

UNIVERSIDADE ESTADAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



200206330

ESTUDO BIOQUÍMICO DAS PEROXIDASES BRUTAS DE ABACAXI
Ananas comosus (L.) Merrill : CULTIVAR IAC GOMO-DE-MEL E CLONE IAC-1.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Carlos Alexandre Kogushi de Brito**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de dezembro de 2001.

Dissertação apresentada ao curso de pós graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas, 19 de dezembro de 2001

A handwritten signature in cursive script, reading "Hélia Harumi Sato".

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Presidente da Banca

Autor: Carlos Alexandre Kogushi de Brito
Orientadora: Hélia Harumi Sato

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TIUNICAMP
	B777e
V.	47528
T.	837102
PREC.	
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA:	06-02-02
N.º CPD	

CM00163065-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

B777e Brito, Carlos Alexandre Koguishi de
Estudo bioquímico das peroxidases brutas de abacaxi *Ananas comosus* (L.) Merrill: cultivar IAC gomo –de-mel e clone IAC-1 / Carlos Alexandre Koguishi de Brito. – Campinas, SP: [s.n], 2001.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Peroxidase. 2.Bioquímica. 3.Abacaxi. 4.Enzima. I.Sato, Hélia Harumi. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. II.Titulo.

BANCA EXAMINADORA

Hélia Harumi Sato

Profª Drª Hélia Harumi Sato
(Orientadora)

Hilary C. de Menezes

Profª Drª Hilary C. de Menezes
(Membro)

Ademár Spironello

Dr Ademár Spironello
(Membro)

Profª Drª Glaucia Maria Pastore
(Suplente)

Campinas, de Abril de 2001.

*“O Importante na vida não é ser, ter ou aparecer...
O Importante é fazer, construir e desenvolver
com coragem e determinação”...*

*“ A vida só é digna de ser vivida, quando
se faz algo pela vida em vida” ...*

AGRADECIMENTOS

À professora e amiga Hélia Harumi Sato, pela valiosa orientação na condução deste trabalho e também, dedicação e disposição em colaborar.

A Ademar Spironello e Walter José Siqueira do Instituto Agronômico de Campinas, que gentilmente cederam as amostras de abacaxi imprescindíveis para o desenvolvimento da pesquisa e também pela colaboração e amizade.

A José Maria Monteiro Sigrist e Giovana (Fruthotec) do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela simpatia e colaboração em parte das análises físico-químicas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos- UNICAMP, que como um todo me recebeu muito bem.

Aos funcionários da FEA e da UNICAMP como um todo, pela disposição em colaborar e simpatia.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

Aos funcionários e colegas de laboratório (Bioquímica e Microbiologia).

Aos *meus amigos* que de alguma forma ou de outra colaboraram e me deram incentivo para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIACÕES

CNPMF	Centro Nacional de Pesquisa da Mandioca e Fruticultura
cv.	Cultivar
Fe ³⁺	Ferro III (Férrico)
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HRP	Horseradish peroxidase
HTST	High Temperature Short Time
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
Kcal	Quilocalorias
KCN	Cianeto de Potássio
nm	Nanômetro
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
TCA	Ácido Tricloroacético
TRIS	Tris (hidroximetil) aminoetano
mM	Milimolar

ÍNDICE

Resumo	1
Summary	4
1. Introdução	7
2. Revisão Bibliográfica	10
3. Material e Métodos	33
3.1 Colheita das amostras de abacaxi	33
3.2 Análises Químicas	37
3.2.1 Textura e Sólidos Solúveis em °Brix	37
3.2.2 Determinação de Ácido Ascórbico	37
3.2.3 Determinação de pH	37
3.2.4 Acidez total	38
3.3 Preparação dos extratos enzimáticos	38
3.4 Determinação de atividade de peroxidase, bromelina e polifenoloxidase	39
3.4.1 Determinação da atividade de peroxidase	39
3.4.2 Determinação da atividade de bromelina (protease)	39
3.4.3 Determinação da atividade de polifenoloxidase	41
3.5 Caracterização bioquímica da peroxidase bruta dos abacaxis IAC-1 e IAC Gomo-de-mel	41

3.5.1 Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta ----	41
3.5.2 Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta-----	42
3.5.3 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta-	42
3.5.4 Estudo da regeneração da atividade da peroxidase bruta após tratamento térmico-----	43
3.5.5 Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta-----	43
4. Resultados e Discussão-----	44
4.1 Análises químicas e físicas da polpa de abacaxi-----	44
4.2 Determinação da atividade de peroxidase bruta-----	48
4.3 Determinação da atividade de bromelina-----	50
4.4 Determinação da atividade da polifenoloxidase-----	52
4.5 Caracterização parcial da peroxidase bruta do clone IAC-1 e do cultivar IAC Gomo-de-Mel-----	53
4.5.1 Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel -----	53
4.5.2 Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel-----	55
4.5.3 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-Mel (Ensaio preliminar)----	60
4.5.3.1 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel-----	61

4.5.3.2 Estudo da regeneração da atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel, após tratamento térmico---	64
4.5.4 Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-Mel-----	66
5. Conclusão-----	68
6. Referências Bibliográficas-----	70

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1- Abacaxi, cultivar IAC Gomo-de-mel.-----	1 e 4
Figura 2 - Estrutura da molécula protoporfirina, sítio ativo da peroxidase--	11
Figura 3 – Determinação da atividade de peroxidase-----	13
Figura 4 - IAC Gomo-de-mel maduro-----	32
Figura 5 - Gomos de abacaxi-----	32
Figura 6- Plantação de abacaxis resultantes de melhoramento genético da estação experimental de Pindorama - Estado de São Paulo.-	34
Figura 7- Amostras de abacaxi de IAC Gomo-de-Mel, IAC-1, IAC-2, IAC-3, Smooth Cayenne e Pérola.-----	35
Figura 8- Sementes de abacaxi IAC-1-----	36
Figura 9- Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel-----	53
Figura 10, 11 e 12 - Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel-----	55, 56 e 57
Figura 13 - Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel (análise prévia) -----	60
Figura 14 e 15 - Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel (Inativação Térmica)	61

Figuras 16 e 17 - Regeneração da atividade da peroxidase bruta de
IAC-1 e IAC Gomo-de-mel----- 64 e 65

Figura 18 e 19 – Efeito do pH na estabilidade da peroxidase brutas de
IAC-1 e IAC Gomo-de-mel----- 66 e 67

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1 – Comparações entre os parâmetros físicos e químicos obtidos e considerados ideais ao consumo <i>in natura</i> e à industrialização, respectivamente para os cultivares Pérola e Smooth Cayenne—	29
Tabela 2 – Textura da polpa dos cultivares de abacaxi IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola e dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3-----	46
Tabela 3 – Sólidos solúveis em (°Brix) da polpa dos cultivares de abacaxi IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola e dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3-----	46
Tabela 4 – pH da polpa dos cultivares de abacaxi IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola e dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3-----	47
Tabela 5 – Acidez da polpa dos cultivares de abacaxi IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola e dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 -----	47
Tabela 6 - Teor de ácido ascórbico da polpa dos cultivares de abacaxi IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola e dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 -----	48
Tabela 7 – Atividade de peroxidase da polpa dos cultivares de abacaxi IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola e dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 -----	50
Tabela 8 – Atividade de bromelina da polpa dos cultivares de abacaxi IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola e dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 -----	51

RESUMO

Foram desenvolvidos no IAC (Instituto Agronômico de Campinas) , clones de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill), com características organolépticas mais desejáveis e resistentes à fusariose, resultantes de melhoramento genético por meio de cruzamentos dirigidos e ao acaso (SPIRONELLO *et alii*, 1994).

O Instituto Agronômico de Campinas (IAC) selecionou alguns clones de abacaxi criados, como TP x ? nº 2 (IAC-1), TP x ? nº 3 (IAC-2) e RT x nº 15 (IAC-3), além do novo cultivar IAC Gomo-de-mel, recentemente indicado para cultivo. Este, apresenta como característica principal: gomos que podem ser destacados manualmente,

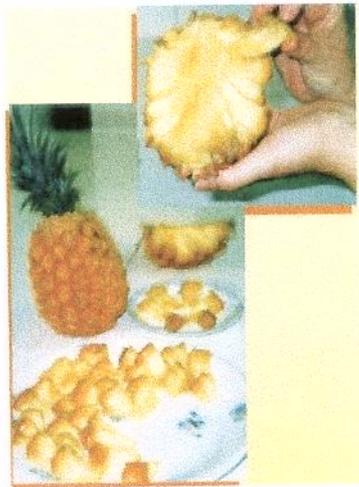


Figura 1. IAC Gomo-de-mel (USBERTI FILHO *et alii*, 1999).

além de fatores desejáveis, como: elevado ^oBrix (doçura), de baixa a moderada acidez, consistência tenra, suculência e coloração atraente - amarelo ouro (USBERTI FILHO *et alii*, 1999). Entretanto, ainda não tiveram suas peroxidases avaliadas quanto às suas propriedades bioquímicas.

Sendo a peroxidase (E.C. 1.11.1.7 doador: peróxido de hidrogênio oxidoreductase) uma enzima associada a reações de deterioração oxidativa em

frutas e vegetais *in natura* e seus produtos processados (HAARD, 1977); o presente trabalho teve por objetivo: a avaliação quantitativa da peroxidase nos clones de abacaxi (IAC1, IAC-2 e IAC-3) e no cultivar IAC Gomo-de-mel em comparação com os cultivares comerciais Pérola e Smooth Cayenne e a caracterização parcial da peroxidase bruta, daqueles abacaxis que apresentaram maior atividade enzimática (cultivar IAC Gomo-de-mel e clone IAC-1). Foram estudados o efeito do pH e da temperatura na atividade e na estabilidade da preparação bruta da peroxidase.

Foram determinadas também algumas características das polpas de abacaxi, como: pH, °Brix, conteúdo de ácido ascórbico, acidez total e atividade de bromelina e polifenoloxidase.

As amostras de abacaxi, obtidas na Estação Experimental de Agronomia de Pindorama (SP) do IAC, foram homogeneizadas em liquidificador e centrifugadas a 11.000 x g por 10 minutos a 5°C e o sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima bruta. Os clones e o novo cultivar IAC Gomo-de-mel apresentaram menor atividade de peroxidase em relação aos comerciais Pérola (5624 U/g) e Smooth Cayenne (5137U/g). O clone IAC-1 e o cultivar IAC Gomo-de-mel que apresentaram maior atividade de peroxidase (4065U/g e 3194U/g, respectivamente), em relação aos demais clones, foram então, selecionados para caracterização bioquímica da peroxidase bruta.

O extrato bruto de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel apresentaram atividade ótima de peroxidase nas faixas de 50-55°C e 45-50°C, respectivamente e em pH 4,5 (tampão citrato-fosfato 0,2M). A peroxidase de IAC-1 manteve cerca de 14% de sua atividade após 30 minutos de tratamento a 70°C e a de IAC Gomo-de-mel manteve cerca de 16% de sua atividade, sendo que a inativação só foi observada após tratamento térmico a 90°C por 2 minutos. As peroxidases de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel mostraram-se estáveis na faixa de pH 3,0 a 9,0 após 24 horas de incubação a 5°C e após 3 horas à temperatura ambiente.

Quanto às características da polpa, observou-se que os abacaxis IAC-1 e IAC Gomo-de-mel apresentaram textura similar a Pérola e Smooth Cayenne (de 0,5 a 0,8 Kgf); os abacaxis IAC Gomo-de-mel, IAC-2 e IAC-3 apresentaram valores de doçura mais elevados (de 14,7 a 19,4°Brix) do que os cultivares comerciais (de 11,7 a 14,4°Brix). Abacaxis IAC Gomo-de-mel, IAC-1 e IAC-2 apresentaram menor atividade de bromelina (0,84 a 0,87 U de bromelina/ g de polpa). Os abacaxis do cultivar IAC Gomo-de-mel e os clones de abacaxi (IAC-1, IAC-2 e IAC-3) apresentaram pH em torno de 3,0 a 4,0, menor acidez total e maior concentração de ácido ascórbico que os cultivares comerciais. Não foi detectado atividade de polifenoloxidase no suco de abacaxi, nas condições de ensaio.

SUMMARY

New pineapple cultivars of *Ananas comosus* (L.) Merrill were developed at Campinas Agronomic Institute - IAC, with more desirable organoleptic characteristics and also fusariose resistant, resulting from genetic improvement by chance and programmed crosses (SPIRONELLO *et alii*, 1994).

The Campinas Agronomic Institute selected some pineapple clones such as TP x ? n°2 (IAC-1), TP x ? n°3 (IAC-2) and RT x ? n°15 (IAC-3), plus the new cultivar IAC Gomo-de-mel, recently indicated for cultivation, which presents as a principal characteristic, segments which can be separated by hand, as well as

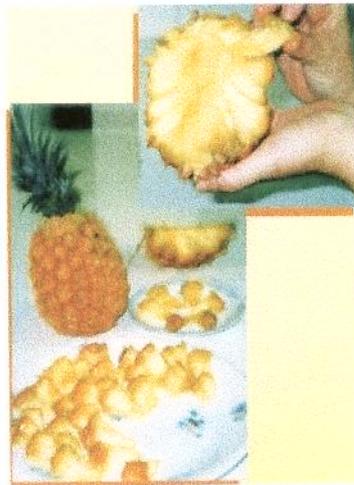


Figure.1 IAC Gomo-de-mel (USBERTI FILHO *et alii*, 1999).

some other desirable factors such as: high °Brix, low to moderate acidity, tender consistency and attractive gold yellow color (USBERTI FILHO *et alii*, 1999). However, these new pineapple cultivars have not had their peroxidases evaluated with respect to their biochemical characteristics.

Since peroxidase (E.C. 1.11.1.7 hydrogen peroxide donor oxidoreductase) is an enzyme associated with oxidative deteriorative reactions in fruits and vegetables *in natura* and in their processed products (HAARD, 1977), the

objective of this study was to quantitatively evaluate the peroxidase of the pineapple clones (IAC-1, IAC-2, IAC-3) and the cultivar IAC Gomo-de-mel) and compare the values with those of the commercial cultivars Pérola and Smooth Cayenne. A partial characterization of the crude peroxidase extract was also carried out for those pineapple cultivars which presented greater enzymatic activity (IAC-1 and IAC Gomo-de-mel). The effects of pH and temperature on the activity and stability of the crude peroxidase extracts were also determined.

Some characteristics of the pineapple pulp such as: pH, °Brix, ascorbic acid content, total acidity and bromelain and polyphenol activities, were also quantified.

The pineapple samples obtained from the Agronomic Experimental Stations of Pindorama (SP), part of IAC, were homogenized and centrifuged at 11.000 x g for 10 minutes at 5°C, and the supernatant used as the crude extract. The clones and the new cultivar IAC Gomo-de-mel presented low peroxidase activity as compared to the commercial cultivars Pérola (5624 U/g) and Smooth Cayenne (5137 U/g). The clone IAC-1 and the cultivar IAC Gomo-de-mel presented the highest activity as compared to the other clones (4065 U/g and 3194 U/g respectively) and were therefore selected for the biochemical characterization of their crude extracts.

The crude extracts of IAC-1 and IAC Gomo-de-mel presented their optimum peroxidase activity in the zone from 50 to 55°C and 45 to 50°C respectively and at pH 4.5 (citrate phosphate buffer 0.2M). The IAC-1 peroxidase retained 14% of its activity after 30 minutes of heat treatment at 70°C and IAC Gomo-de-mel peroxidase retained 16% of its activity. Heat inactivation was only observed after treatment at 90°C for 2 minutes. The peroxidases of IAC-1 and IAC Gomo-de-mel remained stable at pH 3.0 to 9.0 after incubation at 5°C for 24 hours and at room temperature for 3 hours.

With respect to the pulp characteristics, it was observed that the cultivars IAC-1 and IAC Gomo-de-mel showed textures similar to Pérola and Smooth Cayenne (from 0.5 to 0.8 Kgf). The IAC Gomo-de-mel, IAC-2 and IAC-3 pineapples showed high values for sweetness (14.7 to 19.4 °Brix) as compared to the commercial cultivars (11.7 to 14.4 °Brix). The IAC Gomo-de-mel, IAC-1 and IAC-2 pineapples presented low activities of bromelain (0.84 to 0.87 U of bromelain per gramme of pulp). The pineapple cultivar IAC Gomo-de-mel and the clones (IAC-1, IAC-2 and IAC-3) showed pH values between 3.0 and 4.0, lower total acidities and higher contents of ascorbic acid than the commercial cultivars. Polyphenoloxidase activity was not detected in the crude pineapple extract under the assay conditions.

1. INTRODUÇÃO

Existem diversas enzimas oxidativas que promovem alterações em alimentos. Nos vegetais, peroxidase, ácido ascórbico oxidase, tirosinase e polifenoloxidase podem causar reações químicas não desejáveis. O escurecimento dos tecidos de frutos ocorre principalmente pela oxidação enzimática dos compostos fenólicos, reação essa catalisada por duas enzimas: a polifenoloxidase e a peroxidase (BRAVERMAN, 1967).

Algumas dessas reações causam mudanças indesejáveis no *flavor*, aroma e cor, ocorrendo também perda de nutrientes e a coloração escura. A acumulação dos produtos das reações das peroxidases pode ocorrer durante a senescência dos frutos. A formação desses produtos, desde o início até o fim, produz radicais livres, que provavelmente causam danos nas organelas e membranas (HEMEDA & KLEIN, 1990).

O estudo da peroxidase é de grande importância, pois ela pode interferir na qualidade dos produtos tanto para os industrializados como para os de consumo *in natura*, podendo até mesmo influenciar na deterioração de alimentos quando armazenados, desenvolvendo sabores e odores indesejáveis nos produtos (LEE & HAMMES, 1979; HAARD, 1977).

O cultivo de abacaxi está crescendo extensivamente nas Filipinas, no Caribe, na Malásia, em Taiwan, na Tailândia, na Austrália, no México, no Kênia e no Sul da África. É uma das frutas não cítricas tropicais e subtropicais mais populares, devido ao seu aroma atrativo e refrescante e equilíbrio açúcar-ácido (BARTOLOMÉ *et alii*, 1995).

O Brasil é o segundo produtor mundial de abacaxi (1,62 milhões de toneladas em 45.000 hectares plantados) somente superado pela Tailândia com

1,98 milhões de toneladas (USBERTI FILHO *et alii*, 1999). A área colhida da cultura de abacaxi no Brasil cresceu no período recente, evoluindo de 45,3 para 53,0 mil hectares no triênio 1995-1997. As unidades da Federação com maior área de cultivo de abacaxi são Minas Gerais (25,5%), Pará (19,6%) e Paraíba (12,8%) (GONÇALVES *et alii*, 1998).

A quantidade produzida aumentou de 1,28 milhões de toneladas em 1995 para 1,47 milhões de toneladas em 1998, representando um crescimento de 14,8%. A exportação para os principais países compradores de fruto *in natura* e de suco concentrado, entre eles, a Argentina, Uruguai, Países Baixos, Estados Unidos, entre outros, foi de 12,9 mil toneladas em 1997 para abacaxi *in natura* e 762 toneladas para o suco concentrado (AGRIANUAL, 1999).

Segundo a AGRIANUAL (2000), até Julho de 1999 a produção de abacaxi no Brasil foi de 2.383.790 toneladas e a exportação foi de 3700 toneladas para o fruto *in natura* e 1693 toneladas para o suco de abacaxi.

Desde 1991, o Instituto Agrônomo de Campinas vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético de abacaxi, visando a resistência à doença fusariose e características agrícolas e organolépticas mais desejáveis (SPIRONELLO *et alii*, 1994).

O IAC selecionou alguns clones de abacaxi criados, além do novo cultivar IAC Gomo-de-mel, recentemente indicado para cultivo, o qual reúne vários fatores desejáveis: elevado °Brix (doçura), de baixa a moderada acidez, consistência tenra, suculência e coloração atraente - amarelo ouro (USBERTI FILHO *et alii*, 1999). Entretanto, estes abacaxis ainda não foram avaliadas quanto as características bioquímicas.

Por ser de interesse conhecer o perfil da enzima peroxidase em possíveis novos cultivares para processamento e comercialização, avaliou-se

quantitativamente a peroxidase no novo cultivar IAC Gomo-de-mel e nos clones de abacaxi (IAC-1, IAC-2, IAC-3) em comparação com os cultivares comerciais Smooth Cayenne e Pérola. Estudou-se a caracterização parcial da peroxidase bruta, do novo cultivar IAC Gomo-de-mel e do clone IAC-1, que apresentaram maior atividade enzimática. Foram determinadas, também, algumas características das polpas de abacaxi como: pH, °Brix, textura, conteúdo de ácido ascórbico, acidez total, atividade de bromelina e polifenoloxidase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Peroxidase (POD)

Em 1855, Schoenbein (citado por WHITAKER, 1994) observou que extratos de alguns cogumelos e tecidos animais desenvolviam uma cor azul, em soluções de guaiacol, na presença de ar ou soluções diluídas de peróxido de hidrogênio; esta atividade foi atribuída à peroxidase. As peroxidases estão amplamente difundidas nos reinos animal e vegetal e são encontradas também em microrganismos (DUNDFORD, 1991)

A peroxidase (EC 1.11.1.7, doador: H₂O₂ oxidoreductase) é um membro de um importante grupo de enzimas chamadas oxidoreductases, que estão envolvidas em reações deteriorativas de frutas e vegetais (HAMMER, 1993). A polifenoloxidase e a peroxidase são as duas principais enzimas responsáveis pelo escurecimento dos tecidos de frutos envolvendo compostos fenólicos (BRAVERMAN, 1967). Segundo MELLO & CLEMENTE (1996), a peroxidase tem um aumento em sua solubilidade durante o período de maturação da fruta e, conseqüentemente, um aumento na atividade no pós-climatério. Acredita-se que, em pós colheita de frutas e vegetais, as peroxidases são responsáveis por mudanças indesejáveis no *flavor*, textura, aroma e cor, ocorrendo também perda de nutrientes e coloração escura (REED, 1975; BURNETTE, 1977; HEMEDA & KLEIN, 1990; CLEMENTE & PASTORE, 1998).

A peroxidase é intracelular (REED, 1975) e não específica, catalisando a oxidação de um grande número de fenóis e anéis aromáticos que ocorrem naturalmente em tecidos de plantas (Summer & Somners (1947) citado por BURNETTE, 1977). Peroxidases de várias fontes contêm um grupo prostético heme (Fe³⁺ protoporfirínico) e possuem uma variedade de funções biossintéticas e

degradativas, usando o peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons (DAWSON, 1988).

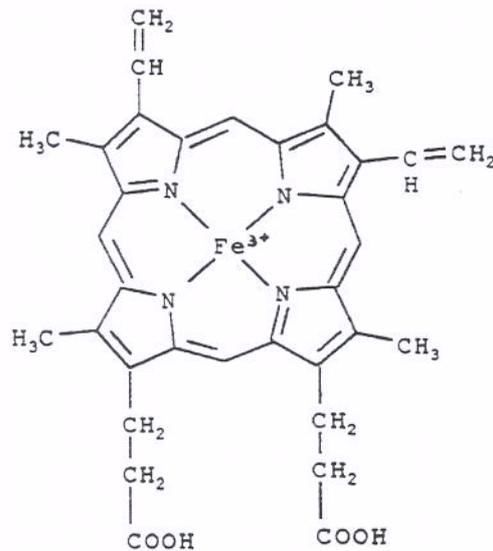


Figura.2 Estrutura da molécula protoporfirina, sítio ativo da peroxidase

O mecanismo geral da peroxidase é o seguinte:



Na reação o peróxido é reduzido enquanto que um doador de elétron (AH_2) é oxidado. O composto ROOH pode ser peróxido de hidrogênio ou outro peróxido orgânico, tal como peróxido de metil ou etil hidrogênio (BURNETTE, 1977; KERMASHA & METCHE, 1988). O doador de elétrons pode ser ascorbato, fenóis, aminas ou outros compostos orgânicos. Em muitos casos o produto de oxidação é altamente colorido e isto serve como base para a determinação colorimétrica da atividade de peroxidase.

A peroxidase catalisa a oxidação de fenóis (guaiacol, p-cresol), aminas aromáticas (anilina, o-dianisidina) e outros compostos orgânicos na presença de peróxido de hidrogênio (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981; ROBINSON, 1991). E pode

catalisar também, reações catalíticas, oxidativas e de hidroxilação (WHITAKER, 1994).

A peroxidase pode participar da destruição oxidativa de vitamina C, catalisar o branqueamento dos carotenóides na ausência de ácidos graxos insaturados e a descoloração de antocianinas. Catalisa a reação de degradação de ácidos graxos insaturados, produzindo compostos voláteis que alteram o sabor (RICHARDSON & HYSLOP, 1985).

A peroxidase pode combinar com peróxido de hidrogênio para produzir um complexo ativo, o qual pode reagir com várias moléculas doadoras; algumas dessas reações causam mudanças indesejáveis, como a descoloração em alimentos (HEMEDA & KLEIN, 1990). Segundo Awahata & Neal (1982), citados por (KHAN & ROBINSON, 1993), as peroxidases estão envolvidas na descoloração catalítica de antocianinas e outros pigmentos encontrados em plantas como cartamina.

As peroxidases são classificadas em três classes: Ferriprotoporfirina peroxidase, Verdoperoxidase e Flavoproteína peroxidase (WHITAKER, 1994).

As peroxidases ferriprotoporfirínicas, que incluem as plantas superiores, possuem ferriprotoporfirina III (Fe^{3+}) como grupo prostético. Essa enzima realiza reações oxidativas, podendo ter como substrato o ácido ascórbico na presença de oxigênio (LEE & HAMMES, 1979).

A peroxidase não existe como uma simples enzima, e sim é encontrada na forma de um número discreto de isoenzimas (isoperoxidases), as quais são detectadas por eletroforese. Baseado em seu ponto isoelétrico as isoenzimas são classificadas em catiônicas (grupos básicos) e aniônicas (grupos ácidos) (ROBINSON, 1991; CLEMENTE & PASTORE, 1998).

A determinação da atividade de peroxidase pode ser feita por espectrofotometria, usando o guaiacol e o peróxido de hidrogênio como substrato. O aumento de absorbância a 470 nm é medido em função do tempo (WHITAKER, 1994). A oxidação de aminas aromáticas como diaminobenzidina e o-dianisidina tem sido usada na determinação quantitativa de peroxidase, contudo aminas aromáticas deste tipo são carcinogênicas e devem ser manipuladas com cuidado (RICHARDSON & HYSLOP, 1985).

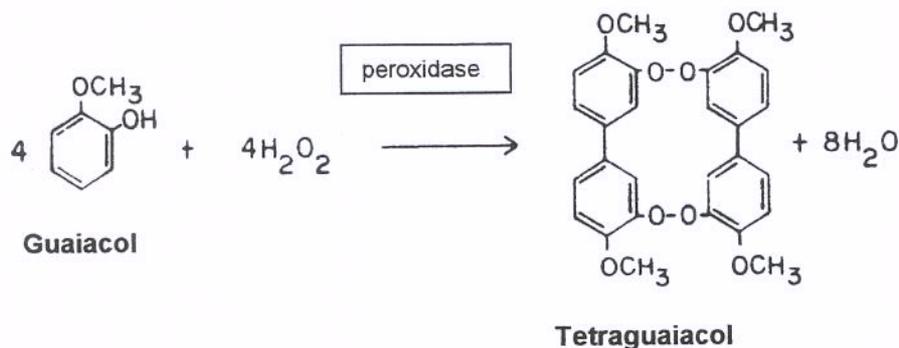


Figura. 3 Determinação da atividade de peroxidase

De todas as peroxidases de vegetais, a mais conhecida e estudada pelos enzimologistas é a *horseradish* peroxidase (HRP). Esta enzima é amplamente utilizada em testes bioquímicos e técnicas de imunoenensaio (HAMMER, 1993).

HINER *et alii* (1996) avaliaram diferentes preparações comerciais de *horseradish* peroxidase. Os autores relataram que todas as enzimas foram inativadas por peróxido de hidrogênio, quando este era fornecido como único substrato. A atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria, utilizando-se guaiacol como substrato redutor e os produtos de reação medidos a 460 nm para o produto de oxidação do guaiacol.

A peroxidase é uma das enzimas mais termoestáveis relatada em vegetais (REED, 1975; BURNETTE, 1977). Podem apresentar diferentes valores de pH ótimo de atividade, dependendo do substrato empregado, sendo que após certas condições de tratamento pode regenerar sua atividade durante o armazenamento de alimentos processados (LU & WHITAKER, 1974; REED, 1975; BURNETTE, 1977; CLEMENTE, 1995).

WENG *et alii* (1991) verificaram a termoestabilidade de peroxidase solúvel e imobilizada de *horseradish*, na faixa de temperatura de 65°C a 98°C. Os autores sugeriram a utilização da enzima como bioindicador para avaliar a eficiência da pasteurização.

Considera-se que a inativação da peroxidase é acompanhada pela desnaturação de todas as outras enzimas (RICHARDSON & HYSLOP, 1985; KHAN & ROBINSON, 1993). A inativação da POD têm sido convencionalmente usada como indicador da eficiência do branqueamento no processamento de vegetais (BURNETTE, 1977).

Há uma relação empírica entre a prevenção de *off flavours* desenvolvidos em vegetais congelados e inativação da POD (LOPEZ-SERRANO & BURGOS, 1995).

Sua habilidade em se regenerar, após desnaturação pelo calor, varia entre as diferentes espécies de plantas e também entre as isoenzimas. A restauração da atividade peroxidásica é geralmente observada em período de poucas horas, após o tratamento térmico da solução da enzima ou vegetal (SCOTT, 1975; CLEMENTE, 1996).

SILVA & NOGUEIRA (1983) estudaram o efeito do calor na atividade da polifenoloxidase e da peroxidase em algumas frutas e hortaliças, bem como avaliaram a regeneração dessas enzimas após processamento térmico.

Concluíram que nas frutas a polifenoloxidase apresentou maior resistência à inativação pelo calor que a peroxidase e que nas hortaliças ocorreu o inverso. Conseguiu-se 100% de inibição da atividade da peroxidase em pêra, banana, maçã e pêsego com tratamento a 80°C por 2 minutos. O fenômeno da regeneração após processamento térmico foi constatado somente no caso da peroxidase. A regeneração ocorreu após 60 dias do processamento na maçã, que apesar da pouca atividade do extrato *in natura*, foi a peroxidase que se mostrou mais estável ao tratamento térmico, apresentando maior taxa de regeneração durante o armazenamento (38,4%).

NOGUEIRA & SILVA (1989) compararam o efeito do calor, dióxido de enxofre e ácido ascórbico no controle do escurecimento enzimático em algumas frutas e hortaliças. Os resultados mostraram que para banana, pêsego e maçã, o calor foi o melhor agente inativador do sistema enzimático (polifenoloxidase e peroxidase), responsável pelo escurecimento .

Os tratamentos térmicos comercialmente usados para o processamento de extratos de frutas e vegetais, como temperatura elevada por curto tempo (HTST) são poucos efetivos para uma inativação irreversível da peroxidase (KHAN & ROBINSON,1993).

A inativação térmica das peroxidases mostra diferentes graus de dependência de fatores relacionados tanto à fonte da enzima, quanto às condições e/ou parâmetros de inativação, na ausência e presença de diferentes aditivos. Este comportamento frente à ação da temperatura tem sido explorado como forma de redução e/ou eliminação do surgimento de sabores e odores estranhos na fase de pós industrialização de frutos e vegetais (CLEMENTE, 1996).

Estudos da inativação térmica da peroxidase em extratos de plantas têm mostrado, de maneira geral, ser não linear com relação aos fatores de tempo e

temperatura, devendo este fato estar associado à presença de isoperoxidasas com diferentes graus de termoestabilidade (LU & WHITAKER, 1974; BURNETTE, 1977; ROBINSON, 1991; CLEMENTE, 1995, 1996; ALVIM & CLEMENTE, 1998). Quanto mais termoestáveis forem as isoperoxidasas, mais não lineares serão as curvas de inativação térmica (Mc Lellan & Robinson, (1987) citado por ROBINSON, 1991).

A perda da atividade da peroxidase durante o tratamento térmico está associada com a origem da enzima, pH, concentração enzimática e métodos de ensaio (LU & WHITAKER, 1974; CLEMENTE, 1995).

A atividade oxidativa da peroxidase é afetada pelo pH; a acidificação causa uma mudança na forma nativa da proteína para um estado reversível de desnaturação, causando um distúrbio na interação heme da proteína e com perda da estabilidade da enzima. Devido à presença de várias isoenzimas, as isoperoxidasas menos resistentes à temperatura formam agregados com o grupo heme que está exposto, sendo capazes, nessa forma, de catalisar a oxidação lipídica, mas incapazes de catalisar a degradação de peróxido de hidrogênio. As isoperoxidasas mais termoresistentes não formam agregados na mesma extensão, sendo responsáveis pela atividade residual da enzima (LU & WHITAKER, 1974).

O pH ótimo de atividade da peroxidase varia com a fonte enzimática, com a composição de isoenzimas e com o substrato doador e tampão aplicado. A ampla faixa de pH observado para diferentes fontes é devido à presença de isoenzimas de diferentes valores de pH ótimo (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A peroxidase está associada também ao mecanismo de autoproteção da planta através da formação de lignina. Essa enzima protege os tecidos contra os efeitos do peróxido de hidrogênio formado durante o metabolismo celular. No entanto, a atividade da enzima pode levar à destruição da vitamina C e a descoloração de carotenóides e antocianinas, além de catalisar a degradação não enzimática de ácidos graxos insaturados, com conseqüente formação de compostos voláteis. Seu pH ótimo varia de 3 a 7 e o bloqueador principal, o metabissulfito, tem ação na destruição do peróxido de hidrogênio, bloqueando a atividade pela manutenção do substrato (doador de hidrogênio) na sua forma reduzida (ARAÚJO, 1995).

Peroxidase de Abacaxi

BEAUDREAU & YASUNOBU (1966) obtiveram na forma cristalina, uma peroxidase B do caule de abacaxi (*Ananas comosus (L.) Merrill*). Estudando as propriedades bioquímicas da enzima, verificaram que se trata de uma peroxidase atípica: pH ótimo ácido e baixa atividade específica. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o guaiacol como substrato redutor; os produtos de reação foram medidos a 470 nm, para o produto de oxidação do guaiacol. Para o extrato bruto, a atividade foi de 24.800 unidades/ml. O pH ótimo da enzima foi determinado usando-se soluções tampão de 0.2 M de diferentes valores de pH, mostrando um pH ótimo ácido de 4,2 em tampão acetato. A atividade de peroxidase em tampão acetato pH 4,2, mostrou ser independente da concentração do tampão entre 0,1 e 0,2 M.

FERREIRA (1983) purificou e caracterizou a peroxidase de abacaxi do cultivar Pérola. A determinação da atividade peroxidásica foi feita por meio de método espectrofotométrico a 460 nm, utilizando a o-dianisidina como substrato. A peroxidase bruta apresentou uma atividade total de 14,6 unidades/minuto/ml de

suco e uma atividade específica de 8,59 unidades/minuto/mg proteína. O autor relatou que a peroxidase fracionada com sulfato de amônio apresentou um pH ótimo de 5,0, mostrando que a enzima atuou melhor em pH levemente ácido e a energia de ativação foi de cerca de 23,18 Kcal/mol para a fração mais termolábil e 38,80 Kcal/mol para a mais termoresistente.

VAN LELYVELD *et alii* (1991) estudaram os efeitos de várias temperaturas de estocagem (durante 30 dias) na atividade de peroxidase de abacaxi cv. *Queen*. Concluíram que a atividade de peroxidase tem correlação com a temperatura de estocagem e o aparecimento dos sintomas de injúrias (escurecimento interno da polpa). Armazenamento em temperaturas de 10°C, 12°C e 16°C resultaram em um aumento da atividade de peroxidase com escurecimento interno do centro e da polpa do abacaxi.

BOTREL & CARVALHO (1993 b) estudaram o efeito do peso do abacaxi Smooth Cayenne no escurecimento interno e na qualidade do fruto e as mudanças ocorridas, após armazenamento (com e sem refrigeração), na atividade da polifenoloxidase e peroxidase e na composição de compostos fenólicos. Observou-se que os frutos avaliados no dia da colheita e aqueles armazenados em condições ambientais não apresentaram sintomas de escurecimento interno. Após o armazenamento com e sem refrigeração, foi detectado aumento da atividade enzimática de peroxidase.

SUNG *et alii* (1993) purificaram 12 isoenzimas da peroxidase do extrato de caule de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) e estudaram algumas propriedades dessas isoenzimas. A atividade de peroxidase foi medida por método espectrofotométrico a 425 nm, utilizando a o-fenildiamina como substrato. Para a peroxidase precipitada entre 55-90% de saturação com sulfato de amônio, a atividade foi de 77.500 unidades em um volume de 80ml. A peroxidase apresentou pH ótimo de atividade entre 5,5 a 6,0 em tampão 0,1M ácido cítrico-fosfato.

MELLO & CLEMENTE (1996) analisaram a termoestabilidade do extrato bruto de peroxidase solúvel e peroxidase iônica de abacaxi num tratamento térmico nas temperaturas de 60°C e 75°C por um período máximo de 10 minutos. Relataram que a inativação térmica da peroxidase mostrou um comportamento não linear, como consequência da presença de isoperoxidasas com diferentes termoestabilidades; a fração solúvel apresentou maior resistência ao tratamento térmico.

Segundo LIMA (1998) para inativar enzimas e inibir o crescimento de microrganismos, o processamento de suco de abacaxi por processo não tradicional utiliza evaporadores no qual o suco é aquecido a 90°C a 95°C durante 30 a 40 segundos.

GONÇALVES *et alii* (2000) estudaram um tratamento alternativo para conservação de frutos de abacaxi Smooth Cayenne, associando tratamento com cloreto de cálcio, imersão em água aquecida. Verificou-se a influência da aplicação, pós-colheita, de cloreto de cálcio a 2%, associada ao tratamento hidrotérmico (38°C e 40°C) por 10 e 20 minutos de imersão, na composição química (fenólicos e enzimas), e na susceptibilidade ao escurecimento interno. Os tratamentos empregados não foram efetivos para evitar completamente a manifestação dos sintomas de escurecimento interno da polpa de abacaxi. Porém, ocorreram índices de escurecimento interno diferenciados nos diversos tratamentos empregados. Os frutos mais sensíveis ao escurecimento interno apresentaram maiores teores de compostos fenólicos. A imersão pós-colheita dos frutos em solução aquosa de cloreto de cálcio 2% reduziu a atividade de fenilalanina amônio liase, de peroxidase e de polifenoloxidase, bem como o teor de fenólicos na polpa, resultando num menor índice de escurecimento interno dos frutos. Sugere-se que a menor atividade enzimática demonstrada pelos frutos, pode ter sido causada pelo efeito favorável do binômio cálcio/calor, devido à atuação do cálcio na manutenção da integridade celular do tecido da polpa (evitando o contato

enzima-substrato), que foi facilitado pelo aquecimento da solução e pelo efeito do próprio calor na diminuição da atividade enzimática.

Peroxidasas de Outras Frutas:

A) Peroxidase de Açaí

CARNEIRO (2000) verificou a atividade da peroxidase da polpa de açaí, obtendo uma atividade enzimática de $6,54 \times 10^4$ U/g de amostra para a polpa não tratada e $5,94 \times 10^4$ U/g de amostra para a polpa após tratamento térmico de 70°C por 3 minutos. A redução de atividade enzimática após tratamento foi de apenas 9,2%, confirmando a termoresistência da peroxidase.

B) Peroxidase de Amora Preta

GONZALEZ *et alii* (2000) realizaram a caracterização parcial da peroxidase de dois cultivares de amora preta (Selvagem e Sem Espinho). A peroxidase apresentou pH ótimo de 6,5 em tampão fosfato de sódio 0,2 M. A atividade foi medida utilizando a o-dianisidina como substrato redutor.

C) Peroxidase de Banana

NAGLE & HAARD (1975) fracionaram e caracterizaram a peroxidase de banana madura. A fração aniônica apresentou um platô de atividade máxima em pH entre 4,5 e 5,0, enquanto que a fração catiônica apresentou um pH ótimo de 4,5 em tampão Tris - citrato 0,01 M, utilizando a o-dianisidina como substrato redutor para determinação da atividade de peroxidase.

SILVA (1981) constatou pequenos traços de atividade de peroxidase em banana. O extrato enzimático apresentou 0,5 unidades/ml e a atividade enzimática foi totalmente inibida após 2 minutos a 70 °C.

D) Peroxidase de Carambola

HOLSCHUH (2000) isolou, purificou e determinou as características bioquímicas da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola, L.*) . O extrato bruto apresentou atividade ótima de peroxidase em pH 5,5 e a isoperoxidase purificada na faixa de pH 5,7 a 5,9 em tampão fosfato de potássio 25mM. A peroxidase do extrato bruto e isoperoxidase purificada apresentaram a mesma temperatura ótima de atividade em torno de 50⁰C. A isoperoxidase permaneceu estável durante 24 horas a 0⁰C na faixa de pH 4,0 a 9,0 e a 25⁰C na faixa de pH 6,0 a 9,0. Foi inativada após tratamento a 75⁰C durante 1 hora em pH 6.0 e em pH 6,0 a 9,0 após 5 minutos de tratamento em ebulição. A atividade de peroxidase foi medida por método espectrofotométrico a 470 nm, utilizando o guaiacol como substrato redutor.

E) Peroxidase de Citrus (Frutas cítricas)

MC LELLAN & ROBINSON (1984) estudaram a estabilidade térmica de peroxidase solúvel e ionicamente ligada de suco de laranja. A inativação térmica demonstrou um comportamento não linear e foi observado pequena regeneração da peroxidase solúvel de laranja.

CATALÁ & CHAMARRO (1987) relataram um pH ótimo entre 4,0 e 6,2 para isoperoxidasas aniônicas e catiônicas de flavedo de laranja ' Valencia Late', dependendo do doador de H⁺. Com guaiacol, as isoperoxidasas aniônicas apresentaram atividade ótima em pH 4,5 e 5,5, enquanto as catiônicas em pH 4,5.

CLEMENTE (1995) comparou em laranja, a estabilidade ao calor do extrato bruto de peroxidase solúvel e peroxidase ionicamente ligada, verificando que as peroxidases permaneceram estáveis após 10 minutos de tratamento a 60°C, 70°C e 75°C e recuperaram a atividade quando deixadas a 30°C após inativação pelo calor.

CLEMENTE & ROBINSON (1995) extraíram peroxidases solúveis de laranja e isolaram ambas as formas das isoenzimas aniônica e catiônica e compararam a termoestabilidade a 70°C. Constataram que a peroxidase solúvel presente no extrato bruto é menos estável ao tratamento térmico do que as frações das isoenzimas isoladas. As isoperoxidasas purificadas perderam aproximadamente 70%, 80% e 40% da atividade original após tratamento a 70°C por 50 segundos em comparação à perda de 90% da atividade quando presentes como mistura na fração solúvel do extrato bruto. A perda de atividade da peroxidase pelo calor mostrou um comportamento não linear. Os autores sugeriram que isso ocorre em função das características estruturais das isoenzimas, devido à presença, ao nível molecular, de número variável de ligações covalentes com resíduos de oligossacarídeos.

CLEMENTE (1996 e 1998) isolou e purificou a peroxidase de suco de laranja por meio de cromatografia de troca iônica. As isoperoxidasas purificadas apresentaram uma atividade enzimática mais estável ao tratamento térmico do que quando presente no extrato bruto de suco de laranja e pequena regeneração, após tratamento térmico. O autor sugeriu que este resultado foi devido à presença de açúcares ou enzimas inibidoras que possam ter afetado a atividade de algumas isoenzimas no extrato bruto.

F) Peroxidase de Cupuaçu

SILVA & SILVA (2000) avaliaram a qualidade de purê de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) após processo de pasteurização a 70°C e 90°C por 5 minutos. Verificaram que, durante a pasteurização, a enzima peroxidase foi inativada e não houve diferenças significativas nas amostras processadas a 70°C e a 90°C, sendo recomendada a pasteurização a 90°C. O guaiacol foi utilizado como substrato na determinação da atividade da peroxidase.

G) Peroxidase de Kiwi

SODA *et alii* (1991) purificaram e verificaram algumas propriedades de peroxidases de kiwi. A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,5 e a 50°C. A atividade da enzima foi totalmente inibida por KCN 1 mM, sugerindo a presença de grupo heme no sítio ativo, como em outras peroxidases de plantas.

H) Peroxidase de Maçã

SILVA (1981) estudou o sistema enzimático de algumas frutas *in natura*. A maçã apresentou baixa atividade de peroxidase (1,3 unidades/ml de suco), que não ultrapassou 30% do total das enzimas presentes, sendo totalmente inibida na temperatura de 80 °C ou 90°C por 2 minutos.

I) Peroxidase de Mamão

LOURENÇO *et alii* (1995) mostraram que a inativação térmica das peroxidases solúvel e ionicamente ligada de mamão, apresentou comportamento bifásico entre 50°C e 80°C. As enzimas mostraram-se termolábeis em temperaturas superiores a 60°C, e foram inativadas em 94% a 70°C.

J) Peroxidase de Melão

RODRIGUEZ-LOPEZ *et alii* (2000) caracterizaram uma peroxidase aniônica de melão (*Cucumis melo L.*) cultivado sob diferentes condições de salinidade. A enzima apresentou pH ótimo de 5,5 em tampão citrato de sódio 0,05 M, utilizando o guaiacol como substrato redutor e os produtos de reação foram medidos a 470 nm.

LAMIKANRA & WATSON (2000) estudando a peroxidase de melão Cantaloupe (*Cucumis melo L. var. reticulatus Naud*), verificaram que a temperatura ótima de atividade da enzima foi na faixa de 50 a 55°C e cerca de 90% da atividade total foi perdida à 80°C por 5 minutos. A faixa de pH ótimo de atividade foi de 5,5 a 7,5 a 50°C.

K) Peroxidase de Morango

CIVELLO *et alii* (1995) purificaram a peroxidase de morango e determinaram algumas de suas propriedades. A peroxidase apresentou atividade ótima em pH 6,0 a 30°C. A enzima mostrou baixa estabilidade térmica, mas manteve atividade acima de 50% na faixa de pH 4,0 a 11,0.

L) Peroxidase de Pêssego

SILVA (1981) verificou que a atividade da peroxidase foi significativa na reação de escurecimento em pêssegos. Obteve 14,2 unidades/ml de atividade de peroxidase na preparação bruta e verificou que a peroxidase apresentou grande sensibilidade ao tratamento térmico, conseguindo-se 100% de inibição após 2 minutos à 70°C.

LOURENÇO & NEVES (1997) isolaram, purificaram parcialmente e estudaram algumas propriedades da peroxidase solúvel de pêssego. A atividade

ótima foi em pH 5,0 e temperatura de 40⁰C, utilizando a o-dianisidina como substrato. Os autores relataram que a inativação térmica foi rápida acima de 70⁰C com quase perda total de atividade após tratamento a 80⁰C por 30 segundos.

Algumas Aplicações da Peroxidase:

A peroxidase tem sido utilizada em análises enzimáticas de glicose e ácido ascórbico em alimentos. Na determinação enzimática da glicose, esta é oxidada pela glicose oxidase, formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio é reduzido e um doador de elétrons (AH₂) é oxidado. Este último é usualmente um composto colorido e a concentração de glicose pode ser estimada estequiometricamente pela reação de glicose oxidase (BERGMEYER,1974).

VOLOTOVSKY & KIM (1998) imobilizaram a peroxidase de *horseradish* na superfície de um transistor de efeito de campo íon sensitivo e usou para a determinação de L – ácido ascórbico em sucos de frutas e bebidas.

FATIBELLO-FILHO & VIEIRA (2000) propuseram um biosensor baseado em pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*) como fonte de peroxidase, para a determinação de ácido L-ascórbico em formulações farmacêuticas.

ROSATO (2000) desenvolveu um biosensor amperométrico para fenol a base de peroxidase, sílica modificada e pasta de carbono, que tem como vantagens: maior sensibilidade, seletividade e intervalo operacional para detecção de fenol. A sensibilidade do biosensor permitiu a determinação de fenol em amostras de efluentes industriais e águas de rios, como da região de Cubatão (SP), demonstrando ser uma excelente alternativa no acompanhamento da concentração de fenol num processo de tratamento de efluentes.

Características e Cultivo do Abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill)

O abacaxizeiro pertencente à família Bromeliaceae, é uma planta herbácea, semiperene, com um talo em forma de clava onde se inserem as folhas, constitui uma infrutescência formada pela união de numerosos “frutinhos”, originados cada um de uma flor, que se dispõem em forma de espiral em torno de um eixo comum (KAVATI & PIZA JR, 1997).

O abacaxi é originário da América do Sul e Central, espalhando-se destas para as outras regiões tropicais e subtropicais do mundo. Por ser uma planta tropical, é extremamente sensível a geadas, preferindo regiões onde a temperatura média situa-se entre 21° e 23°C. Em condições de calor e umidade elevados, a planta desenvolve-se bastante e os frutos produzidos são grandes e com elevado teor de açúcares e baixa acidez (COUTO, 1981).

As principais pragas do abacaxi são a broca-do-fruto, a cochonilha, a broca-do-talo e os nematóides. A principal doença é a fusariose, causado por um fungo (*Fusarium subglutinans*), e que chega a provocar perda de 80% da produção (CIRCUITO AGRÍCOLA, 1996).

A espécie *Ananas comosus* (L.) Merrill é a que engloba os cultivares comerciais, ou seja, aqueles cultivares de abacaxizeiro cujos frutinhos aumentam de volume com a maturação, sendo comestíveis e ricos em suco. Atualmente, os cultivares Smooth Cayenne e Pérola são os mais plantados no Brasil. O cultivar Pérola apresenta polpa de coloração amarela pálida, quase branca, com fibras curtas e ricas em suco de baixa acidez; a coloração da polpa limita o mercado para exportação, pois a preferência é principalmente por frutos de polpa amarela. A grande quantidade de suco e a baixa acidez do fruto são as suas principais características desejadas para o mercado interno. Enquanto que o cultivar Smooth Cayenne, apresenta polpa de coloração amarela e o suco é rico em ácidos e

açúcares, a coloração da polpa faz com que seja preferida, tanto para indústria como para exportação (COUTO, 1981).

O fruto presta-se tanto para consumo *in natura* como para processamento industrial em suas mais diversas formas (pedaços em calda, suco, pedaços cristalizados, geléias, licor, vinho, vinagre e aguardente). Como subproduto da sua industrialização, pode-se obter álcool, ácidos cítrico, málico e ascórbico, rações para animais e bromelina (enzima proteolítica de uso medicinal). De alto valor dietético, a polpa do abacaxi é energética (150 calorias por copo de suco); contém boa quantidade das vitaminas A, B1 e C (SPIRONELLO & TEIXEIRA, 1998).

Melhoramento Genético

Para a propagação comercial do abacaxizeiro são utilizadas partes vegetais da planta, tais como filhotes ou mudas de cacho, rebentões e a coroa do fruto. Este tipo de reprodução é chamado clonal. A grande característica deste processo é a total semelhança genética existente entre a planta-mãe com os seus descendentes. Não havendo fecundação das flores do abacaxizeiro não há formação de sementes e portanto não ocorre recombinação gênica. As variações que podem surgir entre as plantas são basicamente devidas a condições ambientais diferentes, ou ainda a uma modificação genética dos mesmos. O melhoramento envolvendo hibridização, ou seja, o cruzamento controlado é feito na tentativa de reunir boas características agrônômicas (COUTO, 1981).

Poucos estudos têm sido desenvolvidos sobre o melhoramento genético do abacaxi, não obstante um grande número de países envolvidos (FERREIRA & CABRAL, 1998).

No Brasil, o CNPMF da EMBRAPA em Cruz das Almas-BA e o Instituto Agrônomo de Campinas-SP por meio de cruzamentos dirigidos e ao acaso, vêm tentando obter clones de abacaxizeiro com boas características agronômicas de planta e frutas, bem como, frutos de qualidade e ao mesmo tempo resistente à fusariose (COUTO, 1981; SPIRONELLO *et alii*, 1994).

Características Físico-químicas, Químicas e Bioquímicas de Abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill)

Segundo GIACOMELLI (1969), a composição química das frutas é variável de acordo com a época do ano; embora sua produção ocorra geralmente no verão, a colheita é uniformizada ao longo do ano por meio de indução química de seu florescimento. No verão, as frutas têm menor acidez e maior teor de açúcares. Por outro lado, as frutas temporãs (frutas produzidas fora da época) apresentam alta acidez e baixo teor de açúcares, visto a produção ocorrer nos meses em que a temperatura ambiente é baixa. LIMA (1998) relatou que o sabor varia principalmente com as condições climáticas e com a maturação, que pode ser avaliada pela relação Brix/acidez total titulável.

GUERRA & LIVERA (1999) verificaram a correlação entre o perfil sensorial e determinações físico-químicas do abacaxi c.v. Pérola em diferentes estádios de maturação do fruto. Constatou-se que o abacaxi c.v. Pérola atinge o amadurecimento aproximadamente 105 dias após a floração. O °Brix apresentou valores mínimos no início do desenvolvimento, aumentando rapidamente com o amadurecimento; esta mudança é devido predominantemente ao aumento na síntese e translocação de sacarose. Aproximadamente aos 60 dias, observou-se que a acidez alcança o máximo, passando a declinar lentamente pelo consumo dos ácidos orgânicos e/ou transformação em sais.

A polpa do abacaxi contém provitamina A insolúvel, que faz parte do material corante da polpa (caroteno) e vitaminas hidrossolúveis, tais como: ácido ascórbico e ácido pantotênico. As vitaminas são representadas em bom número, porém em quantidades pequenas (MEDINA *et alii*, 1987). Das vitaminas encontradas no abacaxi, destacam-se a vitamina C e a pró vitamina A (HUET, 1958). DULL (1971) relatou que a concentração de vitamina C existente na polpa do abacaxi maduro está situada na faixa de 10 a 25 mg de ácido ascórbico/100g.

Os estudos de MOORE & CAYGILL (1979) revelaram que a bromelina, uma enzima proteolítica do abacaxi, não está presente nos primeiros estádios de desenvolvimento do fruto; seu nível aumenta rapidamente mantendo-se alto até que, por ocasião do amadurecimento, decresce ligeiramente. MEDINA *et alii* (1987) verificaram que o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro.

Tabela 1. Comparações entre os parâmetros físicos e químicos obtidos e os considerados ideais ao consumo *in natura* e à industrialização, respectivamente para os cultivares Pérola e Smooth Cayenne

Parâmetros	Valores Obtidos		Valores ideais	
	Pérola	Smooth Cayenne	<i>In natura</i>	Indústria
Comprimento do fruto (cm)	15,80 – 16,77	18,95	-	20,60
Peso do fruto (kg)	1,05 – 1,06	1,86	1,00 – 1,40	1,80-2,00
% em suco	62 – 64	64	-	63,40
Sólidos Solúveis (%)	13,20 – 14,32	14,58	14,00– 16,00	12,00-15,00
Acidez titulável (%)	0,48 – 0,51	0,80	0,32	0,65 – 1,35
Açúcares totais (%)	11,81-12,55	13,03	11,90-14,70	10,90-13,90

Carvalho *et alii* (1981)

CARVALHO *et alii* (1981) relataram as características químicas e físico-químicas do suco de abacaxi para ser considerado de boa qualidade: o teor de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) do suco não deve ser inferior a 10,5 $^{\circ}$ Brix; a acidez titulável não deve ser superior a 1,35g/100ml de suco expresso em ácido cítrico. Na tabela 1 encontram-se os resultados de análise de frutos dos cultivares Pérola e Smooth Cayenne, bem como os valores considerados ideais de alguns constituintes físicos, físico-químicos e químicos, citados na literatura para frutos destinados ao consumo *in natura* e à indústria.

BLEINROTH (1987), analisou amostras de abacaxi da variedade Smooth Cayenne e verificou que apresenta as seguintes características químicas principais, variáveis segundo o estágio de maturação: pH na faixa de 3,2 a 3,7; teor de sólidos solúveis entre 11,6 e 18,2 $^{\circ}$ Brix; acidez total entre 0,47 e 0,96% expressa em ácido cítrico; teor de açúcares totais entre 9,85 e 16,17%; teor de açúcares redutores entre 4,16 e 5,35%.

MEDINA *et alii* (1987) relatou a composição química para as variedades comerciais Smooth Cayenne e Pérola no estado maduro. As polpas dos frutos da variedade Pérola apresentaram pH 3,6; 11,6 de $^{\circ}$ Brix; acidez total de 0,81 % de ácido cítrico e 32 mg ácido ascórbico/100g enquanto que os abacaxis da variedade Smooth Cayenne apresentaram pH 3,2; 11,6 de $^{\circ}$ Brix; acidez total de 0,96% de ácido cítrico e 17 mg ácido ascórbico/100g.

BOTREL (1991) determinou o efeito do peso do abacaxi Smooth Cayenne na composição físico-química e no grau de escurecimento interno. Os valores médios encontrados no dia da colheita referentes aos índices físicos-químicos nas diferentes categorias de peso de abacaxi foram: pH 3,6; 13,84 a 17,54 de vitamina C mg/100g; 13,62 a 14,25 $^{\circ}$ Brix; 0,81 a 0,84% de acidez titulável. Concluiu que os frutos maiores foram mais susceptíveis ao escurecimento interno.

BOTREL & CARVALHO (1993 a) avaliaram o efeito do peso do abacaxi Smooth Cayenne e as mudanças ocorridas após o armazenamento com e sem refrigeração na composição química, físico química e no grau de escurecimento interno. Verificaram que os frutos maiores foram os mais suscetíveis ao escurecimento interno e se caracterizaram por apresentarem maior teor de sólidos solúveis. A percentagem de acidez titulável não diferiu significativamente no momento da colheita, concluiu-se que foram as variações nos teores de ácidos após o amadurecimento que interferiram na susceptibilidade dos frutos ao escurecimento interno.

BARTOLOMÉ *et alii* (1995) determinaram algumas propriedades físicas, físico-químicas, químicas e bioquímicas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) *in natura* dos cultivares Red Spanish e Smooth Cayenne. Os valores de pH, acidez titulável e °Brix para o cultivar Smooth Cayenne foi pH 3,54; 0,93g de ácido cítrico/100g e 12,48°Brix. O cultivar Smooth Cayenne apresentou atividade de peroxidase de 442(Δ Abs/min/mg proteína), medida por método espectrofotométrico, utilizando-se a o-dianisidina como substrato.

IAC Gomo-de-mel

O abacaxi IAC Gomo-de-mel, como os demais cultivares de abacaxizeiro, pertence à espécie *Ananas comosus* (L.) Merrill, sendo resultante de cruzamento natural. Foi introduzido da China em 1991 e incorporado ao banco de germoplasma de abacaxizeiros do Instituto Agrônomo em Campinas. O nome deve-se ao fato de os “frutinhos” serem soldados menos fortemente entre si, podendo ser retirados manualmente como “gomos”, no fruto maduro, após corte longitudinal. As plantas são multiplicadas principalmente pelo sistema de micropropagação (*in vitro*), além do sistema usual de mudas produzidas naturalmente pela planta: filhote, no pedúnculo do fruto e rebentão, no haste e

rizoma da planta e coroa do fruto. O abacaxi IAC Gomo-de-mel é mais tolerante à infestação por nematóides, principalmente de *Pratilenchus brachiurus*. Os seus frutos apresentam polpa de coloração amarela intensa, bastante doce, pouco ácida, aromática e muito saborosa. É recomendado para mesa, sendo as técnicas de cultivo e colheita semelhantes às empregadas para as atuais cultivares (USBERTI FILHO *et alii*, 1999).

O tamanho pequeno do fruto facilita o manuseio, embalagem e transporte, sendo adequado para o consumo de mesa individual, uma preferência confirmada pelos mercados internacionais (GUIMARÃES, 1999).



Figura. 4 IAC Gomo-de-mel maduro

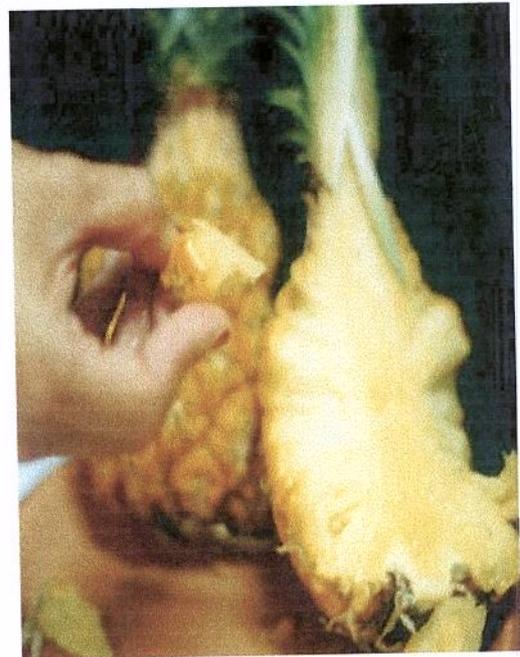


Figura. 5 gomos de abacaxi

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colheita das amostras de abacaxi:

As amostras de abacaxi foram coletadas na Estação Experimental de Agronomia de Pindorama (São Paulo), pertencente ao Instituto Agronômico de Campinas - IAC, em estágio de maturação de 1/4 a 1/2 de casca amarela. Coletaram-se amostras de 3 a 4 frutos por cultivar ou clone de abacaxi.

No dia seguinte à cada colheita, no período da manhã, as amostras foram levadas ao Centro de Tecnologia de Hortifrutícolas - Fruthotec, pertencente ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), onde foram realizadas as análises de textura e °Brix (doçura).

A figura 6 ilustra a plantação experimental de abacaxi da Estação Experimental de Pindorama.

A figura 7 ilustra as amostras de abacaxi cv. Smooth Cayenne, Pérola, IAC Gomo-de-mel, e os clones IAC 1, IAC 2 e IAC 3.

A figura 8 ilustra sementes do abacaxi IAC-1.

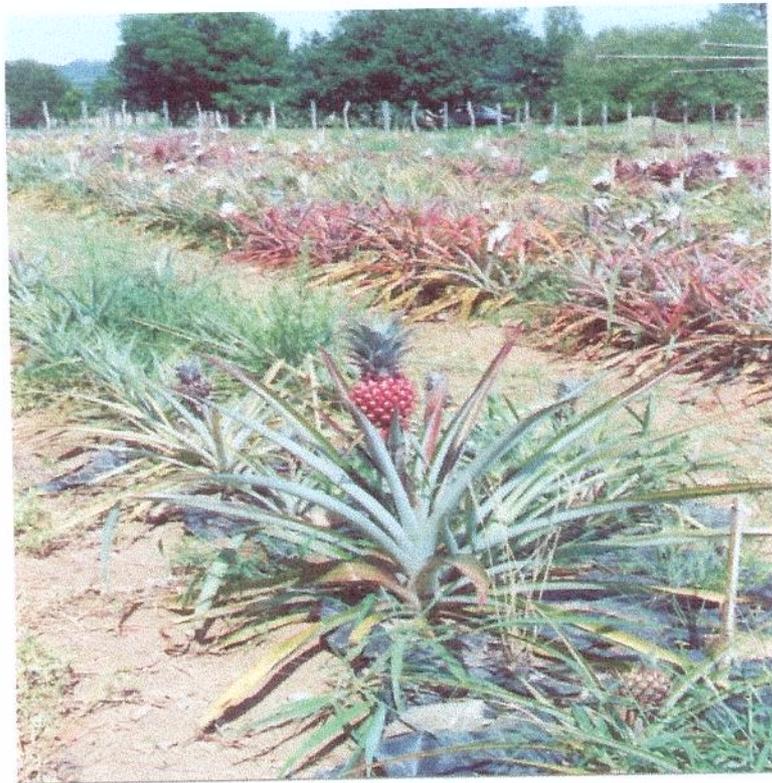


Figura. 6 Plantação de abacaxi – Estação Experimental de Pindorama



Figura. 7 Amostras de abacaxi (*Ananas comosus* (L.)Merrill)



Figura. 8 Sementes do abacaxi IAC-1, que são utilizadas no melhoramento genético, para a obtenção de novos cultivares

3.2 Análises químicas

As análises químicas da polpa foram determinadas na porção inferior, média e superior do fruto do abacaxi, já que o desenvolvimento (maturação) do mesmo ocorre da base para o ápice.

3.2.1 Textura e sólidos Solúveis (°Brix)

Para a análise da textura foi empregado um texturômetro especial para frutas, o Penetrômetro EFFEGI modelo FT 327 com ponteira média 5/16 polegadas pertencente ao Centro Fruthotec do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). O °Brix foi determinado por refratometria, segundo técnica descrita por CARVALHO *et alii* (1990), utilizando refratômetro manual ATAGO modelo nº 1, com escala de 0 a 32%. Os frutos foram descascados em três pontos eqüidistantes, nas regiões superior, mediana e inferior, fazendo-se três leituras em cada ponto, para as determinações de textura e °Brix.

3.2.2. Determinação de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico (vitamina C) da polpa foi determinado por método titulométrico descrito por CARVALHO *et alii* (1990) utilizando-se 2,6 diclorofenol indofenol - sódio . As análises foram feitas em três repetições e os valores foram expressos em mg ácido ascórbico/100 g amostra.

3.2.3 Determinação de pH

Para a determinação do pH do suco obtido da polpa de abacaxi foi utilizado um pHmetro ORION / Isometer modelo 710^a com eletrodo de vidro, utilizando a técnica descrita por CARVALHO *et alii* (1990). As análises foram feitas em três repetições.

3.2.4 Acidez total

Para a determinação da acidez foi utilizado método titulométrico preconizado por CARVALHO *et alii* (1990) e o resultado expresso em % de ácido cítrico. As análises foram feitas em três repetições.

3.3. Preparação dos extratos enzimáticos

Os frutos foram totalmente descascados e retiradas porções da parte inferior (base) , mediana e superior (ápice). Cada fração foi dividida em pedaços pequenos e trituradas separadamente em liquidificador por 2 a 3 minutos sem adição de água. A quantidade de suco do próprio fruto foi julgada suficiente para a homogeneização do material e para produzir um volume de líquido suficiente para os trabalhos que viriam a seguir.

O material assim preparado foi centrifugado em centrífuga BECKMAN modelo J2-21 a 11.000 x g por 10 minutos a 5°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante de cada fração (ápice, meio e base) foi utilizado como fonte de enzimas (extrato bruto).

3.4 Determinação de atividade de peroxidase, bromelina e polifenoloxidase

3.4.1 Determinação da atividade de peroxidase

A medida da atividade de peroxidase dos extratos de abacaxi baseou-se no método de KHAN & ROBINSON (1994). A mistura reativa foi constituída de 0,1 ml de solução enzimática, 1,2 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e 1,5 ml de solução de guaiacol a 1% em tampão fosfato 0,05 M pH 6,0. Em seguida foi adicionado 0,4 ml de solução H₂O₂ em tampão de análise (0,33 ml de H₂O₂ em 100 ml de tampão de análise) completando um total de 3,2 ml.

O aumento de absorbância a 470 nm foi monitorado durante 5 minutos de reação, a 25 °C ou na temperatura indicada, contra um branco no qual a H₂O₂ foi substituída por tampão; em espectrofotômetro BECKMAN UV/VIS Série DU-70. Todas as amostras foram diluídas 1:5 para obter valores de absorbância na porção linear da curva e de modo a padronizar a atividade.

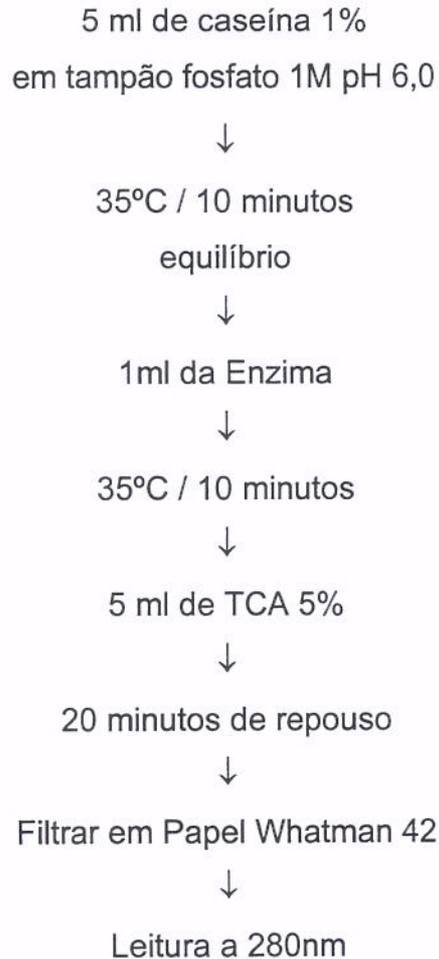
As leituras foram feitas em três repetições para cada fração (ápice, meio e base).

Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima que causa aumento de absorbância de 0,001 unidades por minuto a 470 nm, tendo o guaiacol como doador de H⁺.

3.4.2 Determinação da atividade de bromelina

O teor de bromelina foi estimado por meio do método descrito por BALDINI (1991) utilizando a caseína como substrato. O fluxograma abaixo descreve as etapas da análise. As leituras foram feitas em triplicata e as amostras foram

diluídas na proporção 1:10 para obtenção de valores de absorbância na porção linear da curva e de modo a padronizar a atividade.



OBS1: Controle = 1 ml de água destilada, em vez da solução enzimática.

OBS2: Branco = 5 ml de caseína + 5 ml de TCA 5% + 1 ml de Enzima.

3.4.3 Determinação da atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada pelo método descrito por OKTAI *et alii* (1995), utilizando-se o catecol como substrato. A mistura reativa foi constituída de 0,1 ml de solução enzimática, 1,7 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e 1,2 ml de catecol 0,4 % em tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e foi incubada em cubeta de espectrofotômetro a 25 °C. A atividade enzimática foi feita em três repetições. Uma unidade de atividade foi definida como aumento de 0,001 na absorbância por minuto a 420 nm.

3.5 Caracterização bioquímica da peroxidase bruta dos abacaxis IAC-1 e IAC Gomo-de-mel

3.5.1 Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta

A peroxidase foi analisada na faixa de 10°C a 70°C com intervalos de 10°C estreitado para 5°C na zona de atividade ótima. Para este estudo, a mistura de reação constituída de 0,1 ml de solução enzimática, 1,2ml de solução tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e 1,5 ml de solução 1% de guaiacol foi incubada por 5 minutos na faixa de temperatura de 10°C a 70°C e em seguida adicionou-se H₂O₂, o aumento de absorbância sendo acompanhado como descrito no item anterior 3.4.1 para determinação de atividade de peroxidase.

As análises foram feitas em três repetições e as amostras foram diluídas na proporção 1:5 para obtenção de valores de absorbância na porção linear da curva. A temperatura ótima de atividade foi utilizada nos estudos subseqüentes.

3.5.2 Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta

Para o estudo da influência do pH no meio reativo na atividade da peroxidase foram usados tampões citrato-fosfato (pH 2,6 a 7,0); acetato de sódio/ácido acético (pH 3,6 a 5,5); fosfato de sódio (pH 6,0 a 8,0) e ácido bórico/borato (pH 8,0 a 9,0) na concentração de 0,2 M, dentro da faixa de capacidade tamponante, com intervalos de 0,5 unidades de pH.

A determinação da faixa de pH ótimo de atividade da peroxidase foi realizada como descrito no item 3.4.1 a 50°C porém, substituindo-se o tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 da mistura de reação pelas soluções tampão em estudo. A atividade da peroxidase foi medida usando guaiacol e água oxigenada diluídas nos respectivos tampões. As determinações foram feitas em três repetições e as amostras foram diluídas na proporção de 1:5 para obtenção de valores de absorvância dentro de uma faixa linear, para padronizar os ensaios. O sistema tampão em que foi verificada atividade ótima foi utilizado nos estudos subsequentes.

3.5.3 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta

No estudo de inativação térmica foi feito um ensaio preliminar: a solução enzimática foi incubada primeiramente a temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e temperatura de ebulição por 30 minutos. Em seguida foram resfriadas imediatamente em banho de gelo e a atividade residual determinada como descrito no item 3.4.1 no pH (4,5) e temperatura ótima de atividade (50°C).

A partir dessa análise, foi verificado que só a temperaturas maiores que 80°C ocorreu diminuição da atividade. Então procedeu-se a novo estudo, incubando-se a solução enzimática a temperaturas de 85°C, 90°C e 95°C por tempos de 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos e 3 minutos e em seguida

determinou-se a atividade residual conforme item 3.4.1 no pH (4,5) e temperatura ótima de atividade (50°C).

3.5.4 Estudo da regeneração da atividade da peroxidase bruta após tratamento térmico

O estudo da regeneração da atividade da peroxidase bruta foi baseado no método descrito por Mc LELLAN & ROBINSON (1984). A solução enzimática foi submetida a tratamentos térmicos de 75°C por 10 minutos e a 90°C por 2 minutos, sendo em seguida armazenados a 10°C e a temperatura ambiente por 3 horas e 24 horas. A atividade residual da enzima foi medida conforme descrito no item 3.4.1, no pH (4,5) e temperatura ótima de atividade (50°C). As análises foram feitas em três repetições e as amostras foram diluídas na proporção 1:5 para obtenção de valores de absorbância na porção linear da curva.

3.5.5 Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta

O efeito do pH na estabilidade foi testado na faixa de pH 3,0 a 9,0 em tampão citrato-fosfato 0,05M e borato/ácido bórico 0,05M com intervalo de 1 ponto de pH. Alíquotas de 0,5 ml de solução enzimática e 0,5 ml de solução tampão citrato-fosfato 0,05M foram incubadas a 5°C por 24 horas, a temperatura ambiente por 3 horas e a 50°C por 3 horas e 24 horas. Após a incubação, foi adicionado tampão citrato-fosfato 0,05M pH 4,5 para ajustar a enzima para um mesmo pH e em seguida determinou-se a atividade residual no pH (4,5) e temperatura ótima de atividade da enzima (50°C), conforme descrito no item 3.4.1. As análises foram feitas em três repetições e as amostras foram diluídas na proporção 1:5 para obtenção de valores de absorbância na porção linear da curva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises químicas e físicas da polpa de abacaxi

Nas tabelas de 2 a 6 estão apresentadas as análises químicas e físicas da polpa dos cultivares e clones de abacaxi.

Observa-se que na tabela 2 a textura da polpa de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel apresentaram valores de textura similares aos cultivares comerciais Smooth Cayenne e Pérola e que os clones IAC-2 e IAC-3 apresentaram maior firmeza de polpa.

A tabela 3 mostra que IAC Gomo-de-mel, IAC-2 e IAC-3 apresentaram porcentagem de sólidos solúveis mais elevados (14,7 a 19,4 ° Brix) do que os cultivares comerciais Smooth Cayenne e Pérola (11,7 a 14,4 ° Brix).

A análise apresentada na tabela 4 confirma o caráter ácido do abacaxi (pH em torno de 3,0 a 4,0). Pela análise da tabela 5, IAC Gomo-de-mel e os clones apresentam acidez titulável relativamente baixa em relação aos cultivares comerciais. Em relação à vitamina C (Tabela 6), IAC-1 e IAC-3 apresentaram teores mais elevados, principalmente em relação ao cultivar Pérola.

Segundo GIACOMELLI (1969), a composição química das frutas é variável de acordo com a época do ano, embora sua produção ocorra geralmente no verão, a colheita é uniformizada ao longo do ano através de indução química de seu florescimento. No verão, as frutas têm menor acidez e maior teor de açúcares. Por outro lado, as frutas temporãs (frutas produzidas fora da época) apresentam alta acidez e baixo teor de açúcares, em razão da produção ocorrer nos meses em que a temperatura ambiente é baixa.

Segundo HUET (1958), das vitaminas encontradas no abacaxi, destacam-se a vitamina C e a pró vitamina A. DULL (1971) relatou que a concentração de vitamina C existente na polpa do abacaxi maduro está situada na faixa de 10 a 25 mg de ácido ascórbico/100g. As vitaminas são, portanto, representadas em bom número, porém em quantidades pequenas (MEDINA *et alii*, 1987).

Os cultivares e clones de abacaxi utilizadas no estudo estavam em início de maturação (de 1/4 a 1/2 de casca amarela). De modo geral, os clones (IAC-1, IAC-2 e IAC-3) e o novo cultivar IAC Gomo-de-mel, nas condições de ensaio, apresentaram teores de sólidos solúveis e de ácido ascórbico mais elevados e menor acidez total em relação aos cultivares comerciais Smooth Cayenne e Pérola.

CARVALHO *et alii* (1981) consideram suco de abacaxi de boa qualidade com teor de sólidos solúveis não inferior a 10,5°Brix, acidez titulável não superior a 1,35g/100ml de suco, expresso em ácido cítrico.

Os resultados obtidos para os cultivares (IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola) e clones (IAC-1, IAC-2 e IAC-3) de abacaxi foram próximos dos resultados obtidos por BLEINROTH (1987) com Smooth Cayenne, variando de acordo estágio de maturação: pH dentro da faixa de 3,2 a 3,7; teor de sólidos solúveis entre 11,6 e 18,2 °Brix e acidez total entre 0,47 e 0,96% expressa em ácido cítrico; MEDINA *et alii* (1987), obteve os seguintes valores para as variedades comerciais, no estado maduro: Smooth Cayenne, pH 3,2, 11,6 °Brix e 0,96% de ácido cítrico; Pérola, pH 3,6, 11,6 °Brix e 0,81 % de ácido cítrico. BOTREL (1991) determinou o efeito do peso do abacaxi Smooth Cayenne na composição físico-química e no grau de escurecimento interno; os valores médios encontrados no dia da colheita referentes aos índices físicos-químicos nas diferentes categorias de peso de abacaxi foram: pH 3,6; 13,84 a 17,54 de vitamina C mg/100g; 13,62 a 14,25 °Brix; 0,81a 0,84% de acidez titulável. BARTOLOMÉ *et alii* (1995) determinaram algumas propriedades físicas, físico-

químicas, químicas e bioquímicas de abacaxi *in natura* da variedade Smooth Cayenne, obtendo pH 3,54 e 12,48°Brix.

Tabela 2. Textura da polpa de abacaxi dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 e dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola.

<i>Cultivar/Clone</i>	<i>Textura da polpa (Kgf)**</i>		
	<i>Ápice</i>	<i>Meio</i>	<i>Base</i>
IAC-1	0,6	0,7	0,7
IAC Gomo-de-mel	0,5	0,5	0,8
IAC-2	0,9	0,8	1,1
IAC-3	0,8	0,8	1,0
*Smooth Cayenne	0,6	0,6	0,8
*Pérola	0,5	0,5	0,6

*cultivares comerciais

** O resultado é referente à média de três repetições para cada fração.

Tabela 3. Sólidos solúveis em °Brix da polpa de abacaxi dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 e dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola.

<i>Cultivar/Clone</i>	<i>Sólidos Solúveis em °Brix**</i>		
	<i>Ápice</i>	<i>Meio</i>	<i>Base</i>
IAC-1	11,9	12,4	14,0
IAC Gomo-de-mel	14,7	15,6	16,7
IAC-2	17,4	17,9	18,0
IAC-3	18,4	18,7	19,4
*Smooth Cayenne	11,9	13,2	14,2
*Pérola	11,7	13,6	14,4

* cultivares comerciais

** O resultado é referente à média de três repetições para cada fração.

Tabela 4. pH da polpa de abacaxi dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 e dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola.

<i>Cultivar/Clone</i>	<i>pH da polpa**</i>		
	Ápice	Meio	Base
IAC-1	3,48	3,60	3,69
IAC Gomo-de-mel	3,73	3,88	3,89
IAC-2	3,65	3,66	3,67
IAC-3	3,75	3,83	3,84
*Smooth Cayenne	3,36	3,38	3,42
*Pérola	3,81	3,82	3,88

* cultivares comerciais

** O resultado é referente à média de três repetições para cada fração.

Tabela 5. Acidez da polpa de abacaxi dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 e dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola.

<i>Cultivar/Clone</i>	<i>(g de ácido cítrico/100g)**</i>
IAC-1	0,71
IAC Gomo-de-mel	0,67
IAC-2	0,68
IAC-3	0,73
*Smooth Cayenne	0,85
*Pérola	0,63

* cultivares comerciais

** O resultado é referente à média de ápice, meio e base. E para cada fração foi feita uma média de três repetições.

Tabela 6. Teor de ácido ascórbico dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 e dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola.

Cultivar/Clone	(mg de ácido ascórbico/100g) **
IAC-1	25,3
IAC Gomo-de-mel	21,4
IAC-2	22,6
IAC-3	24,2
*Smooth Cayenne	20,2
*Pérola	18,7

*cultivares comerciais

** O resultado é referente à média de ápice, meio e base. E para cada fração foi feita uma média de três repetições.

4.2 Determinação da atividade da peroxidase bruta

A tabela 7 mostra as atividades de peroxidase bruta dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 e dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola. Os abacaxis dos clones (IAC-1, IAC-2 e IAC-3) e do novo cultivar IAC Gomo-de-mel apresentaram menor atividade de peroxidase que os cultivares comerciais Smooth Cayenne (5137 U/g) e Pérola (5624 U/g). Entre os clones e o novo cultivar, o abacaxi do clone IAC-1 e do cultivar IAC Gomo-de-mel apresentaram maior atividade, 4065 U/g e 3194 U/g, respectivamente e desse modo foram selecionados para estudo bioquímico da peroxidase bruta.

Estes resultados sugerem que os novos cultivares e clones de abacaxi estudados, podem apresentar menor deterioração oxidativa devido à peroxidase, do que os cultivares comerciais Smooth Cayenne e Pérola.

BEAUDREAU & YASUNOBU (1966) estudaram uma peroxidase B do caule de abacaxi e verificaram que se trata de uma peroxidase atípica com pH ótimo ácido e com baixa atividade específica. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o guaiacol como substrato redutor e os produtos de reação medidos à 470nm, para o produto de oxidação do guaiacol, sendo que para o extrato bruto, a atividade foi de 24.800 unidades/ml.

FERREIRA (1983) utilizando como substrato o-dianisidina para determinação da atividade de peroxidase do abacaxi cv. Pérola e definindo uma unidade de atividade como aumento de 0,001 na absorvância por minuto, verificou que a preparação enzimática bruta apresentou 40.880 unidades/minuto/ml enquanto que a preparação de peroxidase fracionada com sulfato de amônio apresentou 21.360 unidades/minuto/ml.

SUNG *et alii* (1993) purificaram 12 isoenzimas peroxidase do extrato de caule de abacaxi e estudaram algumas propriedades dessas isoenzimas. A atividade de peroxidase foi medida por método espectrofotométrico a 425nm e utilizando-se a o-fenildiamina como substrato. Para a peroxidase precipitada entre 55-90% de saturação com sulfato de amônio, a atividade foi de 77.500 unidades em um volume de 80ml.

Tabela 7. Determinação da atividade de peroxidase na polpa de abacaxi dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 e dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola

Cultivar/Clone	Peroxidase U/ml **				Peroxidase U/g **			
	Ápice	Meio	Base	<u>Média</u>	Ápice	Meio	Base	<u>Média</u>
IAC Gomo-de-mel	7205	7135	7065	7135	2953	3199	3430	3194
IAC-1	6565	7010	8210	7262	3668	3916	4612	4065
IAC-2	6240	6935	7130	6768	2453	2358	3442	2751
IAC-3	6469	7008	7085	6854	2856	2987	3453	3099
* Smooth Cayenne	9355	8875	10060	9430	4924	5220	5267	5137
* Pérola	9490	8515	10660	9555	5683	5099	6091	5624

*cultivares comerciais

** O resultado é referente à média de três repetições para cada fração.

4.3 Determinação da Atividade de Bromelina

A tabela 8 ilustra que IAC Gomo-de-mel, IAC-1 e IAC-3 apresentaram menor atividade de bromelina (0,84 a 0,87 U/g de polpa) que IAC-3, Smooth Cayenne e Pérola (1,46 a 1,65 U/g de polpa).

MOORE & CAYGILL (1979) relataram que a bromelina pode ser isolada do fruto e de todas as partes da planta e que, embora a atividade decresça significativamente na maturação, os níveis são razoavelmente altos no suco extraído do fruto parcialmente maduro. Os estudos revelaram que a bromelina não está presente nos primeiros estádios de desenvolvimento do fruto, entretanto, seu nível aumenta rapidamente mantendo-se alto até que, por ocasião do amadurecimento, decresce ligeiramente.

Segundo MEDINA *et alii* (1987), o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro.

A bromelina atinge altas concentrações nos caules de abacaxi, portanto, não se aconselha a utilização da bromelina dos frutos de abacaxi. Os frutos de abacaxi devem se destinar à indústria e ao consumo *in natura* (Buttle & Barret (1990) citado por SANTOS, 1995)

SANTOS (1995) obteve um valor médio de 2,11UP/ml, para a atividade enzimática da bromelina do caule de abacaxi cv. Pérola, armazenado durante 5 tempos, em condição sem refrigeração.

Tabela 8. Atividade de bromelina dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3 e dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola

Cultivar/Clone	Bromelina U/g **			
	Ápice	Meio	Base	Média
IAC Gomo-de-mel	0,88	0,88	0,86	0,87
IAC-1	0,89	0,85	0,82	0,85
IAC-2	0,88	0,86	0,78	0,84
IAC-3	1,79	1,60	1,42	1,60
* Smooth Cayenne	1,60	1,50	1,27	1,46
* Pérola	1,75	1,75	1,46	1,65

*cultivares comerciais

** O resultado é referente à média de três repetições para cada fração.

4.4 Determinação da atividade da polifenoloxidase

Utilizando-se a metodologia descrita no item 3.4.3, não foi detectada atividade de polifenoloxidase no extrato bruto (suco de abacaxi), dos cultivares IAC Gomo-de-mel, Smooth Cayenne e Pérola e dos clones IAC-1, IAC-2 e IAC-3. Coincidindo com resultado obtido por DAS *et alii* (1997) os quais não detectaram atividade de polifenoloxidase no extrato bruto de abacaxi.

4.5 Caracterização parcial da peroxidase bruta do clone IAC-1 e do cultivar IAC Gomo-de-mel

4.5.1 Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de -mel

A faixa de temperatura ótima de atividade das peroxidases nos dois abacaxis em estudo podem ser visualizadas, de forma comparativa na Figura 9.

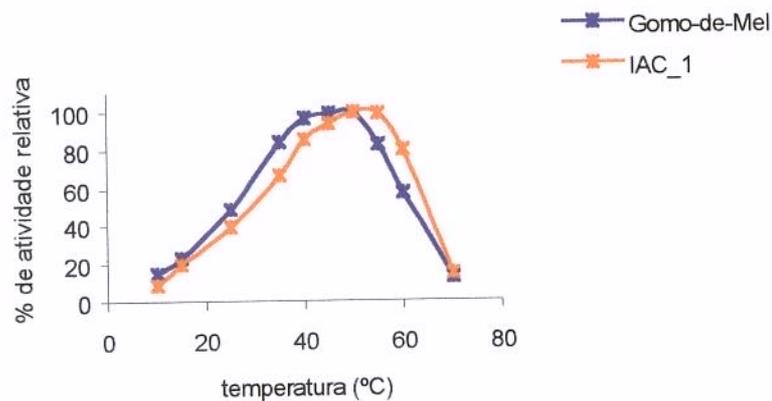


Figura. 9 Efeito da temperatura na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel

Verificou-se um perfil de faixa de temperatura ótima ligeiramente diferente para os dois abacaxis; no cultivar IAC Gomo-de-mel está compreendido entre 45°C e 50°C e no clone IAC-1, entre 50°C e 55°C. Demonstrou ser uma enzima termoestável, estando de acordo com a literatura (REED, 1975; BURNETTE, 1977).

SODA (1991) verificou que para a peroxidase purificada de kiwi a atividade ótima de atividade foi obtida na temperatura de 50°C.

CIVELLO *et alii* (1995) purificaram a peroxidase de morango e observaram que esta teve atividade máxima na temperatura de 30°C.

LOURENÇO & NEVES (1997) isolaram, purificaram parcialmente e estudaram algumas propriedades da peroxidase solúvel de pêssigo e verificaram que a temperatura ótima para atividade da enzima foi de 40°C.

Segundo HOLSCHUH (2000), a peroxidase do extrato bruto e a isoperoxidase purificada de carambola apresentaram a mesma temperatura de atividade ótima em torno de 50°C, sendo que na faixa de 40°C a 55°C a atividade relativa foi superior a 80%.

LAMIKANRA & WATSON (2000) estudaram a peroxidase de melão Cantaloupe (*Cucumis melo L. var. reticulatus Naud*) e verificaram que a atividade da enzima foi máxima na faixa de temperatura de 50-55°C.

Nenhum dado foi encontrado na literatura sobre a temperatura ótima da peroxidase de abacaxi.

4.5.2 Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel

A influência do pH na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel é mostrada nas figuras 10 e 11 com os tampões (citrato-fosfato, acetato de sódio/ácido acético, fosfato de sódio e ácido bórico/borato).

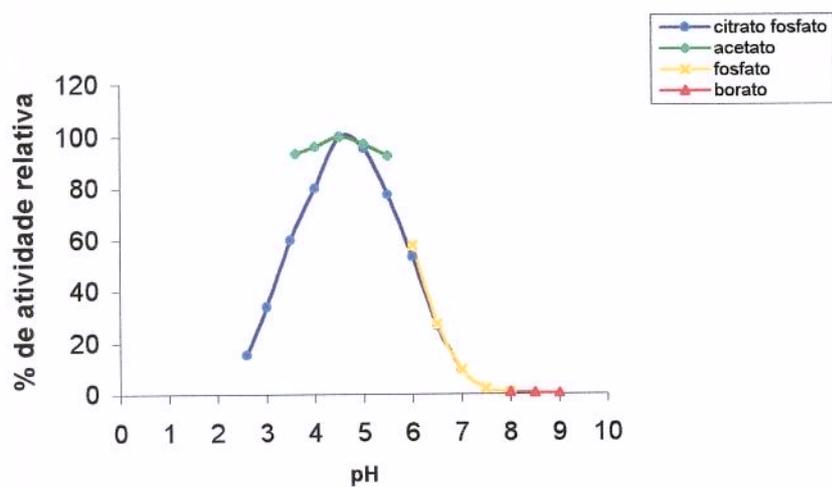


Figura. 10 Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta de IAC-1

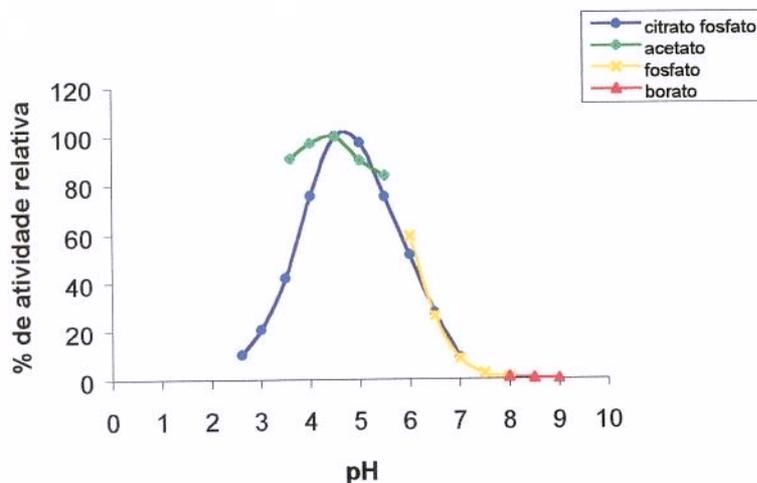


Figura. 11 Efeito do pH na atividade peroxidase bruta de IAC Gomo-de-mel

A comparação da influência do pH na atividade de peroxidase de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel, foi representado em tampão citrato-fosfato 0,2 M na figura 12 e mostra que ambos abacaxis apresentaram atividade máxima em pH 4,5. Isso sugere que a enzima atua melhor num pH levemente ácido. A peroxidase de abacaxi mostrou baixa atividade em pH 2,6 e em pH superiores a 7,0. A presença de um ombro entre valores de pH 5,0 - 5,5 na curva de pH de atividade da peroxidase parece indicar a presença de isoenzimas.

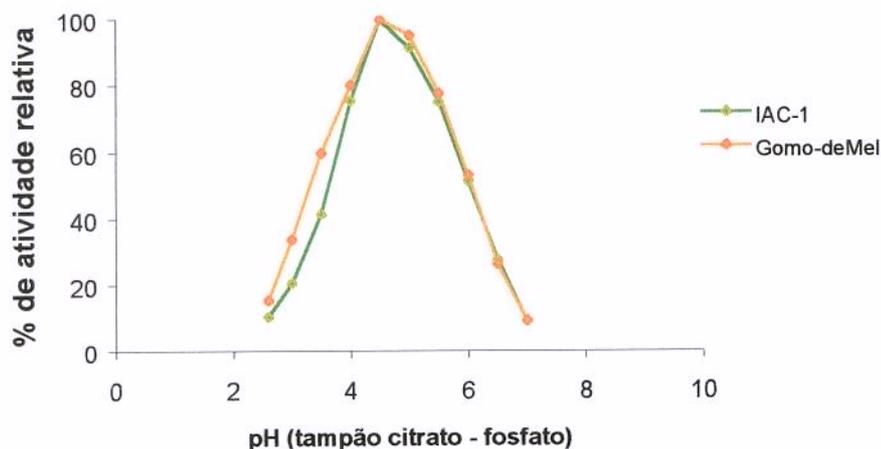


Figura.12 Efeito do pH na atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel

O pH ótimo de atividade da peroxidase varia com a fonte enzimática, com a composição de isoenzimas e com o substrato doador e tampão aplicado. A ampla faixa de pH observado para diferentes fontes é devido à presença de isoenzimas de diferentes valores de pH ótimo (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

O resultado está de acordo com a faixa de pH de atividade de peroxidase citada na literatura de 3,0 a 7,0 por ARAÚJO (1995) e foi próximo do obtido por BEAUDREAU & YASUNOBU (1966) para peroxidase B do caule de abacaxi, mostrando um pH ótimo ácido de 4,2 em tampão acetato. O autor verificou também que a atividade de peroxidase mostra ser independente da concentração do tampão entre 0,1 e 0,2 M.

As enzimas demonstraram atuar melhor num pH levemente ácido, concordando também, com o resultado obtido por FERREIRA (1985) para a peroxidase fracionada com sulfato de amônio de abacaxi cv. Pérola, que apresentou um pH ótimo de 5,0.

Já SUNG *et alii* (1993) estudando o pH ótimo de atividade de isoenzimas de peroxidase extraídas do caule de abacaxi obtiveram uma faixa de pH ótimo entre 5,5 a 6,0 em tampão 0,1M ácido cítrico-fosfato.

As peroxidases de frutas descritas na literatura apresentaram atividade ótima na faixa de pH 4,5 a 7,5.

NAGLE & HAARD (1975) fracionaram e caracterizaram a peroxidase de banana madura. A fração aniônica apresentou um platô de atividade máxima em pH entre 4,5-5,0, enquanto que a fração catiônica apresentou um pH ótimo de 4,5 em tampão Tris - citrato 0,01 M.

CATALÁ & CHAMARRO (1987) relataram um pH ótimo entre pH 4,5 e 5,5 para isoperoxidasas aniônicas e catiônicas de flavedo de laranja 'Valencia Late'.

A peroxidase de kiwi estudada por SODA *et alii* (1991) apresentou pH de atividade ótima de 5,5.

CIVELLO *et alii* (1995) obtiveram atividade ótima em pH 6,0 para a peroxidase de morango.

LOURENÇO & NEVES (1997) isolaram, purificaram parcialmente e estudaram algumas propriedades da peroxidase solúvel de pêssego. A atividade ótima da peroxidase foi em torno pH 5,0.

GONZALEZ *et alii* (2000) realizaram a caracterização parcial da peroxidase de 2 cultivares de amora preta (Selvagem e Sem Espinho), obtendo um pH ótimo de atividade de 6,5 em tampão fosfato de sódio 0,2 M.

HOLSCHUH (2000) isolou, purificou e estudou a caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.). O extrato bruto apresentou atividade ótima de peroxidase em pH 5,5 e a isoperoxidase purificada na faixa de pH 5,7 a 5,9 em tampão fosfato de potássio 25mM.

LAMIKANRA & WATSON (2000) estudaram a peroxidase de melão Cantaloupe (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud). A faixa de pH ótimo de atividade foi de 5,5-7,5 a 50°C.

RODRIGUEZ-LOPEZ *et alii* (2000) caracterizaram uma peroxidase aniônica de melão (*Cucumis melo* L.), apresentando um pH ótimo de 5,5 de atividade em tampão citrato de sódio 0,05 M.

4.5.3 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel (Ensaio preliminar)

As peroxidases de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel mostraram-se termoestáveis, após 30 minutos, em temperaturas inferiores a 50°C. Sendo inativadas em temperaturas superiores a 80°C (figura 13).

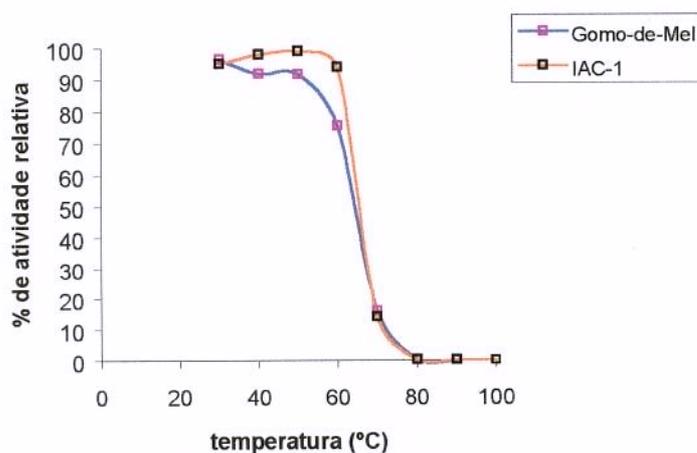


Figura. 13 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel

A partir deste resultado e de acordo com a literatura existente para peroxidases de outras variedades de frutas procedeu-se a um novo estudo.

4.5.3.1 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel

Verificou-se que as peroxidases de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel foram inativadas após 60 e 120 segundos de tratamento a 90°C, nas condições de análise (figuras 14 e 15).

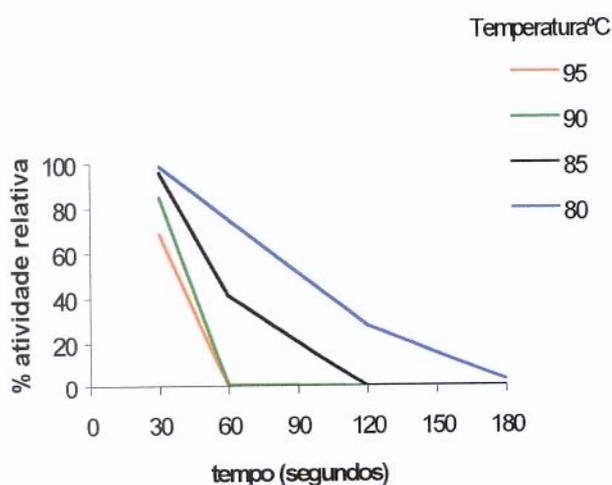


Figura. 14 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1

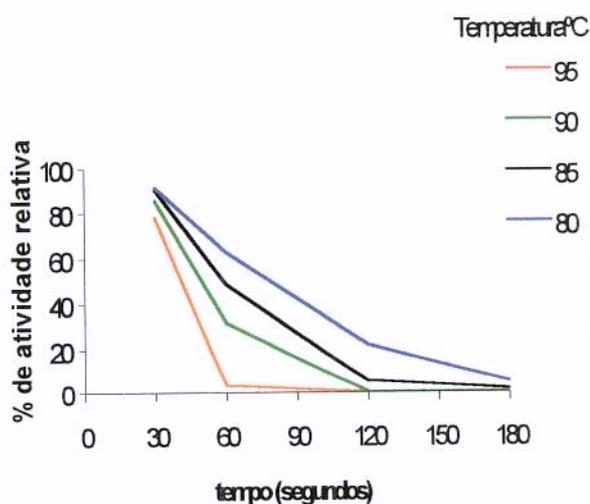


Figura 15 Efeito da temperatura na estabilidade da peroxidase bruta de IAC Gomo-de-Mel

A peroxidase é uma das enzimas mais termoestáveis relatada em vegetais (REED, 1975; BURNETTE, 1977). Considera-se que a inativação da peroxidase é acompanhada pela desnaturação de todas as outras enzimas (RICHARDSON & HYSLOP, 1985; KHAN & ROBINSON, 1993). A inativação da POD tem sido convencionalmente usada como indicador da eficiência do branqueamento no processamento de vegetais (BURNETTE, 1977).

Os tratamentos térmicos comercialmente usados para o processamento de extratos de frutas e vegetais, como temperatura elevada por curto tempo (HTST) são poucos efetivos para uma inativação irreversível da peroxidase (KHAN & ROBINSON, 1993).

A inativação térmica das peroxidases mostra diferentes graus de dependência de fatores relacionados tanto à fonte da enzima, quanto às condições e/ou aos parâmetros de inativação, na ausência e presença de diferentes aditivos. Este comportamento frente à ação da temperatura tem sido explorado como forma de redução e/ou eliminação do surgimento de sabores e odores estranhos na fase de pós industrialização de frutos e vegetais (CLEMENTE, 1996).

O resultado obtido foi semelhante ao obtido por LIMA (1998) para o processamento de suco de abacaxi por processo não tradicional, que utiliza evaporadores no qual o suco é aquecido a 90°C a 95°C durante 30 a 40 segundos.

A inativação mostrou um comportamento não linear, do mesmo modo que ocorreu com o trabalho de MELLO & CLEMENTE (1996) para o extrato bruto de peroxidase solúvel e peroxidase iônica de abacaxi num tratamento térmico nas temperaturas de 60°C e 75°C por um período máximo de 10 minutos.

Este fato está associado à presença de isoperoxidasas com diferentes graus de termoestabilidade (LU & WHITAKER, 1974; BURNETTE, 1977; ROBINSON, 1991; CLEMENTE, 1995, 1996; ALVIM & CLEMENTE, 1998). Quanto mais termoestável forem as isoperoxidasas, mais não lineares serão as curvas de inativação térmica (Mc Lellan & Robinson (1987) citado por ROBINSON, 1991).

O tratamento de inativação foi similar ao tratamento utilizado para outras frutas, como o obtido por SILVA (1981), que verificou que a peroxidase de maçã foi totalmente inibida na temperatura de 80° ou 90°C por 2 minutos e conseguiu 100% de inibição a 70°C por 2 minutos, para a peroxidase de pêsego e banana.

SILVA & NOGUEIRA (1983) conseguiu 100% de inibição da atividade da peroxidase de pêra, banana, maçã e pêsego num tratamento a 80°C por 2 minutos.

SILVA & SILVA (2000) avaliaram a qualidade de purê de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) após processo de pasteurização a 70°C e 90°C por 5 minutos. Verificaram que durante a pasteurização a enzima peroxidase foi inativada, algumas características sensoriais de frescura se perderam, a cor se modificou ligeiramente. Não se encontraram diferenças significativas nas amostras processadas a 70°C e a 90°C, portanto se recomenda a pasteurização a 90°C.

4.5.3.2 Estudo da regeneração da atividade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel, após tratamento térmico.

A figura 16 mostra que após tratamento térmico da peroxidase do clone IAC-1 por 10 minutos a 75°C e incubação durante 3 horas e 24 horas a temperaturas de 5°C e 25°C, foi observado 5% de regeneração da atividade, sendo que após tratamento por 2 minutos a 90°C, a peroxidase permaneceu inativa.

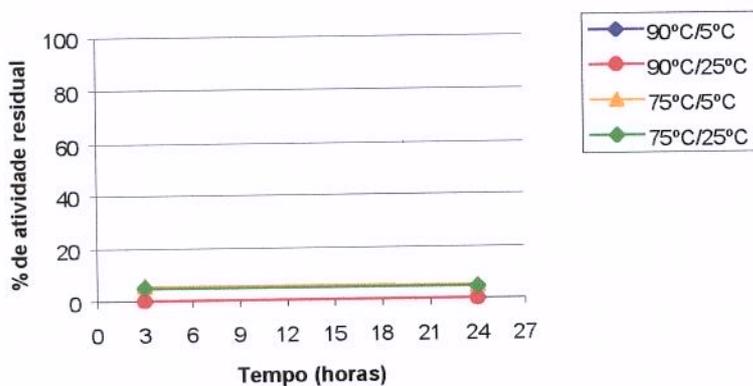


Figura. 16 Regeneração da atividade de peroxidase bruta de IAC-1

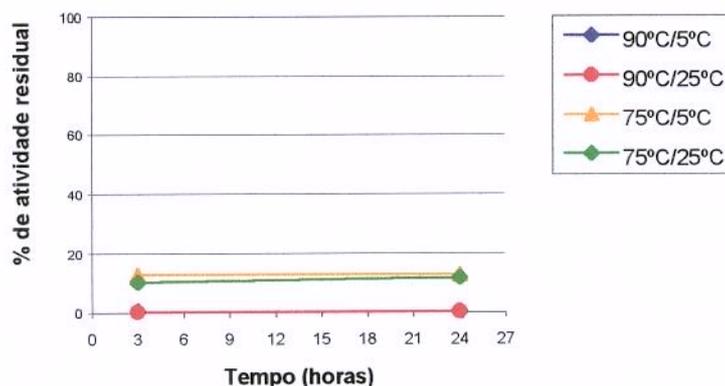


Figura. 17 Regeneração da atividade de peroxidase bruta de IAC Gomo-de-mel

A figura 17 demonstra que após tratamento da peroxidase do cultivar IAC Gomo-de-mel por 10 minutos a 75°C e incubação durante 3 horas e 24 horas a 5°C e 25°C, verificou-se cerca de 10% da regeneração da atividade, ao passo que após 2 minutos de aquecimento a 90°C não foi observada regeneração da peroxidase.

O resultado obtido foi semelhante ao de MC LELLAN & ROBINSON (1984) que, estudando a regeneração da atividade de peroxidase após tratamento a 60°C, 65°C, 70°C e 75°C por 10 minutos, obtiveram baixas concentrações de regeneração para as peroxidases solúveis de laranja.

A habilidade da peroxidase em se regenerar, após desnaturação pelo calor, varia entre as diferentes espécies de plantas e também entre as isoenzimas (SCOTT, 1975; CLEMENTE, 1996).

4.5.4 Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel

As figuras 18 e 19 ilustram que as peroxidases de abacaxi de IAC-1 e IAC Gomo-de-mel mostraram-se estáveis na faixa de pH 3,0 a 9,0 após 24 horas a 5°C e após 3 horas a 25°C mantendo mais de 80% da atividade inicial. Após 24 horas de incubação a 50°C as peroxidases mantiveram-se estáveis na faixa de pH 4,0 a 9,0 retendo mais de 80% de atividade, sendo que em pH 3,0 a peroxidase de IAC-1 reteve cerca de 45% da atividade inicial e a enzima de IAC Gomo-de-mel reteve cerca de 60%.

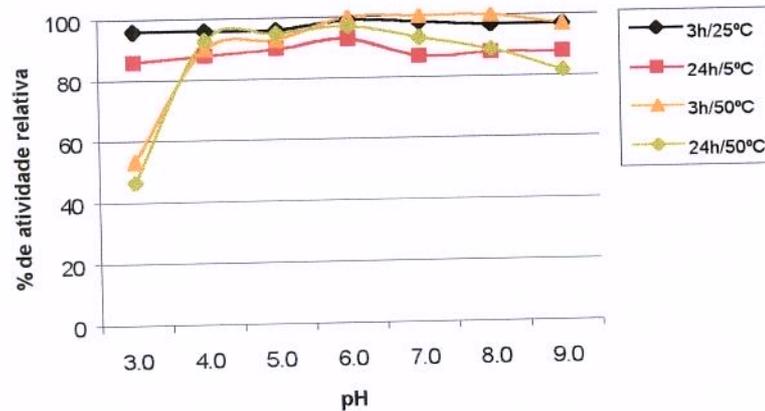


Figura. 18 Efeito do pH na estabilidade de peroxidase bruta de IAC-1

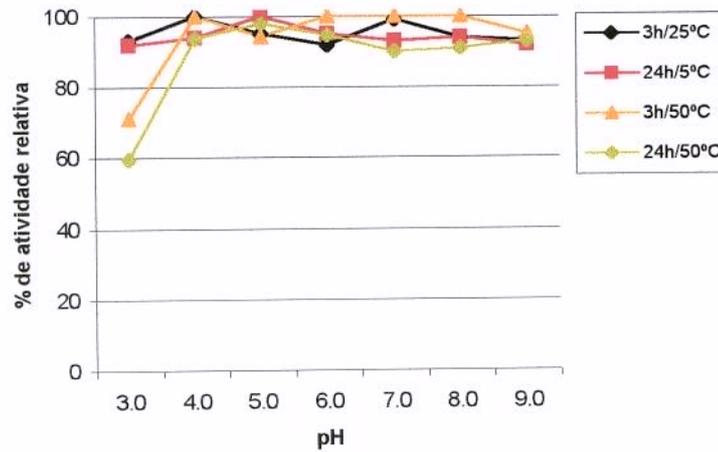


Figura. 19 Efeito do pH na estabilidade da peroxidase bruta de IAC Gomo-de-mel

CIVELLO *et alii* (1995) relataram boa estabilidade para a peroxidase de morango entre os pH 4,0 a 11,0 quando incubada durante 30 minutos a 20 °C.

LOURENÇO & NEVES (1997) incubaram peroxidase solúvel de pêssigo em pH 3,0 a 8,0 durante 2 horas a 30 °C e não encontraram perda de atividade.

HOLSCHUH (2000) isolou e purificou isoperoxidase de carambola e verificou que esta permaneceu estável durante 24 horas a 0°C na faixa de pH 4,0 a 9,0 e a 25°C na faixa de pH 6,0 a 9,0.

5. CONCLUSÃO

1. Não foi detectada atividade de polifenoloxidase no extrato enzimático (suco de abacaxi) dos cultivares (IAC Gomo-de-Mel, Smooth Cayenne e Pérola) e clones (IAC-1, IAC-2 e IAC-3) estudados.
2. O cultivar IAC Gomo-de-mel e os clones (IAC-1, IAC-2 e IAC-3) apresentaram menor atividade de peroxidase em relação aos cultivares comerciais Smooth Cayenne (5137 U/g) e Pérola (5624 U/g).
3. O cultivar IAC Gomo-de-mel (3194 U/g) e o clone IAC-1 (4065 U/g) apresentaram maior atividade de peroxidase que os demais clones, sendo selecionados para a caracterização bioquímica da peroxidase do extrato bruto.
4. No estudo da caracterização parcial da peroxidase bruta de IAC Gomo-de-mel e IAC-1, verificou-se que as peroxidases apresentaram atividade ótima na faixa de temperatura entre 45°C e 50°C e entre 50°C e 55°C, respectivamente.
5. As peroxidases de IAC Gomo-de-mel e IAC-1 apresentaram atividade ótima em pH 4,5 e baixa atividade em pH 2,6 e em valores superiores a 7,0.
6. As peroxidases de IAC Gomo-de-mel e IAC-1 mostraram-se termoestáveis após 30 minutos de tratamento em temperaturas inferiores a 50°C e foram inativadas após 60 segundos e 120 segundos de tratamento a 90°C, respectivamente.

-
7. Foi observado regeneração parcial da atividade da peroxidase após tratamento térmico a 75°C e incubação da enzima a 5°C ou 25°C. Obteve-se, respectivamente, 5% e 10% de regeneração da peroxidase de abacaxi IAC-1 e para IAC Gomo-de-mel após 10 minutos de tratamento térmico a 75°C e incubação durante 3 horas a 5°C ou 24 horas a 25°C. A peroxidase de abacaxi IAC-1 e IAC Gomo-de-mel foi inativada após 2 minutos de tratamento a 90°C.

 8. As peroxidases de abacaxi IAC-1 e IAC Gomo-de-mel permaneceram estáveis na faixa de pH 3,0 a 9,0 após 24 horas de incubação a 5°C e 3 horas a 25°C, retendo mais de 80% da atividade inicial. Em temperatura mais elevada, a 50°C, e nas mesmas condições de incubação, as peroxidases mantiveram-se estáveis na faixa de pH 4,0 a 9,0, retendo mais de 80% da atividade, sendo que em pH 3,0, a peroxidase de IAC-1 reteve cerca de 45% da atividade inicial e a enzima de IAC Gomo-de-mel reteve cerca de 60%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRIANUAL 1999. **Anuário da Agricultura Brasileira**, FNP Consultoria & Comércio, Argos Comunicação, 1999. p. 123.
2. AGRIANUAL 2000. **Anuário da Agricultura Brasileira**, FNP Consultoria & Comércio, Argos Comunicação, 2000. p.141;146.
3. ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa, 1995. cap.12, p. 247- 252.
4. BALDINI, V.L.S.; IADEROZA, M. Enzimas e a qualidade de vegetais processados. Campinas: **Manual Técnico do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1991. p. 44-45.
5. BARTOLOMÉ, A.P.; FÚSTER, C.; RÚPEREZ, P. Pineapple Fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of *Red Spanish* and Smooth Cayenne cultivars. **Food Chemistry**, v. 53, n.1, p. 75-79 1995.
6. BEAUDREAU, C.; YASUNOBU, K. T. Heme Proteins. VI Crystalline pineapple peroxidase B. **Biochemistry**, v. 5, n. 4, p. 1405-1412, 1966.
7. BERGMEYER, H U. **Methods of Enzymatic Analysis** 2ed, New York, Verlag Chemie, , 1974.
8. BLEINROTH, E. W. Matéria – prima. IN: MEDINA *et alii*. **Abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.**, 2.ed. rev. ampl. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. p. 133-164. (Série Frutas Tropicais nº 2)

9. BOTREL, N. **Efeito do peso do fruto no escurecimento interno e qualidade do abacaxi Smooth Cayenne**. Lavras, 1991. 81p. Tese (Mestre em Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura de Lavras .

10. BOTREL, N.; CARVALHO, V.D. Efeito do peso do fruto no escurecimento interno e qualidade do abacaxi Smooth Cayenne III. Escurecimento interno, sólidos solúveis totais, acidez titulável, pH e açúcares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 9, p. 1055-1064, 1993 a.

11. BOTREL, N.; CARVALHO, V.D. Efeito do peso do fruto no escurecimento interno e qualidade do abacaxi Smooth Cayenne I. Atividade de polifenoloxidase, peroxidase e compostos fenólicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 733-742, 1993 b.

12. BRAVERMAN, J.B.S. Vitaminas. IN: _____ **Introduction a la Bioquímica de los Alimentos**. Barcelona: Omega, 1967, cap. 14, p. 206-239.

13. BURNETTE, F. Peroxidase and its relation to flavor and quality : A review. **Journal of Food Science**, v.42, n.1, p. 1-6, 1977.

14. CARNEIRO, F.R.B.D. **Uso da tecnologia de barreiras na obtenção da polpa de açaí e sua caracterização reológica**. Campinas-SP, 2000 135p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

15. CARVALHO, V.D. ; CLEMENTE, P.R . Qualidade, colheita, industrialização e consumo de abacaxi. IN: **Abacaxi - Tecnologia de Produção**. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, 1981. v.7, n. 74, p. 37-42.

16. CARVALHO, R.L.C.; MANTOVANI, D.M.B.; CARVALHO, P.R.N. ; MORAES, R.M.de Análises Químicas de Alimentos. **Manual Técnico do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas,1990. p. 1, 4-8, 82-83.
17. CATALÁ, C.; CHAMARRO, J. Purificación parcial y propiedades de las isoperoxidasas aniónicas y catiónicas del flavedo de naranjas Valencia Late. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v.27, n.4, p.509-518, 1987.
18. CIRCUITO AGRÍCOLA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CENTRAIS DE ABASTECIMENTO. **Abacaxi** *Ananas comosus (L.) Merrill* , ano IV, Julho, 1996, n. 38, p.9.
19. CIVELO, P.M.; MARTINEZ, G.A.; CHAVES, A. R.; AÑON, M.C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa Duch*) : partial purification and determination of some properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.10, p. 2596-2601, 1995.
20. CLEMENTE, E. Heat stability of soluble and ionically bound peroxidase from orange. **Revista Unimar**, Maringá, v. 17, n.3, p. 401-408, 1995.
21. CLEMENTE, E.; ROBINSON, D.S. The thermostability of purified oranges isoperoxidasas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p.1109-1118, 1995.
22. CLEMENTE, E. Isolamento, purificação e termoestabilidade da isoperoxidase do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.16, p. 1-5, 1996.

-
23. CLEMENTE, E. Purification and thermostability of isoperoxidases from oranges. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 29-36, 1998.
24. CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Boletim SBCTA**, v.32, n. 2, p.167-171, 1998.
25. COUTO, F.A.A. Variedades e melhoramento do abacaxizeiro. IN: **Abacaxi** tecnologia de produção. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, 1981. v.7, n. 74, p.13-14.
26. DAS, J.R.; BHAT, S.G.; GOWDA, L.R. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian pineapple fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.2031-2035, 1997.
27. DAWSON, J.H. Probing Structure – function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. **Science**, v. 240, p. 433-439, 1988.
28. DULL, G.G. The pineapple: general. In: HULME , A.C (Ed.) **The Biochemistry of Fruits and their Products**. England, Academic Press, 1971. v. 2, Cap. 9, p. 303-324.
29. DUNDFORD, H.B. Horseradish Peroxidase: structure and kinetic properties. IN: EVERSE, E.K. and GRISHAM, M. B. Ed., **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, CRC-PRESS, 1991. Volume II, cap. 1, p. 1-24.

-
30. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 412-418, 2000.
31. FERREIRA, J.C.D. **Purificação e Caracterização Parcial da Peroxidase do Abacaxi**. Campinas, 1983. 89p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
32. FERREIRA, F. R.; CABRAL, J.R.S. Melhoramento genético. IN: **Abacaxi: tecnologia de produção e comercialização**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 1998, v.19,n.195, p.24-28.
33. GIACOMELLI, E. J. **Curso de especialização em fruticultura**. Recife. Convênio SUDENE / URPE. 1969.
34. GONÇALVES, J. S.; AMARO, A.A.; MAIA, M.L.; SOUZA, S.A.M.; PEREZ, L.H. FRUTAS. **Prognóstico Agrícola**, São Paulo, v.2 , p. 200-202, 1998.
35. GONÇALVES, N.B.; CARVALHO, V.D.N. ; GONÇALVES, J.R.A. Efeito do cloreto de cálcio e do tratamento hidrotérmico na atividade enzimática e no teor de fenólicos do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.10, p. 2075-2081, 2000.
36. GONZALES, E. M.; de ANCOS, B. ; CANO, M. P. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase. Activities in blackberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n.11, p. 5469-5474, 2000.

-
37. GUERRA, N. B.; LIVERA, A. V. S. Correlação entre o perfil sensorial e determinações físicas e químicas do abacaxi c.v. Pérola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p. 32-35, 1999.
38. GUIMARÃES, O. **Abacaxi – Doçura em gomos**. Globo Rural, Rio de Janeiro: Editora Globo, Abril, 1999, n.162.
39. HAARD, N.F. Physiological roles of peroxidase in postharvest fruits and vegetables. IN: ORY, R.L. ; S.t ANGELO, A.T., eds. **Enzymes in Food and Beverages Process**, ACS Symposium Series, 1977. cap.9, p. 143-171.
40. HAMMER, F.E. Oxireductases. IN: **Enzymes in Food Processing**. Ed. NAGODAWITHANA, T. ; REED, G. England, Academic Press, 1993. p. 233-243.
41. HEMEDA, H.M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 184-185, 1990.
42. HINER, A.N.P.; HERNANDEZ-RUÍZ, J; ARNAO, M.B.; GARCÍA-CÁNOVAS, F; ACOSTAL, M. A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 6, p. 655-662 ,1996.
43. HOLSCHUH, H. J. **Isolamento Purificação e Caracterização Bioquímica da Peroxidase de Carambola (*Averrhoa carambola L.*)**. Campinas, 2000. 159p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas.

-
44. HUET, R. La composition chimique de l' ananas. **Fruits**. Paris. v. 13, n. 5, p. 183-197, 1958.
45. KAVATI, R.; PIZA JR, C.T. Abacaxi (*Ananas comosus (L.) Merrill*) IN: **Tomo III Fruticultura**. Manual técnico das culturas 2 ed, 1997. n.8, p 1-13.
46. KERMASHA, S.; METCHE, M. Studies on seed peroxidase *Phaseolus vulgaris* c.v. *haricot*. **Journal of Food Science**, v. 53, n.1, p. 247-252, 1988.
47. KHAN, A. A.; ROBINSON, D.S. The thermostability of purified mango isoperoxidases, **Food Chemistry**, v.47, n. 1, p.53-59, 1993.
48. KHAN, A. A.; ROBINSON, D.S Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases, **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.
49. LAMIKANRA, O.; WATSON, M. A. Cantaloupe melon peroxidase: Characterization and effects of additives on activity. **Nahrung-Food**. v.44, n. 3, p. 168-172, 2000.
50. LEE, Y. C.; HAMMES, J. K. Heat inactivation of peroxidase in corn on the cob. **Journal of Food Science**, v.44, n.3, p. 785-787, 1979.
51. LIMA, U. A. **Agroindustrialização de Frutas**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. v.5; 151p.
52. LÓPEZ-SERRANO, M.; BURGOS, J. Peroxidase stability and reaction after heat treatment and manothermosonication. **Journal of Food Science**, v. 60, n.3, p. 451-482, 1995.

53. LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A. ; SILVA, M. A. Heat inactivation of soluble and bound peroxidase from papaya fruit. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 29, n.2, p. 155-158, 1995.
54. LOURENÇO, E. J. ; NEVES, V. A. Peroxidase solúvel de pêsego: purificação parcial e propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.17, n.1, p.42-28, 1997.
55. LU, A. T.; WHITAKER, J. R. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 6, p. 1173-1178 ,1974.
56. MC LELLAN K. M.; ROBINSON, D.S. Heat stability of peroxidases from orange. **Food Chemistry**, v. 13, p. 139-147, 1984.
57. MEDINA, J.C.; BLEINROTH, E.W.; De MARTIN, Z.J.; SOUZA, A. J. (Jr); LARA, J.C.C.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V.A.; MARQUES, J. F. **ABACAXI : cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.**, 2 ed. rev. ampl. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987, 285 p. (Série Frutas Tropicais nº 2).
58. MELLO, E.T.; CLEMENTE, E. Thermostability of crude extract of peroxidase from pineapple. **Revista UNIMAR**, Maringá, v. 18, n. 4, p. 757-763, 1996.
59. MOORE, D. J; CAYGILL, J.C. Proteolytic activity of malaysian pineapples. **Tropical Science**, v. 21, n. 2, p. 97-102, 1979.

-
60. NAGLE, N.E. ; HAARD, N.F. Fraction and characterization of peroxidase ripe banana fruit. **Journal of Food Science**, v. 40, n. 3, p. 576-579, 1975.
61. NOGUEIRA, J.N. ; SILVA, E. Efeito comparativo do calor, SO₂ e ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase e peroxidase de algumas frutas e hortaliças. **Anais**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1989. v. 46, n. 2, p. 453-471.
62. OKTAI, M.; KÜFREVIÖGLU, I.; KOCACALISKANI SAKIROGLU, H. Polyphenoloxidase from amasya apple. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 3, p. 495- 505, 1995.
63. REED, G. Peroxidase. IN: **Enzymes in Food Processing**, Academic Press, New York, 1975. p. 243-247.
64. RICHARDSON, T ; HYSLOP, D.B.- ENZYMES IN: Owen R. Fennema, **Food Chemistry**, 2ed., New York, Marcel Dekker, INC, 1985. p.
65. ROBINSON, D.S. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. IN: FOX, P.F. Editor, **Food Enzymology**, London and New York, 1991. p. 399-426.
66. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; ESPÍN, J.C.; del AMOR, F.; TUDELA, J.; MARTÍNÉZ,V.; CERDÁ, A. & GARCÍA-CÁNOVAS, F. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 5, p. 1537-1541, 2000.

67. ROSATO, S. S. **Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico para Fenol a Base de Peroxidase e Sílica Modificada**. Campinas, 2000. 77p. Tese (Doutor em Ciências). Universidade Estadual de Campinas.
68. SANTOS, S. A. **Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração**. Lavras, 1995. 72p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Lavras.
69. SCOTT, D. Oxireductases. IN: **Enzymes in Food Processing**. Academic Press New York, 1975. p. 216.
70. SILVA, E. **Estudo da atividade enzimica da polifenoloxidase e peroxidase em algumas frutas e hortaliças *in natura* e processadas**. Piracicaba, 1981. 108 p. (Mestre em Tecnologia de Alimentos) . Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
71. SILVA, E. ; NOGUEIRA, J.N. Efeito do calor na atividade da polifenoloxidase e peroxidase em algumas frutas e hortaliças. **Anais**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1983. v. 40, n. 1, p. 137-161.
72. SILVA, F.M.; SILVA, C.L.M. Note. Quality evaluation of cupuaçu (*Theobroma gradiflorum*) pureé after pasteurization and during storage. **Food Science and Technology International**, v. 6, n. 1, p. 53-58, 2000.

73. SODA, I.; HASEGAW, A.T.; SUZUKI, T.; OGURA, N. Purification and some properties of peroxidases from kiwifruit. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, n.6, p. 1677-1678, 1991.
74. SPIRONELLO, A.; BORTOLETTO, N.; SIGRIST, J.M.M. ; NAGAI, V. Potencial de Produção de Sementes de Cultivares e Clones de Abacaxi Visando ao Melhoramento Genético. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n.2, p. 177-184, 1994.
75. SPIRONELLO, A. ; TEIXEIRA, L. A.J. Abacaxi *Ananas comosus* L. Merrill IN: **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. Boletim IAC 200, 6 ed. 1998. p95.
76. SUNG, H.Y.; YU, R.H.; CHANG, C.T. Purification and some properties of peroxidase isozymes from pineapple stem. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 29, n.1, p. 185-195, 1993.
77. USBERTI FILHO, J. A.; SIQUEIRA, W. J. ; SPIRONELLO, A.; TANAKA, M.A.S.; SIGRIST, J.M.M.; MARTINS, A.L.M.; BORTOLETTO, N.; TSUHAKO AT. ; GUSHIKEN, A. **IAC Gomo-de-mel**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 1999 (Folder).
78. VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, 1981. v. 15, p. 49-127.
79. VAN LELYVELD, L.J.; VISSER, G.J. ; SWARTS D.H. The effects of various storage temperature on peroxidase activity and protein page gel-electrophoresis in Queen pineapple fruit. **Journal of Horticultural Science**, v. 66, n. 5, p. 629-634, 1991.

- 80.VOLOTOVSKY, V.; KIM, N. Ascorbic acid determination with an ion-sensitive field effect transistor based peroxidase biosensor. **Analytica Chimica**, v. 359, n. 1-2, p. 143-148, 1998.
- 81.WENG, Z.; HENDRICKX, M.; MAESMANS, G.; GEBRUERS, K.; TOBBACK, P. Thermostability of soluble and immobilized horseradish peroxidase, **Journal of Food Science**, v.56, n. 2, 574-578, 1991.
82. WHITAKER, J.R. Catalase and Peroxidase. IN:____ **Principles of Enzymology for The Food Sciences**, 2ed., Marcel Dekker-INC, New York, 1994, v. 26, p. 565-577.