

Área: Ciência de Alimentos

ESTABILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUCO DE MAÇÃ POR TRATAMENTO QUÍMICO

**Juliana Rizzardi, Aline Moreira, Cássia Borges de Camargo, Larissa Pagliarini, Vandrê
Barbosa Brião, Luciane Maria Colla ***

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo

**E-mail: lmcolla@upf.br*

RESUMO

As enzimas polifenoloxidase e peroxidase presentes em tecidos vegetais são as principais responsáveis pelo escurecimento enzimático de frutas e hortaliças, uma vez que estas enzimas entram em contato com os compostos fenólicos (substratos), provocando o escurecimento, o qual altera as propriedades de cor, sabor, odor e textura. Esta oxidação enzimática pode ser prevenida utilizando métodos químicos, os quais estão baseados na inativação das enzimas ou na eliminação do oxigênio, mas como a inativação das enzimas pode ser prejudicial e a remoção do oxigênio difícil, torna-se necessário o uso de substâncias antioxidantes como inibidores da ação das enzimas. Objetivou-se realizar a inativação enzimática do suco de maçã através de tratamento químico. Os sucos produzidos foram tratados quimicamente com cloreto de cálcio, ácido cítrico, ácido ascórbico e metabissulfito de sódio em diferentes concentrações. As enzimas polifenoloxidase e peroxidase foram inibidas em todos os sais testados, exceto para o ácido cítrico. A atividade da enzima peroxidase apresentou maior inibição quando o suco foi tratado com ácido ascórbico 0,5%, enquanto a polifenoloxidase foi totalmente inativada utilizando o ácido ascórbico 0,5% e inibida quando tratado com metabissulfito de sódio 0,1%.

Palavras-chave: inativação enzimática, tratamento químico, peroxidase, polifenoloxidase.

1 INTRODUÇÃO

A maçã é a fruta mais comercializada como fruta fresca tanto no contexto internacional quanto brasileiro, oferecendo também promissoras perspectivas para a industrialização, uma vez que apresenta características favoráveis para obtenção de produtos de boa aceitação (MELLO, 2004).

A cor é um critério importante na decisão de compra de frutas e hortaliças pelo consumidor. A preservação dos pigmentos responsáveis por essa característica é de fundamental importância para qualidade desses produtos. As mudanças de cor em frutas e hortaliças possuem diferentes origens, podendo ser influenciadas pela presença de pigmentos naturais, como clorofilas carotenóides e antocianinas ou por pigmentos formado com reações enzimáticas e não enzimáticas (MARSHALL; KIM; WEI, 2000).

No processamento do suco de maçã a reação de escurecimento enzimático ocasionada pela ação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase ocorre devido ao contato destas enzimas com os compostos fenólicos (substratos), desencadeando o escurecimento. Este, por sua vez, prejudica propriedades do suco como cor e sabor (MARTINEZ; WHITAKER, 1995, apud OLIVEIRA et al, 2008; MARSHALL, KIM, WEI, 2000).

A polifenoloxidase (PPO) é responsável pelo aparecimento da coloração marrom-escura; e a peroxidase (POD) pode destruir a vitamina C e provocar descoloração de antocianinas e carotenóides. A investigação desse grupo de enzimas tem sido de grande importância para a tecnologia de alimentos, uma vez que a atividade enzimática ocasiona mudança na cor, variações de aroma, alterações no teor de vitaminas e até modificações na textura (PADMAJA et al., 1982, apud CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

Os métodos químicos para inibição do escurecimento enzimático estão baseados em um sistema oxidante que necessita da presença de três compostos: enzima, oxigênio e substrato. Esta oxidação pode ser evitada pela inativação da enzima ou eliminação do oxigênio, mas a inativação das enzimas é algumas vezes prejudicial e a eliminação do oxigênio é difícil. Assim, o único recurso possível é o uso de substâncias antioxidantes. Alguns alimentos não podem passar por estes processos, pois podem alterar suas propriedades organolépticas, como sabor e odor. Outras possibilidades consistem em retirar o oxigênio do meio e controlar a luminosidade utilizando embalagens adequadas, a vácuo e não-transparentes e/ou utilização de conservantes (antioxidantes) (BRAVERMAN, 1998 apud FAGUNDES et al., 2005).

A procura pela produção de um suco processado que mantenha suas características mais próximas das naturais tem sido um objetivo de pesquisas e metas para o setor de planejamento e desenvolvimento de novos produtos. No entanto, a obtenção de um suco industrializado que apresente características sensoriais mais próximas do suco natural ainda é uma meta a ser alcançada.

Objetivou-se realizar a inativação enzimática do suco de maçã através de tratamento químico com cloreto de cálcio, ácido cítrico, ácido ascórbico e metabissulfito de sódio.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Avaliação Sensorial Preliminar

Para a produção do suco utilizou-se maçãs de cultivares Fuji, as quais foram selecionadas manualmente, limpas e lavadas. Em seguida, as maçãs foram centrifugadas em centrífuga doméstica (Black&Decker), e o suco extraído utilizado para a realização do tratamento químico. O suco obtido após a centrifugação foi tratado quimicamente com cloreto de cálcio, ácido ascórbico, ácido cítrico e metabissulfito de sódio em diferentes concentrações.

As concentrações dos sais adicionadas foram: cloreto de cálcio (0,5 %, 0,75 % e 1,0 %); ácido ascórbico (0,5 %, 0,75 %, 1,0 % e 1,5 %); ácido cítrico (0,5 %, 0,75 %, 1,0 % e 1,5 %) e metabissulfito de sódio (0,1 %, 0,2 % e 0,5 %). Após 10 min de tratamento com os sais, foi realizada a avaliação subjetiva da cor e sabor dos sucos submetidos aos diferentes tratamentos químicos por uma equipe de 6 julgadores, objetivando-se definir as concentrações que inibiriam visualmente o escurecimento enzimático sem deixar sabor residual e descaracterizar o sabor natural da fruta. Observou-se o comportamento da cor dos sucos tratados comparado ao controle (suco sem tratamento). Após definir quais eram as melhores concentrações para cada tipo de sal, foram realizadas as análises de atividade enzimática.

2.1.2 Análises da atividade enzimática

A atividade da polifenoloxidase foi determinada utilizando o método descrito por Valderrama et al., (2001 apud FUJITA, 1995) com algumas modificações. A medida da atividade enzimática foi realizada tomando-se em tubos de ensaio 2 mL de solução de catecol 1%, 5 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 e 0,1 mL da solução enzimática (suco). As

reações foram realizadas a 37°C, durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, sendo interrompidas pela adição de 1 mL de HCl 1 N. O escurecimento enzimático foi avaliado pela leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 425 nm. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por grama de proteína da amostra.

A atividade de peroxidase foi determinada utilizando o método descrito por Valderrama et al., (2001 apud CLEMENTE, 1998) com algumas modificações. A medida da atividade enzimática foi realizada tomando-se em tubos de ensaio, 2 mL de solução de guaiacol 0,5%, 1 mL de H₂O₂ 0,08%, 10 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 e 0,5 mL da solução enzimática (suco). As reações foram realizadas a 37°C, durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, sendo interrompidas pela adição de 1 mL de HCl 1 N. O escurecimento enzimático foi avaliado pela leitura da absorbância das amostras 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 da amostra.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Avaliação Sensorial Preliminar

A Figura 1 apresenta o suco de maçã sem tratamento e tratado com cloreto de cálcio em concentrações de 0,5 %, 0,75 % e 1,0 %, respectivamente, durante 10 min de tratamento. Em todas as concentrações de cloreto de cálcio testadas, os sucos apresentaram-se com aspecto mais claros quando comparados com o controle (suco sem tratamento) durante os 10 min de tratamento, observou-se também que a concentração de 0,5 % de cloreto de cálcio foi a qual o suco manteve-se mais claro durante todo o tempo de tratamento, mostrando que esta concentração minimizou a oxidação enzimática na avaliação sensorial visual. Os sucos tratados com concentrações de 0,75 % e 1,0 % de cloreto de cálcio apresentaram sabor acentuado de sal comparado com osucos tratados com a concentração de 0,5 %. Assim, a concentração de cloreto de cálcio mais eficiente para reduzir, visualmente o escurecimento causado pelas enzimas peroxidase e polifenoloxidase foi a de 0,5 %, e também por apresentar menos sabor acentuado de sal.

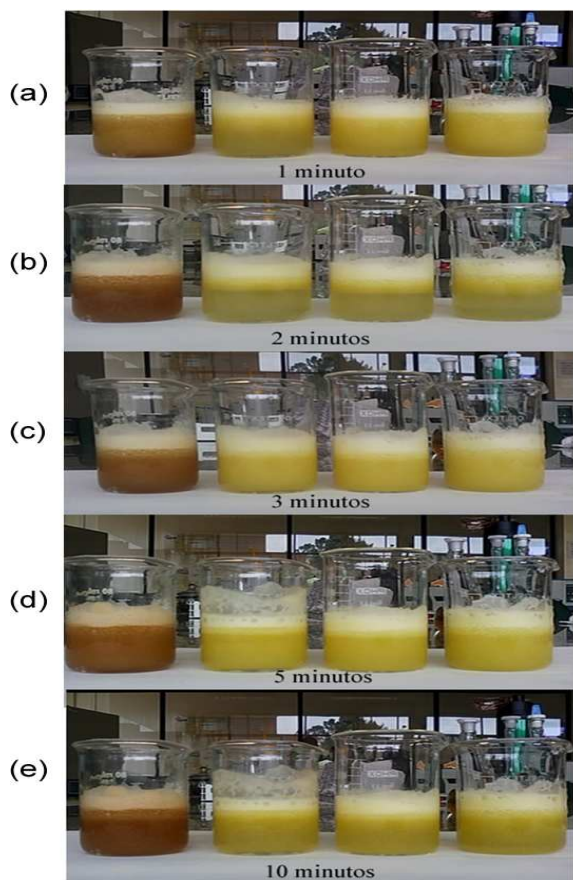


Figura 1 Suco de maçã sem tratamento e tratado com cloreto de cálcio em concentrações de 0,5 %, 0,75 % e 1,0 % durante 10 min.

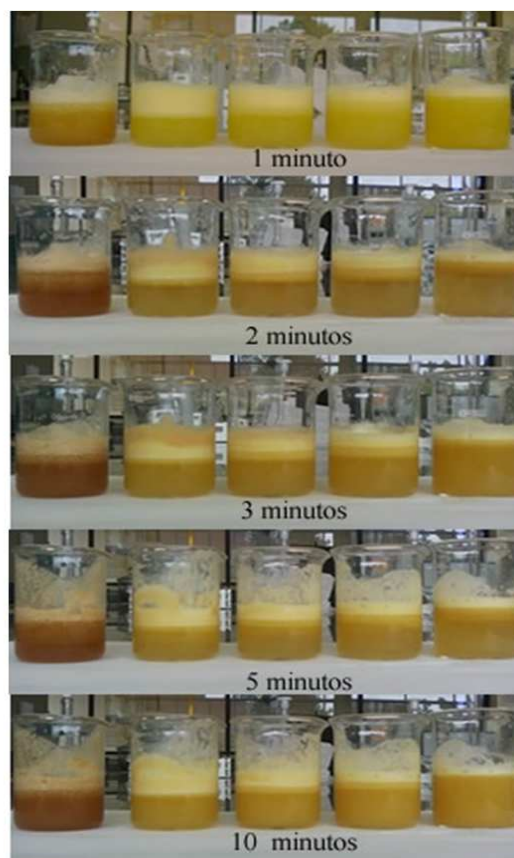


Figura 2 Suco de maçã sem tratamento e tratado com ácido ascórbico em concentrações de 0,5 %, 0,75 %, 1,0 % e 1,5 % durante 10 min.

A Figura 2 apresenta o suco de maçã sem tratamento e tratado com ácido ascórbico em concentrações de 0,5 %, 0,75 %, 1,0 % e 1,5 %, respectivamente, durante 10 min de tratamento. Todas as concentrações de ácido ascórbico testadas demonstraram-se eficientes para inibir visualmente o escurecimento enzimático, pois os sucos apresentaram-se com aspecto mais claros quando comparados com o controle (suco sem tratamento) durante os 10 min de tratamento. No tempo de 10 min de tratamento, os sucos com concentrações de 0,5 % e 0,75 % de ácido ascórbico foram os que apresentaram-se mais claros quando comparados com o suco sem tratamento, demonstrando que estas concentrações foram as mais eficientes para a inibição visual do escurecimento. Verificou-se que quanto maior a concentração de ácido ascórbico, maior a descaracterização do sabor do suco de maçã, o qual assemelhou-se ao sabor de suco de laranja. No suco tratado com 0,5 % de ácido ascórbico, a descaracterização do sabor foi menos acentuada, além desta concentração ser eficiente para inibir, visualmente o escurecimento causado pelas enzimas polifenoloxidase e peroxidase. O

ácido ascórbico e seus vários sais neutros são os principais antioxidantes para o uso em frutas e hortaliças e seus sucos, visando prevenir escurecimento e outras reações oxidativas (WILEY,1994, apud MELO; VILAS BOAS, 2006). Ele atua seqüestrando o cobre, grupo prostético da polifenoloxidase, e reduzindo quinonas de volta a fenóis, antes de formarem pigmentos escuros (SAPERS, 1998 apud MELO, 2006).

A Figura 3 apresenta o suco de maçã sem tratamento e tratado com ácido cítrico em concentrações de 0,5 %, 0,75 %, 1,0 % e 1,5 %, respectivamente, durante 10 min de tratamento. Os sucos tratados com quaisquer concentrações de ácido cítrico apresentaram-se com a mesma aparência do suco não tratado (controle). Como o ácido cítrico não foi eficiente para minimizar a oxidação enzimática na avaliação sensorial visual, este sal foi descartado como inibidor do escurecimento enzimático. Eram esperados resultados diferentes, já que a literatura relata que o ácido cítrico apresenta efeito inibitório duplo sobre as polifenoloxidase não somente pelo abaixamento do pH do meio, mas também complexando com o cobre do centro ativo da enzima (JESUS, et al., 2008).

A Figura 4 apresenta o suco de maçã sem tratamento e tratado com metabissulfito de sódio em concentrações de 0,1 %, 0,2 % e 0,5 %, respectivamente, durante 10 min de tratamento. Todas as concentrações de metabissulfito de sódio apresentaram-se eficientes para inibir, visualmente do escurecimento enzimático durante todo o tempo de tratamento, pois os sucos tratados apresentaram-se com aparência mais clara que o suco sem tratamento. No tempo de 10 min, a menor concentração de metabissulfito de sódio (0,1 %) foi a que se mostrou mais eficiente na inibição visual do escurecimento enzimático. Verificou-se que quanto maior a concentração de metabissulfito de sódio, maior o sabor residual característico de remédio, descaracterizando o sabor do suco de maçã, assim, com o tratamento de 0,5 % de metabissulfito de sódio a descaracterização do sabor foi menos acentuada, demonstrando-se também ser eficiente na inibição visual do escurecimento causado pelas enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Este comportamento foi o esperado, uma vez que o uso de compostos redutores, como o sulfito e a cisteína, são bastante efetivos no controle do escurecimento enzimático. Eles previnem o escurecimento através da redução das o-quinonas para o-difenóis, que são compostos menos escuros, ou pela complexação com produtos da reação enzimática formando compostos de coloração mais clara e estáveis ou ainda pela inativação irreversível da polifenoloxidase (GONZALEZ et al., 1993).

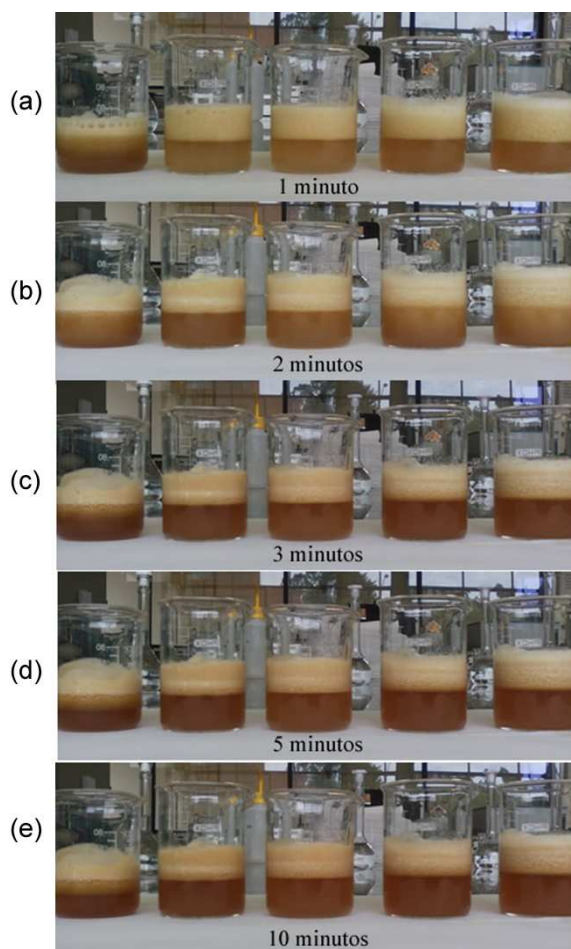


Figura 3 Suco de maçã sem tratamento e tratado com ácido cítrico em concentrações de 0,5 %, 0,75 % 1,0 % e 1,5 % durante 10 min.

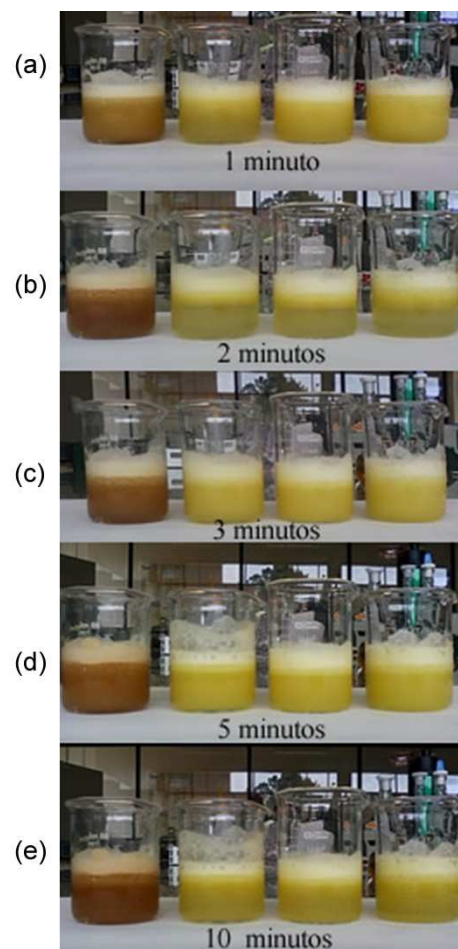


Figura 4 Suco de maçã sem tratamento e tratado com metabissulfito de sódio em concentrações de 0,1 %, 0,2 % e 0,5 % durante 10 min.

Baseado nestes resultados, os sucos tratados com 0,5 % de cloreto de cálcio, 0,5 % ácido ascórbico e 0,1 % de metabissulfito de sódio foram os escolhidos os ensaios de atividade enzimática, uma vez que estas concentrações foram eficientes na análise preliminar de cor e sabor, para inibir o escurecimento enzimático do suco.

2.2.2 Atividade enzimática das enzimas polifenoloxidase e peroxidase

A Figura 5 apresenta a atividade enzimática da peroxidase em função do tempo para os sucos sem tratamento e com tratamento. Pode-se observar na Figura 5, que todos os tratamentos reduziram a atividade da enzima peroxidase durante os 30 min de reação. O tratamento com ácido ascórbico 0,5 % foi o que apresentou a maior redução de atividade

desta enzima, seguido do tratamento com metabissulfito de sódio 0,1 % e cloreto de cálcio 0,5 %.

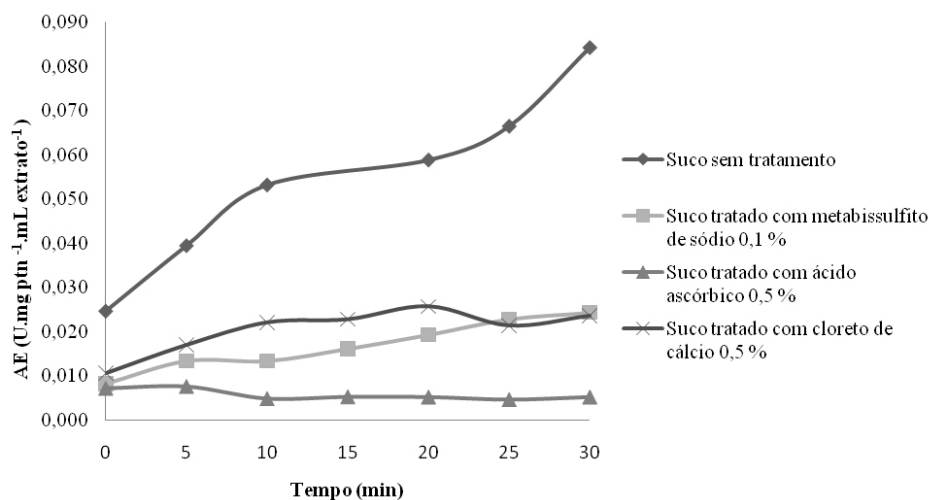


Figura 5 Atividade enzimática da peroxidase em função do tempo para os sucos sem tratamento e com tratamento.

A Figura 6 apresenta a atividade enzimática da polifenoloxidase em função do tempo para os sucos sem tratamento e com tratamento. Na Figura 6 pode-se observar que somente o tratamento com o ácido ascórbico e com o metabissulfito de sódio foram efetivos na inibição da polifenoloxidase, enquanto que o tratamento com cloreto de cálcio não apresentou redução da atividade, ou seja, o suco tratado com cloreto de cálcio apresentou maiores atividades da enzima polifenoloxidase que o suco sem tratamento, assim, este sal não foi eficiente para reduzir a ação desta enzima. O comportamento do ácido ascórbico foi o esperado, uma vez que a literatura relata este ácido como inibidor da enzima polifenoloxidase, já que a enzima catalisa a oxidação do substrato natural a quinonas e estas são reduzidas pelo ácido ascórbico novamente aos fenóis originais (FENNEMA, 1993 apud FAGUNDES, 2005).

Baseado nos resultados das atividades, o ácido ascórbico 0,5 % foi o que apresentou maior redução da atividade da enzima peroxidase durante os 30 min de reação, enquanto que a inibição da enzima polifenoloxidase foi completa após 5 minutos de reação. O metabissulfito de sódio 0,1 % foi o tratamento que reduziu as atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, apresentando-se mais eficiente na inibição da enzima polifenoloxidase, uma vez que as atividades foram quase reduzidas por completo. Desta forma, a combinação dos tratamentos com ácido ascórbico e metabissulfito de sódio pode ser

uma alternativa para posteriores estudos; isto justifica-se pela necessidade de diminuir a concentração desses inibidores, uma vez que individualmente, nas concentrações testadas, ocasionaram descaracterização do sabor dos sucos.

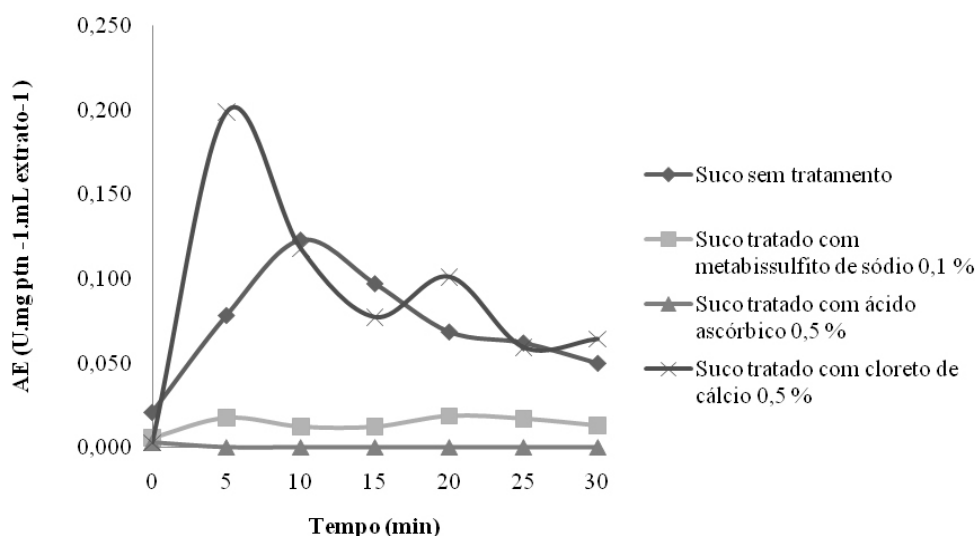


Figura 6 Atividade enzimática da polifenoloxidase em função do tempo para os sucos sem tratamento e com tratamento.

Nogueira et al.(1989) estudou a inativação enzimática em maçã usando tratamento térmico, ácido ascórbico e metabisulfito. Na maçã, a peroxidase apresentou uma atividade muito baixa, e o tratamento que se mostrou mais eficiente para sua inativação foi o tratamento térmico, com o ácido ascórbico, também se conseguiu a inativação total, enquanto o metabisulfito se mostrou menos eficiente, em todas as concentrações utilizadas. Para a inativação da polifenoloxidase da maçã, o método mais eficiente foi o metabisulfito, pois na menor concentração usada, já houve a total inativação da enzima. O tratamento térmico também se mostrou eficiente bem como o emprego do ácido ascórbico, mas menos eficiente que o metabisulfito. Assim levando-se em consideração a inibição das duas enzimas, o tratamento térmico parece ser o mais indicado no caso da maçã.

3 CONCLUSÃO

Os tratamentos químicos foram eficientes para a estabilização enzimática do suco de maçã, uma vez que os sais utilizados inibiram a ação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, exceto o ácido cítrico.

REFERÊNCIAS

- CARNEIRO, A.A.J.;ALVES-PRADO,H.F.;GOMES.E,DA SILVA.R, Escurecimento Enzimático em Alimentos: Ciclodextrina como Agente Antiescurecimento. Comunicado Técnico. INSS 0103-4235, 2006.
- COMPOS, SILVEIRA, Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado técnico. ISSN 1806-9185, 2003.
- FAGUNDES,A.F.,AYUB,R.A. Característica físico-química de caquis cv. Fuyu submetido a aplicação de agentes inibidores de escurecimento e armazenados a 0°C. Acta Sci. Agron, v. 27, n. 3, p. 403-408, 2005.
- LOZANO-DE-GONZALEZ, P. G.; BARRETT, D. M.; WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W. Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. Journal of Food Science, Chicago, v.58, n.2, p.399-404, 1993
- JESUS, M. M. S., CARNELOSSI, M. A. G., SANTOS F. S.NARAIN, N.CASTRO, A.A.Inibição do escurecimento enzimático de quiabo minimamente Processado. Revista Ciência Agronômica, 2008.
- MARSHALL, M. R.; KIM, J.; WEI, C. I. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. 2000. Disponível em:
<<http://www.fao.org/ag/Ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>>. Acesso em: abril 2009.
- MELLO, L.M.R. Produção e mercado brasileiro de maçã, ISSN 1808-6802. Bento Gonçalves-RS, Junho, 2004.
- MELO,A.A.M., VILAS BOAS, E.V. de B.,INIBIÇÃO DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO DE BANANA MAÇÃ MINIMAMENTE PROCESSADA. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 26(1): 110-115, jan.-mar. 2006.

VALDERRAMA, P. MARANGONI, F. CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*) *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(3): 321-325, set.-dez. 2001.

MIRANDA, M. Z., EL-DASH, A. Farinha integral de trigo germinado. Características nutricionais e estabilidade ao armazenamento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 3, p. 216-223, 2002.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MOSKOWITZ, H. R. *Applied Sensory Analysis of Foods*. Boca Raton: CRC Press, v. 1, 1988, 259 p.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N; CATANOZI, M. P. L. M. Emprego de sanitizantes na desinfecção de vegetais. *Higiene Alimentar*, v. 17, n. 112, p. 42-46, 2003.