

# DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA ENZIMA PECTINAMETILESTERASE EM SUCO DE MAÇÃ NÃO CLARIFICADO

L. J. PEREIRA<sup>1</sup>, E. S. SIGUEMOTO<sup>1</sup>, J. A. W. GUT<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Dep.de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, FoRC - Centro de Pesquisa em Alimentos

E-mail para contato: jorgewgut@usp.br

**RESUMO** – O tratamento térmico de alimentos líquidos a base de frutas visa a inativação de micro-organismos e enzimas indesejadas. O objetivo deste trabalho é estudar a cinética de inativação da enzima pectinametilesterase (PME) em suco de maçã não clarificado. O processo foi realizado em batelada por imersão de amostras em banho termostatizado (60, 70, 80 e 90 °C) por tempos de imersão determinados (10, 30, 60 e 90 s) com registro do histórico de temperatura e atividade residual. Um modelo de primeira ordem com dois componentes para processo não isotérmico foi ajustado ao conjunto de dados pela minimização do erro quadrático. Os parâmetros ajustados indicam que 26% da atividade da PME vem de uma fração termicamente resistente que não é inativada nas condições estudadas. Para atingir uma atividade residual de 10% seriam necessários 78 s a 90 °C, o que é uma condição desfavorável em termos de qualidade do produto.

## 1. INTRODUÇÃO

O suco de maçã é conhecido como um produto de alta qualidade nutricional e sensorial. Segundo USDA apud Renard *et al.* (2011), ele ocupa o segundo lugar na produção mundial de sucos de frutas, com uma produção anual de quase 1,5 milhões de toneladas de suco concentrado, abaixo somente do suco de laranja. Um dos problemas enfrentados no seu processamento e comercialização consiste na manutenção da turbidez do suco, característica essencial na avaliação da qualidade sensorial do produto. Essa característica, por sua vez, está diretamente relacionada à atividade da enzima pectinametilesterase (Niu *et al.*, 2010).

No decorrer dos últimos anos, observou-se um crescimento na procura por alimentos prontos para consumo. Visou-se, portanto, a máxima conservação das características naturais tanto na produção quanto durante o período de estocagem. Os sucos de frutas, inclusive nessa categoria, são produtos que demandam um processamento específico, denominado pasteurização. A pasteurização é baseada no aquecimento do alimento a uma determinada temperatura com o objetivo de eliminar micro-organismos patogênicos e deterioradores e reduzir a atividade enzimática, garantindo a inocuidade do alimento e estendendo a vida de prateleira. O aquecimento convencional usando trocadores de calor é um dos mais comumente utilizados na indústria alimentícia, porém os longos tempos de processamento a altas temperaturas ocasionam considerável perda na qualidade do produto (Benlloch-Tinoco *et al.*, 2013).

Com este trabalho, objetiva-se estudar a inativação enzimática da pectinametilesterase (PME) de suco de maçã não clarificado, ajustando modelos cinéticos aos dados experimentais. Desta forma, pretende-se encontrar as condições ideais de tratamento térmico para o suco de maçã não clarificado em relação à inativação dessa enzima.

## 1.1. Pectinametilesterase

As pectinametilerases são enzimas altamente específicas cuja ação envolve apenas metil ésteres. Sua presença foi detectada em todas as plantas e particularmente em vários espécimes superiores como maçã, banana, citrus (limão, laranja, tangerina, grapefruit), cereja, uva e manga (Whitaker *et al.*, 2003). No suco de maçã, a PME propicia a desesterificação da pectina, transformando-a em ácido péctico e um álcool metílico. Segundo Krapfenbauer *et al.* (2006), a alteração na turbidez do suco de maçã é relacionada à atividade da PME.

Os diversos estudos sobre PME realizados em sucos de frutas, principalmente em frutas cítricas, sugerem a existência de várias isoformas da enzima. Embora pouca pesquisa tenha sido feita sobre a pectinametilesterase no suco de maçã, foram encontrados dois tipos preponderantes da enzima (Krapfenbauer *et al.*, 2006). Neste projeto, levou-se em consideração a existência de duas isoformas nos modelos matemáticos utilizados.

## 1.1. Cinética de Inativação Enzimática

As reações enzimáticas nos alimentos ocorrem a uma taxa que é limitada pela atividade das enzimas presentes. A alta temperatura altera a estrutura terciária da proteína, fazendo com que a enzima perca sua atividade catalisadora. A inativação térmica das enzimas usualmente segue uma cinética de primeira ordem (Toledo, 1991):

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k \cdot t \quad (1)$$

em que  $A$  é a atividade,  $A_0$  é a atividade inicial,  $k$  é a constante de velocidade e  $t$  é o tempo.

Os parâmetros cinéticos mais comumente utilizados para expressar a inativação térmica de enzimas em alimentos são  $D$  e  $z$ . O valor  $D$  é o tempo pelo qual uma amostra deve ser mantida a uma dada temperatura de modo a reduzir a atividade enzimática a um décimo do seu valor inicial. O valor  $z$ , por sua vez, representa a variação de temperatura que provoca uma mudança decimal em  $D$  (Toledo, 1991).

Apesar de o modelo cinético de inativação enzimática ser usualmente descrito como de 1ª ordem, desvios foram observados, como o reportado por Fujikawa (1996) para inativação térmica de enzimas. O modelo proposto para explicar essa não linearidade considera a existência de dois grupos de isoenzimas, no qual um é mais termorresistente do que o outro. A inativação de cada grupo segue um modelo de primeira ordem. Esse modelo de dois componentes está representado na equação abaixo para um processo a temperatura constante:

$$\frac{A}{A_0} = \alpha \cdot \exp\left(-\frac{t}{D_1}\right) + (1 - \alpha) \cdot \exp\left(-\frac{t}{D_2}\right) \quad (2)$$

em que  $\alpha$  é a fração inicial da atividade enzimática da forma termorresistente e os índices 1 e 2 correspondem às frações termoresistente e termolábil (Aguiar *et al.*, 2012).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Matéria-prima

Maçãs da variedade Fuji Suprema foram doadas pelo produtor Hiragami's Fruit localizado na cidade de São Joaquim (Santa Catarina), embaladas individualmente em filme de PVC e mantidas a 5 °C. Para a produção do suco de maçã não clarificado, utilizou-se o Master suco inox (Funkitchen, USA). Ao final da extração foram adicionados 800 mg/L de ácido ascórbico com o objetivo de minimizar o escurecimento da amostra, segundo Krapfenbauer *et al.* (2006). Em seguida, o suco foi armazenado em recipientes de 100 mL e mantido em um freezer plasma 349-FV (FANEM, Brasil) à -30 °C, até o tratamento térmico.

### 2.2. Tratamento Térmico Convencional

O processamento foi feito em batelada de acordo com a técnica empregada por Aguiar *et al.* (2012). O suco foi introduzido em envelopes finos (3,5 cm de largura, 15,0 cm de comprimento e 0,12 cm de espessura) de polietileno, pois este material apresenta menor resistência à troca térmica do que o vidro. A amostra foi aquecida e mantida a temperatura pré-determinada em um banho termostatizado MA-194 (Marconi, Brasil) pelo tempo desejado e em seguida resfriada em um banho de gelo. Para este estudo, foram escolhidas temperaturas de 60, 70, 80 e 90 °C e tempos de imersão de 10, 30, 60 e 90 s. A utilização do termopar acoplado ao termômetro digital TH-060 (Instrutherm, Brasil), permitiu a obtenção do valor de temperatura a cada segundo. Por fim, os envelopes foram congelados e mantidos à temperatura de -30 °C até análise da atividade enzimática residual.

### 2.3. Atividade da Pectinametilesterase

A atividade da PME foi determinada por titulação dos grupos carboxilas à temperatura de 30 °C, pH 7,5 por 30 min, de acordo com Rouse e Atkins (1952). Para isso, foi utilizado o titulador automático ABU901 (Radiometer Copenhagen, Dinamarca), e, como substrato, 25 mL de uma solução de pectina 1% com 0,15 M de NaCl para 2,0 mL de suco de maçã. Uma unidade de atividade de pectinametilesterase (PEU) é definida como a necessária para liberar 1 μmol de grupo carboxil em um minuto. A atividade enzimática foi calculada como:

$$PE\left(\frac{PEU}{mL}\right) = \frac{V \cdot N \cdot 1000}{V' \cdot t_R} \quad (3)$$

em que  $V$  é o volume de NaOH adicionado (mL),  $N$  é a normalidade da solução de NaOH,  $V'$  é o volume da amostra (mL),  $t_R$  é o tempo de reação (min).

### 2.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos da inativação térmica foram ajustados de acordo com Aguiar *et al.* (2012). Como as condições de aquecimento não são isotérmicas, tem-se a necessidade de definir uma função letalidade integrada ( $L$ ) que representa o efeito da temperatura e do tempo sobre a inativação enzimática:

$$L = \int_0^t 10^{\frac{T - T_{ref}}{z}} dt \quad (4)$$

em que  $T$  é o histórico de temperatura,  $T_{ref}$  é a temperatura de referência

A função letalidade integrada equivale ao tempo equivalente do processo isotérmico na temperatura de referência ( $L = t_{eq}$ ). Desta forma, a atividade enzimática residual pode ser calculada como:

$$\left(\frac{A}{A_0}\right) = 10^{\frac{-t_{eq}}{D}} \quad (5)$$

No caso de um sistema com duas frações com resistências térmicas diferentes tem-se a seguinte composição, obtida a partir da Equação 2:

$$\left(\frac{A}{A_0}\right) = \alpha \cdot \left(\frac{A}{A_0}\right)_1 + (1 - \alpha) \cdot \left(\frac{A}{A_0}\right)_2 \quad (6)$$

Em suma, o modelo final tem cinco parâmetros cinéticos:  $\alpha$ ,  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $z_1$  e  $z_2$ . Para o ajuste foi minimizada a função somatório do erro quadrático para predição da atividade enzimática residual. O método do gradiente reduzido generalizado foi usado na minimização por meio do software Excel (Microsoft, USA) e diversos chutes iniciais foram testados para garantir a convergência para a solução correta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de atividade residual de PME medidos após o tratamento térmico de cada amostra em suas determinadas condições podem ser vistos na Figura 1 em função da temperatura do banho quente e do tempo de imersão. Observou-se no geral uma tendência decrescente de atividade residual conforme o aumento do tempo de retenção. No entanto, nas temperaturas de 80 e 90 °C a atividade atinge um valor residual estável, o que evidencia a existência de uma fração termo-resistente da enzima, não inativada nestas temperaturas e tempos.

Pelos dados apresentados, pode-se ver que em nenhum dos casos foi obtida uma inativação completa da enzima, sendo o melhor resultado o de 13 % de atividade residual após aquecimento a 90 °C por 90 s. Observa-se que a 60 e 70 °C, a máxima redução de atividade enzimática, obtida a 90 s, não ultrapassou 60 %, enquanto foi visível uma redução mais significativa a 80 e 90 °C.

O modelo de primeira ordem não forneceu um ajuste adequado, mas foi possível ajustar o modelo cinético de inativação de primeira ordem com duas frações enzimáticas e os parâmetros obtidos para  $T_{ref} = 90$  °C foram:  $\alpha = 0,26$ ,  $D_1 = 3,48$  min,  $D_2 = 10,3$  s,  $z_1 = 7,92$  °C e  $z_2 = 18,6$  °C. Isso significa que 26% da atividade enzimática está ligada à fração termoresistente da enzima. Comparando  $D_1$  e  $D_2$  nota-se uma grande diferença entre resistências térmicas, pois para uma redução de 10% na atividade a 90 °C são necessários apenas 10,3 s para a fração termolábil e um tempo mais de dez vezes maior para a fração termoresistente. Essa discrepância pode ser notada na nítida mudança de inclinação da curva a 90 °C na Figura 1.

A Figura 2 apresenta o gráfico de paridade para a predição do modelo, indicando um ajuste adequado com os pontos espalhados ao redor da linha de 45°. A Figura 2 também ilustra a previsão de inativação enzimática pelo modelo ajustado.

Figura 1. Atividade residual média da PME após tratamento térmico

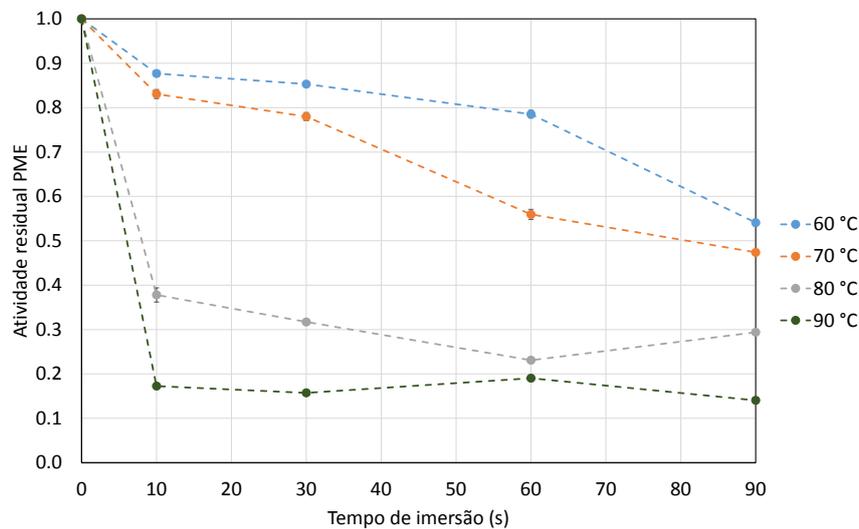
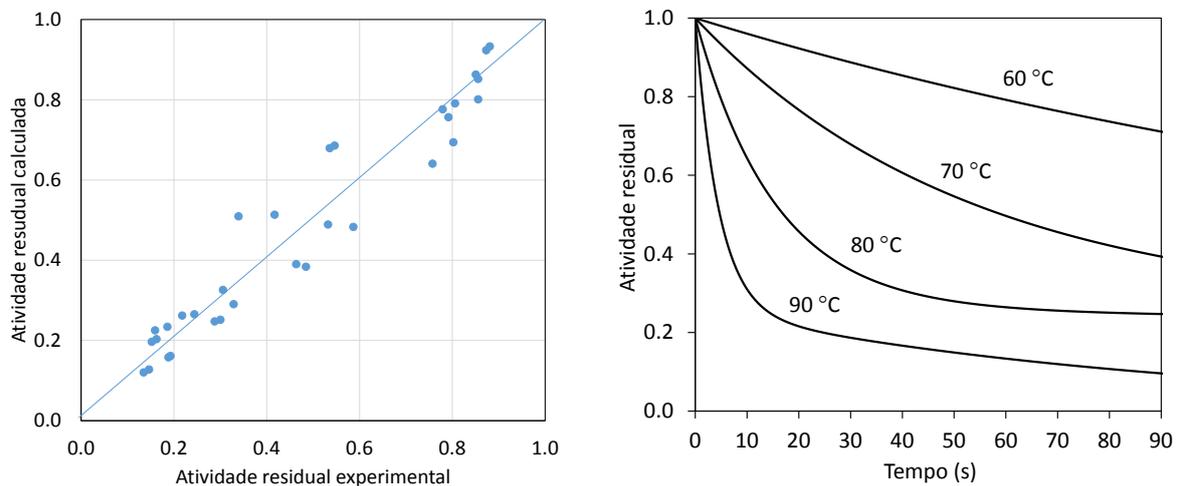


Figura 2. Gráfico de paridade e previsão de inativação pelo modelo ajustado.



#### 4. CONCLUSÕES

Foi possível ajustar o modelo cinético de inativação da PME de suco de maçã não clarificado para temperaturas entre 60 e 90 °C e os resultados indicam a presença de duas frações com resistências térmicas bastante diferentes. O modelo prevê que a 90°C uma atividade residual de 20% seria atingida após 25 s, mas para atingir 10% o tempo total deveria ser de 78 s, devido à presença da fração termoresistente da enzima. Temperaturas acima de 90

°C devem ser necessárias para ter tempos condizíveis com um processamento HTST. Testes de vida de prateleira são necessários para verificar qual a atividade residual tolerável e quais os impactos do processamento sobre atributos de qualidade para determinar uma condição ideal de processamento.

## 5. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, H. D. F.; YAMASHITA, A. S.; GUT, J. A. W. Development of enzymic time-temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. *LWT - Food Science and Technology*, v. 47, n. 1, p. 110-116, 2012.
- BENLLOCH-TINOCO, M.; IGUAL, M.; RODRIGO, D.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. Comparison of microwaves and conventional thermal treatment on enzymes activity and antioxidant capacity of kiwifruit puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 19, p. 166-172, 2013.
- FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 31, p. 263-271, 1996.
- KRAPFENBAUER, G.; KINNER, M.; GÖSSINGER, M.; SCHÖNLECHNER, R.; BERGHOFER E. Effect of thermal treatment on que quality of cloudy apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 5453-5460, 2006.
- NIU, S.; XU, Z.; FANG, Y. ; ZHANG, L. ; YANG, Y. ; LIAO, X. ; HU, X. Comparative study on cloudy apple juice qualities from apple slices treated by high pressure carbon dioxide and mild heat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 91-97, 2010.
- RENARD, C. M. G. C.; QUERÉ, J.-M.; BAUDUIN, R.; SYMONEAUX, R.; BOURVELLEC, C.; BARON, A. Modulating polyphenolic composition and organoleptic properties of apple juices by manipulating the pressing conditions. *Food Chemistry*, v. 124, p. 117-125, 2011.
- ROUSE, A. H.; ATKINS, C. D. Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. *Food Technology*, v. 6, n. 8, p. 291-294, 1952.
- TOLEDO, R. T. *Fundamentals of Food Process Engineering*. 2<sup>nd</sup> ed. New York/London: Chapman & Hall, 1991.
- WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. *Handbook of Food Enzymology*. New York: Marcel Dekker, 2003.