

EFEITO DE TRATAMENTO SALINO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE EM MAÇÃ FUJI

**Muriel Gaio, Juliana Mello Silva, Alessander Lodi Ressini, Telma Elita Bertolin*,
Luciane Maria Colla***

*Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo
Email: lmcolla@upf.br

RESUMO

A polifenoloxidase e a peroxidase são as principais enzimas responsáveis pelo escurecimento enzimático de frutas e hortaliças, provocando nestas mudanças indesejáveis de cor, sabor, odor e textura. Objetivando avaliar a influência do CaCl_2 sobre a atividade enzimática de peroxidase e polifenoloxidase de maçã Fuji foram realizados tratamentos salinos por imersão de fatias de maçã em soluções de CaCl_2 nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0%, em tempos de imersão de 10 min e 20 min, a temperatura ambiente. As enzimas foram extraídas com tampão fosfato pH 6,0, precipitadas com acetona e o precipitado contendo as enzimas ressuspensas em EDTA 0,01%. A atividade enzimática da polifenoloxidase foi avaliada em sistema reacional na presença de catecol e a atividade enzimática da peroxidase na presença de guaiacol e peróxido de hidrogênio, ambas realizadas a 37°C e tempo de reação de 30min. Os produtos das reações foram determinados através da leitura das absorbâncias a 425 nm, para a polifenoloxidase, e a 470 nm, para a peroxidase. Tanto para a polifenoloxidase quanto para a peroxidase as menores atividades enzimáticas foram obtidas quando os frutos foram submetidos ao tratamento salino com CaCl_2 2,0% e tempo de imersão de 10 min. Os maiores potenciais de inibição atingidos para a polifenoloxidase e para a peroxidase foram de 74,8% e de 56,5%, respectivamente.

Palavras chave: inativação enzimática, escurecimento enzimático, cloreto de cálcio

1 INTRODUÇÃO

O controle da atividade da peroxidase e polifenoloxidase é de grande importância para a tecnologia de alimentos, uma vez que estas são responsáveis pelo escurecimento em frutas e vegetais e seus produtos processados. A ação de ambas as enzimas catalisam mais de uma reação e agem em um amplo número de substratos quando há ruptura do tecido vegetal, não somente causando o escurecimento dos alimentos, mas também conduzindo à descoloração de antocianinas e carotenóides, *off-flavours* e danos nutricionais (VALDERRAMA et al, 2001). Muitos métodos químicos e físicos têm sido desenvolvidos visando inibir o escurecimento enzimático, tendo por base a eliminação ou complexação de um ou mais componentes essenciais à reação como os tratamentos salinos com ácido ascórbico, ácido cítrico e cloreto de cálcio. O cálcio tem um papel especial na manutenção da estrutura da parede celular dos frutos, pois interage com a pectina desta parede, mantendo a firmeza e textura dos frutos (CARVALHO e Lima 2002; IHL et al, 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de tratamentos salinos com soluções de cloreto de cálcio sobre a atividade enzimática das enzimas peroxidase e polifenoloxidase de maçãs Fuji.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Material

As maçãs Fuji utilizadas foram adquiridas no mercado local de Passo Fundo, frescas e maduras, sem injúrias mecânicas e em bom estado sanitário.

2.1.2 Tratamentos salinos

As maçãs foram lavadas, descascadas e cortadas em fatias, e estas imediatamente submetidas aos tratamentos salinos pela imersão em soluções de CaCl_2 em concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0%, por períodos de 10 e 20 minutos.

2.1.3 Extração e purificação das enzimas

A extração das enzimas foi realizada tomando-se 100 g de maçã, sendo estas homogeneizadas em liquidificador por período de 3 min com solução tampão fosfato 4°C e pH 6,0. Em seguida, o material homogeneizado foi filtrado em algodão sendo recolhido em 200 mL de acetona, em banho de gelo. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min. O precipitado obtido foi ressolubilizado em solução de EDTA 0,01% e filtrado a vácuo para retirar a matéria não dissolvida. O extrato filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com solução de EDTA 0,01%.

2.1.4 Medida da atividade enzimática da peroxidase

A atividade de POD foi determinada utilizando o método descrito por Valderrama et al (2001) modificado. As reações foram realizadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de guaiacol 0,5%, 1 mL de H_2O_2 0,08%, 10,5 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 e 0,5 mL do extrato enzimático, incubados a 37°C por 30 min. Ao final da reação foi adicionado 1 mL de HCl 1 N, e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 470 nm. Uma unidade de atividade de POD foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por grama de proteína do extrato por minuto.

2.1.5 Medida da atividade enzimática residual da polifenoloxidase

A atividade de PPO foi determinada utilizando o método descrito por Valderrama et al (2001) com algumas modificações. As reações foram realizadas a 37°C, durante 30 min, em tubos de ensaio contendo 2 mL de catecol 0,2%, 5 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 e 2 mL do extrato enzimático sendo interrompidas pela adição de 1 mL de HCl 1 N. A medida da absorbância foi realizada espectrofotômetro a 425 nm. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por grama de proteína do extrato por minuto.

2.1.6 Quantificação de proteínas

As proteínas solúveis presentes no extrato enzimático foram quantificadas pelo Método de Biureto, utilizando curva padrão construída com solução de albumina de ovo em concentração de 5 mg/mL, preparada em NaCl 0,9%. Tubos de ensaio contendo 3 mL de reagente de Biureto, 2 mL da extrato enzimático foram incubados em banho-maria a 37°C por um período de 10 min, em seguida feita a leitura da absorbância a 540 nm.

2.1.7 Potencial de inibição da atividade enzimática

O potencial de inibição foi definido pela Equação 1, comparando-se o percentual de inibição de atividade enzimática das maçãs submetidas aos tratamentos em relação ao controle (maçã não tratada)

$$P_I \% = \frac{AE_{controle} - AE_{tratamento}}{AE_{controle}} .100 \quad (1)$$

sendo: P_I – potencial de inibição

$AE_{controle}$ – atividade enzimática do controle

$AE_{tratamento}$ – atividade enzimática do tratamento

2.1.8 Tratamento de dados

Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey utilizando-se o Software Statistica 6,0.

2.2 Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os níveis de significância dos fatores tempo de tratamento e concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade de polifenoloxidase e peroxidase.

Tabela 1 Níveis de significância (p) da análise de variância dos resultados de atividade enzimática das enzimas PPO e POD em função do tempo de tratamento e concentração de $CaCl_2$

Parâmetro	PPO	POD
Tempo de tratamento	<0,001	<0,001
Cloreto de cálcio	<0,001	<0,001
Tempo x Cloreto de cálcio	0,095	<0,001

Verifica-se através da Tabela 1 que os fatores tempo de tratamento e concentração de cloreto de cálcio influenciaram significativamente ($p < 0,001$) a atividade enzimática das enzimas estudadas. A interação entre os dois fatores teve influência significativa para POD ($p < 0,001$) devendo esta ser analisada em detrimento dos fatores individuais. Para a PPO a influência dos fatores individuais pode ser analisada individualmente ($p = 0,095$).

A Tabela 2 apresenta os resultados de atividade enzimática e potencial de inibição das enzimas POD e PPO para os diferentes tratamentos salinos. Para as atividades enzimáticas, letras iguais na mesma coluna representam médias iguais entre si e letras diferentes, médias diferentes, a nível de significância de 0,05.

Tabela 2. Atividade enzimática e potencial de inibição do cloreto de cálcio sobre as enzimas PPO e POD das maçãs submetidas aos tratamentos salinos.

Tratamento	PPO		POD	
	AE ($U_{PPO}/g_{pin} \cdot min$)	PI (%)	AE ($U_{POD}/g_{pin} \cdot min$)	PI (%)
CaCl ₂ 0,5% 10 min	0,470 ^c	54,3	6,468 ^{bc}	42,2
CaCl ₂ 0,5% 20 min	0,671 ^d	34,6	9,771 ^d	12,6
CaCl ₂ 1,0% 10 min	0,311 ^{ab}	69,7	7,150 ^c	36,1
CaCl ₂ 1,0% 20 min	0,409 ^{bc}	60,1	6,144 ^b	45,1
CaCl ₂ 2,0% 10 min	0,259 ^a	74,8	4,867 ^a	56,5
CaCl ₂ 2,0% 20 min	0,417 ^{bc}	59,4	6,146 ^b	45,1

AE- atividade enzimática

PI- potencial de inibição

A menor atividade enzimática de PPO foi de 0,259 U_{PPO}/g_{ptn} para o tratamento salino com $CaCl_2$ 2,0% e tempo de imersão de 10 min, sendo este resultado estatisticamente igual ao obtido com o tratamento com $CaCl_2$ 1% com tempo de imersão de 10 min (0,311 $U_{PPO}/g_{ptn}\cdot min$). Observou-se que no caso da PPO, aumentando-se o tempo de tratamento com cloreto de cálcio foram ocorreram aumentos nas atividades enzimáticas. A maior atividade enzimática foi observada para o tratamento com $CaCl_2$ 0,5% e tempo de imersão de 20 min (0,671 $U_{PPO}/g_{ptn}\cdot min$).

A menor atividade enzimática obtida para a peroxidase foi de 4,867 $U_{POD}/g_{ptn}\cdot min$ para o tratamento com $CaCl_2$ 2,0 % com tempo de imersão de 10 min, enquanto a maior atividade foi observada no tratamento com $CaCl_2$ 0,5% com tempo de imersão de 20 min.

Os valores das atividades enzimáticas da POD foram muito maiores que os valores obtidos para as atividades enzimáticas da PPO. Valderrama et al. (2001) observaram o mesmo comportamento para a atividade enzimática tanto da polpa quanto da casca de maçãs Fuji e Gala.

A redução da atividade enzimática pode ter sido influenciada pela queda do pH da maçã, provocada pelo tratamento salino; fato relatado por Antonioli et al. (2003) em estudo sobre o efeito do tratamento com cloreto de cálcio no abacaxi “pérola”, o qual observou redução do pH do fruto, promovida pelo tratamento salino com $CaCl_2$, este possivelmente interferindo na atividade de peroxidase, uma vez que a acidificação do meio conduz à desnaturação reversível da proteína (2003 apud Lu & Whitaker, 1974).

Gonçalves et al. (2000) constataram uma menor atividade peroxidásica em abacaxis “pérola” tratados com $CaCl_2$ e atribuiu essa redução à ação do cálcio na manutenção da integridade celular, evitando, desse modo, o contato enzima-substrato e conseqüentemente, reduzindo a formação de pigmentos escuros.

3 CONCLUSÃO

A menor atividade enzimática de PPO foi de 0,259 $U_{PPO}/g_{ptn}\cdot min$ e para POD foi de 4,867 $U_{POD}/g_{ptn}\cdot min$, ambas para o tratamento salino com $CaCl_2$ 2,0% e tempo de imersão de 10 min, obtendo-se percentuais de inibição de 74,8% para PPO e de 56,5% para POD.

4 REFERÊNCIAS

ANTONIOLLI, L. R.; BENEDITTI, B. C.; SOUZA FILHO, M. de S. M. de. Efeito do cloreto de cálcio na qualidade do abacaxi ‘pérola’ minimamente processado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, set. 2003.

CARVALHO, A. L.; LIMA, L. C. de O. Qualidade de kiwis minimamente processados e submetidos a tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e cloreto de cálcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 679-685, 2002.

GONÇALVES, N. B.; CARVALHO, V. D. DE C.; GONÇALVES, J. R. A. Efeito do cloreto de cálcio e do tratamento hidrotérmico na atividade enzimática e o teor de fenólicos do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2075-2081, 2000.

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

IHL, M.; et al. Effect o immersion solutions on shelf-life of minimally processed lettuce.
Swiss Society of Food Science and Technology, Lebensm, v. 36, p. 591-599, 2003.