

OTIMIZAÇÃO DA INATIVAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE EM POLPA DE ABACAXI

Isabela Rodrigues dos Santos¹; Marilia Lordêlo Cardoso Silva²; Aline Silva Costa³; Maria Gabriela Bello Koblitz⁴

1. Estudante PEVIC, Graduanda do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana. e-mail: isa_belinharodrigues@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. email: marilialordelo@uefs.br
3. Participante do Projeto, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. e-mail: sc_aline@yahoo.com.br
4. Participante do Projeto, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. e-mail: mkoblitz@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: inativação, inibidores, enzimas.

INTRODUÇÃO

Em alimentos ácidos, como o abacaxi, os microrganismos deterioradores são geralmente bactérias não esporuladas, leveduras e bolores, que apresentam resistência térmica menor que as enzimas termorresistentes. Desta forma, um tratamento térmico visando à destruição de microrganismos não eliminaria as enzimas que podem levar á deterioração do produto (Cunha et al., 2005).

Nos produtos de origem vegetal a peroxidase é a enzima mais termorresistente (Cunha, 2005). Entretanto, nas frutas, devido às condições ácidas, ela encontra-se menos estável, embora seja difícil sua inativação. Essa enzima pertence ao grupo das oxidorreduzases, que realizam reações de oxirredução. As peroxidases, na presença de peróxidos, oxidam diferentes substâncias produzindo radicais livres. Na ausência de peróxidos podem hidroxilar compostos aromáticos e catalisar a oxidação de alguns substratos com o auxílio do oxigênio molecular (Koblitz, 2008). Juntamente com a polifenoloxidase, a peroxidase é tida como a responsável pelo escurecimento enzimático em frutas e vegetais.

Desta forma, a inativação enzimática é um recurso que pode ser bastante utilizado na indústria de alimentos com o objetivo de conservar o produto. Tal inativação pode ser feita tanto pela adição de inibidores quanto tratamento térmico ou combinação de ambos. Alguns dos inibidores utilizados são o ácido ascórbico, o metabissulfito de sódio e o cloreto de cálcio. Quando é empregado calor na inativação é necessário controlar o tempo para uma determinada temperatura a fim de evitar danos na estrutura do fruto ou no produto final (Silva et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi estudar as condições ideais da inativação enzimática em polpa de abacaxi, a fim de conhecer o inibidor químico mais eficiente e as combinações mais favoráveis de tempo, temperatura e concentração do inibidor utilizado neste processo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com abacaxi cv. Pérola adquiridos no comércio da cidade de Feira de Santana, Bahia. Os abacaxis foram descascados e sua polpa homogeneizada. O material obtido foi centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm a 4 °C e armazenado sob congelamento (-10 °C) até a sua utilização nos experimentos. Foram usados três inibidores químicos (metabissulfito de sódio, ácido ascórbico e cloreto de cálcio). Dessa forma, foi elaborado um planejamento composto central (para cada inibidor), utilizando três variáveis independentes (tempo, temperatura e concentração do inibidor químico) com quatro repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios (Tabela 1). Como variável de resposta (dependente) foi avaliada a inativação da enzima PER, em termos de porcentagem de inativação.

A atividade da enzima PER foi determinada em temperatura ambiente usando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A reação foi seguida a 470 nm, em espectrofotômetro UV/VIS, pela formação de tetraguaicol em 3,5 mL de meio reacional contendo: 3,3 mL de guaicol, 0,1% (2-metoxi fenol), preparado em tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH=6,5) e 0,2 mL de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 30% e foram realizadas leituras a cada dez segundos por até dez minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de extrato capaz de aumentar a absorvância em 0,001 unidades por minuto de reação e foi expressa em U/g de polpa (Liu et al., 2008; Shalini et al., 2008). O percentual de inativação enzimática foi calculado baseado na atividade ótima da enzima (sem tratamento aplicado).

A influência dos parâmetros da inativação de PER foi avaliada pela construção de superfície de resposta, e análise de variância (ANOVA) no *software* STATISTICA versão 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os resultados do planejamento experimental para a inativação enzimática de PER em polpa de abacaxi cv. Pérola

Tabela 1. Condições de ensaio e resultados experimentais em termos de porcentagem de inativação enzimática ao adicionar ácido ascórbico, metabissulfito de sódio e cloreto de cálcio.

| Ensaio | Concentração(mg/L) | Temperatura(°C) | Tempo (min) | % inativação (ácido ascórbico) | % inativação (Metabissulfito de sódio) | % inativação (cloreto de cálcio) |
|--------|--------------------|-----------------|-------------|--------------------------------|--|----------------------------------|
| 1 | 40 | 43 | 3 | 21,38 | 18,25 | 22,24 |
| 2 | 40 | 43 | 7 | 21,59 | 40,46 | 31,61 |
| 3 | 40 | 74 | 3 | 65,93 | 70,58 | 47,39 |
| 4 | 40 | 74 | 7 | 72,72 | 90,23 | 54,89 |
| 5 | 160 | 43 | 3 | 31,88 | 36,02 | 28,20 |
| 6 | 160 | 43 | 7 | 30,78 | 31,98 | 34,19 |
| 7 | 160 | 74 | 3 | 67,35 | 80,33 | 59,87 |
| 8 | 160 | 74 | 7 | 83,04 | 85,14 | 62,42 |
| 9 | 0 | 57 | 5 | 0 | 0 | 32,53 |
| 10 | 200 | 57 | 5 | 39,56 | 16,16 | 5,54 |
| 11 | 100 | 27 | 5 | 12,28 | 36,32 | 18,47 |
| 12 | 100 | 86 | 5 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 13 | 100 | 57 | 1 | 18,36 | 24,27 | 29,65 |
| 14 | 100 | 57 | 9 | 33,33 | 37,47 | 29,47 |
| 15(C) | 100 | 57 | 5 | 23,25 | 31,51 | 25,14 |
| 16(C) | 100 | 57 | 5 | 25,30 | 31,91 | 27,37 |

| | | | | | | |
|-------|-----|----|---|-------|-------|-------|
| 17(C) | 100 | 57 | 5 | 23,19 | 31,54 | 25,97 |
| 18(C) | 100 | 57 | 5 | 24,32 | 32,16 | 27,46 |

Observa-se na Tabela 1 que para todos os experimentos, somente nos ensaios em que foi aplicada a temperatura de 86 °C houve 100% de inativação enzimática. BRITO et al. (2005) conseguiram inativar peroxidases de abacaxi 'IAC Gomo-de-mel' e 'IAC-1' com tratamentos a 60 e 120 segundos a 90 °C. Já LOURENÇO & NEVES (1997) observaram que a peroxidase de pêssigo apresentou rápida inativação em temperaturas acima de 70° C, com perda praticamente total após tratamento a 80° C durante 30 segundos.

A influência dos parâmetros de inativação para PER foi avaliada pela construção de superfícies de resposta, nas quais foi possível determinar as regiões de valores em que se obteve uma maior inativação enzimática. Os modelos propostos foram avaliados por análise de variância (ANOVA). Observou-se que os modelos empíricos estabelecidos nos três planejamentos executados mostraram boa concordância com os dados experimentais obtidos. Todos obtiveram uma regressão significativa, pois o F calculado foi superior ao F tabelado (1%). A partir das equações de regressão obtiveram-se as superfícies de resposta.

A análise da superfície de resposta para o ácido ascórbico mostrou que a temperatura mínima para se obter 100% de inativação de PER é 78,41°C, e a concentração de ácido ascórbico dependerá do tempo de tratamento empregado. A partir dos resultados obtidos para o cloreto de cálcio, observa-se que 100 % de inativação são alcançados com uma temperatura de 84°C independente da concentração e do tempo aplicado no tratamento. Gonçalves et al. (2000) verificou a influência do tratamento hidrotérmico com a aplicação de cloreto de cálcio em abacaxis 'Smooth Cayenne'. Eles alcançaram a inativação da enzima peroxidase fazendo a imersão dos frutos de abacaxi em uma solução a 1% de cloreto de cálcio em água aquecida (38 °C ou 40 °C) por 10 ou 20 minutos. Os autores atribuíram a inativação da peroxidase à ação do cálcio na manutenção da integridade celular, reduzindo o contato da enzima com seu substrato.

Na figura 1 encontra-se o gráfico bidimensional quando se aplicou metabissulfito de sódio como inibidor químico. Entre o limite testado, alcançou-se 100 % de inativação a partir de uma temperatura de 77,52 °C com uma concentração de metabissulfito de 130 mg/L. O uso de altas dosagens deste aditivo pode provocar gosto e cheiro desagradáveis além de causar crises alérgicas em pessoas asmáticas tendo o seu uso controlado pela legislação.

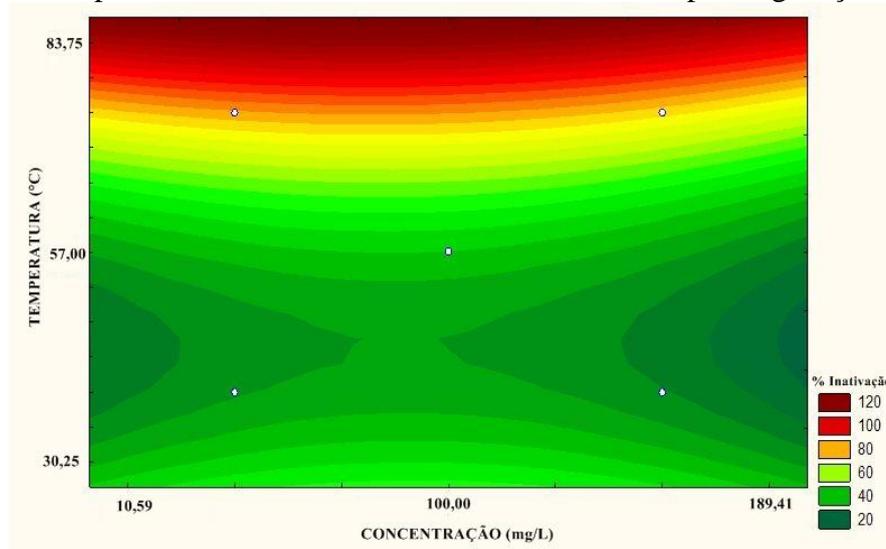


Figura 1. Gráfico bidimensional para a inativação com metabissulfito de sódio

Clemente (1996) em seu trabalho com isoenzimas de laranja, não conseguiu inativar peroxidase com tratamento de 70°C e elevando a temperatura para 80 °C não houve alteração no comportamento da atividade enzimática, mostrando estas temperaturas serem ineficientes para a inativação da peroxidase. Neste trabalho, segundo os modelos propostos, 100% de inativação é alcançada com uma temperatura de 77,52 °C, isso pode ser atribuído ao efeito benéfico dos agentes químicos empregados nos tratamentos. Quanto menor for o binômio tempo/temperatura a ser aplicado para inativação enzimática, melhor para a indústria de alimentos. Temperaturas e tempos longos podem levar à destruição de vitaminas e à formação de sabor de cozido (Koblitz, 2008).

O metabissulfito de sódio apresentou a melhor resposta de inativação, pois a uma concentração mais baixa e tratamento térmico mais brando, do que quando comparados com os outros inibidores, atingiu-se 100% de inativação enzimática, sem necessitar longo tempo de exposição. Isso representa vantagens de reduzido emprego de aditivo e diminuição dos danos causados por tratamentos térmicos severos.

5. REFERENCIAS

- BRITO, C. A. K.; SATO, H. H.; SPIRONELLO, A & SIQUEIRA, W. J. (2005) Características da atividade da peroxidase de abacaxis *Ananás comosus* ((L.) Merrill) da cultivar IAC gomo-de-mel e do clone IAC-1. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 25(2), 244-249,
- BURNETTE, F. S., Peroxidase and its relationship to food flavour and quality: a review. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 42, p.1-6. 1977
- CLEMENTE, E., The characterisation of isoperoxidase from orange. 1993 Tese (Doutorado) - University of Leeds/Procter Department of Food Science, Leeds, England.
- CUNHA, G. M. A.; ALVES, J. K. P.; JÚNIOR, W. M. A.; DUARTE, W. K. C. & MAGALHÃES, M. M. A., Estudo da cinética de inativação térmica da peroxidase presente na polpa de goiaba. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005.
- GONÇALVES, N. B.; CARVALHO, V. D. & GONÇALVES, J. R. A., (2000), Efeito do cloreto de cálcio e do tratamento hidrotérmico na atividade enzimática e no teor de fenólicos do abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 2075-2081.
- KOBLITZ, M. G. B. *Bioquímica de alimentos. Teoria e aplicações práticas*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1. 242 p, 2008.
- LIU, X.; GAO, Y.; PENG, X.; YANG, B.; XU, H. & ZHAO, J., Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris L.*) extract with high pressure carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 24–31, 2008.
- LOURENÇO, E. J. & NEVES, V. A., (1997), Peroxidase solúvel de pêssego: Purificação parcial e propriedades. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 17, 42-48.
- SILVA, M. V. dos; ROSA, C. I. L. F. & BOAS, E. V. de B. V. Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, 27, 83-96, 2009.
- SHALINI, G.R., U.S. SHIVARE, U.S., BASU, S. *Journal of Food Engineering*. 85: 147–153, 2008.