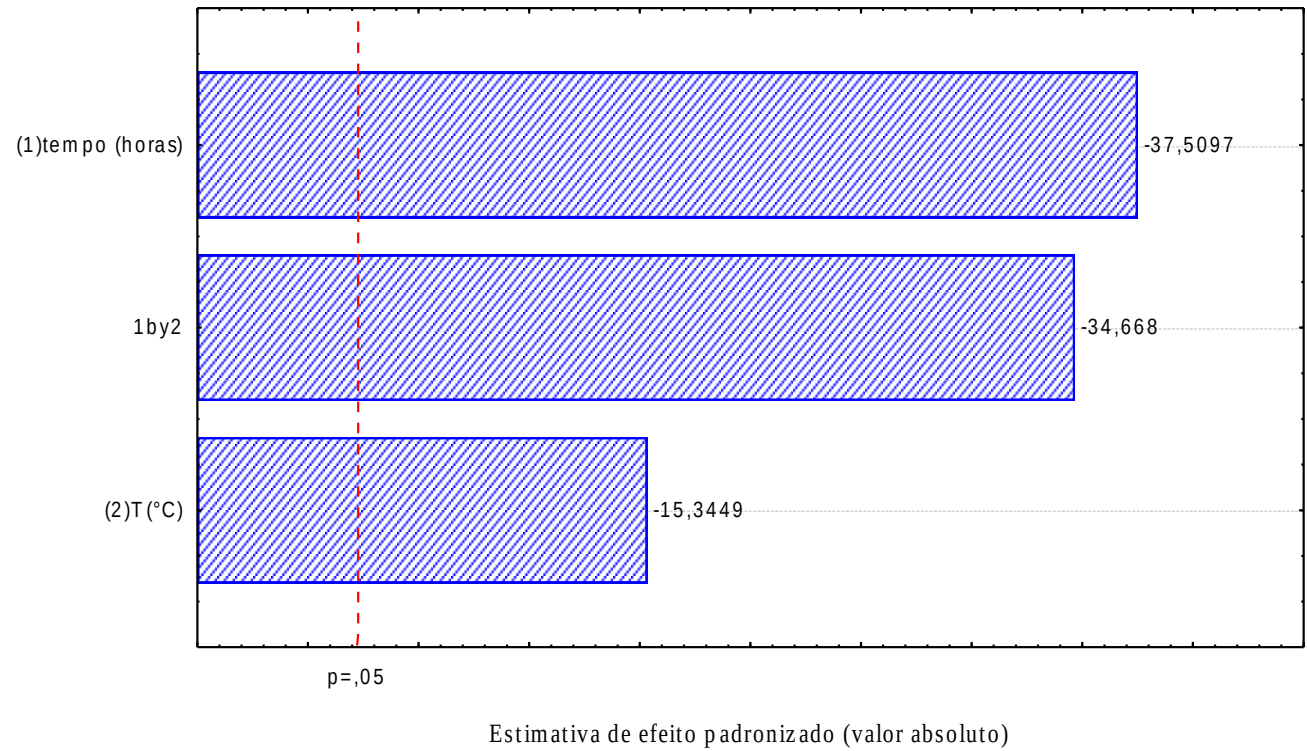
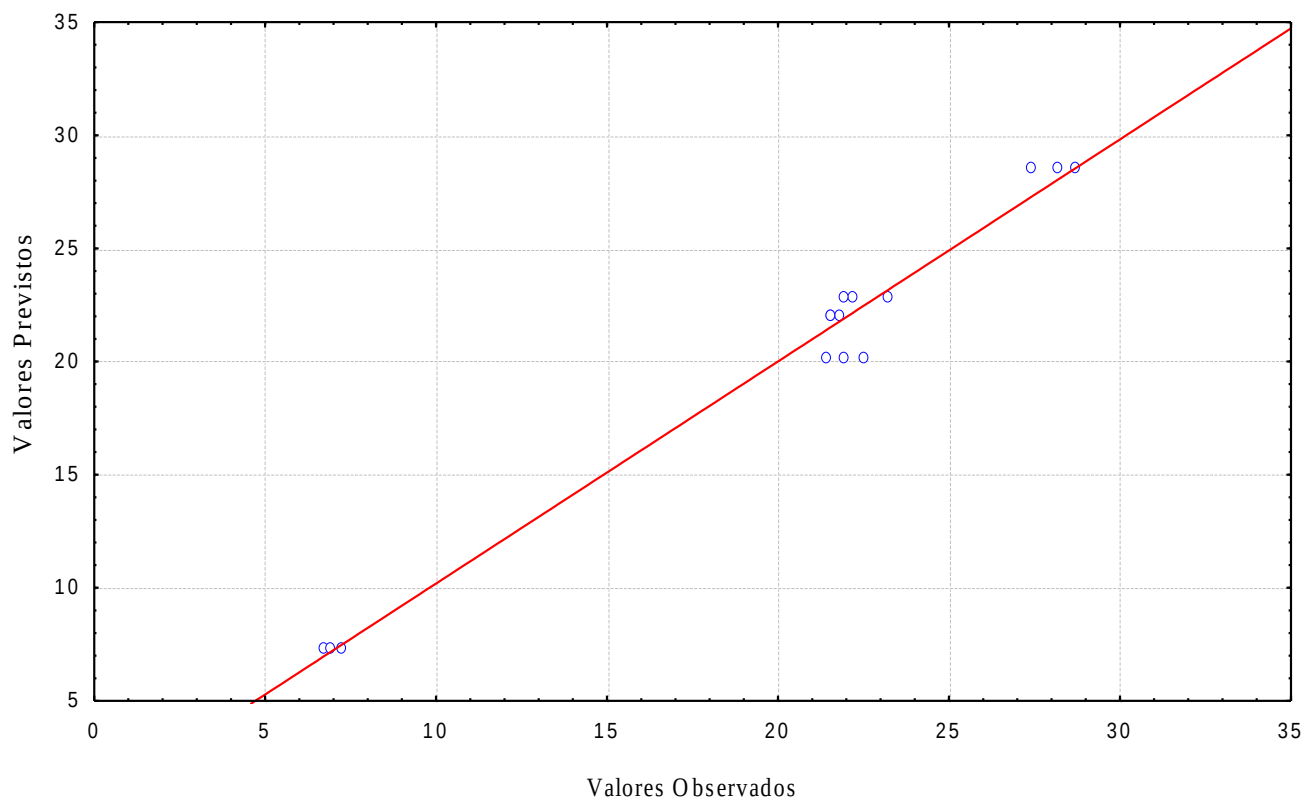


Gráfico C.2: Valores previstos x valores observados da variável: Unidade de Atividade Enzimática (U).



APÊNDICE D – Estudo através do delineamento fatorial completo para Inativação Térmica da Unidade de Atividade Enzimática (U) em função do tempo (minutos) e da Temperatura (°C) (15 ensaios):

Tabela D.1. Planejamento fatorial, valores codificados e originais das variáveis de estudo (tempo e temperatura) e Unidade de Atividade Enzimática (U).

Ensaio	tempo (minutos)	Temperatura (°C)	tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Unidade de Atividade Enzimática (U)
1	-1	-1	0	70	30,0
2	1	-1	4	70	22,9
3	-1	1	0	90	23,6
4	1	1	4	90	7,7
5	0	0	2	80	19,9
1	-1	-1	0	70	30,0
2	1	-1	4	70	21,3
3	-1	1	0	90	22,8
4	1	1	4	90	8,8
5	0	0	2	80	16,6
1	-1	-1	0	70	28,0
2	1	-1	4	70	21,6
3	-1	1	0	90	23,1
4	1	1	4	90	6,8
5	0	0	2	80	20,6

Gráfico D.1: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados da variável: Unidade de Atividade Enzimática (U).

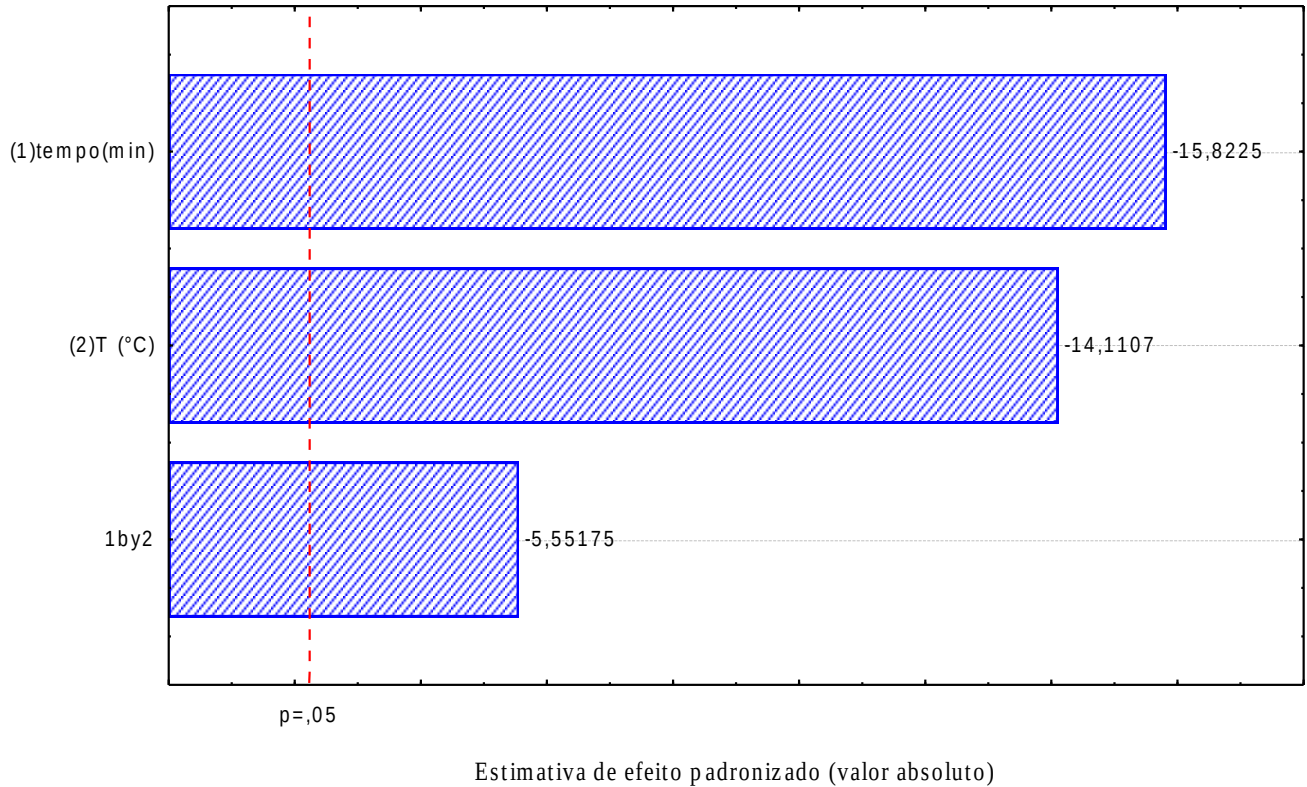


Gráfico D 2 : Valores previstos x valores observados da variável: Unidade de Atividade Enzimática (U).

