Efeito do campo elétrico na atividade da peroxidase e na cor do suco de melancia durante a pasteurização e armazenamento

N.P. Rodrigues^{1*}, L.A. Silva¹, L.D.F. Marczak¹

1- Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 90035-007 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-5155 – Fax: 55 (51) 3308-3277 – e-mail*: (nairapoernersa@gmail.com).

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos aquecimentos ôhmico (AO) e convencional (AC) na inativação da peroxidase (POD) e na cor do suco de melancia pasteurizado a 70, 80 e 90 °C. Independente do tipo de tratamento, a pasteurização a 90 °C apresentou melhores resultados, inativando cerca de 90% da POD em apenas 3 minutos, enquanto que o processamento a 70 °C se mostrou ineficiente na inativação da POD. No tratamento a 80 °C, não houve diferença significativa na inativação da POD entre o AC e o AO, enquanto que a 90 °C o AC mostrou-se mais efetivo. Durante o processo de pasteurização, a alteração de cor do suco ocorreu principalmente na rampa de aquecimento para as três temperaturas estudadas. Em uma segunda etapa, foi realizado o monitoramento da POD e da cor durante o armazenamento refrigerado por 14 dias do suco pasteurizado a 80 e 90 °C. A pasteurização a 90 °C causou menor alteração na qualidade do suco de melancia armazenado refrigerado. O emprego somente da tensão elétrica no aquecimento do suco forneceu um produto de semelhante qualidade ao AC, porém com um tempo de processamento menor (redução de cerca de 1/3 do tempo).

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the effect of ohmic heating (OH) and conventional heating (CH) on peroxidase (POD) inactivation and on the color of watermelon juice pasteurized at 70, 80 and 90 °C. Regardless of the treatment type, pasteurization at 90 °C showed better results, being able to inactivate 90% of the POD activity in just 3 min, while processing at 70 °C was inefficient in the POD inactivation. In the treatment at 80 °C, there was no significant difference in POD inactivation between CH and OH, whereas at 90 °C, CH was more effective. During the pasteurization process, changes in the juice color occurred mainly in the heating ramp for the three temperatures studied. In a second step, the POD and color were monitored during the cold storage for 14 days of the pasteurized juice at 80 and 90 °C. Pasteurization at 90 °C caused less change in the quality of the watermelon juice stored under refrigeration. The heating of the juice using only electric voltage provided a product of similar quality to the conventional heating, but with a shorter processing time (reduction of about 1/3 of the time).

PALAVRAS-CHAVE: campo elétrico; enzimas; processamento; qualidade

KEYWORDS: electric field; enzymes; processing; quality

1. INTRODUÇÃO

A melancia apresenta alta capacidade antioxidante relacionada aos elevados teores de ácidos fenólicos e carotenoides, especialmente o licopeno. Por conta disso e pela presença de minerais (K, Mg, Ca e Fe) e vitaminas (A, B, C e E) na fruta, o consumo de melancia apresenta grandes benefícios à saúde humana, atraindo consumidores de várias partes do mundo. Apesar dessas vantagens, o suco de melancia apresenta grandes empecilhos para o seu sucesso comercial devido à sua rápida deterioração, causada pelo seu elevado pH (em torno de 6,0) e alta atividade de água, propiciando ótimas condições para o crescimento microbiano e para a ação enzimática (Liu et al., 2012; Oberoi & Sogi, 2015). As principais enzimas presentes na melancia, e que são responsáveis pelas alterações indesejadas que ocorrem no suco ao longo do tempo, como perda de cor, viscosidade e sabor, são a peroxidase (POD) e a lipoxigenase (LOX) (Aguiló-Aguayo et al., 2010). Outros estudos apontam a presença de polifenoloxidase (PPO) como sendo importante para a degradação deste





alimento (Liu et al., 2012). Vale destacar que a melancia avaliada neste estudo, da cultivar Manchester F1, somente apresentou atividade da POD.

A POD (EC 1.11.1.7) é uma glicoproteína presente nos tecidos vegetais na forma de diversas isoenzimas, provavelmente provenientes de diferentes genes codificadores de acordo com a espécie, e que contêm como grupo prostético a ferriprotoporfirina III (Koblitz, 2015). A principal característica da POD é sua termoestabilidade associada à sua capacidade de regenerar após a desnaturação térmica. Essa capacidade, incomum entre as enzimas, é provavelmente devido à reincorporação do grupo prostético à apoenzima, após o tratamento térmico. A regeneração da atividade acontece em poucas horas em temperatura ambiente e em períodos mais longos de repouso sob refrigeração e congelamento. A atividade da POD está ligada ao surgimento de *off-flavor* em produtos vegetais, sobretudo naqueles conservados sob congelamento. Além disso, essas enzimas podem participar da alteração de cor e da redução do valor nutritivo do alimento devido à degradação de vitamina C e de aminoácidos. A atividade da POD diminui conforme o pH é reduzido na faixa de 3,0-7,0, e sua regeneração pode ocorrer com pH na faixa de 5,5-8,0 (Damodaran et al., 2010).

Os processamentos térmicos convencionais, com seus variados binômios tempo-temperatura, são os mais utilizados na indústria e apresentam ótimos resultados na inativação de enzimas e diminuição de atividade microbiana. No entanto, estes métodos causam alterações indesejadas nas propriedades dos alimentos; no suco de melancia, matéria-prima do presente trabalho, ocorre a alteração de cor e de outras propriedades organolépticas, além da perda de valor nutritivo. O aquecimento ôhmico é uma das alternativas que vêm sendo estudadas para substituir os métodos convencionais e se baseia na passagem de corrente elétrica pelo alimento, propiciando, pelo princípio do efeito Joule, um aquecimento mais homogêneo e, consequentemente, de menor duração. Desta forma, o aquecimento ôhmico se apresenta como uma possível forma de reduzir as alterações indesejadas nas propriedades nutritivas e organolépticas do suco.

Considerando o exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do tipo de aquecimento, convencional e ôhmico, na inativação da POD e na cor do suco de melancia pasteurizado a 70, 80 e 90 °C. A atividade da POD e a cor também foram monitoradas durante o armazenamento refrigerado do suco por 14 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo do suco de melancia

Quatro melancias da cultivar Manchester F1, híbrido diploide da Crimson Sweet, de aproximadamente 9 Kg cada foram adquiridas no comércio local em Porto Alegre (RS). As melancias foram lavadas com água corrente, cortadas em fatias e o suco foi processado em um *juicer* (Philips Walita, modelo RI1870, Brasil), filtrado, homogeneizado, transferido em alíquotas de aproximadamente 260 mL para embalagens de polietileno, seladas a vácuo e armazenadas protegidas da luz em freezer a -38 °C. Todo o procedimento do preparo do suco foi realizado sob proteção da luz em laboratório a temperatura ambiente. O suco de melancia apresentou pH de 5.94 ± 0.01 e teor de umidade de $90.959\% \pm 0.003$.

2.2 Processamento térmico via aquecimento ôhmico e convencional

O suco de melancia foi pasteurizado em um equipamento de aquecimento ôhmico composto por um estabilizador (Forceline, modelo EV 1000 T/2-2, Brasil) que utiliza corrente alternada numa frequência de 60 Hz, um variador de tensão (Sociedade Técnica Paulista LTDA, modelo Varivolt, Brasil), um disjuntor (Siemens, Brasil) e um sistema de aquisição de dados (Novus, modelo Field logger, Brasil). A célula ôhmica tem o formato de um béquer de 300 mL encamisado, com duas aberturas para a conexão de mangueiras com banhos termostáticos, e sua tampa possui espaços para a inserção de termopares e eletrodos, além de um furo central para a retirada de amostras. Foram utilizados dois eletrodos de titânio, que possuem formato curvado semelhante ao da célula, sendo que as distâncias máxima e mínima entre os eletrodos foram de, respectivamente, 6,7 e 5,7 cm. O uso do aquecimento ôhmico foi realizado somente na tensão de 50 V e, considerando a distância dos eletrodos, o campo elétrico aplicado variou entre 7,5 e 8,8 V/cm.

O suco descongelado foi transferido para a célula ôhmica e homogeneizado em agitador magnético. O aquecimento do suco foi obtido através da passagem de água proveniente de um banho a 98 °C até que o suco





alcançasse 2 graus abaixo da temperatura desejada do experimento. Nesse momento, a tensão elétrica era ajustada para 50 V para o tratamento com aquecimento ôhmico (AO) ou em 0 V para o tratamento convencional (AC). A temperatura do experimento foi mantida constante devido ao acoplamento de um segundo banho termostatizado através de um sistema de *by-pass*. Ensaios prévios foram realizados para acertar a temperatura do banho de forma que o perfil de temperatura do suco aquecido por AO fosse semelhante ao do AC, possibilitando a avaliação dos efeitos não-térmicos. O suco foi pasteurizado até alcançar a inativação enzimática de aproximadamente 90%. Uma alíquota de 12 mL do suco *in natura* foi coletada antes do aquecimento ser iniciado e, durante a pasteurização, novas alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo específicos para cada temperatura de pasteurização (70, 80 e 90 °C). O suco foi imediatamente refrigerado em banho de gelo. Todos os experimentos de pasteurização do suco foram realizados em duplicata.

2.3 Processamento térmico do suco e armazenamento refrigerado

Para esta etapa do estudo, o suco de melancia foi pasteurizado nas temperaturas de 80 e 90 °C e a qualidade do suco armazenado sob refrigeração por 14 dias foi avaliada através do monitoramento da atividade enzimática e da cor. Foram utilizados três diferentes tratamentos térmicos para cada temperatura: aquecimento convencional (AC); aquecimento ôhmico a 50 V (AO 50V), utilizando os banhos de aquecimento; e aquecimento ôhmico com tensão variável (AO TV), sem a utilização dos banhos térmicos. No AO TV foi aplicada uma tensão inicial alta, em torno de 120 V, a qual foi sendo reduzida gradativamente até aproximadamente 20V em ambos os experimentos, momento em que a temperatura do experimento foi atingida.

As amostras foram processadas até tempos tais que a inativação atingisse aproximadamente 90% da atividade enzimática da amostra *in natura*. Imediatamente após o tratamento térmico, o suco foi resfriado em banho de gelo até temperatura ambiente e alíquotas de 5 mL foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e armazenadas por 14 dias, protegidas da luz, em uma geladeira sob temperatura média de 1 °C. Neste suco foi determinada a atividade enzimática e a cor. A atividade residual da POD foi calculada dividindo-se a atividade do suco após o armazenamento refrigerado pela atividade do suco logo após a pasteurização (tempo zero).

2.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade da POD foi realizada utilizando-se uma adaptação do método descrito por Brochier et al. (2016). Os extratos enzimáticos foram preparados transferindo-se 3 mL do suco e 7 mL de tampão fosfato 0,05 M de pH 7,0 para um tubo Falcon de 15 mL, seguido da agitação por 30 s em vórtex (Phoenix Luferco, modelo AP 56, Brasil), centrifugação a 12000 g, por 10 min a 5 °C (SIGMA, modelo 2-16KL) e filtração a vácuo utilizando papel filtro qualitativo. A análise da atividade enzimática da POD foi determinada espectrofotometricamente através do monitoramento da formação do tetraguaiacol a 460 nm, gerado pela peroxidação do guaiacol, na presença de peróxido de hidrogênio. O meio reacional contendo 1500 μL de tampão citrato-fosfato (pH 5,0), 1000 μL de extrato enzimático, 200 μL de H₂O₂ 0,29% (conc. final de 7,7 mM) e 500 μL da solução aquosa de guaiacol 1,5% (v/v) ou 500 μL de água destilada para o branco foi preparado diretamente em cubeta de poliestireno. O sinal de absorbância a 460 nm foi monitorado em espectrofotômetro a cada 2s durante 2 min a 25 °C. O preparo do extrato enzimático foi realizado em monoplicata e o preparo do meio reacional e leitura em espectrofotômetro foram realizados em duplicata.

A atividade enzimática da POD foi determinada utilizando a inclinação da reta quando plotados os valores de absorbância e tempo em minutos e considerado somente a seção linear da curva através de regressão linear. O valor da inclinação da reta foi dividida por 0,001 resultando na UAE/min, e, após considerar o fator de diluição e a quantidade de amostra utilizada no meio reacional, os resultados foram expressos em unidade de atividade enzimática por minuto por grama de suco (UAE/min/g).

2.5 Análise de cor

A cor dos sucos foi analisada em duplicata em um colorímetro (HunterLab, modelo ColorQuest XE) no modo de refletância com especular incluída, utilizando o iluminante D65 e ângulo de observação de 10°.

2.6 Determinação dos parâmetros cinéticos





A modelagem matemática do perfil de inativação da POD foi realizada utilizando uma reação de primeira ordem de acordo com a Equação 1. O tempo de redução decimal (valor-D) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3, respectivamente:

$$\ln\left(A/A_0\right) = k \times t \tag{1}$$

$$D = \ln(10)/k \tag{2}$$

$$t_{1/2} = \ln\left(2\right)/k \tag{3}$$

sendo C a atividade da POD a cada instante de tempo (t), A_0 a atividade da POD no tempo zero e k a constante cinética de inativação. Os critérios estatísticos utilizados para validar o modelo foram o coeficiente de determinação (R^2) e o erro médio (E).

2.7 Análise estatística

Os resultados, apresentados como média ± desvio-padrão, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no Statistica[®] 8.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inativação da POD do suco de melancia foi estudada nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C utilizando perfil de aquecimento convencional e ôhmico similar para cada temperatura com o objetivo de avaliar somente os efeitos elétricos. O tempo necessário para alcançar a temperatura de pasteurização foi de 4, 6 e 11 min para as temperaturas de 70, 80 e 90 °C, respectivamente. Neste período ocorreu redução da POD de aproximadamente 28% para os experimentos a 70 e 80 °C e de 82% até alcançar a temperatura de 90 °C.

Os experimentos à mesma temperatura apresentaram um perfil semelhante de inativação enzimática, independentemente tipo de aquecimento aplicado. No tratamento a 70 °C, a inativação máxima obtida foi de aproximadamente 34% em um período de 120 min. Os processamentos a 80 °C apresentaram uma inativação intermediária com relação às outras duas temperaturas, alcançando por volta de 80% de inativação após 50 min de tratamento. Como esperado, os experimentos a 90 °C se mostraram muito mais eficientes na inativação da POD, alcançando cerca de 92% de inativação com apenas 3 min de aquecimento.

A cinética de inativação térmica da POD a 80 e 90 °C foi ajustada ao modelo de primeira ordem e os parâmetros avaliados estão apresentados na Tabela 1. A cinética de inativação a 70 °C não foi avaliada, pois não conseguimos obter pontos que representem ampla faixa de inativação. Na pasteurização a 80 °C não houve diferença significativa entre os tratamentos via AC e AO 50V, mostrando que o efeito térmico a essa temperatura é preponderante ao efeito elétrico. Em 90 °C, por sua vez, a velocidade de inativação foi significativamente maior para o AC do que para o AO. Os valores encontrados de D e $t_{1/2}$ foram maiores para os dois processamentos térmicos realizados a 80 °C, indicando a inativação mais lenta de POD a esta temperatura.

Tabela 1. Constante de velocidade (k) de inativação da peroxidase, tempo de redução decimal (D) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do suco de melancia pasteurizado via aquecimentos convencional (AC) e ôhmico (AO).

111010 (11/2) 00 5000 00 1110	iuriora pastoarrizado via aque	11110111000 00111011011011011 (120)	0 01111100 (110).
Tipo de pasteurização	k (min ⁻¹)	D (min)	t _{1/2} (min)
80 °C - AC	$0,030 \pm 0,004^{c}$	$77,44 \pm 8,58$	$23,35 \pm 2,58$
80 °C - AO 50V	$0,030 \pm 0,004^{c}$	$77,00 \pm 9,41$	$23,31 \pm 2,83$
90 °C - AC	$1,137 \pm 0,078^{a}$	$2,04 \pm 0,14$	$0,612 \pm 0,042$
90 °C - AO 50V	0.949 ± 0.006^{b}	$2,428 \pm 0,012$	0.731 ± 0.004

Os resultados correspondem a média das duplicatas \pm desvio padrão. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes (p<0,05).

A Tabela 2 apresenta os valores de diferença total de cor (ΔE) com relação ao suco *in natura* e com relação ao tempo zero (tempo em que atingiu temperatura da pasteurização) e seus níveis correspondentes de percepção humana. Todos os tratamentos apresentaram uma alteração de cor distinguível quando se calcula o ΔE com relação ao suco *in natura*, mas tiveram alteração pequena de cor quando se considera o tempo zero. Isso demonstra que a maior parte da alteração de cor do suco de melancia ocorreu durante a rampa de aquecimento para todas as temperaturas de pasteurização avaliadas.



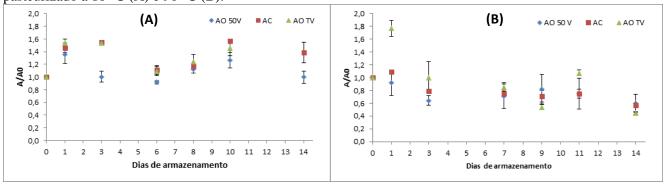


Tabela 2. Diferença total de cor (ΔE) e nível de percepção humana da cor do suco de melancia ao final de cada pasteurização com relação ao suco *in natura* e ao tempo zero.

pustourização com ren	nto Suco in natura humana hum			
Tratamento	ΔE com relação ao	Nível de percepção	ΔE com relação ao	Nível de percepção
	suco in natura	humana	tempo zero	humana
70 °C - AC	1,74	distinguível	1,01	pequena
70 °C - AO 50V	1,94	distinguível	0,86	pequena
80 °C - AC	1,50	distinguível	1,12	pequena
80 °C - AO 50V	2,12	distinguível	0,50	pequena
90 °C - AC	1,96	distinguível	0,71	pequena
90 °C - AO 50V	1,81	distinguível	0,46	pequena

Nesta segunda etapa do trabalho o principal objetivo foi avaliar se o tipo de pasteurização, convencional ou elétrica, influencia na capacidade de regeneração da POD do suco de melancia armazenado sob refrigeração. A inativação da POD obtida ao final de todos os tratamentos térmico foi de 94%. Ao longo do armazenamento refrigerado do suco pasteurizado a 80 °C ocorreu uma regeneração da POD, sendo que esta porcentagem de regeneração foi maior no suco pasteurizado convencionalmente (38%) quando comparada com o suco pasteurizado via aquecimento ôhmico sem tensão variável (0%), ao final de 14 dias de armazenamento (Figura 1A). O valor da atividade enzimática para o aquecimento ôhmico com tensão variável após 14 dias não foi incluído pois a medida da atividade somente pôde ser feita no dia seguinte e, desta forma, o resultado obtido não é inteiramente confiável. Com relação ao suco pasteurizado a 90 °C, após 14 dias de armazenamento a atividade diminui cerca de 55% e não foi observada diferença significativa na atividade de POD dos sucos pasteurizados via aquecimentos ôhmico, com e sem tensão variável, e convencional (Figura 1B).

Figura 1 - Atividade residual de peroxidase durante o armazenamento refrigerado do suco de melancia pasteurizado a 80 °C (A) e 90 °C (B).



O suco pasteurizado a 80 °C apresentou um aumento na atividade da POD durante o armazenamento enquanto que no suco pasteurizado a 90 °C a atividade enzimática apresentou tendência de redução. Esta diferença deve-se provavelmente à intensidade do tratamento térmico, sendo que em temperaturas maiores como 90 °C pode ter ocorrido a desnaturação irreversível da enzima enquanto que a desnaturação provocada pelo aquecimento a 80 °C pode ter sido reversível. Portanto, a pasteurização a 80 °C se torna interessante para estudar o efeito do tipo de tratamento térmico na conformação da enzima. Neste estudo observamos que apesar de não haver diferenças na velocidade de inativação da POD do suco pasteurizado a 80 °C via aquecimentos convencional e ôhmico (Tabela 1), o mecanismo de inativação pode ser diferente já que após 14 dias de armazenamento ocorreu um aumento de 38% na atividade enzimática do suco tratado convencionalmente enquanto que no suco pasteurizado ohmicamente não houve aumento da atividade (Figura 1A).

Os sucos de melancia processados a 80 °C apresentaram uma alteração de cor facilmente distinguível entre o primeiro e último dias de armazenamento e esta mudança de cor foi semelhante a do suco *in natura* que não sofreu tratamento térmico (Tabela 3). Estes sucos ficaram mais escuros (aumento da luminosidade) e mais amarelados (aumento do parâmetro b^* e aumento do ângulo h_{ab}) (dados não apresentados). Isto provavelmente está relacionado à regeneração da POD que atuou durante o armazenamento do suco causando alteração organoléptica. Já no suco pasteurizado a 90 °C, a alteração durante o armazenamento refrigerado foi de pequena





a distinguível. Considerando que no suco de melancia não foi detectada a atividade da polifenoloxidase e da lipoxigenase, esta pequena alteração na cor pode ter sido causada por outros fatores como: enzimas produzidas por microrganismos termorresistentes ou a maior incorporação de oxigênio durante a pasteurização do suco causando a degradação dos principais pigmentos, os carotenoides.

Tabela 3. Diferença total de cor (ΔE) e correspondentes nível de percepção para cada tratamento após o armazenamento do suco de melancia pasteurizado.

Temperatura	Tratamento	ΔΕ	Nível de percepção humana
sem aquecimento	in natura	5,70	Facilmente distinguível
	AC	4,13	Facilmente distinguível
80 °C	AO 50 V	5,37	Facilmente distinguível
	AO TV	5,53	Facilmente distinguível
sem aquecimento	in natura	4,51	Facilmente distinguível
_	AC	1,17	Pequena
90 °C	AO 50 V	1,74	Distinguível
	AO TV	1,98	Distinguível

4. CONCLUSÃO

O tipo de tratamento térmico do suco de melancia via AC ou AO não influenciou na velocidade de inativação da POD nas temperaturas de 70 e 80 °C, enquanto que a 90 °C a pasteurização convencional inativou mais rapidamente a POD quando comparada com o ôhmico. Durante o processo de pasteurização, a alteração de cor do suco ocorreu principalmente na rampa de aquecimento para as três temperaturas estudadas (70, 80 e 90 °C). A pasteurização a 90 °C causou uma desnaturação irreversível na POD impedindo a sua regeneração durante o armazenamento refrigerado e consequente alteração indesejável na cor do suco de melancia, o que foi observado claramente no suco pasteurizado a 80 °C, independente do tipo de tratamento térmico aplicado. Dentre as temperaturas avaliadas, a pasteurização a 90 °C é a que teve menor alteração nas qualidades do suco de melancia armazenado sob refrigeração. Aliado a isto, o emprego somente da tensão elétrica (sem auxílio de banho termostático) no aquecimento do suco forneceu um produto de semelhante qualidade ao aquecimento convencional, porém com um tempo de processamento menor (redução de cerca de 1/3 do tempo).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2010). Color and viscosity of watermelon juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(2), 299–305.

Brochier, B., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2016). Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 396–403.

Damodaran, S., Parkin, K. L., Fennema, O. R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema* (4. ed.) Porto Alegre: Artmed.

Koblitz, M. G. B. (2015). *Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara. Liu, Y., Hu, X., Zhao, X., & Song, H. (2012). Combined effect of high pressure carbon dioxide and mild heat treatment on overall quality parameters of watermelon juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *13*, 112–119.

Oberoi, D. P. S., & Sogi, D. S. (2015). Effect of drying methods and maltodextrin concentration on pigment content of watermelon juice powder. *Journal of Food Engineering*, 165, 172–178.



