



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

**EFEITO DO CONGELAMENTO E DA ESTOCAGEM NA  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POLIFENOLOXIDASE  
(PFO) E PEROXIDASE (POD) E NA COMPOSIÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA DE POLPA CONGELADA DE  
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum).**

**CAROLINA QUEIROGA FERREIRA**

**MANAUS**

**2009**

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

**CAROLINA QUEIROGA FERREIRA**

**EFEITO DO CONGELAMENTO E DA ESTOCAGEM NA  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POLIFENOLOXIDASE  
(PFO) E PEROXIDASE (POD) E NA COMPOSIÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA DE POLPA CONGELADA DE  
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção de título de mestra em Ciência de Alimentos.

**Orientadora: Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ila Maria de Aguiar Oliveira**

**MANAUS**

**2009**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Ferreira, Carolina Queiroga

F383e Efeito do congelamento e da estocagem na atividade enzimática da Polifenoloxidase (pfo) e Peroxidase (pod), na composição físico-química e qualidade microbiológica de polpa congelada de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schum) / Carolina Queiroga Ferreira. - Manaus: UFAM, 2009.

60f. il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) — Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira

1. Cupuaçu 2. Enzimas 3. Estocagem de alimentos I. Oliveira, Ila Maria de Aguiar II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 664.8.037:633.74(043.3)

**CAROLINA QUEIROGA FERREIRA**

**EFEITO DO CONGELAMENTO E DA ESTOCAGEM NA  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POLIFENOLOXIDASE  
(PFO) E PEROXIDASE (POD) E NA COMPOSIÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA DE POLPA CONGELADA DE  
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção de título de mestra em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

**Professora Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira**

**Professor Dr. Takeshi Matsuura**

**Professor Dr. José Merched Char**

**Ao meu Amado e Querido Deus!  
Pela certeza que este foi mais um  
presente Teu para mim.  
Por saber que tudo que vem de Ti é o  
melhor.  
Por Teu apoio nos momentos mais  
difíceis.  
Este trabalho é Teu.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por Seu amor, paciência, carinho e consolo nos momentos mais difíceis desta etapa da minha vida. Sem Ti, nada seria possível!

Aos meus pais! Mãe, suas mãos estão aqui também! Obrigada pelas horas intermináveis me ajudando com as vidrarias. Pai, obrigada pelo tempo gasto nas manhãs de domingo!

Ao meu querido Cláudio Alex e à minha família por suas orações, apoio e carinho! Sem vocês tudo teria sido mais difícil!

À professora Doutora Ila Maria de Aguiar Oliveira por sua direção, apoio e conforto durante todo o curso. Professora, sua dedicação e sabedoria são uma inspiração para mim.

Às minhas amigas do coração: Ivana Andrade, Cássia Sobreira e Aline Maciel, por todo apoio e ajuda nas análises.

Às professoras Cynthia Tereza, Ângela Líbia, Marlene Donádio e Jerusa Andrade, pelas orientações extras e apoio durante os experimentos laboratoriais.

Ao corpo técnico do Departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Laboratório de Bioquímica de Alimentos – CPTA pela ajuda e apoio nas análises.

Às funcionárias da Biblioteca Setorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, que facilitaram o trabalho na pesquisa bibliográfica.

Ao corpo técnico do LABIO pela ajuda nas análises estatísticas.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>Produção de frutos de cupuaçu no período de 1998-2007.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Fluxo da produção e obtenção da polpa pasteurizada de cupuaçu....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Seqüência de processamento e análises das amostras.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Plot de distribuição normal dos resíduos da peroxidase em polpa de cupuaçu.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Plot de distribuição normal dos resíduos dos sólidos totais.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Plot de distribuição normal dos resíduos do pH.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Plot de distribuição normal dos resíduos dos sólidos solúveis (°Brix).....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Plot de distribuição normal dos resíduos da vitamina C.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Plot de distribuição normal dos resíduos da acidez.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Plot de distribuição normal dos resíduos dos açúcares totais.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição físico-química da polpa do cupuaçu.....	46
Tabela 2. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em polpa congelada de cupuaçu ( <i>Lote 1</i> ) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses.....	49
Tabela 3. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em polpa congelada de cupuaçu ( <i>Lote 2</i> ) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses.....	50
Tabela 4. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em polpa congelada de cupuaçu ( <i>Lote 3</i> ) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses.....	51
Tabela 5. Análises físico-químicas em polpa congelada de cupuaçu ( <i>Lote 1</i> ) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses...	53
Tabela 6. Análises físico-químicas em polpa congelada de cupuaçu ( <i>Lote 2</i> ) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses...	54
Tabela 7. Análises físico-químicas em polpa congelada de cupuaçu ( <i>Lote 3</i> ) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses...	55



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Cupuaçu.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Peroxidase.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Polifenoloxidase.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Conservação de alimentos a baixas temperaturas.....</b>	<b>18</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>23</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>25</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Obtenção e preparo das amostras.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Análises enzimáticas.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Análises físico-químicas.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Análises microbiológicas.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5 Análise estatística.....</b>	<b>30</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1.INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Cupuaçu

O interesse em frutos amazônicos tem aumentado de forma significativa nos últimos anos, de um lado pela procura incessante por novos produtos e sabores exóticos, e de outro, devido a sua produção e comercialização serem consideradas um bom meio de aumentar a renda do pequeno produtor, preservando a natureza (ROGEZ et al., 2004).

O cupuaçu é um dos mais importantes frutos tipicamente amazônicos. Seu valor econômico encontra-se na polpa, que é consumida na forma de suco, néctar, iogurte, sorvete, creme, licor, torta, geléia, compota, biscoito, sorvete, e outros doces, os quais, na sua maioria são processados de forma artesanal, em pequenas escalas de produção (COHEN, 2005). Este fruto apresenta, além de seu aroma/sabor exótico, boas propriedades de conservação (SILVA, SILVA, 1999). De acordo com Quijano e Pino (2007), o cupuaçu é um dos mais promissores frutos para comercialização dentre a rica flora amazônica.

Segundo dados obtidos pelo IDAM (Instituto de Desenvolvimento Agropecuário do Amazonas) a produção de cupuaçu no estado do Amazonas foi de 4.495 milhões de frutos no ano de 2007 (Anexo I).

Além do aumento na produção de frutos, cresce também a industrialização de sua polpa, que é comercializada nos estados produtores de cupuaçu (Pará, Amazonas, Acre e Rondônia), em outros estados do Brasil e no exterior (COHEN, 2005).

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum) é uma das mais populares frutíferas da Amazônia. Pertence à classe *Magnoliopsida*, subclasse *Dilleniidae*, ordem *Malvales*, família *Sterculiaceae* e ao gênero *Theobroma* (IZQUIERDO, 2001). A

família a qual pertence (Sterculiaceae), possui cerca de cinquenta gêneros e setecentas e cinquenta espécies (PURSEGLOVE, 1968 apud VENTURIERI, 1993).

O fruto do cupuaçu é uma baga elipsóide ou oblonga com extremidades obtusas, arredondadas, variando de 12-15 cm de comprimento e 10-12cm de diâmetro pesando até 1,5 Kg, com casca dura, lenhosa porém facilmente quebrável, recoberta por um indumento ferrugineo que se desprende com o manuseio. Possui mesocarpo (polpa) abundante, de cor amarelada ou esbranquiçada, de sabor ácido, cheiro forte e agradável. As sementes, de 20 a 50 unidades, são recobertas por fina película e possuem um alto valor nutritivo, representando cerca de 20% do fruto (VENTURIERI, 1993).

A época de floração varia de região para região, porém, de modo geral, a safra inicia-se no mês de outubro indo até maio do ano seguinte, tendo picos de produção nos meses de dezembro, janeiro e março (VILLACHICA, 1996 apud OLIVEIRA, 2001).

Os frutos caem ao solo quando se completa a maturação, devendo ser recolhidos diariamente; frutos colhidos diretamente da árvore geralmente não completam sua maturação, não havendo o desenvolvimento do sabor e aromas característicos, tornando o fruto inadequado ao consumo (VENTURIERI, 1998 apud OLIVEIRA, 2001).

Após a colheita, os frutos passam a ter vida independente e utilizam substratos acumulados durante o desenvolvimento e maturação. Durante o amadurecimento dos frutos são observadas alterações nas proteínas, glicídios, lipídios, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais e alguns componentes da parede celular. Em condições não controladas as modificações destes constituintes podem levar a alterações indesejáveis, acelerando o processo de senescência (LIMA, 1993).

O fruto pode permanecer em torno de uma semana em condições satisfatórias para o consumo ou beneficiamento, ainda na casca, sem quebrá-la. A partir daí, caso não seja beneficiado, entra em rápido processo de deterioração (OLIVEIRA, 2001).

O rendimento dos frutos do cupuaçuzeiro é variável de acordo com tamanho, genótipo e o período de safra, bem como o método de extração da sua polpa. Para processamento industrial utiliza-se a despulpadeira que deixa a polpa homogênea e com proporção variável de acordo com o equipamento utilizado. Este método é empregado por produtores, revendedores e indústrias (OLIVEIRA, 2001).

O sistema de transporte do produtor até o mercado consumidor ocorre por via fluvial ou terrestre. Os frutos são acondicionados e transportados em condições precárias, geralmente ao ambiente, levando até cinco dias entre a coleta e o centro consumidor (ARAGÃO, 1992 apud OLIVEIRA, 2001). Estima-se que sejam grandes as perdas pós-colheita de cupuaçu. Os fatores que contribuem vão desde as condições da alta temperatura e umidade relativa da região, propícias ao desenvolvimento de microrganismos responsáveis pela deterioração, até os métodos inadequados de manuseio na coleta, transporte, armazenamento e comercialização (LIMA, 1993).

A composição do cupuaçu já foi determinada por diversos autores (Anexo II). A elevada acidez em ácido cítrico da polpa, que atinge cerca de 2,15 (BARBOSA et al. 1978 apud VENTURIERI, 1993) a 2,35% (CHAAR, 1980 apud VENTURIERI, 1999), favorece a fabricação de néctares, geléias e outros doces pastosos (VENTURIERI, 1993). Porém, este sabor ácido da polpa restringe seu consumo na forma “in natura”.

A polpa é comercializada, geralmente, na forma pasteurizada e congelada. A técnica de congelamento industrial mais comumente utilizada é a do túnel de congelamento, onde as temperaturas são muito baixas. Quando descongelada esta polpa se caracteriza como se não houvesse sido congelada. Essa técnica de congelamento rápido e profundo deveria evitar a perda de vitamina C, como também controlar a atividade microbiana (VENTURIERI, 1999).

## 1.2 Peroxidase

As peroxidases (POD) (doador: peróxido de hidrogênio oxirredutase, E.C. 1.11.1.7) são enzimas amplamente distribuídas na natureza que catalisam a oxidação do substrato utilizando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como molécula aceptora (DUNFORD, 1999 apud PERALTA et al., 2004). Trata-se de uma heme proteína que promove a degradação de um grande número de compostos incluindo aromáticos como fenóis, hidroquinonas, derivados de benzidina, entre outros (PERALTA et al., 2004). Em muitos casos o produto da oxidação é colorido e serve como base para a determinação colorimétrica da atividade da peroxidase (BRITO, et al., 2005).

As peroxidases estão vastamente distribuídas no reino vegetal (HALPHIN et al. apud PEREIRA, 2003), sendo a peroxidase da raiz forte (HRP, horseradish peroxidase) a principal representante desse grupo de enzimas de origem vegetal, além de ser a mais estudada e a de maior importância comercial (PEREIRA, 2003). Várias atividades fisiológicas têm sido atribuídas às isoenzimas da peroxidase de raiz forte: metabolismo do ácido 3-indolacético, lignificação, “*cross-linking*” de polímeros da parede celular, formação da suberina e resistência às infecções. Porém, muito pouco se sabe sobre suas funções específicas na planta (VEITCH, 2004).

Nos vegetais, a peroxidase está localizada na forma solúvel no citoplasma celular e na forma insolúvel, ionicamente ou covalentemente, ligada à parede celular (GKINIS, FENNEMA, 1978; McLELLAND, ROBINSON, 1981; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981 apud MORALES-BLANCAS et al., 2002). As múltiplas formas de isoperoxidasas encontradas em um mesmo extrato podem diferir quanto à massa molecular, ponto isoelétrico, pH e temperatura ótimos, especificidade de substrato, composição de aminoácidos e açúcares e estabilidade térmica (SARAIVA et al., 2007).

A utilização mais comum desta enzima é na elaboração de “kits” de imunoenaios enzimáticos e na imuno-histoquímica. Por sua capacidade em catalisar a oxidação de materiais fenólicos esta enzima também é utilizada em diferentes processos nas indústrias de panificação, têxteis e químicas (MIRANDA, CASCONI, 1997). A peroxidase também está sendo utilizada como catalisadora na formação de radicais livres para síntese de vários polímeros (KOBAYASHI, UYAMA, KIMURA, 2001), na promoção de biotransformações estereoespecíficas (ADAM et al., 1999 apud SARAIVA, 2007) e para biorremediação (KLIBANOV, TU, SCOTT, 1983 apud SARAIVA, 2007).

O comportamento da peroxidase durante o aquecimento e resfriamento ou congelamento é o tópico mais investigado em relação a esta enzima (BURNETTE, 1977 apud PEREIRA, 2003). E o controle de sua atividade é importante na preservação e no processamento dos alimentos (VALDERRAMA, CLEMENTE, 2004).

A peroxidase está associada a mudanças deteriorativas no “*flavour*” de vegetais estocados e é largamente utilizada como índice de branqueamento em tratamentos térmicos devido à sua resistência à inativação térmica (BURNETTE, 1977; KHAN, ROBINSON, 1993; LÓPEZ-SERRANO, ROS BARCELÓ, 1997 apud SANTOS, 2001).

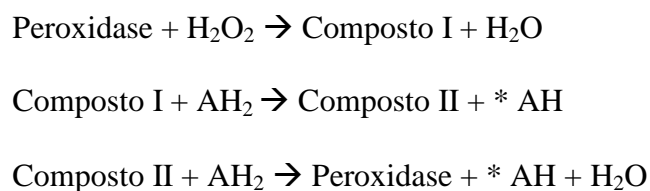
O tratamento térmico comercialmente utilizado durante o processamento de sucos de frutas e vegetais utiliza altas temperaturas em curto tempo (HTST), porém esta intervenção não é muito eficaz para a inativação irreversível da peroxidase (KHAN, ROBINSON, 1993; McLELLAND, ROBINSON, 1987 apud VALDERRAMA, CLEMENTE, 2004).

A perda da atividade da peroxidase durante o tratamento térmico depende da origem da enzima, pH, concentração enzimática e métodos de ensaio. A inativação

desta enzima em extratos vegetais tem se mostrado, de maneira geral, como sendo não-linear devido aos fatores tempo e temperatura (VALDERRAMA, CLEMENTE, 2004).

A peroxidase também é capaz de atuar em condições adversas de temperatura e umidade. Pode agir mesmo em temperaturas abaixo de zero e em condições de umidade muito baixas. A peroxidase parece ser importante no ponto de vista nutricional e na alteração da coloração de frutas e vegetais (RICHARDSON; HYSLOP, 1985 apud SANTOS, 2001).

A reação ocorre em múltiplas etapas, como demonstrado abaixo:



No primeiro estágio do processo catalítico ocorre a reação do sítio ativo com o peróxido de hidrogênio. A água oxigenada é reduzida produzindo água e a proteína oxidada formando o composto I, uma forma intermediária reativa que apresenta um estado de oxidação mais alto em comparação com a enzima nativa. No segundo estágio da reação, o composto I oxida uma molécula de substrato ( $\text{AH}_2$ ) gerando um substrato radicalar e o composto II. Finalmente, o composto II é reduzido por uma segunda molécula de substrato para o estado ferro III latente (BANCI, 1997; HINER et al., 2001 apud PEREIRA, 2003).

Segundo Cano et al. (1998) citado por Pereira (2003), a ação prejudicial da peroxidase é observada na maioria das frutas e vegetais congelados, junto com a lipoxigenase, catalase e polifenoloxidase. As atividades destas enzimas diminuem a baixas temperaturas, exceto das peroxidases. As reações químicas que elas catalisam

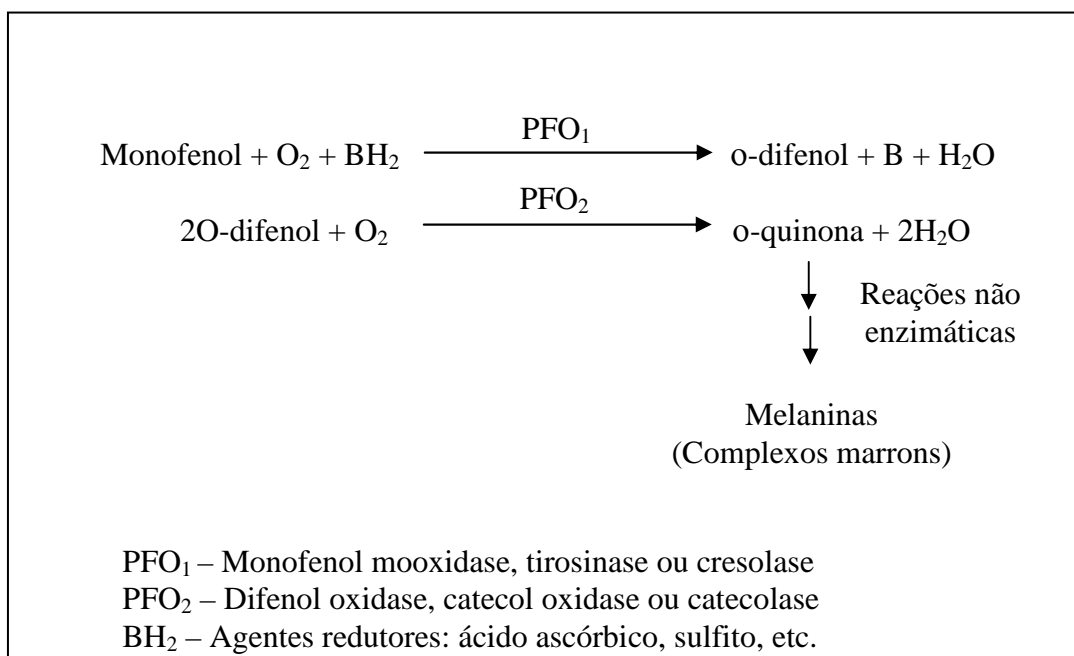
podem ocorrer mesmo a temperaturas de subcongelamento. A quebra das células da membrana pelo congelamento descompartmentaliza as enzimas que podem levar a formação de outros compostos fisiológicos. A atividade da peroxidase é usualmente reduzida ou reversivelmente inativada a baixas temperaturas, e a regeneração é frequentemente observada depois de longos períodos de estocagem.

### 1.3 Polifenoloxidase

A polifenoloxidase (PFO) é uma enzima que contém íon cobre as quais catalisam a hidroxilação de monofenóis a *O*-difenois (atividade de cresolase ou monofenol monooxigenase EC 1.14.18.1) e a oxidação de *O*-difenois à *O*-quinona (atividade de catecolase ou difenolase EC 1.10.3.1) (EIDHIN, 2005).

Em ambas as atividades, a PFO, também conhecida como catecol oxidase, catecolase, difenoloxidase, *o*-difenolase, fenolase e tirosinase, utiliza o oxigênio molecular (MARTINEZ; WHITAKER, 1995 apud SANTOS, 2001).

As reações catalisadas pela polifenoloxidase são demonstradas a seguir:



Fonte: SANTOS, 2001; ARAUJO, 1985.



As polifenoloxidasas são responsáveis pelas reações indesejáveis de escurecimento enzimático que ocorrem nos tecidos danificados de vegetais, frutas frescas, bem como em alguns produtos de origem animal, durante a manipulação, estoque e processamento. (MAYER, 1987; MAYER, HAREL, 1991 apud KAVRAYAN, AYDEMIR, 2001). O escurecimento enzimático não ocorre nas plantas íntegras, já que os compostos fenólicos nos vacúolos estão separados da PFO no citoplasma (YEMENICIOĞLU et al., 1997). No processamento de alimentos, há uma interrupção na seqüência das reações metabólicas, com a liberação das enzimas que, em contato com os substratos, promovem o escurecimento do alimento (ARAUJO, 1985).

A PFO está distribuída não somente em vegetais, mas também em outras formas de vida, incluindo insetos, crustáceos, moluscos e mamíferos, estando envolvidas na pigmentação da pele através da ação sobre a tirosina (ARAUJO, 1985). Em todos os casos essa enzima está associada à pigmentação escura do organismo e parece ter uma função protetora (MAYER; HAREL, 1991 apud SANTOS, 2001).

Ziot et al. (1998) citado por Santos (2001) afirmam que palmeiras resistentes acumulam teores fenólicos significativamente superiores aos de plantas superiores. Estes compostos podem contribuir para a defesa da palmeira, uma vez que a insolubilização de fenóis nas paredes celulares reforça sua rigidez e as torna mais resistente. Outro fato que sugere fortemente a relação entre a PFO e mecanismos de defesa da planta contra doenças é que quando insetos comem as folhas, algumas estruturas são rompidas e a PFO fica livre para reagir com polifenóis formando polímeros escuros. Esses polímeros obstruem a boca dos insetos inibindo o ataque dos mesmos (MURATA et al., 1995 apud SANTOS, 2001).

A formação de pigmentos escuros nos alimentos é devida a reações secundárias resultantes da interação de quinonas, culminando na formação de melaninas. O

pigmento melanina pode sofrer oxidações adicionais e interagir com outros constituintes vegetais formando complexos coloridos (ARAÚJO, 1985).

O pH dos tecidos das plantas tem um papel importante nas reações de natureza enzimática. No caso do escurecimento causado por enzimas, abaixando-se o pH natural do meio observa-se uma diminuição da atividade das enzimas oxidativas (EVANGELISTA, 2001).

Segundo Evangelista (2001) a PFO tem seu pH ativo entre 5,0 e 7,0, tornando-se irreversivelmente inativada em pH menor que 3. Cano et al. (1996), demonstram que o pH ótimo de atividade para esta enzima isolada do mamão é de 6,5 quando se utiliza o catecol como substrato.

Yang et al. (2001) estudaram a PFO parcialmente purificada da casca de banana (*Musa sapientum* L.) e demonstraram o efeito da temperatura sobre esta enzima: a temperatura ótima para a PFO foi de 30°C. Quando se trata de inativação térmica observou-se que é uma enzima relativamente estável a altas temperaturas: cerca de 90% de sua atividade permaneceu depois de um tratamento térmico a 60°C por 30 minutos.

Já Santos (2001) demonstrou que a PFO do açaí apresentou sua atividade ótima em pH 6,0 a uma temperatura de 45°C. No estudo da estabilidade da enzima em diferentes pH foram observadas diferentes faixas de pH indicando a presença de isoenzimas. A PFO se mostrou uma enzima termoinstável, perdendo cerca de 50% de sua atividade com tratamento térmico de 30°C por 10 minutos.

#### **1.4 Conservação de Alimentos a baixas temperaturas**

Aspectos relacionados com a qualidade dos alimentos e a determinação do tempo de prateleira são importantes devido ao aumento do consumo de alimentos processados, dentre os quais os vegetais congelados ocupam um espaço proeminente. O grande problema é como estabelecer o critério mais apropriado para avaliar a qualidade

(IFT, 1981 apud APARICIO-CUESTA, MATEOS-NOTARIO, RIVAS-GONZALO, 1992).

O congelamento é um dos processos mais indicados para a preservação das propriedades químicas, nutricionais e sensoriais de polpas. Embora apresente custos de produção, transporte e armazenamento relativamente elevados (FU, LABUZA, 1997 apud LOPES et al., 2005), pode ser considerado o mais simples e natural meio de preservar vegetais (CANO, 1996 apud GÖKMEN, 2005). É utilizado para manter a qualidade do produto durante um longo período de estocagem e resulta em um baixo nível da maioria das reações deteriorativas, tais como: envelhecimento, crescimento microbiano, deterioração enzimática e química (BAHÇECI et al., 2005). Entretanto, o congelamento não previne o desenvolvimento de “off-flavor”, deterioração da cor e da textura de vegetais congelados já que os sistemas enzimáticos continuam ativos mesmo em temperaturas abaixo de zero (RODRIGUEZ-SAONA, BARRETT, SELIVONCHICK, 1995 apud BAHÇECI et al., 2005).

Outra utilidade deste método é a de proporcionar maior disponibilidade de reservas de alimentos “frescos” em domicílios e estabelecimentos institucionais (EVANGELISTA, 2001). Este tratamento também favorece a comercialização de produtos de boa qualidade entre países distantes entre si.

A contaminação microbiológica dos alimentos é o maior interesse para a indústria de alimentos, agências reguladoras e consumidores. Estima-se que cerca de 76 milhões de pessoas contraem doenças de origem alimentar cada ano nos Estados Unidos; a estimativa dos custos relativos a doenças alimentares neste país está entre 10 e 83 bilhões de dólares por ano (USFDA, 2001 apud WU, 2008).

Sabe-se que o congelamento inibe a atividade microbiana e diminui a velocidade de reações químicas (CANET PARREÑO, 1996 apud MONDRAGÓN-

PORTOCARRERO, 2006). Portanto, os microrganismos não devem ser considerados um grande problema em alimentos congelados, pois estes não crescem em temperaturas usuais de congelamento (-18°C) (FU, LABUZA, 1997 apud LOPES et al., 2005). E segundo Hurst (1977), Foegeding e Ray (1992) citados por Wu (2008) organismos patogênicos e deteriorantes podem ser danificados juntamente com os alimentos durante o processamento e manuseio: tratamento térmico, refrigeração, congelamento, secagem e irradiação, exposição a conservantes, acidez ou baixa atividade de água (HURST, 1977; FOEGEDING and RAY, 1992; JAY, 2005).

No entanto, a ação de enzimas é preocupante, pois pode provocar significativas alterações de cor e sabor em polpas de frutas congeladas (FU, LABUZA, 1997 apud LOPES et al., 2005).

Durante o congelamento, uma parte da fração aquosa congela e forma cristais de gelo, os quais prejudicam a integridade dos compartimentos celulares. A membrana celular perde seu estado osmótico e sua semi-permeabilidade (TREGUNNO, GOFF, 1996 apud TALENS et al., 2003). O sistema metabólico do tecido vegetal é interrompido, ocorre o deslocamento dos sistemas enzimáticos e a célula perde sua turgidez. Além de uma grande mudança na textura do tecido, reações bioquímicas deteriorativas são muito prováveis (TALENS, 2003).

Em estudos recentes tem-se verificado que as mais importantes mudanças no teor nutricional dos alimentos congelados ocorrem devido ao tempo de estocagem (MOHAMMAD, MOHSEN, ZOHREH, 2004).

Vários estudos foram realizados para avaliar o efeito do congelamento na preservação das qualidades nutricionais e físico-químicas do alimento, bem como verificar o efeito das baixas temperaturas sobre os sistemas enzimáticos presentes nas células teciduais.

Em trabalho realizado por Lim et al. (2006) foi observada uma pequena mudança no pH de ervilhas congeladas submetidas previamente a branqueamento térmico e armazenadas em temperaturas de -5°C, -12, -20, -25 e -30°C por 4 meses. No entanto, o nível de vitamina C permaneceu constante.

Lopes et al. (2005) analisaram a estabilidade da polpa de pitanga sob congelamento e observaram que os valores de pH, acidez titulável, sólidos totais, teores de açúcares redutores e totais, não variaram estatisticamente mantendo-se dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente. Porém, o teor de carotenóides totais apresentou uma queda significativa durante os primeiros trinta dias de armazenamento em temperatura de -18°C (cerca de 13,76%). Já nos tempos de 45, 60 e 90 dias não foi verificado decréscimo importante.

Resultados de análises físico-químicas semelhantes aos de Lopes et al. (2005) também foram encontrados por Lisiewska e Kmiecik (2000). Os autores demonstram que o congelamento dos cubos de tomate não alterou de forma significativa os teores de matéria seca, sólidos solúveis, açúcares, fibra dietética, nitrogênio total, nitratos, nitritos, pH, cinzas e alcalinidade.

Silva et al. (2004) avaliaram a estabilidade do ácido ascórbico em pseudofrutos de caju congelados e armazenados em temperatura de -18°C por um período de 90 dias, a análise feita nas amostras depois de um período de 60 dias mostraram uma redução em aproximadamente 37% de vitamina C; ao final dos 90 dias a perda foi de 60%.

Em trabalho realizado por Ziena (2000), que avaliou a qualidade do suco de *Citrus latifolia tan* (lima) durante o armazenamento, demonstrou-se que o pH das amostras congeladas a -20°C e armazenadas por 7,5 meses decaiu entre 1,1% e 1,7%. Já o nível da acidez titulável aumentou gradualmente durante o período do armazenamento. Com relação aos açúcares redutores observou-se que houve um

aumento enquanto que os açúcares totais apresentaram um decréscimo. O valor dos sólidos totais (°Brix) permaneceu estável.

O trabalho realizado por Lobo e Cano (1998) o qual avaliou a conservação de mamões hermafroditas e fêmeas pelo congelamento, demonstrou que o congelamento por si só resultou em um decréscimo acentuado no pH de ambos cultivares e um aumento significativo na acidez titulável do mamão fêmea e nos ácidos solúveis do mamão hermafrodita.

Segundo Skrede (1996) citado por Ancos et al. (2000) fatores como variedade, maturação, área de crescimento e variações sazonais podem reverter alguns dos efeitos do congelamento.

## RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum.*) está entre os frutos mais populares da Amazônia, sendo comercializado como polpa congelada pasteurizada ou não. Durante o processamento dos frutos o tecido vegetal torna-se escuro devido às reações catalisadas por enzimas oxidativas: peroxidase e polifenoloxidase, presentes naturalmente nos frutos atuando não somente na alteração da cor, mas também na degradação dos nutrientes, especialmente durante o armazenamento. O congelamento e a pasteurização são geralmente utilizados para minimizar os efeitos causados pela oxidação e eliminar parte dos microrganismos presentes nos frutos. Este estudo teve por objetivo avaliar as alterações físico-químicas e enzimáticas em três lotes de polpas congeladas de cupuaçu, provenientes de diferentes regiões, pasteurizadas e não pasteurizadas, armazenadas em temperatura entre -25°C e -30°C por um período de 12 meses. As análises físico-químicas foram realizadas a partir das Normas do Instituto Adolfo Lutz (2005) e as análises de polifenoloxidase e peroxidase, segundo método descrito por Oktay, M. et al. (1995) e Khan e Robinson (1994), respectivamente. Foi realizada uma análise estatística dos dados coletados segundo o modelo linear geral e através do teste ANOVA. Após o período de armazenamento observou-se que a procedência do lote, o tempo de armazenamento e a submissão ao processo de pasteurização exerceram influências significativas (1%,  $p < 0,05$ ) nos teores de sólidos totais, ácido ascórbico, acidez titulável e na atividade da peroxidase. Os açúcares foram influenciados de forma significativa (1%,  $p < 0,05$ ) pelo lote, pasteurização e tempo de estocagem, bem como pela interação do lote e da pasteurização. A polifenoloxidase nas amostras pasteurizadas

e não pasteurizadas, em todos os lotes, apresentou variações durante os doze meses de armazenamento sob congelamento.

**Palavras-chave:** frutas da Amazônia, enzimas, composição química, conservação pelo frio, padrão de qualidade.



## ABSTRACT

Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) is one of the most popular fruit of Amazon. The pulp is commercialized in two forms: pasteurized or non pasteurized. During processing, the pulp becomes dark due to reactions catalyzed by oxidative enzymes: such as peroxidase and polyphenol oxidase. These enzymes are naturally present in the fruit and causes alteration in its color, and also, in degradation of fruit nutrients, especially during the storage. Generally, freezing and pasteurization are used to minimize the effect caused by the oxidation reactions and to eliminate part of the microorganisms present in the fruit. The objective of this study was to evaluate the enzymatic alterations in three lots of frozen cupuaçu pulp, received from different regions, on pasteurized and non pasteurized forms and stored in between -25°C and -30°C for a 12 months period. The physico-chemical analyses were carried according to Norms of the Instituto Adolfo Lutz (2005) and the analyses of polifenoloxidase and peroxidase, according to Oktay et al. (1995) and Khan and Robinson (1994), respectively. After one year of storage, it was observed that the source of each lot, the time of storage and the pasteurization processing show significant influences (1%,  $p < 0,05$ ) in total solid level, ascorbic acid content, titratable acidity and peroxidase activity. The source of each lot, the pasteurization processing, times of storage and the interaction between lot source and pasteurization processing showed significative differences (1%,  $p < 0,05$ ) on the sugars content. The polyphenol oxidases in the pasteurized and non pasteurized pulps, from the three lots, presented variations during twelve months of storage under freezing.

**Key words:** Amazonian fruit, enzymes, chemical composition, conservation by low temperature, quality standard.

## 2. INTRODUÇÃO

A região Amazônica apresenta como vocação natural o cultivo de plantas perenes, com particular relevância para as espécies frutíferas e o interesse em frutos amazônicos tem aumentado de forma significativa nos últimos anos, de um lado pela procura incessante por novos produtos e sabores exóticos, e de outro, devido a sua produção e comercialização serem consideradas um bom meio de aumentar a renda do pequeno produtor, preservando a natureza (ROGEZ et al., 2004).

Dentre estas frutas destaca-se o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), cuja polpa é bastante apreciada e utilizada no preparo de vários tipos de alimentos (COHEN, 2005). Este fruto apresenta, além de seu aroma/sabor exótico, boas propriedades de conservação (SILVA, SILVA, 1999). De acordo com Quijano e Pino (2007), vários autores têm relatado que o cupuaçu é um dos mais promissores frutos para comercialização dentre a rica flora amazônica.

Durante o processamento dos frutos para produção das polpas o tecido vegetal é danificado e torna-se rapidamente escuro. Esta alteração da cor é promovida por reações químicas catalisadas por enzimas oxidativas: a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PFO), presentes naturalmente nos frutos, as quais, segundo Lester et al. (2004) são utilizadas pelos frutos em várias combinações para regular e manter as espécies de oxigênio reativo sob controle. Estas enzimas atuam não somente alterando a coloração da polpa, mas também na degradação dos nutrientes presentes nos frutos. Segundo Richardson (1985) citado por Brito (2005) a POD pode participar da destruição de vitamina C e na descoloração de antocianinas, além de catalisar a reação de degradação de ácidos graxos insaturados, produzindo voláteis que alteram o sabor. Com o intuito de minimizar os efeitos provocados pela oxidação e diminuir a população microbiana

presente normalmente nos frutos, a indústria lança mão do congelamento como forma de conservação dos produtos. Porém este processo somente retarda a ação enzimática e inibe o crescimento da população microbiana, principalmente as formas vegetativas, enquanto que os esporos são pouco afetados, devendo o produtor utilizar outro tratamento como, por exemplo, a pasteurização para inativar as enzimas e eliminar a carga microbiana antes do congelamento e armazenagem, embora, a peroxidase por ser uma enzima termo resistente, geralmente permanece ativa após o tratamento térmico.

Porém, a aplicação de calor poderá levar a uma perda de certos nutrientes, principalmente a vitamina C, devendo-se observar o tempo e temperatura a que são submetidas as polpas.

Portanto, torna-se necessário avaliar a eficácia e o efeito da pasteurização e do congelamento com relação à atividade das enzimas oxidativas dos microrganismos e propriedades físico-químicas das polpas, para que seja apresentado ao consumidor um produto com qualidade nutricional adequada e segurança quanto à ausência de microrganismos patogênicos.

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase durante o período de estocagem de 12 meses, analisar a eficácia da pasteurização e do congelamento sobre a população microbiana presente nas polpas de cupuaçu e também monitorar as alterações físico-químicas ocorridas durante o processamento, congelamento e armazenagem das referidas polpas.

### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

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

### ***3.1 Obtenção e preparação das amostras:***

As polpas congeladas de cupuaçu foram obtidas diretamente de uma indústria de processamento de frutas do município de Manaus, coletadas em três lotes (lotes 1, 2 e 3). Entretanto cada lote apresentou procedências diferentes: o lote 1 proveniente de Roraima, o lote 2 de Itacoatiara e Roraima e o lote 3 somente de Itacoatiara (anexo III).

Para as análises, foi coletada uma amostra de 2,4 kg de polpa de cada lote, antes e depois da pasteurização, a qual foi subdividida e armazenada da seguinte maneira: 700g das polpas não pasteurizadas foram subdivididas em porções menores (100g) e acondicionadas em sacos de polietileno previamente esterilizados em luz UV, constituindo a amostra para os testes microbiológicos subsequentes. Os 1,7 kg restantes das referidas polpas não pasteurizadas receberam o mesmo processamento de subdivisão sendo, entretanto, acondicionadas em sacos de polietileno sem tratamento com luz UV. Estas amostras foram armazenadas em freezer (Electrolux/Prosdócimo Freezer F25) em temperatura entre -25°C e -30°C. A mesma quantidade (2,4kg) de polpas pasteurizadas foi coletada e mantida em sua embalagem comercial original no mesmo freezer que continha as amostras não pasteurizadas (anexo IV).

A cada 2 meses durante um período de 12 meses foram realizadas análises enzimáticas, físico-químicas e microbiológicas constituindo sete tempos de análise (t0-t6).

### ***3.2 Análises Enzimáticas:***

As atividades da polifenoloxidase e da peroxidase foram determinadas segundo o método descrito por Oktay, M. et al. (1995) e Khan e Robinson (1994), respectivamente.

### ***3.3 Análises Físico-químicas:***

Para avaliação da composição físico química, foi realizada a determinação do teor de açúcares totais (g/100g), sólidos solúveis em °Brix, pH, acidez titulável expressa em ácido cítrico (g/100g), ácido ascórbico (mg/100g) e sólidos totais (g/100g), atendendo a exigência da Instrução Normativa Nº. 01, de 7 de janeiro de 2000 , do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – M.A.P.A., que aprovou o regulamento técnico geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpas de frutas.

As análises foram executadas a partir do estabelecido pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Com exceção da determinação da vitamina C que seguiu o método descrito por Ranganna (1986), com modificações.

### ***3.4 Análises microbiológicas:***

No tempo inicial foram realizadas análises microbiológicas para verificar a presença de Salmonela e Coliformes termo-tolerantes (45°C) em cada amostra dos referidos lotes de acordo com os padrões exigidos pela American Public Health Association – A.P.H.A. (1992), segundo o estipulado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, através da Resolução – RDC nº12 de 2 de Janeiro de 2001, publicada no Diário Oficial da União, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

Também neste tempo, foi realizada a contagem de bolores e leveduras segundo o determinado pela Instrução Normativa Nº. 01, de 7 de janeiro de 2000 , do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – M.A.P.A., de estabelece um nível máximo de  $5 \times 10^3$  UFC/g para polpa não pasteurizada e de  $2 \times 10^3$  UFC/g para polpa pasteurizada.

### ***3.5 Análise Estatística:***

Os dados coletados foram avaliados estatisticamente de acordo com Modelo Geral Linear através do teste ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## **4.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***Análises Enzimáticas:***

#### ***Amostra Lote 1:***

Com relação ao lote 1, observou-se que as amostras apresentaram resultados variáveis ao longo dos tempos de análise (anexo V): Na amostra pasteurizada, a atividade inicial da peroxidase foi de 9777UA apresentando um aumento de 4% na atividade após 2 meses de estocagem, esta regeneração da atividade da peroxidase está de acordo com o encontrado por Pinsent (1962) que observou um aumento da peroxidase em ervilhas branqueadas e congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Este aumento pode ser explicado de acordo com o exposto por Cano, Marin e Fúster (1990), que afirmam que a solubilidade da peroxidase pode ser afetada pela perda da integridade da membrana celular como resultado do crescimento dos cristais de gelo no tecido promovendo o aumento da atividade residual. A pós 8 meses de congelamento houve uma diminuição em 44% da atividade inicial. Ao final dos 12 meses a atividade ficou em 9650UA.

Segundo Khan, Robinson, 1993; Mclelland, Robinson, 1987 apud Valderrama, Clemente (2004) o tratamento térmico de sucos de frutas e vegetais que utiliza altas temperaturas em curto tempo (HTST) não é muito eficaz para a inativação irreversível da peroxidase. Também a inativação desta enzima em extratos vegetais tem se mostrado, de maneira geral, como sendo não-linear devido aos fatores tempo e temperatura.

Para o mesmo lote de polpa de cupuaçu a atividade da polifenoloxidase apresentou um valor inicial de 35UA, apresentando um aumento em 57% na atividade após o sexto mês de congelamento, a atividade ao final do período foi de 30UA.

Já na amostra não pasteurizada, o resultado inicial da atividade da peroxidase foi de 16780UA, apresentando uma redução em 48% na atividade nos dois primeiros meses de análise, seguida por um aumento em 19% ao final de 4 meses de armazenamento e com 12 meses o resultado foi de 8225UA. Lobo e Cano (1998) também observaram um aumento na atividade da peroxidase em pedaços de mamões fêmeos congelados e armazenados a  $-24^{\circ}\text{C}$  ao final de três meses.

Com relação à polifenoloxidase na amostra não pasteurizada a atividade inicial foi de 30UA, apresentando um aumento em 50% após 4 meses de estocagem o que está de acordo com o observado por Lobo e Cano (1998) que notaram um aumento na atividade da polifenoloxidase de mamões congelados e armazenados em temperatura de  $-24^{\circ}\text{C}$  ao final de três meses. Ao final do tempo de análises a atividade desta enzima foi de 25UA.

Uma explicação para a diminuição da atividade enzimática é relatada por Sgarbieri (1996), que afirma que a desnaturação de proteínas pode ocorrer em baixas temperaturas, durante o congelamento e armazenamento de alimentos congelados. Segundo Cano, Ancos e Lobo (1995) a peroxidase é muito estável a baixas temperaturas, mas o congelamento e subsequente armazenamento de frutas e vegetais congelados, normalmente inativam a enzima.

#### ***Amostra Lote 2:***

Os resultados do lote 2 estão expressos no anexo VI. A atividade inicial da peroxidase na amostra pasteurizada foi de 10450UA a qual diminuiu em 47%. Após 12

meses de estocagem a peroxidase na amostra pasteurizada apresentou um aumento em 16% na atividade.

Com relação à polifenoloxidase a atividade inicial foi de 40UA apresentando um aumento em 42,5% após 4 meses de congelamento e ao final das análises a atividade foi de 24UA.

Na amostra não pasteurizada, o valor inicial da peroxidase foi de 1948UA a qual apresentou uma queda em 62% após 8 meses de congelamento e em 31% ao final do período de análises com uma atividade de 31UA. Um declínio contínuo na atividade da peroxidase durante o armazenamento também foi observado por Gökmen et al. (2005) ao analisar o comportamento desta enzima em ervilhas armazenadas em temperatura de -18°C por um período de 12 meses.

Para a polifenoloxidase, a atividade inicial foi de 49UA, mas houve uma leve redução em 7%, após 2 meses de armazenamento congelado. Este resultado é semelhante ao observado por Cano, Ancos e Lobo (1995) que constataram um leve declínio na atividade da polifenoloxidase de mamões durante 30 dias de armazenamento a -18°C. Depois de 8 meses, observou-se uma redução em 51% da atividade inicial. A atividade final desta enzima foi de 31UA (redução em 37%). Este resultado é semelhante ao observado por Cano et al. (1997) que demonstraram uma redução em 38% na atividade da polifenoloxidase em pedaços de banana não branqueados, congelados e armazenados em temperatura de -18°C por 12 meses.

### ***Amostra Lote 3:***

Os resultados observados no lote 3 estão descritos no anexo VII. A amostra pasteurizada apresentou atividade inicial de 17233UA para peroxidase, com uma redução em 69% nos dois primeiros meses de congelamento e uma atividade final de 14900UA.



Com relação à polifenoloxidase a atividade inicial foi de 46UA com uma redução de 32% da atividade inicial após 2 meses de armazenamento. Este resultado foi semelhante ao observado por Cano, Marin e Fúster (1990) que evidenciara uma diminuição em 34% na atividade de polifenoloxidase de pedaços de banana branqueados após 30 dias armazenados a  $-24^{\circ}\text{C}$ . Com 12 meses de congelamento, a atividade desta enzima foi de 30UA, havendo, portanto, uma redução em 35%.

Na amostra não pasteurizada a atividade inicial da peroxidase foi de 18067UA com uma redução da atividade enzimática em 59% depois de um ano de armazenamento sob congelamento. Observou-se durante todo o período de estocagem um declínio na atividade residual da peroxidase. Este resultado está de acordo com o observado por Gökmen et al. (2005) que constataram uma diminuição na atividade da enzima durante o armazenamento de ervilhas congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 12 meses.

Com relação à polifenoloxidase, a atividade inicial foi de 32UA a qual apresentou um aumento em 34% após 4 meses de congelamento. Lobo e Cano (1998) observaram um incremento na atividade desta enzima em mamões após 3 meses de armazenamento a  $-24^{\circ}\text{C}$ .

De acordo com um Modelo Linear Geral observou-se, através do teste ANOVA, que o tempo de congelamento e estocagem, a procedência do lote, a pasteurização e a interação destes fatores influenciaram na atividade da peroxidase com um grau de significância a 1% ( $p < 0,05$ ) (Anexo VIII).

Quanto ao comportamento da peroxidase em relação ao lote 3, verificou-se que houve um decréscimo constante na atividade da enzima tanto na amostra pasteurizada quanto na amostra não pasteurizada. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Gökmen et al. (2005), que observaram uma redução na atividade da peroxidase durante 12 meses de congelamento e armazenamento de ervilhas. Com relação aos outros lotes

observou-se que houve uma oscilação constante na atividade durante todos os meses de análise, especialmente no lote 1 onde os picos de aumento na atividade enzimática foram mais evidentes.

Com relação à polifenoloxidase os valores também foram bastante variáveis durante os tempos de análise.

### ***Análises Físico-químicas:***

#### ***Amostra Lote 1:***

Os resultados das análises físico-químicas para o lote 1 estão descritos no anexo IX. Os dados demonstraram que para a amostra de cupuaçu pasteurizada do lote 1 proveniente de Roraima, ocorreu uma variação nos fatores analisados durante o período de congelamento e estocagem, apresentando os seguintes valores para os tempos zero e com doze meses de armazenamento congelado, respectivamente: sólidos (10,53%-10,44%); pH (3,41-3,36); °Brix (8,81-8,40); Vitamina C (20,32mg/100g-20,14mg/100g); Acidez (1,92g/100g-1,80g/100g) e Açúcares (5,24g/100g-6,04g/100g).

Já para a amostra não pasteurizada do mesmo lote os resultados para o tempo zero e após um ano de estocagem sob congelamento foram os seguintes: sólidos (13,97%-13,31%); pH (3,53-3,35); °Brix (12,01-10,90); vitamina C (22,75mg/100g-26,01mg/100g); acidez (2,19g/100g-2,19g/100g) e açúcares (6,56g/100g-6,62g/100g).

#### ***Amostra Lote 2:***

Os dados observados no lote 2, proveniente de Itacoatiara e Roraima, estão descritos no anexo IX. Com relação a este lote a amostra pasteurizada apresentou os seguintes resultados nos tempos zero e após 12 meses de congelamento: sólidos (11,81%-11,30%); pH (3,44-3,35); °Brix (9,11-9,40); vitamina C (23,18mg/100g-22,77mg/100g); acidez (1,80g/100g-1,99g/100g) e açúcares (6,00g/100g-6,19g/100g).

A amostra não pasteurizada da referida polpa apresentou os seguintes dados: sólidos (13,29%-12,32%); pH (3,48-3,31); °Brix (11,15-10,40); vitamina C (25,91%-26,82%); acidez (2,22g/100g-2,23g/100g) e açúcares (6,23g/100g-6,85g/100g).

***Amostra Lote 3:***

O lote 3, oriundo somente de Itacoatiara, apresentou para a polpa de cupuaçu pasteurizada, no tempo zero e com doze meses de congelamento os seguintes dados, constantes no anexo X: sólidos (15,09%-14,04%); pH (3,30-3,23); °Brix (11,27-10,57); vitamina C (20,97g/100g-19,66g/100g); acidez (2,07g/100g-2,07g/100g); açúcares (7,17g/100g-7,61g/100g). Com relação à amostra não pasteurizada os dados se comportaram da seguinte maneira: sólidos (15,36%-14,57%); pH (3,32-3,22); °Brix (12,07-11,45); vitamina C (20,92mg/100g-19,76mg/100g); acidez (2,22g/100g-2,22g/100g) e açúcares (7,18g/100g-7,45g/100g).

De acordo com um Modelo Linear Geral observou-se, através do teste ANOVA, que o tempo de congelamento e estocagem, a procedência do lote, a pasteurização e a interação destes fatores influenciaram no teor de sólidos totais em todos os lotes com um grau de significância a 1% ( $p < 0,05$ ) (anexo XII). O valor do pH foi influenciado pelo tipo de lote e pelo tempo ( $p < 0,05$ ) com um grau de significância de 1% e a interação destes fatores com um grau de 5% (anexo XIII). O valor dos sólidos solúveis (°Brix) teve influência do tipo de lote e do processo de pasteurização, também com um grau de significância a 1% e a interação destes com grau de significância a 1% ( $p < 0,05$ ) (anexo XIV). A vitamina C também teve seus valores influenciados pelo lote, a pasteurização e o tempo, bem como pela interação destes fatores, com o mesmo grau de significância demonstrado no teor de sólidos (1%,  $p < 0,05$ ) (anexo XV). Com relação à acidez, observou-se a mesma influência e grau de significância (1%) do lote, da pasteurização e do tempo, como também da interação destes fatores (anexo XVI). Os

açúcares foram influenciados também pelo lote, a pasteurização e o tempo com um grau de significância de 1%, porém a única interação que também influenciou significativamente o teor de açúcares foi entre o lote e o processo de pasteurização (anexo XVII).

O comportamento dos sólidos totais foi semelhante nas amostras pasteurizadas de todos os lotes, apresentando um movimento de redução com o passar do tempo. Nos lotes 2 e 3 esta diminuição foi bem mais acentuada ficando em torno de 4% e 7%, respectivamente. Com relação à amostra não pasteurizada do lote 2, nos dois primeiros meses de análise houve um aumento em cerca de 2% no teor de sólidos e este resultado foi semelhante ao encontrado por Silva et al. (2004) que constataram um acréscimo em cerca de 2% nos sólidos totais de pseudofrutos de caju-do-cerrado congelados por um mês.

A amostra não pasteurizada do lote 3 apresentou uma redução em 8,8% no valor dos sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix) ao final de dois meses de congelamento, o que está de acordo com o observado por Silva et al. (2004) que relatam uma redução no valor dos sólidos solúveis de pseudofrutos de caju-do-cerrado de 8,1% ao final de um mês de congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Já a amostra não pasteurizada do lote 2 apresentou uma redução em 6,7% no teor de sólidos solúveis ao final de doze meses de congelamento com resultado semelhante ao encontrado por Lobo e Cano (1998) que observaram uma redução em 6,4% no teor de sólidos solúveis em pedaços congelados de mamões hermafroditas a uma temperatura de  $-24^{\circ}\text{C}$ .

Com relação à retenção de ácido ascórbico a amostra não pasteurizada do lote 3 apresentou uma retenção de 97,4% ao final de 2 meses de congelamento, um resultado semelhante ao demonstrado por Lim et al. (2006) que analisou ervilhas e ao final de 4 meses de congelamento a  $-30^{\circ}\text{C}$  observou uma retenção de 99,4% no teor de vitamina

C. Ao final de 4 meses de congelamento a amostra não pasteurizada apresentou uma perda em 4,3% no teor de ácido ascórbico o que é semelhante ao encontrado por Lavinias et al. (2006) que ao final de 4 meses verificaram uma perda em 6% no teor deste nutriente em sucos de caju congelados em temperatura de -22°C. Entretanto, a maior perda observada para este nutriente na amostra não pasteurizada do lote 3 foi no 8º mês de congelamento (9%), semelhante ao encontrado por De Ancos et al. (2000), que no 9º mês do congelamento de morangos (cultivares Zeva e Rubi) constataram a maior perda no teor deste nutriente.

#### ***Análises Microbiológicas:***

Para todas as amostras em todos os lotes, o resultado para Salmonela foi de ausência em 25g. No caso dos coliformes a 45°C/g o resultado foi do NMP/g ser <0,03 em todas as amostras analisadas. Para bolores e leveduras os resultados (UFC/g) na amostra pasteurizada foram:  $8,3 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^3$  e  $1,8 \times 10^3$  nos lotes 1, 2 e 3, respectivamente. Já na amostra não-pasteurizada os resultados (UFC/g) encontrados foram de  $2 \times 10^2$ ,  $2,5 \times 10^2$  e  $2,6 \times 10^2$ , para os lotes 1, 2 e 3, respectivamente. Os resultados demonstraram que o produto está dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente.

## **5.CONCLUSÃO**

- Constatou-se que o a procedência do lote, a pasteurização e o tempo de estocagem, bem como a interação destes fatores influenciaram significativamente (1%,  $p < 0,05$ ) nos valores dos sólidos totais, ácido ascórbico, acidez e atividade da peroxidase.
- A procedência do lote e o tempo de estocagem influenciaram de forma significativa (1%,  $p < 0,05$ ) o valor do pH, bem como a interação destes fatores (5%,  $p < 0,05$ ).

- A procedência do lote e o processo de pasteurização, bem como a interação destes influenciaram de forma significativa o teor de sólidos solúveis (°Brix) (1%,  $p < 0,05$ ).
- O teor de açúcares foi influenciado de forma significativa (1%,  $p < 0,05$ ) pela procedência do lote, processo de pasteurização e pelo tempo de estocagem, bem como pela interação do lote e da pasteurização.
- Todos os lotes um, dois e três, procedentes respectivamente de Roraima, Roraima e Itacoatiara e somente de Itacoatiara apresentaram uma redução no teor de vitamina C nas polpas de cupuaçu pasteurizadas em função do tempo de congelamento.
- O teor de açúcares, sólidos solúveis, acidez, e pH, bem como a atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase tanto nas polpas de cupuaçu pasteurizadas quanto nas amostras não pasteurizadas dos lotes um, dois e três apresentaram variações durante os doze meses de armazenamento sob congelamento.
- O comportamento enzimático e físico-químico da polpa de cupuaçu foi variável durante o tempo de congelamento, demonstrando que não se deve esperar um comportamento constante e linear destes fatores;
- A variação encontrada nos valores físico-químicos das amostras durante o congelamento foi mínima, especialmente nos valores de pH e acidez;
- As amostras não pasteurizadas encontraram-se dentro dos padrões físico-químicos exigidos pela legislação vigente durante todo o período de estocagem;
- As amostras pasteurizadas dos lotes 2 e 3 apresentaram teores de sólidos solúveis, totais e açúcares fora destes padrões.

- A polpa de cupuaçu congelada é um produto adequado para o consumo do ponto de vista microbiológico e nutricional;
- O congelamento é um meio adequado para conservação da polpa de cupuaçu.

## 6. REFERÊNCIAS

APARICIO-CUESTA, M.P.; MATEOS-NOTARIO, M.P.; RIVAS-GONZALO, J.C. Sensory evaluations and changes in peroxidase activity during storage of frozen green beans. *Journal of Food Science*. v. 57, n. 5, p. 1129-1131, 1992.

A. P. H. A. American Public Health Association. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington, D.C.: A.P.H.A., 1992.

ARAÚJO, J. M. A. *Escurecimento Enzimático em Alimentos. Aspectos químicos e controle*. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1985.

ARAÚJO, Josalice de Lima; Queiroz, Alexandre José de Melo; Figueirêdo, Rossana Maria Feitosa. Propriedades termofísicas da polpa do cupuaçu com diferentes teores de sólidos. *Ciência Agrotécnica Lavras*, v. 28, n. 1, p. 126-134, 2004.

BRASIL. Instrução Normativa No 01, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. In: *Diário Oficial da União*, Brasília 10 de janeiro de 2000.

BRASIL. Resolução – RDC nº12, de 2 de Janeiro de 200. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

BRITO, C. A. K.; SATO, H. H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W. J. Características da Atividade da Peroxidase de Abacaxis (*Ananas comosus* (L.) Merrill) da cultivar IAC Gomo-de-mel e do clone IAC-1. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 25, n. 2, 2005.

CABRAL VELHO, Cristiane; WHIPKEY, Anna; JANICK, Jules. Cupuassu: a new beverage crop for Brazil. In: JANICK, Jules; SIMON, J. E. *Advances in new crops*. Portland, 1990.

CALZAVARA, Batista Benito Gabriel; MÜLLER, Carlos Hans; KAHWAGE, Olivia de Nazaré da Costa. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro. Cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CPATU*, 1984.

CANO, Pilar; ANCOS, Begoña de; LOBO, Glória. Peroxidase and polifenoloxidase activities in papaya during postharvest ripening and after freezing/thawing. *Journal of Food Science*. v. 60, n.4, p. 815-817, 1995.

CANO, M. Pilar; ANCOS, Begoña de; LOBO, M. Glória; SANTOS, Mariana. Improvement of frozen banana (*Musa cavendishii*, cv. Enana) colour by blanching:

relationship between browning, phenols and polyphenol oxidase and peroxidase activities. *Z. Lebensm. Unters Forsch. A.* v. 204, p. 60-65, 1997.

CANO, M. Pilar; LOBO, M. Gloria; ANCOS, Begoña de; GALEAZZI, M. Antonia M. Polyphenoloxidase from Spanish hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica papaya* Cv. Sunrise, Solo group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v. 44, p. 3075-3079, 1996.

CANO, Pilar; MARIN, M. Antonia; FÚSTER, Carmen. Freenzing of banana slices. Influence of maturity level and thermal treatment prior to freezing. *Journal of Food Science.* v. 55, n.4, p. 1070-1072, 1990.

CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. *Biodiversidade Amazônica: Exemplos e estratégias de utilização.* Manaus: INPA, 2000.

COHEN, Kelly de Oliveira; JACKIX, Marisa de Nazaré Hoelz. Estudo do liquor de cupuaçu. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.

COSTA, Marta Cristina; MAIA, Geraldo Arraes; FILHO, Men de Sá Moreira Souza; FIGUEIREDO, Raimundo Wilane; NASSU, Renata Tiekko; MONTEIRO, José Carlos Sabino. Conservação de polpa de cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum] por métodos combinados. *Revista Brasileira de Fruticultura.* v. 25, n. 2, p. 213-215, 2003.

DE ANCOS, Begoña; GONZÁLEZ, Eva M.; CANO, M. Pilar. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v. 48, p. 4565-4570, 2000.

EIDHIN, Deirdre M. Ni; MURPHY, Eileen; O'BEIRNE, David. Polyphenol oxidase from apple (*Malus domestica* Borkh. cv Bramley's Seedling): purification strategies and characterization. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology.* v. 71, n.1, p. 51-58, 2005.

EVANGELISTA, J. *Tecnologia de Alimentos.* 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

GONDIM, Tarcísio Marcos de Souza; THOMAZINI, Marcílio José; CAVALCANTE, Maria de Jesus Barbosa; Souza, Maria Joana Leite. *Aspectos da Produção do Cupuaçu.* Rio Branco: Embrapa, 2001.

GÖKMEN, Vural.; SAVAŞ BAHÇECI, K.; SERPEN, Arda.; ACAR, Jale. Study of lipooxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Food Science and Technology.* v. 38, p.903-908, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos.* 4ed. v.1. São Paulo: O Instituto, 2005.



INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO AGROPECUÁRIO DO ESTADO DO AMAZONAS. Cultura: cupuaçu. Relatório de acompanhamento trimestral: janeiro – dezembro, 2007.

IZQUIERDO, J. *Theobroma grandiflorum*.

Disponível em: < <http://ecoport.org/ep?Plant=10394>>

Acesso em: 22 ago. 2007.

KAVRAYAN, Demet; AYDEMIR, Tülin. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chemistry*. v. 74, p. 147-154, 2001.

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

KOBAYASHI, Shiro; UYAMA, Hiroshi; KIMURA, Shunsaku. Enzymatic Polymerization. *Chemical Reviews*. v. 101, n.12, 3793-3818, 2001.

LAVINAS, Flávia Conde; ALMEIDA, Natália Correa; MIGUEL, Marco Antonio Lemos; LOPES, Maria Lúcia Mendes; VALENTE-MESQUITA, Vera Lúcia. Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju *in natura* armazenado em diferentes condições de estocagem. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 26, n. 4, p. 875-883, 2006.

LIM, Miang; WU, Hongbing; BRECKELL, Michael; BIRCH, John. Influence of the glass transition and storage temperature of frozen peas on the loss of quality attributes. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 41, p. 507-512, 2006.

LIMA, C. L. *Conservação pós-colheita do cupuaçu (Theobroma grandiflorum) em condições ambientes e sob conservação*. Manaus: INPA, 1993. Dissertação (Mestrado Biologia Tropical e Recursos Naturais do Convenio INPA/UFAM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1993.

LISIEWSKA, Z.; KMIECIK, W. Effect of storage period and temperature on the chemical composition and organoleptic quality of frozen tomato cubes. *Food Chemistry*. v. 70, p. 167-173, 2000.

LESTER, Gene E.; HODGES, D. Mark; MEYER, Robert D.; MUNRO, Kathleen D. Pre-extraction preparation (fresh, frozen, freeze-dried, or acetone powdered) and long-term storage of fruit and vegetables tissues: effects on antioxidant enzyme activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, p.2167-2173, 2004.

LOBO, M. Glória; CANO, M. Pilar. Preservation of hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica papaya* L., Cv Sunrise, Solo group) by freezing: physical, physico-chemical and sensorial aspects. *Z Lebensm Unters Forsch A*. v. 206, p. 343-349, 1998.

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

MIRANDA, María V.; CASCON, Osvaldo. Partition of horseradish peroxidase in aqueous two-phase systems containing polyvinylpyrrolidone. *Bioseparation*. v. 7, p.25-30, 1997.

MOHAMMAD, Ali Sahari; MOHSEN, Boostani F.; ZOHREH, Hamidi E. Effect of low temperature on the ascorbic acid content and quality characteristics of frozen strawberry. *Food Chemistry*. v. 86, p. 357-363, 2004.

MONDRAGÓN-PORTOCARRERO, Alicia del Carmen; PENA-MARTINEZ, Belén; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Encarnación; ROMERO-RODRÍGUEZ, Angeles; VÁZQUEZ-ODÉRIZ, Lourdes. Effects of different pre-freezing blanching procedures on the physicochemical properties of *Brassica rapa* leaves (Turnip Greens, *Grelos*). *International Journal of Food Science and Technology*. v. 41, p. 1067-1072, 2006.

MORALES-BLANCAS, E. F.; CHANDIA, V.E.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Thermal inactivation kinetics peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*. v. 67, n. 1, p. 146-154, 2002.

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

OKTAY, M.; KUFREVIDGLU, I.; KOCACALISKAN, L.; SAKIROGLU, H. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. *Journal of Food Science*. v.60, n.3, p.494-496, 1995.

OLIVEIRA, C. I. F. B. *Isolamento e identificação da microbiota nos diferentes estágios de fermentação das sementes de cupuaçu (Theobroma grandiflorum (willd. ex spreng.) Schum)*. Manaus: UFAM, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Amazonas, 2001.

PERALTA, Rosane M.; SOUZA, Cristina G. Marques; BÔER, Cinthia G. As principais oxidoredutases de uso industrial. In: SAID, Suraia; PIETRO, Rosemeire C. L. R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Suma, 2004.

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

PINSENT, B. R. W. Peroxidase regeneration and its effect on quality in frozen peas and thawed peas. *Journal of Food Science*. v. 27, n.2, p.120-126, 1962.

QUIJANO, Clara E.; PINO, Jorge A. Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. *Food Chemistry*. v. 104, p. 1123-1126, 2007.

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

ROGEZ, Hervé; BUXANT, Raphaële; MIGNOLET, Eric; SOUZA, Jesus N. S.; SILVA, Evaldo M.; LARONDELLE, Yvan. Chemical composition of the pulp of three

typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research and Technology*. v. 218, p. 380-384, 2004.

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

SARAIVA, Jorge A.; NUNES, Cláudia S.; COIMBRA, Manuel A. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*. v. 101, p. 1571-1579, 2007.

SAVAŞ BAHÇECI, K.; SERPEN, Ardas.; GÖKMEN, Vural.; ACAR, Jale. Study of lipoxigenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Journal of Food Engineering*. v.66, p. 187-192, 2005.

SGARBIERI, Valdemiro C. *Proteína em alimentos protéicos. Propriedades, degradações e modificações*. São Paulo: Varela, 1996.

SILVA, Filipa M.; SILVA, Cristina L. M. Colour changes in thermally processed cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) puree: critical times and kinetics modelling. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 34, p. 87-94, 1999.

SILVA, Mara Reis; SILVA, Maria Sebastiana; OLIVEIRA, Jeanne Silva. Estabilidade de ácido ascórbico em pseudofrutos de caju-do-serrado refrigerados e congelados. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. v. 34, n. 1, p. 9-14, 2004.

TALENS, P.; ESCRICHE, I.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; CHIRALT, A. Influence of osmotic dehydration and freezing on the volatile profile of kiwi fruit. *Food Research International*. v. 36, p. 635-642, 2003.

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

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

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

VENTURIERI, Giorgini A. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). In: CLAY, Janson W.; SAMPAIO, Paulo de T. B.; CLEMENT, Charles R. *Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização*. Manaus: INPA/SEBRAE, 1999.

VENTURIERI, Giorgini Augusto; RONCHI-TELES, Beatriz; FERRAZ, Isolde Dorothea Kossman; LOURDE, Maurice; HAMADA, Neusa. *Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento*. Belém: Clube do Cupu, 1993.

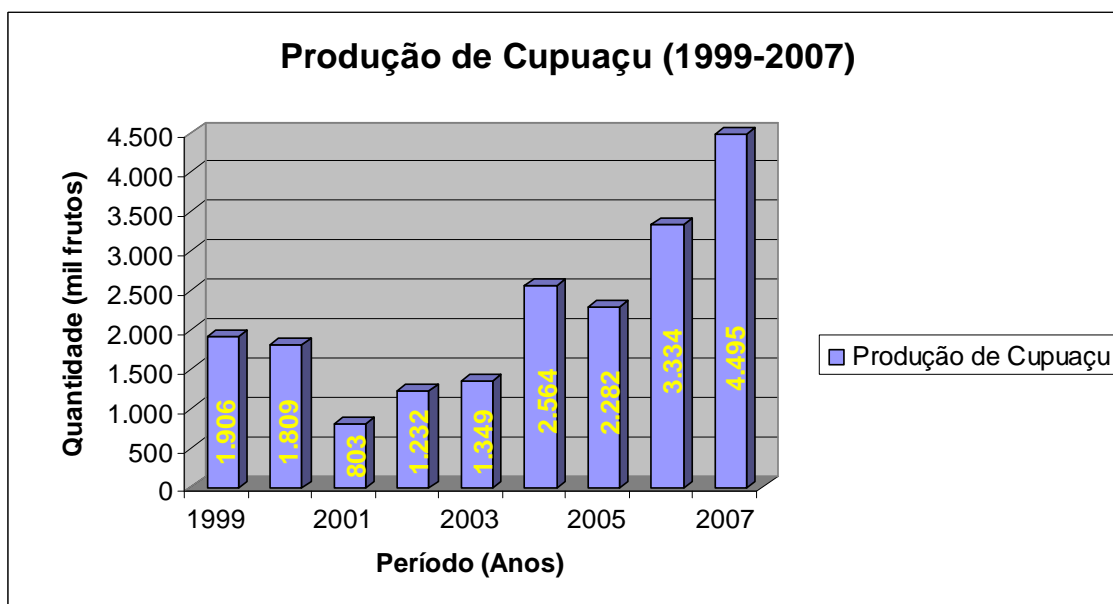
YANG, Chang-Peng; Shuji; ASHRAFUZZAMAN, M. D.; NAKAMURA, Naoko; HAYASHI, Noboyuki. Purification and characterization of polyphenoloxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 48, p. 2732-2735, 2000.

YEMENICIOĞLU, Ahmet; ÖZKAN, Mehmet; CEMEROĞLU, Bekir. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form. *Journal of Food Science*. v. 62, n. 3, p. 508-510, 1997.

WU, V.H.C. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*. v. 25, p. 735-744, 2008.

ZIENA, H. M. S. Quality attributes of bears seedless lime (*Citrus latifolia* Tan) juice during storage. *Food Chemistry*. v. 71, p. 167-172, 2000.

## ANEXO I



**Figura 1.** Produção de frutos de cupuaçu no período de 1998-2007.

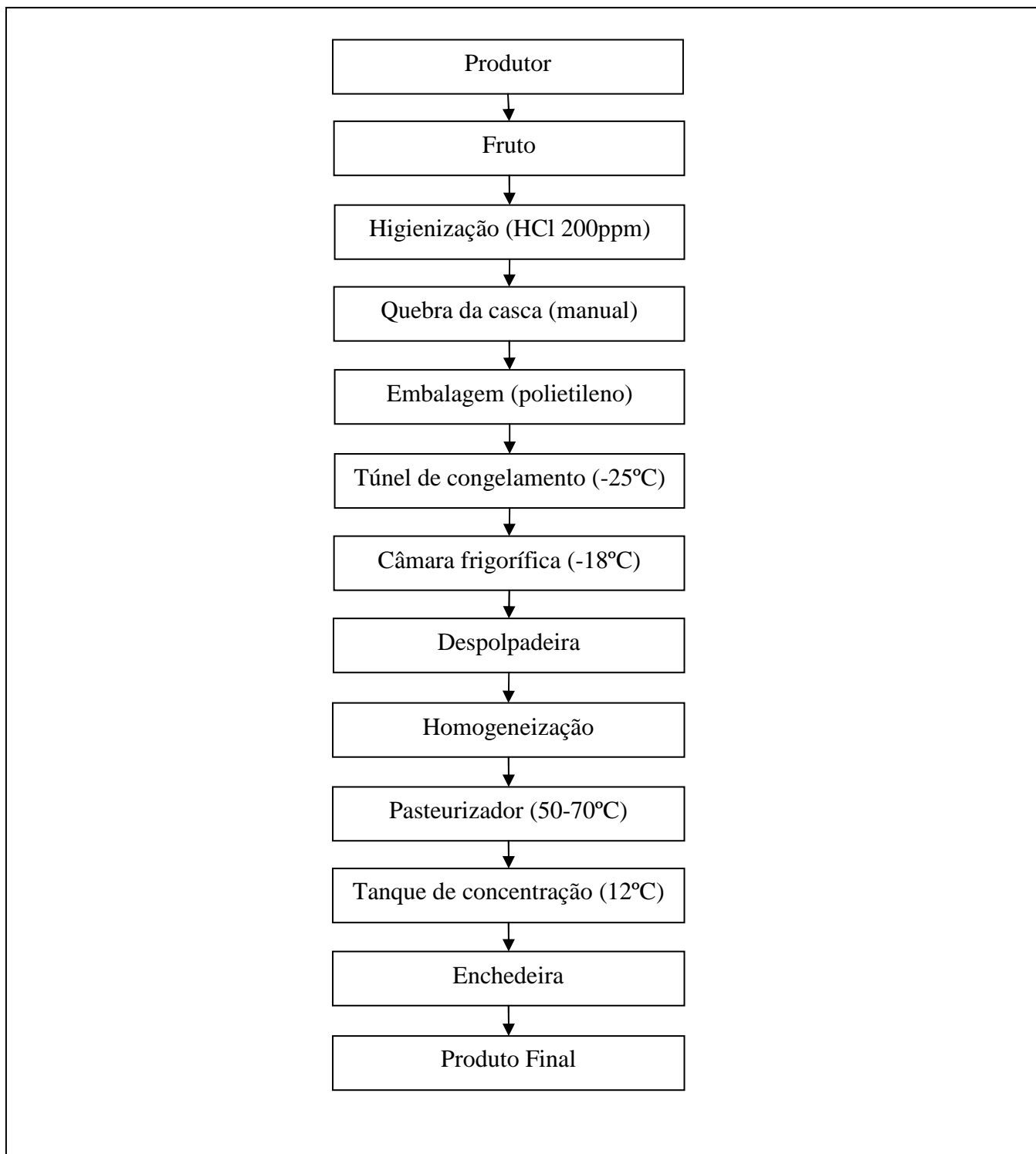
Fonte: IDAM, 2008

## ANEXO II

<i>Dados Físico-Químicos</i>						<i>Referências</i>
Sólidos(%)	pH	°Brix	Acidez(g/100g)	Açúcares(g/100g)	Vit. C(mg/100g)	Autores
13,4	-	-	-	-	24,5	TACO (2006)
12,1	3,4	-	-	5,9	-	ROGEZ et al. (2004)
-	-	12	-	-	-	ARAÚJO et al. (2004)
-	3,34	12,5	2,27	-	-	COSTA et al. (2003)
11	3,30	-	2,15	-	23,10	ROCHA NETO et al. (1999) apud GONDIM et al. (2001)
-	3,60	10,51	2,35	8,81	28,32	CABRALVELHO et al. (1990)
11	3,30	10,80	2,15	-	23,12	CALZAVARA et al. (1984)

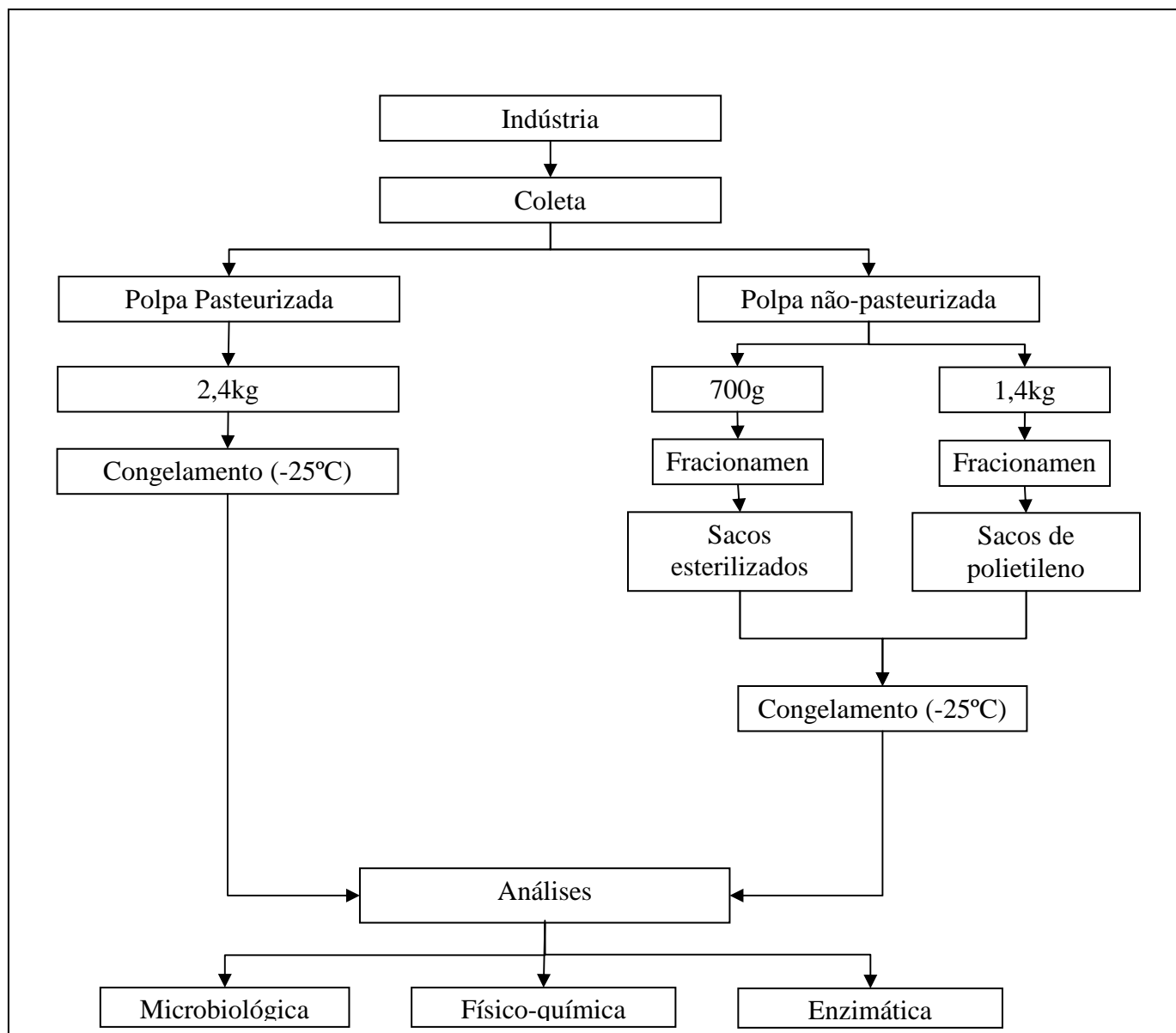
**Tabela1.** Composição físico-química da polpa de cupuaçu “*in natura*”.

## ANEXO III



**Figura 2.** Fluxograma da produção e obtenção da polpa pasteurizada de cupuaçu em uma indústria de processamento de frutas, em Manaus.

## ANEXO IV



**Figura 3.** Sequência de processamento e análises das amostras de polpa de cupuaçu



## ANEXO V

Tempo (meses)	<i>Pasteurizada</i>		<i>Não Pasteurizada</i>	
	Peroxidase (Unidades de Atividade/g/min.)	Polifenoloxidase (Unidades de Atividade/g/min.)	Peroxidase (Unidades de Atividade/g/min.)	Polifenoloxidase (Unidades de Atividade/g/min.)
0	9777 ± 161,49*	35 ± 1,43*	16780 ± 0,58*	30 ± 0,00*
2	10220 ± 1159,66*	33 ± 2,77*	8690 ± 1145,51*	20 ± 0,01*
4	14993 ± 1406,32*	44 ± 5,60*	20000 ± 0,00*	45 ± 5,55*
6	8617 ± 621,15*	55 ± 0,00*	17317 ± 1177,21*	62 ± 1,40*
8	5517 ± 596,52*	45 ± 4,20*	10983 ± 1037,22*	36 ± 15,85*
10	9875 ± 530,33*	29 ± 0,00*	10327 ± 1893,63*	40 ± 5,71*
12	9650 ± 707,11*	30 ± 9,11*	8225 ± 1025,30*	25 ± 0,00*

**Tabela2.** Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em polpa congelada de cupuaçu (*Lote I*) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses. (\*Desvio Padrão)

## ANEXO VI

Tempo (meses)	<i>Pasteurizada</i>		<i>Não Pasteurizada</i>	
	Peroxidase	Polifenoloxidase	Peroxidase	Polifenoloxidase
	(Unidades de Atividade/g/min.)	(Unidades de Atividade/g/min.)	(Unidades de Atividade/g/min.)	(Unidades de Atividade/g/min.)
0	10450 ± 438,41*	40 ± 0,00*	19480 ± 0,58*	49 ± 4,24*
2	12550 ± 636,40*	41 ± 1,40*	10780 ± 0,58*	46 ± 1,37*
4	8683 ± 388,37*	57 ± 4,24*	9333 ± 579,51*	46 ± 9,62*
6	7917 ± 946,48*	36 ± 1,37*	7267 ± 592,31*	30 ± 9,70*
8	5583 ± 115,47*	20 ± 0,00*	7367 ± 368,56*	24 ± 3,92*
10	9700 ± 1979,90*	17 ± 1,40*	9167 ± 797,39*	2 ± 2,77*
12	12100 ± 494,97*	24 ± 2,60*	13350 ± 1060,66*	31 ± 5,49*

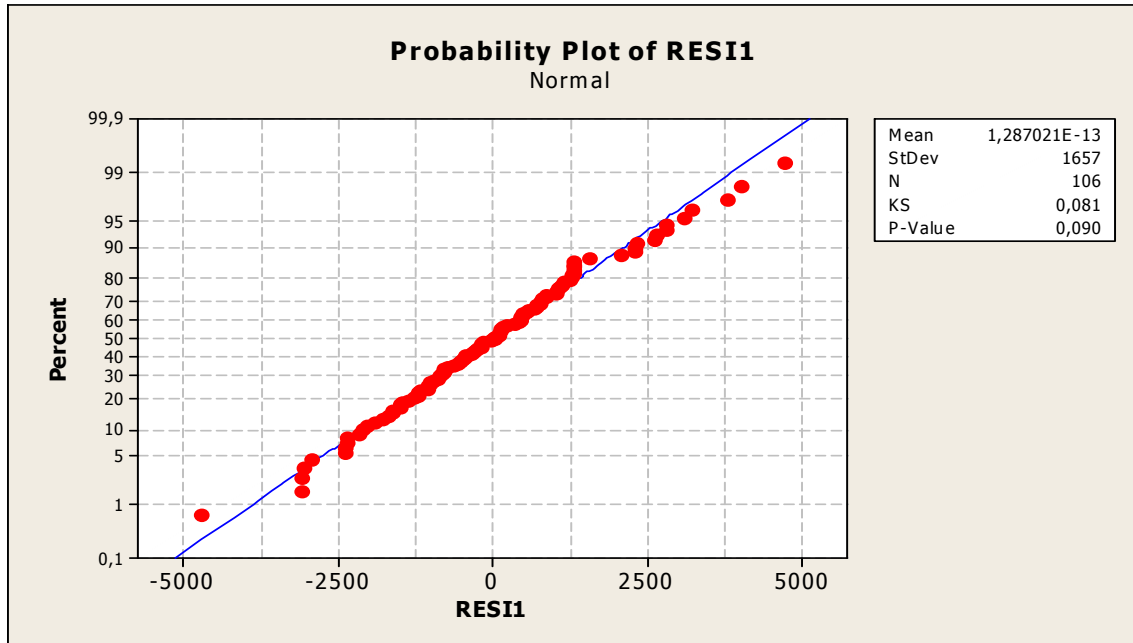
**Tabela 3.** Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em polpa congelada de cupuaçu (*Lote 2*) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses. (\*Desvio Padrão)

## ANEXO VII

Tempo (meses)	<i>Pasteurizada</i>		<i>Não Pasteurizada</i>	
	Peroxidase	Polifenoloxidase	Peroxidase	Polifenoloxidase
	(Unidades de Atividade/g/min.)	(Unidades de Atividade/g/min.)	(Unidades de Atividade/g/min.)	(Unidades de Atividade/g/min.)
0	17233 ± 781,37*	46 ± 4,12*	18067 ± 1160,23*	32 ± 2,80*
2	5407 ± 421,58*	31 ± 7,07*	10017 ± 548,48*	34 ± 17,85*
4	8417 ± 202,07*	34 ± 4,16*	8217 ± 202,07*	42 ± 5,99*
6	8225 ± 530,33*	27 ± 2,76*	9050 ± 229,13*	15 ± 4,20*
8	15597 ± 1991,99*	48 ± 4,16*	7775 ± 459,62*	46 ± 1,77*
10	9850 ± 614,41*	43 ± 8,32*	6367 ± 368,56*	24 ± 0,00*
12	14900 ± 878,92*	30 ± 5,78*	7417 ± 758,84*	31 ± 5,54*

**Tabela 4.** Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em polpa congelada de cupuaçu (*Lote 3*) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses. (\*Desvio Padrão)

## ANEXO VIII



**Figura 4.** Plot de distribuição normal dos resíduos da peroxidase em polpa de cupuaçu.

## ANEXO IX

Tempo (meses)	<i>Pasteurizada</i>						<i>Não Pasteurizada</i>					
	Sólidos Totais (%)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	Vitamina C (mg/100g)	Acidez (mg de Ác. Cítrico/100g)	Açúcares Totais (g/100g)	Sólidos Totais (%)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	Vitamina C (mg/100g)	Acidez (mg de Ác. Cítrico/100g)	Açúcares Totais (g/100g)
0	10,53 ±0,18*	3,41 ±0,01*	8,81 ±0,29*	20,32 ±0,01*	1,92 ±0,32*	5,24 ±0,08*	13,97 ±0,01*	3,53 ±0,01*	12,01 ±0,05*	22,75 ±0,46*	2,19 ±0,04*	6,56 ±0,00*
2	10,72 ±0,01*	3,39 ±0,01*	8,97 ±0,06*	19,72 ±0,13*	1,75 ±0,13*	5,18 ±0,04*	14,01 ±0,01*	3,41 ±0,01*	12,27 ±0,05*	22,99 ±0,21*	2,23 ±0,03*	6,43 ±0,06*
4	10,54 ±0,03*	3,43 ±0,01*	9,06 ±0,50*	19,12 ±0,09*	1,57 ±0,23*	5,26 ±0,17*	13,39 ±0,45*	3,37 ±0,01*	11,46 ±0,36*	24,43 ±0,24*	2,53 ±0,30*	6,68 ±0,26*
6	10,52 ±0,01*	3,43 ±0,01*	8,64 ±0,00*	18,86 ±0,47*	1,77 ±0,01*	5,59 ±0,09*	13,36 ±0,07*	3,41 ±0,01*	11,31 ±0,21*	23,97 ±0,31*	2,33 ±0,01*	6,96 ±0,10*
8	10,43 ±0,01*	3,43 ±0,01*	8,41 ±0,29*	18,99 ±0,18*	1,79 ±0,03*	5,39 ±0,08*	13,49 ±0,06*	3,44 ±0,01*	11,32 ±0,00*	25,41 ±0,76*	2,27 ±0,02*	6,77 ±0,13*
10	10,30 ±0,03*	3,39 ±0,01*	8,85 ±0,71*	20,26 ±0,15*	1,72 ±0,01*	5,69 ±0,23*	13,64 ±0,10*	3,40 ±0,01*	10,90 ±0,00*	26,86 ±0,12*	2,26 ±0,05*	7,05 ±0,35*
12	10,44 ±0,05*	3,36 ±0,018*	8,40 ±0,01*	20,14 ±0,05*	1,80 ±0,09*	6,04 ±0,15*	13,31 ±0,06*	3,35 ±0,01*	10,90 ±0,00*	26,01 ±0,00*	2,19 ±0,03*	6,62 ±0,00*

**Tabela 5.** Análises físico-químicas em polpa congelada de cupuaçu (*Lote 1*) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses. (\*Desvio Padrão)

## ANEXO X

Tempo (meses)	<i>Pasteurizada</i>						<i>Não Pasteurizada</i>					
	Sólidos Totais (%)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	Vitamina C (mg/100g)	Acidez (mg de Ác. Cítrico/100g)	Açúcares Totais (g/100g)	Sólidos Totais (%)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	Vitamina C (mg/100g)	Acidez (mg de Ác. Cítrico/100g)	Açúcares Totais (g/100g)
0	11,81 ±0,11*	3,44 ±0,01*	9,11 ±0,13*	23,18 ±1,12*	1,80 ±0,13*	6,00 ±0,01*	13,29 ±0,19*	3,48 ±0,01*	11,15 ±0,29*	25,91 ±0,45*	2,22 ±0,01*	6,23 ±0,00*
2	11,76 ±0,05*	3,41 ±0,01*	9,83 ±0,29*	21,52 ±0,08*	1,81 ±0,00*	5,70 ±0,19*	13,51 ±0,03*	3,43 ±0,01*	11,53 ±0,32*	26,33 ±0,12*	2,13 ±0,01*	6,40 ±0,14*
4	11,52 ±0,03*	3,49 ±0,01*	10,89 ±0,29*	25,54 ±0,16*	2,20 ±0,04*	6,15 ±0,00*	13,64 ±0,03*	3,36 ±0,01*	11,16 ±0,17*	26,37 ±0,19*	2,26 ±0,02*	6,38 ±0,20*
6	11,46 ±0,03*	3,37 ±0,01*	8,91 ±0,59*	21,55 ±0,33*	1,87 ±0,03*	5,66 ±0,37*	13,54 ±0,08*	3,42 ±0,01*	10,53 ±0,06*	25,55 ±0,14*	2,26 ±0,02*	6,52 ±0,07*
8	11,14 ±0,02*	3,44 ±0,01*	8,32 ±0,00*	21,03 ±0,27*	1,85 ±0,03*	6,08 ±0,11*	13,51 ±0,07*	3,48 ±0,01*	10,98 ±0,00*	24,15 ±0,09*	2,18 ±0,02*	6,91 ±0,07*
10	11,10 ±0,02*	3,39 ±0,01*	9,40 ±0,50*	21,07 ±0,07*	1,83 ±0,01*	6,37 ±0,12*	12,64 ±0,02*	3,37 ±0,01*	11,07 ±0,76*	24,54 ±0,09*	2,19 ±0,03*	6,50 ±0,17*
12	11,30 ±0,03*	3,35 ±0,01*	9,40 ±0,01*	22,77 ±0,04*	1,99 ±0,048	6,19 ±0,26*	12,32 ±0,22*	3,31 ±0,01*	10,40 ±0,00*	26,82 ±0,18*	2,23 ±0,05*	6,85 ±0,20*

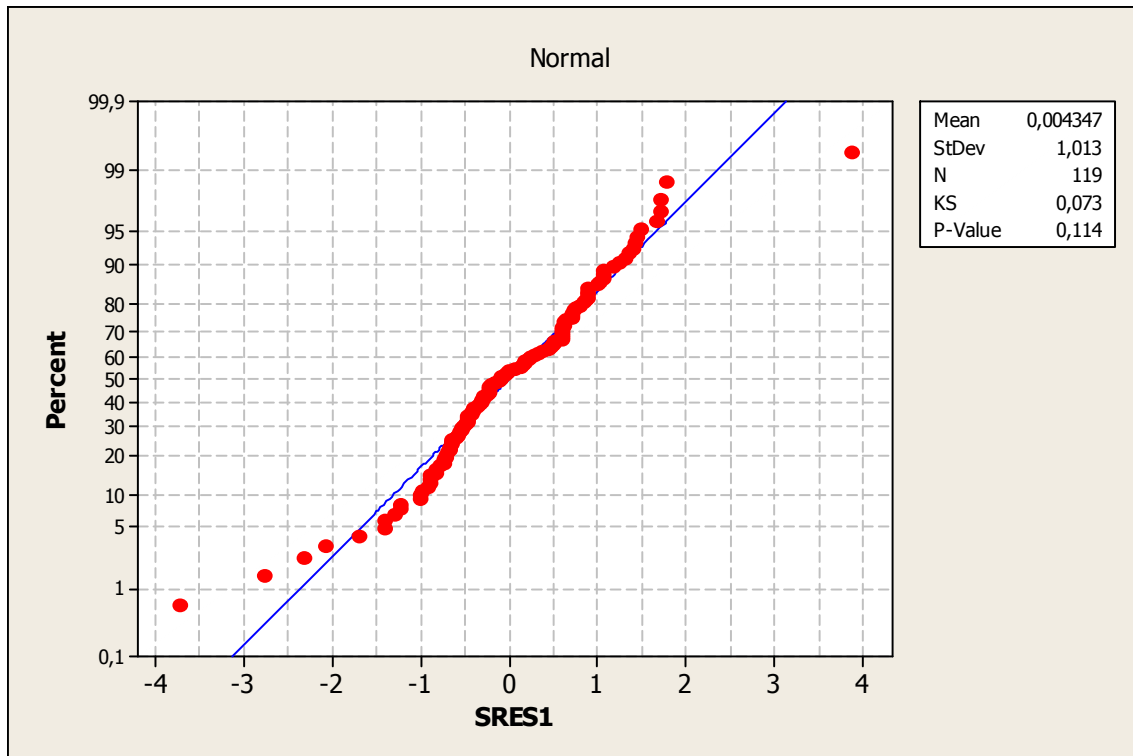
**Tabela 6.** Análises físico-químicas em polpa congelada de cupuaçu (*Lote 2*) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses. (\*Desvio Padrão)

## ANEXO XI

Tempo (meses)	<i>Pasteurizada</i>						<i>Não Pasteurizada</i>					
	Sólidos Totais (%)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	Vitamina C (mg/100g)	Acidez (mg de Ác. Cítrico/100g)	Açúcares Totais (g/100g)	Sólidos Totais (%)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	Vitamina C (mg/100g)	Acidez (mg de Ác. Cítrico/100g)	Açúcares Totais (g/100g)
0	15,09 ±0,66*	3,30 ±0,01*	11,27 ±0,45*	20,97 ±0,05*	2,07 ±0,04*	7,17 ±0,22*	15,36 ±0,07*	3,32 ±0,01*	12,07 ±0,42*	20,92 ±0,18*	2,22 ±0,10*	7,18 ±0,12*
2	14,47 ±0,01*	3,43 ±0,01*	11,33 ±0,25*	19,88 ±0,11*	2,11 ±0,10*	7,25 ±0,15*	15,06 ±0,03*	3,38 ±0,01*	11,01 ±0,06*	20,37 ±0,10*	2,34 ±0,02*	7,09 ±0,07*
4	13,94 ±0,14*	3,35 ±0,01*	11,15 ±0,29*	19,51 ±0,06*	2,07 ±0,03*	7,28 ±0,00*	14,72 ±0,14*	3,34 ±0,01*	11,82 ±0,00*	20,03 ±0,55*	2,28 ±0,02*	7,33 ±0,08*
6	14,17 ±0,02*	3,32 ±0,01*	11,22 ±0,00*	19,71 ±0,26*	2,04 ±0,05*	7,38 ±0,00*	15,03 ±0,12*	3,42 ±0,01*	11,49 ±0,32*	19,58 ±0,16*	2,17 ±0,02*	7,33 ±0,08*
8	14,43 ±0,05*	3,19 ±0,01*	11,00 ±0,01*	19,95 ±0,07*	2,02 ±0,02*	7,74 ±0,00*	14,97 ±0,11*	3,23 ±0,01*	11,50 ±0,01*	19,05 ±0,18*	2,19 ±0,03*	7,18 ±0,00*
10	14,07 ±0,03*	3,35 ±0,01*	11,07 ±0,00*	19,63 ±0,20*	2,05 ±0,05*	7,28 ±0,00*	14,92 ±0,04*	3,24 ±0,01*	11,40 ±0,00*	19,54 ±1,00*	2,19 ±0,07*	7,39 ±0,00*
12	14,04 ±0,01*	3,23 ±0,01*	10,57 ±0,29*	19,66 ±0,03*	2,07 ±0,04*	7,61 ±0,00*	14,57 ±0,10*	3,22 ±0,01*	11,45 ±0,23*	19,76 ±0,17*	2,22 ±0,02*	7,45 ±0,08*

**Tabela 7.** Análises físico-químicas em polpa congelada de cupuaçu (*Lote 3*) armazenada em temperatura de -25°C a -30°C por um período de 12 meses. (\*Desvio Padrão)

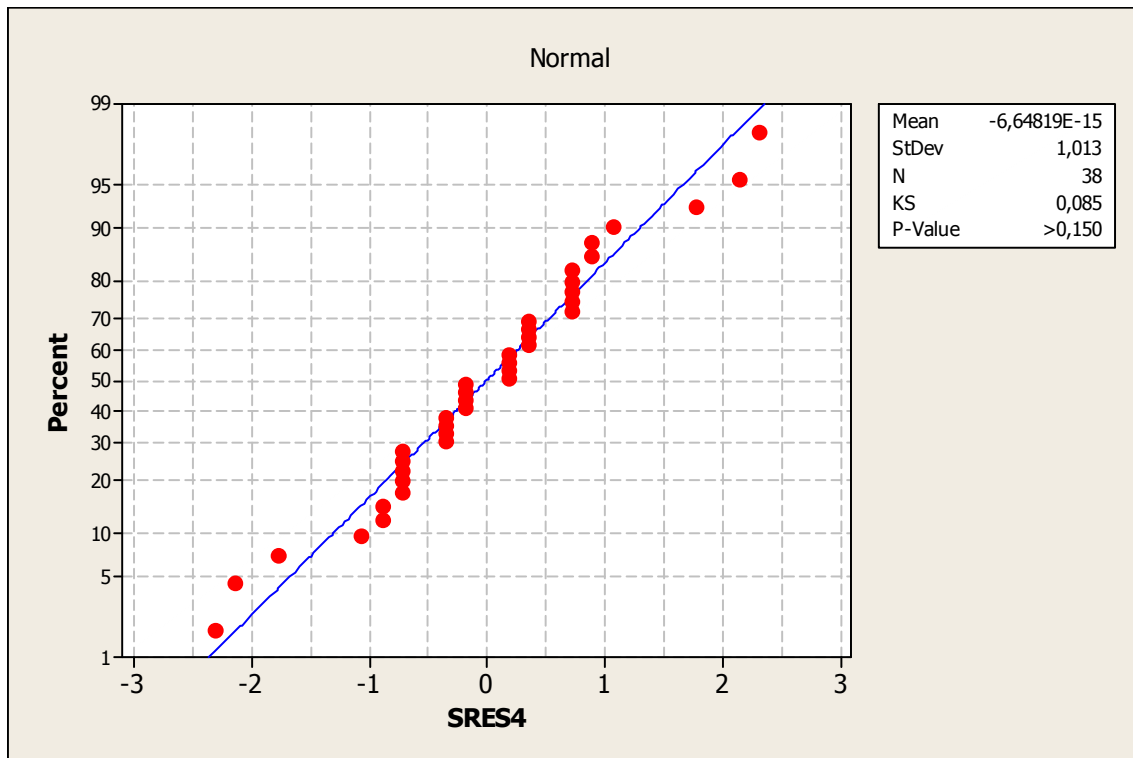
## ANEXO XII



**Figura 5.** Plot de distribuição normal dos resíduos dos sólidos totais.

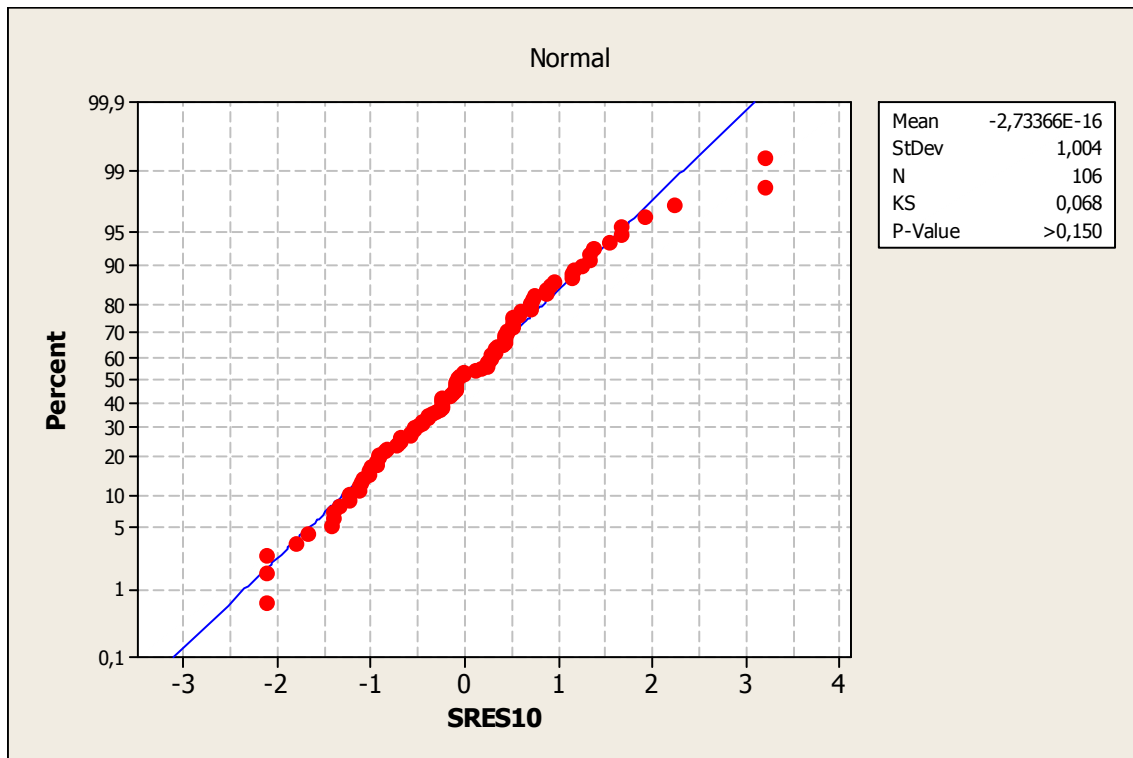


## ANEXO XIII



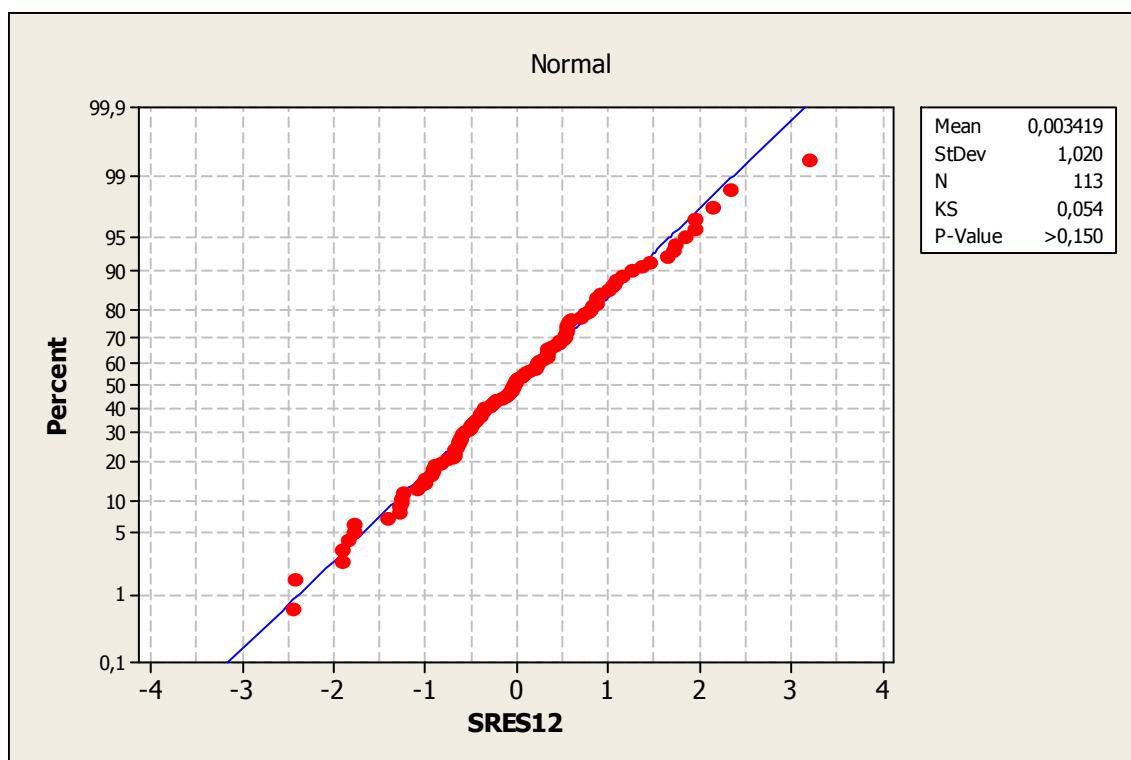
**Figura 6.** Plot de distribuição normal dos resíduos do pH.

## ANEXO XIV



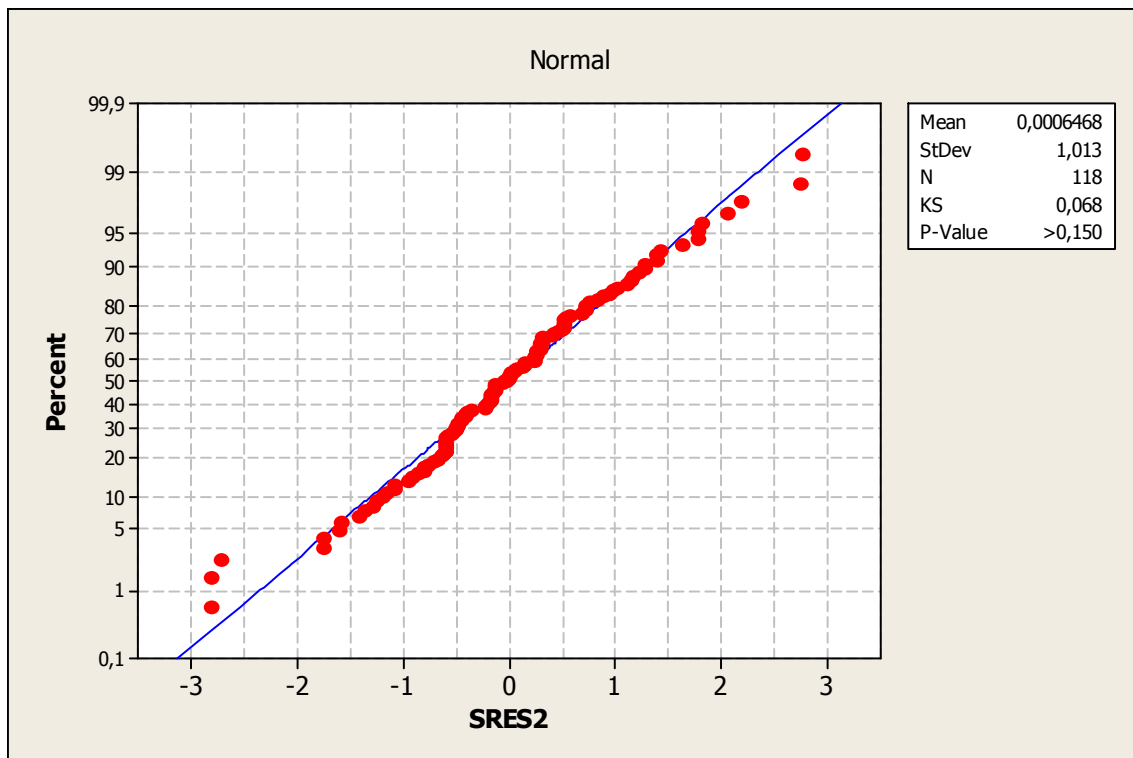
**Figura 7.** Plot de distribuição normal dos resíduos dos sólidos solúveis (°Brix).

## ANEXO XV



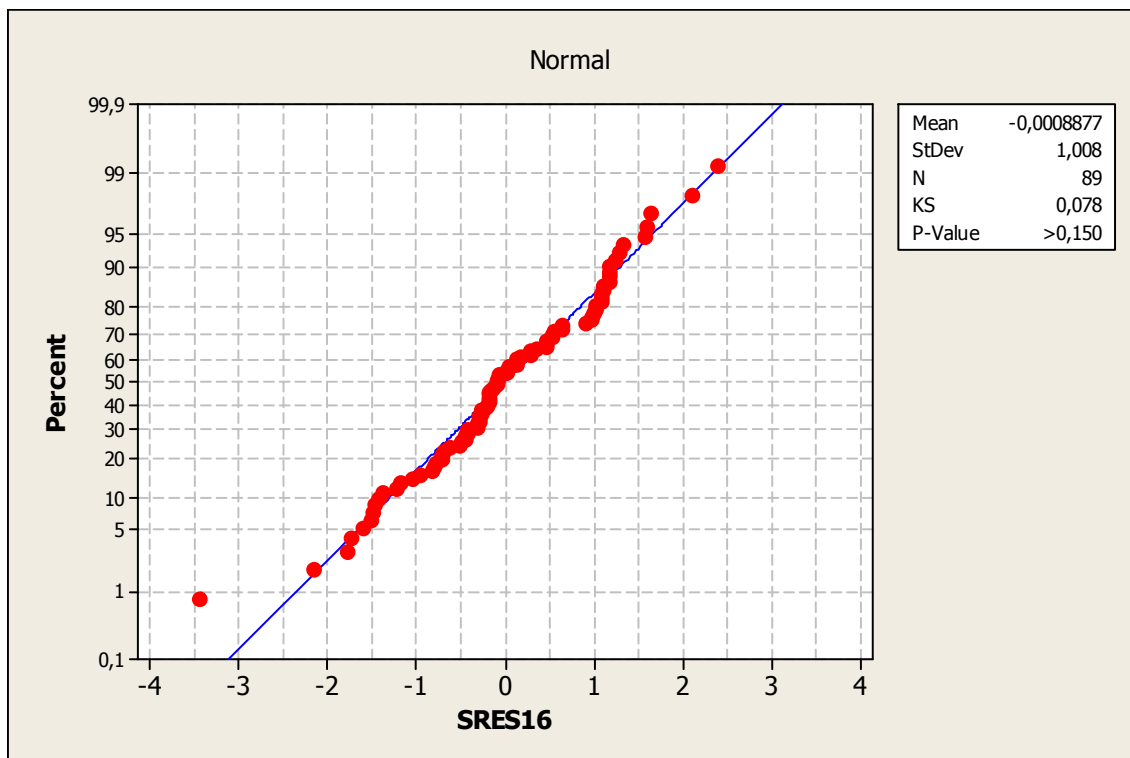
**Figura 8.** Plot de distribuição normal dos resíduos da Vitamina C.

## ANEXO XVI



**Figura 9.** Plot de distribuição normal dos resíduos da acidez.

## ANEXO XVII



**Figura 10.** Plot de distribuição normal dos resíduos dos açúcares totais.