

ANDRÉIA APARECIDA JACOMASSI CARNEIRO

**APLICAÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase) E DE
CICLODEXTRINAS COMO COADJUVANTE NA INIBIÇÃO DO ESCURECIMENTO
EM ALIMENTOS**

**APLICAÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase) E DE
CICLODEXTRINAS COMO COADJUVANTE NA INIBIÇÃO DO ESCURECIMENTO
EM ALIMENTOS**

ANDRÉIA APARECIDA JACOMASSI CARNEIRO

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, como requisito para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos (Área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos)**.

São José do Rio Preto, SP

Julho/2006

UNESP-UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS (ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS)

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado “Aplicação de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) e de ciclodextrinas como coadjuvante na inibição do escurecimento em alimentos” apresentada por Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro perante a banca examinadora em 28 de julho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto da Silva
Universidade Estadual Paulista-Campus de São José do Rio Preto-SP
(Orientador)

Profa. Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres
Faculdade de Engenharia Química de Lorena-SP
(Titular)

Profa. Dra. Heloiza Ferreira Alves do Prado
Universidade Estadual Paulista-Campus de São José do Rio Preto-SP
(Titular)

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.
Universidade de São Paulo-USP
(Suplente)

Prof. Dr. José Antônio Vieira
Universidade Estadual Paulista-Campus de São José do Rio Preto-SP
(Suplente)

***“Tenha dinamismo em sua vida!
Não fique aí parado, de braços cruzados
Não são as idéias bonitas que valem
São as ações práticas!
Os pés que não caminham criam raízes”.***

Carlos Torres Pastorino

***Aos meus pais, José e Leonice, meus irmãos, Vani, Valdecir e Adriana, pelo
amor, carinho, amizade, compreensão e apoio...***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pela oportunidade, compreensão, amizade e dedicação na orientação desse trabalho.

A CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pela amizade, dedicação e incentivo.

À Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco, pelo auxílio e por ceder o equipamento necessário para a análise de DSC (Differential scanning calorimetry), parte essencial desse trabalho.

Às minhas amigas do Laboratório de Cereais, Thaís e Patrícia e do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Maria Luiza, pela amizade e auxílio.

À Profa. Dra. Eleni Gomes e aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada, Alexandre, Aline, Ana Paula de Aguiar, Ana Paula, Carol, Dênis, Eduardo, Ellen, Érica, Dênis, Fabiana, Gisele, Hamilton, Heloiza, Luis Gustavo, Marcelo, Maira, Natália, Patrícia, Paula, Roberto, Rodolfo, Rodrigo e Rosângela, pela amizade e auxílio.

E a todos que em algum momento contribuíram, direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma enzima microbiana que converte o amido em ciclodextrinas (CDs). Estes compostos são moléculas cíclicas, formadas por monômeros de D-glicoses unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. As CDs podem ser uma alternativa para controlar o escurecimento de batatas e frutas devido a sua capacidade de formar complexo de inclusão com substratos da reação de escurecimento. Alimentos contendo amido, quando adicionados da CGTase são também, potencialmente capazes de sofrer a ação da enzima formando CD localmente. Esse trabalho teve por finalidade estudar a aplicação direta da enzima CGTase em batatas e a aplicação de ciclodextrina comercial em batatas, maçãs, bananas e pêras visando controlar as reações de escurecimento enzimático ou não enzimático, destes alimentos. A formação de complexos com ciclodextrina foi determinada por calorimetria diferencial de varredura (DSC). Este trabalho mostrou pela primeira vez que tanto a CGTase produzida por *Bacillus clausii* E16 quanto a CGTase comercial (Toruzyme®, Novozymes), foram capazes de controlar o escurecimento químico de batata e enzimático de batata e maçã. A utilização da CD mostrou efeito similar a ação das CGTases para batata e maçã, reduzindo dessa forma o escurecimento enzimático causado pela enzima polifenoloxidase. Pode-se inferir que ocorreu a produção da CD pela ação da CGTase em presença do substrato natural (amido de batata e maçã) e por consequência sua ação complexante junto aos agentes responsáveis pelo escurecimento, inibindo assim a efetivação das reações. Essa possível encapsulação foi demonstrada pela análise de DSC referente à diminuição do pico da amostra de batata tratada com CGTase.

ABSTRACT

The cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) is a microbial enzyme that converts starch to cyclodextrins (CDs). These compounds are cyclical molecules, formed by D-glucose monomers linked by α -1,4-glycosidic linkages type. The CDs can be an alternative to control the potato and fruits browning due its capacity to form complexes of inclusion with substrate of the browning reaction. Foods containing starch, when added of the CGTase are also potentially able to the action from the enzyme, then forming CD. This work had the purpose to study the direct application of the CGTase enzyme in potatoes and the commercial cyclodextrin application in potatoes, apples, bananas and pears aiming to control the browning enzymatic or no enzymatic reactions of these foods. The cyclodextrin complexes formation was determined by differential scanning calorimetry (DSC). This work showed for the first time that as the CGTase produced for *Bacillus clausii* E16 as the commercial CGTase (Toruzyme®, Novozymes), were capable to control the chemical browning of potato and enzymatic browning of potato and apple. The use of the CD showed to similar effect to the action of CGTases for potato and apple, reducing in both the enzymatic browning caused by polyphenoloxidase enzyme. It can be concluded that the production of CD occurred by CGTase action in presence of the natural substrate (starch of potato and apple) and for consequence it's action to form complexes next to the responsible agents for the browning, thus inhibiting effectively the reactions. This possible encapsulation was demonstrated by analysis of DSC referring to the reduction of the peak of the potato sample treated with CGTase.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em três capítulos, os quais serão submetidos à publicação.

Um resumo e uma introdução geral foram introduzidos para mostrar ao leitor a importância do trabalho científico.

O primeiro capítulo consta de uma revisão bibliográfica destacando a produção, estrutura e função da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), responsável pela formação de moléculas cíclicas, as ciclodextrinas (CDs), a partir da hidrólise do amido. Este capítulo também apresenta as reações de escurecimento, destacando-se a reação de escurecimento enzimático e não enzimático, envolvendo suas estruturas, a importância dessas reações e seus inibidores, assim como a atuação da ciclodextrina nas reações de escurecimento enzimático.

O segundo capítulo consta de estudos relacionados à produção, purificação parcial e aplicação da CGTase nas reações de escurecimento enzimático e não enzimático de batatas, assim como a ação da ciclodextrina no escurecimento enzimático desse tubérculo.

O terceiro capítulo consta de estudos relacionados à aplicação da CGTase e CDs no escurecimento enzimático de maçã, banana e pêra. A seguir foi apresentada uma conclusão geral do trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura I.1 - Fórmulas estruturais do amido: a) amilose e b) amilopectina	4
Figura I.2 - A ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.....	5
Figura I.3 - Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase	6
Figura I.4 - Estrutura da α -CD, β -CD e γ -CD com seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente	9
Figura I.5 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina	10
Figura I.6 - Esquema do escurecimento enzimático da PPO	14
Figura I.7 - Reação de Maillard	16
Figura I.8 - Possíveis caminhos de formação da acrilamida	18

Capítulo 2

Figura II.1- Perfil de eluição da CGTase de <i>Bacillus clausii</i> E16 em gel filtração.	46
Figura II.2 - Ação da CGTase produzida por <i>B. clausii</i> E16 e da CGTase Toruzyme® no escurecimento não enzimático de batata	48
Figura II.3 - Ação das enzimas E16 e Toruzyme® no escurecimento enzimático de batata.....	49
Figura II.4 - Ação da ciclodextrina no escurecimento enzimático de batata	49
Figura II.5 - Ação da β -ciclodextrina com o extrato enzimático de batata.....	50
Figura II.6 - Ação da β -ciclodextrina na atividade da PPO	51
Figura II.7 - Ação da β -ciclodextrina em combinação com o ácido ascórbico no extrato enzimático de batata	53
Figura II.8 - Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico na atividade da PPO	54
Figura II.9 - O efeito das enzimas com o substrato natural de batata	54
Figura II.10 - Efeito das enzimas E16 e Toruzyme® na velocidade da reação de Maillard	55

Figura II.11 - Efeito da β -ciclodextrina na reação de Maillard em presença de glicose e glicina e de arabinose e glicina ao longo do tempo.....	56
Figura II.12 - Efeito da β -ciclodextrina na reação de Maillard em presença de glicose e valina e de arabinose e valina ao longo do tempo	57
Figura II.13 - Efeito da β -ciclodextrina na reação de Maillard em presença de arabinose e prolina; arabinose e fenilalanina ; arabinose e ácido aspártico; arabinose e triptofano ao longo do tempo	58
Figura II.14 - Ação da β -ciclodextrina com o aminoácido tirosina.....	59
Figura II.15 - Curvas de DSC para β -ciclodextrina, somente batata e batata tratada com CGTase comercial.....	61

Capítulo 3

Figura III.1 - Ação da CGTase produzida por <i>B. clausii</i> E16 e da CGTase comercial Toruzyme® no escurecimento enzimático de maçã, banana e pêra	74
Figura III.2 - Ação da ciclodextrina no escurecimento enzimático em maçã, banana e pêra	76
Figura III.3 - Atividade da polifenoloxidase (a) e da peroxidase (b)	77
Figura III.4 - Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico no extrato enzimático de pêra	79

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1 - Síntese das 6 diferentes misturas da reação de Maillard	44
Tabela II 2 - Síntese do processo de purificação parcial da CGTase produzida por <i>Bacillus clausii</i> E16	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AA= ácido ascórbico
AAP= ácido ascórbico-2-fosfato
AP= ascorbil palmitato
CD (s)= ciclodextrina (s)
CGTase= ciclodextrina glicosiltransferase
CINN= cinamato de sódio
Dimaltosil- β -CDs= dimaltosil- β -ciclodextrinas
DSC= calorimetria diferencial de varredura
EDTA= ácido etilenoaminoacético
FDA= Food and Drugs administration
GRAS= Gernerally recognized as safe
Hidroxietil- β -CDs= hidroxietil- β -ciclodextrinas
HP- β -CDs= hidroxipropil- β -ciclodextrinas
Maltosil- β -CDs= maltosil- β -ciclodextrinas
MJ= metil jasmonato
PA= ácido fosfórico
POD= peroxidase
PPO= polifenoloxidase
PMC= pentametilcromo-6-ol
REE= reação de escurecimento enzimático
RENE= reação de escurecimento não enzimático
RM= reação de Maillard
SAPP= ácido pirofosfato de sódio
SHMP= ácido hexametafosfato de sódio
TA= tecnologia de alimentos
TBC= tert-butilcatecol
TBC-CDs= tert-butilcatecol-ciclodextrinas

LISTA DE SÍMBOLOS

α -CD= α -ciclodextrina

β -CD= β -ciclodextrina

γ -CD= γ -ciclodextrina

2-hidroxipropil- β -CDs= 2-hidroxipropil- β -ciclodextrinas

SÚMARIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
APRESENTAÇÃO	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
 INTRODUÇÃO	 1
CAPÍTULO I-Revisão da literatura.....	3
I.1.1. Estrutura do amido	3
I.1.2. CGTase	4
I.1.3. Ciclodextrina	7
I.1.4. Formação do complexo de inclusão	9
I.1.5. Aplicações das ciclodextrinas em alimentos.....	11
I.1.6. Reações de escurecimento	13
I.1.6.1. Reação de escurecimento enzimático	13
I.1.6.2. Reação de Maillard	15
I.1.6.2.1. Formação de acrilamida.....	17
I.1.7. Processamento de alimentos.....	18
I.1.7.1. Corte	18
I.1.7.2. Fritura, desidratação e secagem.....	18
I.1.8. Inibidores das reações de escurecimento	19
 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 25
 CAPÍTULO II-Aplicação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) como inibidor do escurecimento em batatas	 36
Resumo	37
Abstract	38
II.1.INTRODUÇÃO	38

II.2. MATERIAL E MÉTODOS	40
II.2.1. Microrganismo e enzima	40
II.2.2. Produção e purificação da CGTase	40
II.2.3. Batatas	41
II.2.4. Métodos de determinação da atividade enzimática	41
II.2.4.1. Método fenoltaleína	41
II.2.4.2. Atividade da polifenoloxidase (PPO)	41
II.2.5. Determinação de proteína	42
II.2.6. Aplicação da CGTase nos ensaios de escurecimento da batata	42
II.2.6.1. Escurecimento não enzimático	42
II.2.6.2. Escurecimento enzimático	42
II.2.7. Aplicação da CD nos ensaios de escurecimento enzimático da batata	42
II.2.7.1. Batata fatiada	42
II.2.7.2. Efeito da β -ciclodextrina no escurecimento do extrato de batata	43
II.2.7.3. Efeito da β -ciclodextrina sobre a atividade da PPO	43
II.2.7.4. Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico no escurecimento do extrato de batatas e sobre a atividade da PPO	43
II.2.7.5. Teste qualitativo da presença de ciclodextrina em batatas	44
II.2.7.6. Efeito da CGTase na reação de Maillard a partir de aminoácidos	44
II.2.7.7. Efeito da ciclodextrina na reação de Maillard a partir de aminoácidos	45
II.2.7.8. Efeito da ciclodextrina com o aminoácido tirosina	45
II.2.7.9. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	45
II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
II.3.1. Purificação parcial da enzima	46
II.3.2. Efeito da CGTase no escurecimento de batata	47
a) Escurecimento não enzimático	47
b) Escurecimento enzimático	48
II.3.3. Aplicação da CD nos ensaios de escurecimento enzimático de batata	49

II.3.3.1. Batata fatiada.....	49
II.3.3.2. Efeito da β -ciclodextrina no escurecimento do extrato de batata	50
II.3.3.3. Efeito da β -ciclodextrina na atividade da PPO	50
II.3.3.4. Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico no escurecimento do extrato de batatas e sobre a atividade da PPO	52
II.3.4. Teste qualitativo da presença de ciclodextrina em batatas	54
II.3.5. Efeito da CGTase na reação de Maillard a partir de aminoácidos.....	55
II.3.6. Efeito da ciclodextrina na reação de Maillard a partir de aminoácidos ..	56
II.3.7. Efeito da ciclodextrina com o aminoácido tirosina	59
II.3.8. Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	60
II.4. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO III- Efeito da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) e ciclodextrina (CD) como inibidor do escurecimento enzimático em maçã, banana e pêra.....	
Resumo	69
III.1.INTRODUÇÃO.....	70
III.2. MATERIAL E MÉTODOS	71
III.2.1. Microrganismo e enzima.....	71
III.2.2. Seleção de frutas.....	71
III.2.3. Escurecimento enzimático de frutas	71
III.2.3.1. Efeito da CGTase	71
III.2.3.2. Efeito da CD.....	71
III.2.4. Extração da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POP) de polpas de maçã, banana e pêra	72
III.2.5. Determinação da atividade enzimática	72
III.2.5.1. Atividade da polifenoloxidase	72
III.2.5.2. Atividade da peroxidase	72
III.2.6. Efeito da β -ciclodextrina em combinação com o ácido ascórbico.....	73

III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
III.3.1. Efeito da CGTase no escurecimento enzimático de maçã, banana e pêra	73
III.3.2. Efeito da ciclodextrina no escurecimento enzimático de maçã, banana e pêra	75
III.3.3. Atividade da polifenoloxidase e da peroxidase	77
III.3.4. Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico em extrato enzimático de pêra	78
III.4. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CONCLUSÃO GERAL.....	83

INTRODUÇÃO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima microbiana que converte o amido em ciclodextrinas por meio da reação de ciclização (BENDER, 1986; TONKOVA, 1998).

As ciclodextrinas (CDs) são maltooligossacarídeos cíclicos não-redutores com 6 a 13 unidades de glicose (BENDER, 1986; LARSEN et al., 1998) ligadas entre si, por ligações glicosídicas α -1,4. As CDs mais comuns são do tipo α -, β - e γ -, constituídas de seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente. Suas cavidades internas são hidrofóbicas, mas externamente são hidrofílicas. Formam complexos de inclusão com uma variedade de substâncias, mudando as suas características físicas e químicas. Essa propriedade da CD tem levado a um aumento na sua aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, produtos agroquímicos, plásticos e outras (ALLEGRE; DERATANI, 1994; ALVES-PRADO; GOMES; DA SILVA, 2002; BENDER, 1986; PSZCZOLA, 1988; SHUKLA, 1991; SZEJTLI, 1982, 1985, 1997).

A ciclodextrina foi recentemente estudada como uma alternativa para inibir o escurecimento de alimentos (SOJO et al. 1999). Os principais grupos de reações de escurecimento são conhecidos como reação de escurecimento enzimático (REE) da polifenoloxidase (PPO) e reação de escurecimento não enzimático (RENE), causado pela reação de Maillard (RM). Outros mecanismos que também levam a escurecimento, tais como oxidação da vitamina C, ação de peroxidases e caramelização (BOBBIO; BOBBIO, 2001) não serão abordados nesse estudo.

A principal via de escurecimento enzimático inicia-se com a oxidação de fenóis endógenos por ação da enzima PPO na presença de oxigênio formando o-quinonas e a subsequente polimerização destas, formando pigmentos escuros denominados melaninas (ÖZOĞLU; BAYMDIRH, 2002).

A mais importante via de escurecimento não enzimático dos alimentos é conduzida por meio da reação de Maillard, nesta os grupos aminos de aminoácidos e proteínas e açúcares redutores reagem formando pigmentos escuros conhecidos como melanoidinas. Recentemente relatou-se a produção de acrilamida em batatas fritas e assadas, esse composto foi classificado como provável carcinógeno em humanos, causando uma preocupação mundial (FISELIER; GROB; PFEFFERLE, 2004).

O método mais comum para controlar o escurecimento enzimático e não enzimático é o uso de sulfito em alguma de suas formas (dióxido de enxofre, metabissulfito de sódio ou potássio e bissulfito de sódio ou potássio) (SAPERS, 1993). No entanto, o sucesso para prevenir o escurecimento de frutas e vegetais é ainda um desafio depois da proibição do uso do sulfito e derivados nos E.U.A pelo FDA em 1986, por causa dos efeitos adversos à saúde humana. É evidente que isto terá efeito mesmo no Brasil onde ainda se utiliza o bissulfito, considerando as restrições impostas a produtos importados pelos E.U.A que tenham na sua composição o uso desta substância química.

Recente mudança no estilo de vida tem levado a uma demanda maior pelos alimentos naturais e seguros e a uma menor adição química nos alimentos processados. Devido a esta restrição tem sido renovado o interesse pela pesquisa por agentes naturais antiescurecimento. Com isso as ciclodextrinas naturais podem ser uma alternativa. A sua cavidade hidrofóbica é capaz de formar complexos de inclusão com uma ampla classe de moléculas orgânicas, incluindo os compostos fenólicos (CAI et al., 1990).

Este trabalho teve por finalidade a abordagem de dois aspectos da utilização das CDs em tecnologia de alimentos: a) Estudar a aplicação da enzima CGTase diretamente em batatas, visando controlar o escurecimento enzimático e não enzimático, como também aplica-la em maçã, banana e pêra propondo controlar o escurecimento enzimático. b) Estudar o uso da CD diretamente na inibição do escurecimento enzimático de batata, maçã, banana e pêra.

CAPÍTULO I

I.1. REVISÃO DA LITERATURA

I.1.1. Estrutura do Amido

O amido é o substrato da CGTase para a formação de CD. Ele é um polímero relativamente simples composto de moléculas de glicose de alto peso molecular. Encontra-se na forma de substância de reserva em plantas, incluindo sementes, frutas, tubérculos e raízes. Ele é formado basicamente por amilose e amilopectina. A amilose é uma molécula essencialmente linear, constituída de unidades de glicose (α -D-glicopiranosil) unidas entre si por ligações α -1,4 (Figura 1a). A amilopectina é formada de centenas de cadeias curtas de α -1,4-glucanas, que são interligadas por aproximadamente 5% de ligações α -1,6, formando uma estrutura altamente ramificada (Figura 1b) (JOBILING, 2004).

O amido é um dos polissacarídeos de grande importância para a indústria alimentícia, devido as suas características funcionais e qualidade nutricional. Assim, têm uma grande aplicação seja diretamente como alimento ou como texturizante, estabilizante, ligante, gelatinizante, dentre outras aplicações nas formulações alimentares (WHISTER; BEMILLER, 1997). A degradação total do amido se dá principalmente, pela ação combinada de enzimas amilolíticas, as quais atuam na hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6, especificamente. Exemplos dessas enzimas estão ilustradas na Figura 2.

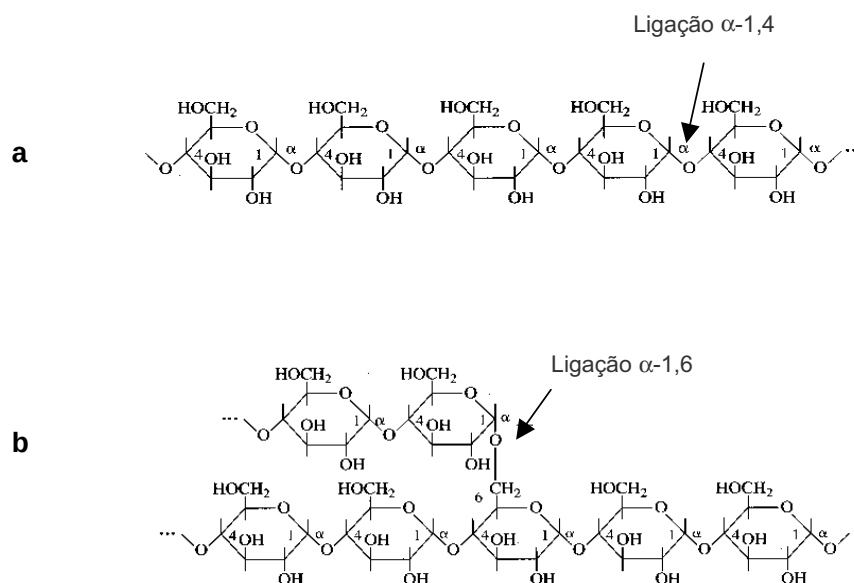


Figura 1- Fórmulas estruturais do amido: a) amilose e b) amilopectina. **Fonte:** JOBLING, 2004, com modificações.

I.1.2. CGTase

A utilização de enzimas amilolíticas tem aumentado abundantemente, entre essas enzimas, a CGTase vem ganhando grande importância industrial. Elas têm a capacidade de modificar o amido, catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas e a subsequente reação de transglicosilação intramolecular ou a ciclização dos oligossacarídeos (Figura 3A), formando moléculas cíclicas, compostas de ligações glicosídicas do tipo α -1,4, denominadas de ciclodextrinas (CDs) (VAN DER VEEN et al., 2000).

A CGTase também catalisa outros dois tipos de reações, descritas a seguir. A reação de acoplamento (Figura 3B) é reversa a ciclização, onde o anel de CD é clivado e transferido para um substrato receptor linear. A reação de desproporcionamento (Figura 3C) é uma reação de transferase propriamente dita, onde um maltooligossacarídeo é clivado e transferido para um substrato receptor linear. A enzima apresenta ainda, uma fraca atividade hidrolítica em presença de amido (Figura 3D), maltooligossacarídeos ou CDs (ABELYAN et al., 1995; ALVES-PRADO; GOMES; DA SILVA, 2002; BENDER, 1986; BOVETTO et al., 1992; TONKOVA, 1998; UITDEHAAG et al., 1999; VAN DER VEEN et al., 2000; WIND et al., 1995).

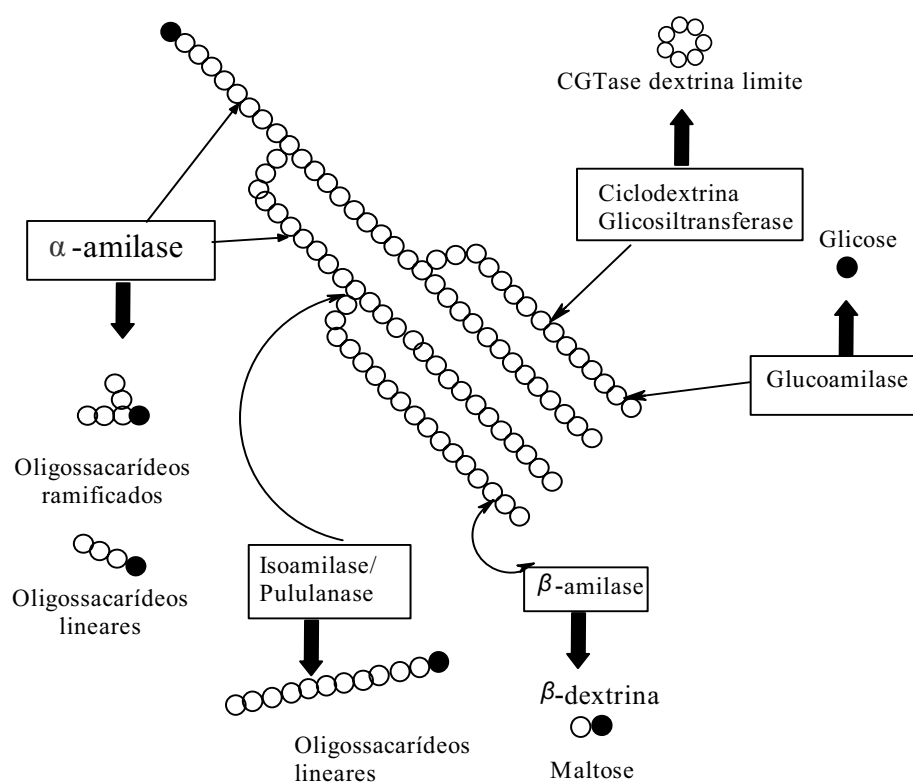


Figura 2 - A ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) Molécula de glicose com extremidade redutora; (○) Molécula de glicose sem a extremidade redutora. As setas indicam a preferência pela quebra na molécula de amido. (Reproduzido por WIND, 1997, com modificações).

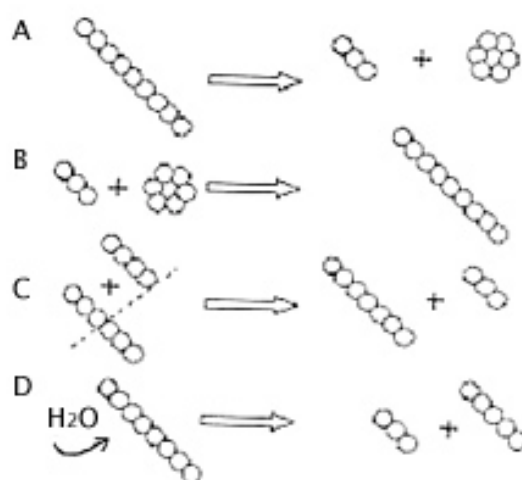


Figura 3 - Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase. A) ciclização, B) acoplamento, C) desproporcionação e D) hidrólise. Cada círculo representa uma unidade de glicose. **Fonte:** VAN DER VEEN et al., 2000.

A produção de CGTase foi inicialmente estudada em fermentação em estado sólido. Posteriormente, Kitahata et al. (1974) e Nakamura e Horikoshi (1976a,b) propuseram meios líquidos, composto de amido solúvel e caldo de maceração de milho, além de extrato de levedura, peptona e sais. Para os microrganismos alcalofílicos produtores de CGTases, a presença de sais carbonato como o Na_2CO_3 no meio é essencial. Apesar dos resultados significativos da produção de CGTase em meio sólido, deve-se considerar que a fermentação submersa é a melhor escolha principalmente devido às vantagens operacionais. Parâmetros como aeração, agitação, temperatura e pH podem ser precisamente controlados e um nível maior de esterilidade pode ser mantido.

A CGTase é produzida por uma variedade de bactérias, sendo detectada predominantemente em *Bacillus* spp (ALVES-PRADO, 2005; SIAN et al., 2005; MARTINS; HATTI-KAUL, 2002). (Outros gêneros foram caracterizados como produtores da mesma, entre eles o *Micrococcus* sp ATCC 31606 (STARNES, 1990), *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians* (ABELYAN et al., 1995), *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (BENDER, 1977; VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989), *Klebsiella oxytoca* 19-1 (LEE et al., 1992), *Brevibacterium* sp n° 9605 (MORI et al., 1994, 1995).

Na literatura foram propostas numerosas opções para a produção de CDs, a partir do amido e os seus processos de purificação foram aprimorando-se

(PSZCZOLA, 1988). Em 1969, a Corn Products International Co. produziu β -CD usando a CGTase de *Bacillus macerans*. A Teijin Ltd., no Japão, também produziu β -CD, usando a mesma enzima em uma planta piloto, mas sérios problemas foram encontrados em ambos os processos. A CGTase produzida por *Bacillus macerans* não foi adequada para a aplicação industrial, por não ser suficientemente termoestável. Deste modo, os rendimentos da produção de CD foram baixos, 20 a 30% em escala industrial, a partir do amido (HORIKOSHI, 1996). No mesmo ano, Horikoshi iniciou, num instituto do governo japonês, um estudo para a produção de CD, utilizando a CGTase do *Bacillus* sp alcalofílico. Em 1977, uma empresa japonesa iniciou a produção de CD em escala industrial, sob a denominação de Celdex, utilizando o método proposto por Horikoshi com a CGTase do *Bacillus* sp alcalofílico.

O amido de mandioca foi considerado um dos melhores substratos para produção de CD comparado com o de milho e arroz, a partir da CGTase de *Bacillus* alcalofílico sp. G1 (SIAN et al., 2005).

I.1.3. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas foram descobertas por Villiers em 1891, citado por Martin del Valle, 2004. Pela utilização de técnicas bacteriológicas rudimentares e, provavelmente usando cultura impura, obteve uma pequena quantidade de um material cristalino, a partir da hidrólise do amido por *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*), o qual denominou de “celulosina”, por visualizar semelhanças com a celulose. Posteriormente, Schardinger em 1903, citado por Martin del Valle, 2004, isolou dois produtos cristalinos, chamados de dextrina A e B sendo que essas não apresentavam ação redutora. A bactéria capaz de produzir esses produtos a partir do amido não foi conservada, dessa forma, em 1904 ele isolou a linhagem de *Bacillus macerans*, que, quando cultivada na presença de amido, produzia grandes quantidades das dextrinas cristalinas (25 a 30%), as quais ele denominou de α e β . Em 1942 as estruturas α e β -ciclodextrinas foram determinadas por cristalografia de raio-x (BUSCHMANN; SCHOLLMEYER, 2002). Somente em 1948 foi reconhecido que a ciclodextrina podia formar complexo de inclusão (HIROSE; YAMAMOTO; HINOKITOL, 2001).

As CDs são aprovadas para uso na indústria alimentícia em vários países como Bélgica, França, Alemanha, Japão, Holanda, Espanha, África do Sul, Coreia do Sul e Hungria. Nos E.U.A é reconhecida como segura pelo Generally recognized as

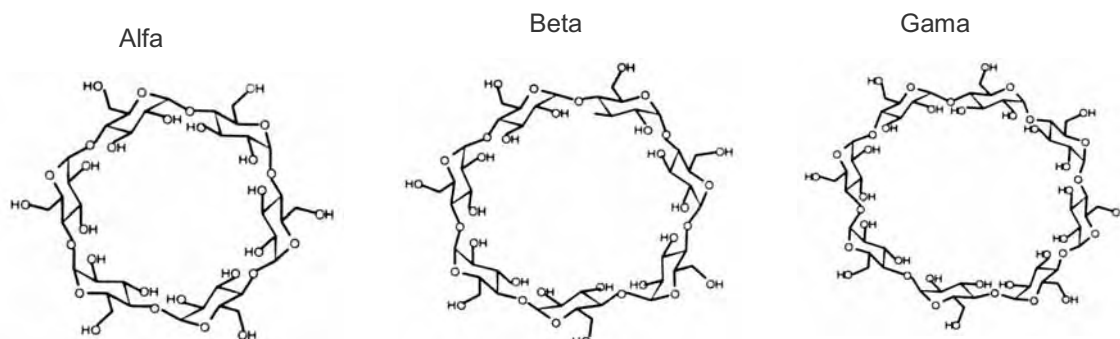
safe (GRAS) e é utilizada como transportador de sabores em gelatinas, pudins, café, chá e cereal matinal (CYCLOLAB, 2002). As CDs passaram a ser utilizadas no Japão a partir dos anos 80 quando iniciou sua produção com propósitos comerciais. O uso de CD tem aumentado significativamente ano após ano, e o Japão é o maior consumidor do mundo. Aproximadamente 78,8% e 11,5% das CDs são consumidas pela indústria de alimentos e cosméticos, respectivamente. Cerca de 3,2% da produção de CDs são usadas na indústria química sendo 4,6% destinada à indústria farmacêutica e produtos agroquímicos (HASHIMOTO, 2002).

Atualmente os principais campos de aplicação das CDs, em escala industrial, são a encapsulação de substâncias do sabor e aroma e a extração do colesterol de leite e gemas de ovos, mas outras aplicações na indústria alimentícia são também realizadas. A β -CD é a mais utilizada nos processos industriais cujo preço médio é de US\$ 5-6/Kg (SZENTE; SZEJTLI, 2004). Outras CDs, ou derivados da mesma, são pouco usados devido ao alto custo (ALLEGRE; DERATANI, 1994; SMITH et al., 1995; SZEJTLI, 1997).

O uso de enzimas em processos industriais tem sido amplamente discutido e cerca de 2500 reações diferentes, catalisadas por enzimas estão listadas no International Union Handbook of Enzyme Nomenclature. Estima-se que 80% das enzimas sejam produzidas por fermentação e muitas destas adicionadas em detergentes ou utilizadas no processamento de amido e produtos lácteos (AGUIAR, 2001).

As estruturas químicas da α -, β - e γ -CD são apresentadas na Figura 4a. A forma circular da CD é devido à conformação do carbono C1 da unidade de glicose e suas ligações glicosídicas. Sua forma ovalada, semelhante a um cone truncado, tem um lado com diâmetro maior que é formado pelos grupos hidroxilas secundários (nos átomos de C2 e C3) e um lado com diâmetro menor, onde estão situadas as hidroxilas primárias (nos átomos de C6), tornando a CD hidrofílica externamente (Figura 4b) (PURDY, 1992).

A



B

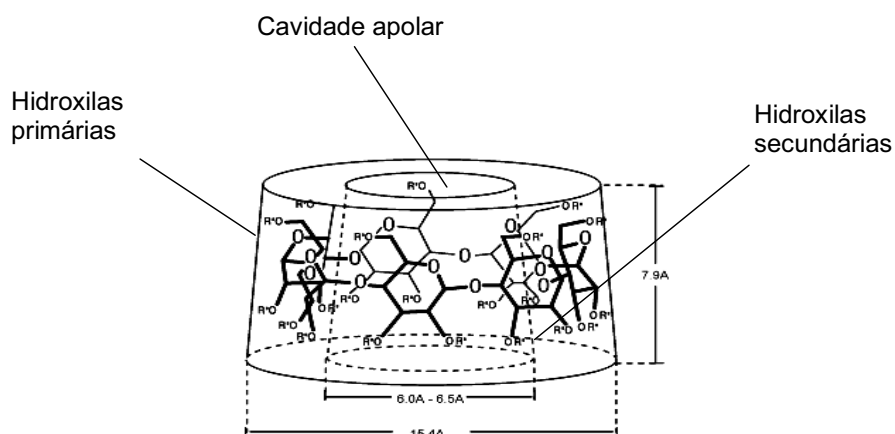


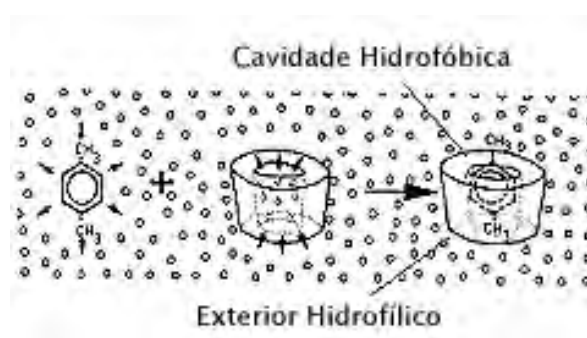
Figura 4 - Estrutura da α -CD, β -CD e γ -CD com seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente. **Fonte:** A) ALVES-PRADO et al., 2002. B) Fonte modificada, figura original disponível no site www.cyclodex.com/images/figure2.gif.

I.1.4. Formação do complexo de inclusão

A cavidade da ciclodextrina é um espaço apolar, sendo este ocupado pela molécula hospedeira (HEDGES, 1998). Os complexos podem ser formados em qualquer solução sendo a água o principal solvente de escolha. Em solução aquosa, a cavidade fracamente apolar da CD é ocupada por moléculas de água que podem ser substituídas por "moléculas hospedes" como o xileno que são menos polares que

a água (Figura 5A) (SZEJTLI, 1998). Outro exemplo de complexação é o que ocorre entre o *p*-clorofenol e a ciclodextrina, conforme Figura 5B, onde os átomos de oxigênio e hidrogênio glicosídicos localizados no interior da molécula interagem com os átomos do *p*-clorofenol para formar o complexo de inclusão (CASTILLO; BOYD, 2005).

A

 α -CD

B

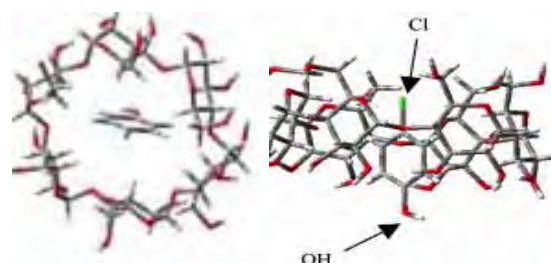


Figura 5 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina. A) A molécula hospedeira é o *p*-Xileno e os círculos menores representam as moléculas de água. **Fonte modificada:** SZEJTLI, 1998. B) O *p*-clorofenol no interior da α -ciclodextrina, vista frontal e lateral. **Fonte modificada:** CASTILLO; BOYD, 2005.

As ligações envolvidas na formação dos complexos são forças de van der Waals, interações dipolo-dipolo e/ou pontes de hidrogênio. Essas ligações são fortes o suficiente para impedir a separação do complexo mesmo em estado sólido e fracas o suficiente para permitir a liberação da molécula encapsulada, quando necessário (HEDGES; McBRIDE, 1999).

O complexo de inclusão exerce um efeito intenso nas propriedades físico-químicas da molécula hospedeira, dentre essas propriedades encontram-se: o aumento da solubilidade da molécula hospedeira, a estabilização da molécula hospedeira lábil contra os efeitos de degradação pela oxidação, o controle da volatilidade e sublimação e as separações cromatográficas (SCHMID, 1989).

A encapsulação pode ser analisada por Calorimetria diferencial de varredura (DSC). A molécula hospedeira deverá ter ponto de fusão menor que 300°C, visto que é a temperatura que a CD se decompõe. Quando a molécula hospedeira é encapsulada pela CD não ocorre absorção de energia, no entanto, observa-se um aumento na temperatura de fusão, de aproximadamente 10°C (HEDGES, 1998).

1.1.5. Aplicações das ciclodextrinas em alimentos

As ciclodextrinas são usadas na indústria alimentícia para proteção dos princípios ativos contra o oxigênio, luz, calor e volatilidade, para reduzir odores e sabores indesejáveis e para acelerar e estabilizar o processo de emulsão.

As ciclodextrinas formam complexos de inclusão com uma variedade de moléculas incluindo lipídios e componentes do sabor e aroma, assim são usadas na remoção do colesterol de produtos como o leite, a manteiga e os ovos. Emulsões como a maionese, a margarina ou a manteiga podem ser estabilizadas com a α -CD (SZEJTLI, 1998; HEDGES, 1998). Chin; Tsain (1995) removeram o colesterol da mistura água-toucinho com β -ciclodextrina, onde verificaram que cerca de 90% do colesterol foi removido utilizando 5% de β -CD.

Ácidos graxos livres podem ser removidos de gorduras usando CDs, estas melhoram as propriedades de fritura, reduz a formação de fumaça, de espuma, de escurecimento e depósito de óleos residuais na sua superfície (MUÑOZ-BOTELLA; DEL CASTILLO; MARTYN, 1995).

O ketchup de tomate pode ser estabilizado pela adição de 0,2% de β -CD, este não perde a cor com o aquecimento a 100°C por 2 horas, o mesmo não ocorre com o controle (KAWASHIMA, 1980). A adição de CD no queijo pode aumentar a retenção de água e a vida de prateleira. Em produtos de carne processada a CD melhorou a retenção de água e a textura (OTA; TAKEDA, 1981).

A complexação das CDs com agentes adoçantes como o aspartame estabiliza e melhora o seu sabor. Da mesma forma que a complexação com agentes flavorizantes

a CD também foi utilizada no clareamento de bebidas alcoólicas como o whisky e a cerveja (PARRISH, 1988). Garbow; Likos; Schroeder, 2001, estudaram complexos de inclusão da β -CD com adoçantes aspartame e neotame, verificaram que a solução com concentração de 5:1 de β -CD:aspartame, apresentou um aumento de 42% na sua estabilidade, comparado a uma solução sem β -CD.

Os grãos de soja têm um sabor adstringente e um peculiar cheiro de grama, que parece ser resultante de componentes como compostos carbonil e álcoois alifáticos. A adição de CD na pasta de soja na manufatura de seus produtos, forma complexos com os componentes citados anteriormente, resultando em produtos alimentícios deodorizados (SAKAKIBARA, 1985 citado por SZEJTLI; SZENTE, 2005).

O arroz quando armazenado por mais de um ano adquire “off-flavour” indesejável, que pode ser eliminado pelo seu cozimento na presença de 0,01-0,4% de β -CD (TAKEDA, 1980). No mesmo sentido, grãos de arroz ou a água utilizada no seu cozimento quando tratada com aditivos constituídos de glucana- δ -lactona ou ácidos não voláteis (ácido carboxílico) e agentes que mascaram o odor, como a CD apresentaram uma boa textura, sabor e aroma agradável (SATAKE; SATAKE; HOSAKA, 1991).

Hidrolisado de caseína do leite é uma fonte de proteína facilmente digestiva, mas seu sabor amargo é um grande problema. A adição de 10% de β -CD no hidrolisado pode eliminar seu sabor amargo (SUZUKI, 1975).

A gelatinização é uma importante característica do amido. A β -CD modifica consideravelmente a gelatinização da farinha de trigo. A presença de 1,5 % de β -CD aumentou o poder de inchamento e a solubilidade dos grânulos de amido de trigo, enquanto que a viscosidade da pasta aumentou cerca de quatro vezes (KIM; HILL, 1984). Similarmente, as CDs foram adicionadas em farinhas no preparo de diferentes produtos alimentícios, tais como, macarrão, pizza e bolo de arroz para conferir melhor elasticidade e a flexibilidade da massa (FUJISHIMA et al., 2001).

Em trabalho mais recente, Cucolo (2004) empregou CGTase em massas de pães, mostrou que a tonalidade da cor do pão na presença de CGTase foi mais clara que o controle. Isto poderia ser resultante da ação de desproporcionamento da CGTase que apresentou menor teor de açúcar redutor, conseqüentemente menor escurecimento devido à reação de Maillard. Por outro lado, também poderia ser por

causa da complexação da CD formada com reagentes da reação de Maillard com a subsequente redução na intensidade desta reação.

I.1.6. Reações de escurecimento em alimentos

As reações de escurecimento são um dos mais importantes fenômenos que ocorrem durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Representam uma importante área de pesquisa tanto pelas implicações na estabilidade e na tecnologia de alimentos, como também na nutrição e na saúde. Os principais grupos de reações de escurecimento são conhecidos como escurecimento enzimático (REE) da polifenoloxidase (PPO) e escurecimento não enzimático (RENE) da reação de Maillard (RM).

I.1.6.1. Reação de escurecimento enzimático

O escurecimento enzimático, com poucas exceções (café, coco, figos pretos e chá), é considerado um problema, que diminui a qualidade das frutas e suas características nutricionais (MARQUÉS; FLEURIET; MACHEIX, 1995). As reações oxidativas deste processo, independentemente de sua causa (amassamento, fermento e ação de microrganismo, etc), envolve o contato entre as enzimas oxidativas e vários compostos fenólicos. A principal enzima envolvida neste processo é a polifenoloxidase (PPO), que utiliza o oxigênio molecular na catálise de o-hidroilação de monofenol para o-difenóis (atividade da monofenolase) e, posteriormente, a oxidação do difenol (atividade de difenolase) em o-quinona. Essas o-quinonas se polimerizam e/ou reagem com aminoácidos endógenos e proteínas formando pigmentos marrons complexos denominados melaninas (Figura 6).

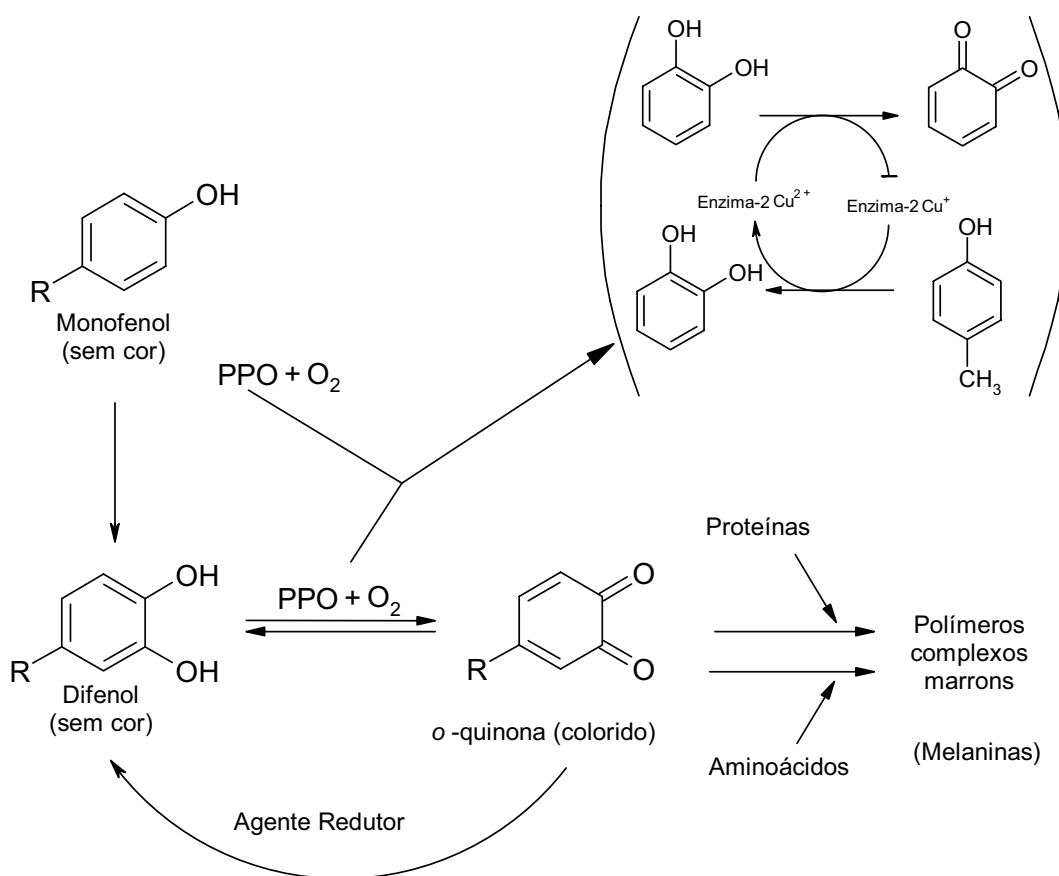


Figura 6 - Esquema do escurecimento enzimático da PPO. **Fonte modificada:** McEVILY; IYENGAR; OTWELL, 1992.

A enzima localiza-se nos plastídios das células vegetais e os substratos fenólicos estão armazenados nos vacúolos. Esta separação física previne qualquer oxidação dos fenóis sem danificar o tecido vivo. A separação pode ser rompida como resultado de danos à célula durante a colheita (não intencional) ou o processamento (intencional), com isso a oxidação dos fenóis por meio da PPO se inicia (BUSCH, 1999).

Os fatores mais importantes no aumento do escurecimento provocado por esta enzima são a concentração de compostos fenólicos, o pH, a temperatura e o oxigênio disponível no tecido (LAURITA; KERVINEN; AHVENAINEN, 1998). A escolha do cultivar tem demonstrado efeito no potencial de controle de escurecimento de batatas

minimamente processadas, uma vez que diferentes cultivares têm diferentes composições químicas.

Em tubérculos como batatas, os compostos fenólicos estão principalmente distribuídos nos tecidos entre o córtex e a pele. Na verdade, cerca de 50% dos compostos fenólicos estão localizados na pele e tecidos adjacentes, enquanto que os outros 50% estão no centro do tubérculo (FRIEDMAN, 1997a).

Os nutrientes mais importantes presentes em batatas são os carboidratos, como o amido e açúcar, ácidos orgânicos e fenóis, como o ácido clorogênico. A concentração de ácido clorogênico representa cerca de 90% do total de compostos fenólicos em batatas (BELL, 1980; FRIEDMAN, 1997b; MONDY; GOSSELIN, 1988).

A comercialização de frutas recém-cortadas, como as maçãs, é fortemente influenciada pela mudança de cor devido às reações enzimáticas dos compostos fenólicos com a ativação endógena da PPO e a difusão do oxigênio atmosférico pelo tecido (PEREZ-GAGO; SERRA; DEL RIO, 2006).

As pêras são particularmente propensas ao escurecimento enzimático e seu uso é muito restrito em produtos processados como o suco ou purê. O grau de envolvimento das peroxidases no escurecimento enzimático permanece duvidoso, especialmente por causa da maior afinidade da PPO com os substratos naturais e o baixo nível de peróxido de hidrogênio em frutas (RICHARD-FORGET; GAUILLARD, 1997).

1.1.6.2. Reação de Maillard ou escurecimento não enzimático

A reação de Maillard é uma reação química entre os grupos aminos de aminoácidos, proteínas e açúcares redutores conforme Figura 7, é muito significativa na indústria alimentícia, uma vez que afeta fortemente a qualidade dos alimentos. É um dos fenômenos químicos mais estudados, além de induzir o escurecimento dos alimentos, afeta a qualidade nutricional e o “flavour” e pode apresentar implicações toxicológicas tais como a formação de acrilamida. A reação de Maillard é dividida em três estágios: inicial, intermediário e final. O primeiro estágio inicia-se com a condensação entre o grupo amino e um açúcar redutor, levando a cetose amina (1-desoxi-1-glicino-D-frutose) numa sequência denominada rearranjo de Amadori no caso de ser uma aldose o açúcar redutor (ou rearranjo de Heyns no caso em que o açúcar redutor é uma cetose levando a uma aldose amina (2-desoxi-2-glicino-D-glucose). O estágio intermediário inicia-se com os produtos de Amadori/Heyns,

levando a produtos de fragmentação de açúcar e a liberação do grupo amino. No estágio final ocorre reações de fragmentação, ciclização e polimerização em que o grupo amino novamente participa (VAN BOEKEL, 2006).

As melanoidinas podem ser detectadas em alimentos e materiais biológicos, destacando sua importância para a ciência de alimentos e também para os estudos fisiológicos e médicos, no entanto pouco se sabe sobre sua estrutura e propriedades químicas (CÄMMERER; KROH, 1995).

A reação de Maillard poderá ser afetada por fatores intrínsecos dos alimentos. Alguns dos mais importantes parâmetros que a podem afetar são a natureza química, a concentração dos reagentes, o pH, a atividade de água, a temperatura e o tempo de aquecimento dos processos (ASHOOR; ZENT, 1984; BARBANTI; MASTROCOLA; LERICE, 1990; BUERA et al., 1987; EICHNER; CINER-DORUK, 1981; LERICE et al., 1990; LINGENERT, 1990; NICOLI; ANESE; LERICE, 1993).

Reação de Maillard

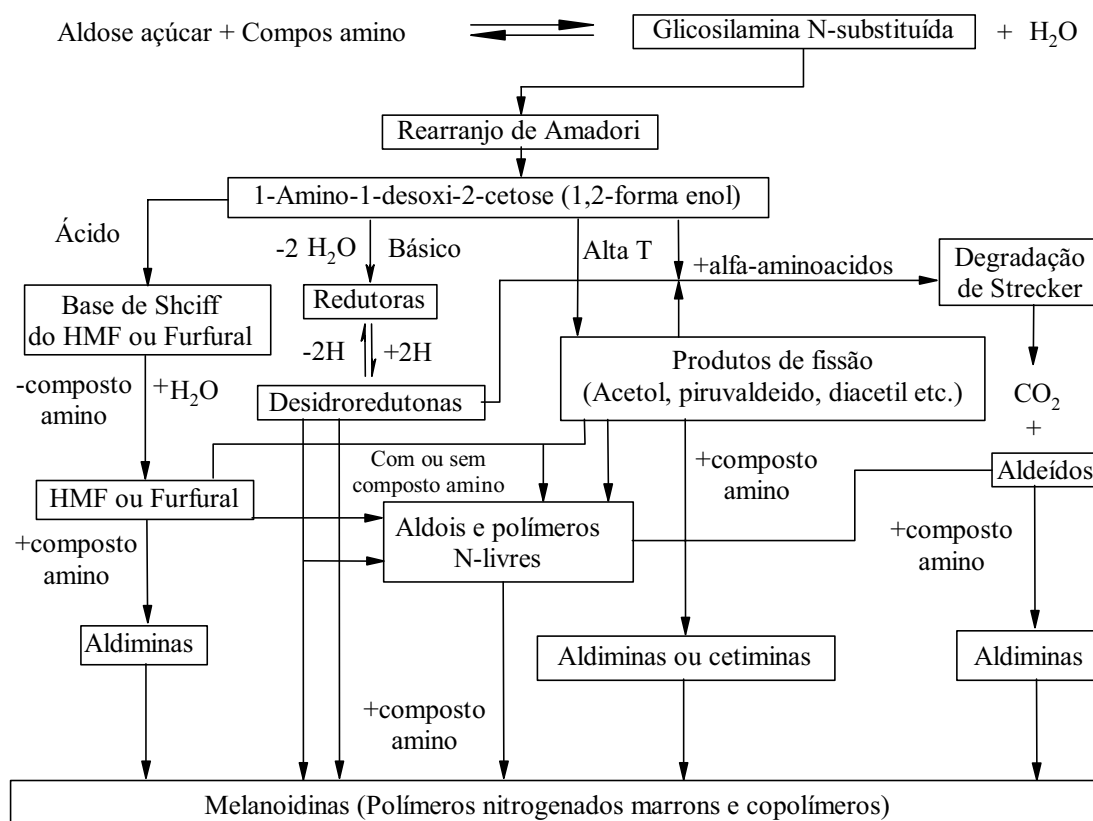


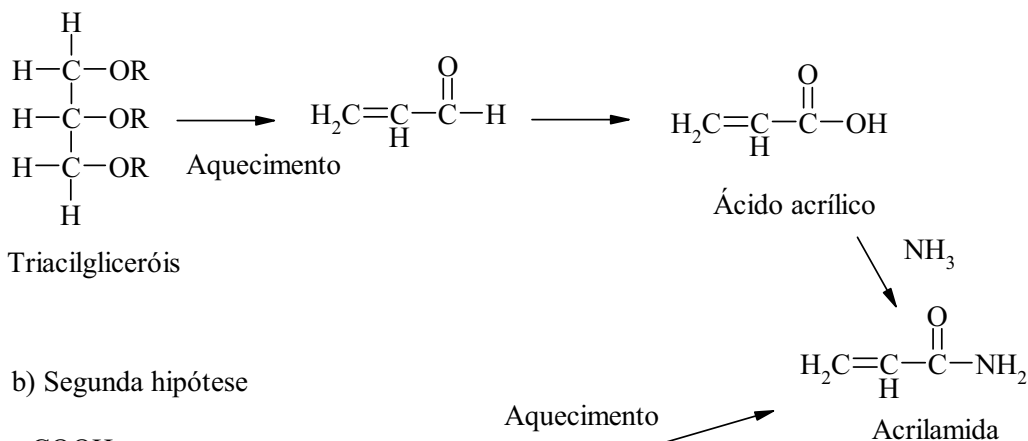
Figura 7 - Reação de Maillard. **Fonte modificada:** Hodge, 1953.

I.1.6.2.1. Formação de acrilamida

A Acrilamida nos alimentos é em grande parte derivada de reações induzidas pelo aquecimento entre o grupo amino de proteínas e aminoácidos livres, como a asparagina e o grupo aldeído de açúcares como a glicose durante a fritura e o assado. Com base em numerosos estudos, a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer classificou acrilamida como “provável carcinógeno em humanos”. Por isso há uma enorme preocupação pelo grande consumo de produtos de batatas assadas e fritas (FISELIER; GROB; PFEFFERLE, 2004). Os autores verificaram que o escurecimento pode causar um aumento no nível de acrilamida durante o processamento de croquetes de batatas fritas e assadas e quanto maior for o escurecimento maior será o conteúdo de acrilamida.

Becalski et al. (2003) analisaram duas hipóteses para a formação de acrilamida as quais estão ilustradas na Figura 8. Na primeira hipótese a acrilamida poderá ser formada por óleos e compostos nitrogenados presentes nos alimentos. O esquema mais plausível poderá ser a formação de acroleína ocasionada pela degradação térmica do glicerol (UMANO; SHIBAMOTO, 1987), a oxidação de acroleína para ácido acrílico e finalmente reações do ácido acrílico com amônia, que potencialmente poderá ser formado pela pirólise de compostos nitrogenados ocasionando a formação de acrilamida. Na segunda hipótese a acrilamida poderá ser formada sozinha, por rearranjo dos compostos nitrogenados presentes nos alimentos.

a) Primeira hipótese



b) Segunda hipótese

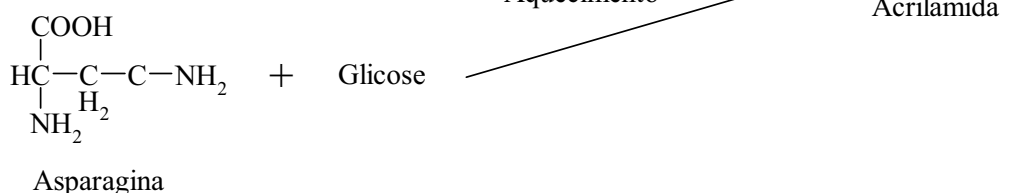


Figura 8 - Possíveis caminhos de formação da acrilamida. **Fonte modificada:** Becalski et al., 2003.

I.1.7. Escurecimento no processamento de alimentos

I.1.7.1. Operações iniciais: descascamento e corte

Quando submetidas às etapas de descasque e corte, as frutas e hortaliças sofrem um processo de escurecimento, oriundo das reações catalisadas por enzimas, sendo as mais importantes a polifenoloxidase e a peroxidase. Essas reações ocorrem no tecido vegetal quando há ruptura das células e a reação não é controlada, muito embora, no tecido intacto de frutas e hortaliças, possa também ocorrer o escurecimento (ARAÚJO, 1999).

I.1.7.2. Fritura, desidratação e secagem

A fritura é uma operação que causa mudanças características de odor, sabor, cor e textura de grande consequência sobre a aceitabilidade sensorial. Estas mudanças podem tornar os alimentos mais atraentes para o consumo (O' DONNELL, 1995).

O ato de fritar um alimento como, por exemplo, a batata que contém água intrínseca acelera reações que exercem um efeito deteriorativo sobre o óleo aquecido (rancificação) e também o escurecimento do alimento devido à reação de Maillard, dentre outras (PERKINS; AKKEREN, 1965).

A secagem é um fenômeno complexo envolvendo aquecimento combinado com a transferência de massa e em muitos casos resultando em produtos com propriedades modificadas. Dependendo das condições de secagem, os produtos alimentícios podem sofrer vários graus de escurecimento (HAWLADER; PERERA; TIAN, 2006). Além disso, o escurecimento poderá continuar, embora lentamente durante o armazenamento dos produtos secos, limitando desse modo, a vida de prateleira. A desidratação é a secagem produzida artificialmente em condições de temperatura, umidade e corrente de ar rigorosamente controlada. Na desidratação de frutas, ocorre menor perda de açúcar em relação à secagem natural, ocasionada pela contínua respiração tecidual e pela fermentação que ocorre (EVANGELISTA, 1989).

Jayaraman; Das Gupta (1995) constataram mudanças na coloração de frutas e vegetais depois de submetidos à secagem. Esses autores observaram a destruição do pigmento natural durante a desidratação por meio de reações não enzimáticas. Verificaram que a adição de sulfito durante o início da secagem foi efetiva no controle do escurecimento.

I.1.8. Inibidores das reações de escurecimento

A prevenção ou a inibição do escurecimento enzimático é uma das principais preocupações da indústria de alimentos em todo o mundo e trabalhos têm sido realizados para eliminar algum dos fatores essenciais da reação, como o oxigênio, a enzima, o cobre ou polifenóis (RICHARDSON; HYSLOP, 1985 citado por SOJO et al., 1999). Os inibidores apresentam três diferentes modos de ação, primeiro, a inibição direta da PPO, segundo, a redução química da o-quinona em compostos o-difenólicos e por último a modificação química ou a remoção dos substratos fenólicos da PPO (PILIŽOTA; ŠUBARIĆ, 1998).

A enzima (PPO) é relativamente lábil ao calor e também pode ser inibida por ácidos, sulfitos, agentes quelantes e agentes redutores como o ácido ascórbico. A resistência da PPO ao calor depende do tipo de alimento. Essa enzima é relativamente sensível a temperatura maior que 50°C e a escolha do tempo

apropriado de tratamento permite uma diminuição na sua atividade, no entanto, ela é completamente destruída a 80°C (VAMOS-VIGYAZÓ, 1981).

O método mais comum para controlar as reações de escurecimento enzimático (REE) e não enzimático (RENE) é o uso de sulfito em algumas de suas formas (dióxido de enxofre, metabissulfito de sódio ou potássio e bissulfito de sódio ou potássio) (SAPERS, 1993).

Em diversos estudos os sulfitos foram considerados agentes antiescurecimento, assim como os agentes redutores (ácido ascórbico, glutatona, L-cisteína), os agentes quelantes (fosfatos, ácido etilenodiaminoacético (EDTA), ácidos orgânicos), os agentes acidulantes (ácido cítrico, ácido fosfórico) e agentes complexantes (ciclodextrinas) (LABUZA; LILLEMO; TAOUKIS, 1992; LAMBRECHT, 1995; MARTINEZ; WHITAKER, 1995; McEVILY; IYENGAR; OTWELL, 1992; MOLNAR-PERL; FRIEDMAN, 1990a, 1990b; MONSALVE-GONZALEZ et al., 1993; MOON; SON; LEE, 1999; NICOLAS et al., 1994; VAMOS-VIGYAZO, 1995; WALKER, 1995).

Os sulfitos são econômicos e podem controlar as REE e RENE funcionando como agentes antimicrobianos, branqueadores, agentes redutores e antioxidantes (LAMBRECHT, 1995). Embora os sulfitos sejam muito efetivos nas REE e RENE existem vários fatores negativos associados com o seu uso nos alimentos e bebidas. Os sulfitos são conhecidos por causar diversos efeitos na saúde, especialmente em certos indivíduos sensíveis como os asmáticos dependentes de esteróides. Em casos mais extremos poderão ocorrer reações anafiláticas e até mesmo a morte, devido ao consumo de alimentos tratados com sulfitos (TAYLOR, 1986).

Por causa dos efeitos adversos à saúde o FDA (E.U.A) em 1986 proibiu o uso de sulfito em frutas e vegetais para o consumo humano. Certos compostos químicos como os ácidos antioxidantes (cítrico e málico) e agentes redutores (ácido ascórbico, sozinho ou em combinação) estão sendo usados (FAYAD et al., 1997). No entanto, a recente mudança no estilo de vida tem levado a uma demanda maior pelos alimentos naturais e seguros e a uma menor adição química nos alimentos processados. A esse respeito, tem sido renovado o interesse pela pesquisa por agentes naturais antiescurecimento (SOJO et al., 1999).

Entre os agentes mais promissores estão as ciclodextrinas (CDs). A sua cavidade hidrofóbica é capaz de formar complexos de inclusão com uma ampla classe de moléculas orgânicas, incluindo alguns polifenóis (CAI et al., 1990). Essas

moléculas foram propostas como agentes no controle do escurecimento enzimático de produtos de maçãs causado pela PPO (SAPERS; HICKS, 1989; BACHEM et al., 1994; CROUZET et al., 1991; BILLAUD et al., 1995; FAYAD et al., 1997) e seu uso na prevenção do escurecimento foi patenteado (HICKS; SAPERS; SEIB, 1990). A β -CD mostrou que inibe o escurecimento enzimático de suco de maçã (SAPERS; HICKS, 1989; CROUZET et al., 1991). Os autores propuseram que a β -CD forma complexos de inclusão com o substrato da polifenoloxidase, desse modo prevenindo a oxidação das quinonas e a sua subsequente polimerização em pigmentos escuros.

O controle do escurecimento enzimático também foi descrito por Nuñez-Delicado; Sánchez-Ferrer; Garcia-Carmona (1997), os autores estudaram o efeito do 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em sinergismo com o ácido ascórbico na oxidação do PMC (pentametilcromo-6-ol) causado pela lipoxigenase. Verificaram diminuição da atividade enzimática com o aumento na concentração de ciclodextrina, o ácido ascórbico por ser um composto hidrofílico não pode ser incluído na cavidade da ciclodextrina, provavelmente essa diminuição ocorreu devido a complexação do PMC na cavidade hidrofóbica da CD.

Sojo et al. (1999) avaliaram-se o efeito da ciclodextrina na redução de oxidação enzimática dos fenóis da polpa de banana. Esse trabalho mostrou pela primeira vez que as ciclodextrinas ao contrário do que geralmente se supunha, ou seja que elas somente agiam como inibidores, mostrou também que elas podem ativar o escurecimento em extratos de frutas cruas. Assim a CD, apresentou dois efeitos, um ativador e outro inibidor do escurecimento, conforme o produto utilizado. Quando se usou o fenol hidrofóbico como o tert-butilcatecol (TBC) observou-se uma acentuada inibição tanto com o derivado β -hidroxipropil-CD quanto com o maltosil β -CD. Essa inibição foi ocasionada pela complexação do TBC com o centro da ciclodextrina, demonstrando que a PPO da polpa de banana reagia somente com o substrato livre e não com o complexo TBC-CDs. O aumento das concentrações de CDs na presença de dois inibidores da PPO (4-iodofenol e o ácido cinâmico) foi capaz de reativar a enzima, antes inibida, para alcançar o nível não inibido (ausência do inibidor). Isto ocorreu pela complexação dos inibidores com o centro hidrofóbico da ciclodextrina, impedindo sua ação inibidora.

A β -ciclodextrina não foi efetiva no suco de maçã em concentrações de 0,3-1,8 mM. Observou-se o escurecimento gradual de suco de maçã nas concentrações testadas indicando que não houve a formação completa do complexo.

Se a concentração for aumentada a eficiência poderá ser maior, embora isso possa causar menos “flavour”, por causa da complexação de seus compostos e devido à falta da especificidade da formação de complexos (ÖZOGLU; BAYMDIRHI, 2002).

SAPERS et al. (1989) verificaram que a combinação de β -CD com o ácido ascórbico 2-fosfato (AAP) ou ascorbil palmitato (AP) foi significativamente mais efetiva como inibidor do escurecimento em suco de maçã comparado com a β -CD e ácido ascórbico (AA). A ação da β -CD com o AAP foi mais efetiva do que o cinamato de sódio (CINN) com o AAP. A β -CD e combinações dessa com o AA ou seus derivados apresentaram efeitos promissores na inibição do escurecimento em suco de maçã, entretanto, a mesma não foi efetiva em maçãs fatiadas. A capacidade da β -CD de inibir o escurecimento enzimático em suco de maçã provavelmente resultou da capacidade deste composto de formar complexos de inclusão com o substrato da polifenoloxidase prevenindo, dessa forma, a oxidação das quinonas e a sua subsequente polimerização em pigmentos escuros. Irwin et al. (1994) avaliaram que a ciclodextrina forma um complexo de inclusão na proporção 1:1 com o substrato da PPO (ácido clorogênico) em suco de maçã, protegendo o substrato da oxidação enzimática.

A β -ciclodextrina dissolvida em suco de maçã “Granny Smith” inibiu o escurecimento enzimático por mais de uma hora com inibição proporcionalmente à concentração de ciclodextrina entre 5,9 e 13,6 mM, entretanto, α - e γ -CDs foram menos efetivas. A inibição do escurecimento por β -ciclodextrina foi mais efetiva com a adição de ácido ascórbico (1,14 mM) ou de outros derivados ascorbil. Misturas contendo maltosil- β -CD, dimaltosil- β -CD e β -CD foram efetivas na concentração de 1 a 4%, com a adição de ácido difosfato (SporixTM), ácido ascórbico ou ácido cítrico (HICKS; SAPERS; SEIB, 1990).

A ciclodextrina insolúvel foi empregada em suco de uvas verdes, maçãs “Granny Smith”, pêra “Anjou” e aipo. O suco de maçã escureceu significativamente em 1 hora, no entanto, na amostra submetida ao tratamento, o escurecimento foi prevenido por 82 horas, quando a mesma foi descartada devido ao desenvolvimento microbiano. Em suco de pêra o escurecimento ocorreu em aproximadamente 60 horas. Embora as ciclodextrinas pareçam ser efetivas em retardar o escurecimento, existem diversos inconvenientes potenciais para o seu uso, entre esses poderá ocorrer à diminuição do “flavour” (HICKS et al., 1996). Estes autores também

utilizaram as ciclodextrinas solúveis e insolúveis, sozinhas ou em combinação com o fosfato orgânico e inorgânico para inibir o escurecimento em suco de maçã, onde verificaram que a β -CD inibiu o escurecimento por 2 horas na concentração de 1% (8,8 mM), resultados similares foram encontrados com o maltosil- β -CD, entretanto, com o aumento na sua concentração a 4% (28 mM), o período de inibição foi maior, aproximadamente 6 horas. A combinação de 1% de β -CD com 0,5% de SAPP (ácido pirofosfato de sódio) ou SHMP (ácido hexametáfosfato de sódio) e com 0,25% de ácido difosfato ou ácido fosfórico (PA), proporcionou a inibição do escurecimento por mais de 25 horas a temperatura ambiente. Os polifenóis complexados na cavidade da ciclodextrina não ficam disponíveis para a enzima por causa do anel da ciclodextrina. Os autores propuseram que produto baseado nessa tecnologia poderá representar novo conceito em sucos de frutas minimamente processados.

Billaud et al. (1995) estudaram o efeito da CD na atividade da PPO de maçã, utilizaram como substrato fenólico o ácido clorogênico e a (+) catequina. A CD diminuiu a atividade da PPO, esse composto provavelmente atuou na complexação com o substrato. A adição de β -ciclodextrina poderá resultar em uma maior ou menor diminuição de oxigênio consumido pela PPO. Além disso, o equilíbrio entre os substratos fenólicos disponíveis poderá ser rapidamente modificado, as CDs podem induzir grandes mudanças na cor em solução oxidada. Isso poderá provavelmente explicar os efeitos observados por Crouzet et al. (1991) os quais verificaram a inibição do escurecimento enzimático em suco de maçã com o uso da CD, que também foi dependente da variedade da maçã.

O HP- β -CD (hidroxipropil- β -ciclodextrina) pode ser considerado melhor inibidor do escurecimento enzimático em suco de maçã quando comparado com a β -CD, uma vez que a sua solubilidade em água é maior (BILLAUD et al., 1995). Os derivados HP- β -CD são prontamente solúveis em água (> 50 g/100 mL a 25°C), são mais estáveis em condições ácidas e na presença da α -amilase do que a β -CD (YOSHIDA et al., 1989 citado por BILLAUD et al., 1995). A β -CD tem uma solubilidade menor em água (1,85 g/100 mL a 25°C) comparada com a α - e γ -CD (14,5 e 23,3 g/ 100 mL, respectivamente). A baixa solubilidade é devida principalmente às ligações de hidrogênio intramolecular, vários derivados têm sido propostos para aumentar a solubilidade em água (DUCHÊNE; WOUESSIDJEWE, 1990 citado por BILLAUD et al., 1995; SZEJTLI, 1992).

Shaw; Buslig (1986) revelaram que a β -CD foi mais efetiva do que α - ou γ -CD removendo a naringina e limonina de suco de toranja. A eficiência da β -CD como inibidor do escurecimento depende do equilíbrio entre o substrato livre e o complexado e da proporção da formação do complexo.

É muito ampla a utilização da ciclodextrina, uma vez que a mesma apresenta vantagens nas mais diversas áreas da tecnologia de alimentos (TA), resultando na melhoria da qualidade referente à cor, sabor, aroma, solubilidade e estabilidade em alimentos processados. O alto custo da produção da ciclodextrina é um fator que deve ser levado em consideração e que limita seu emprego na TA. Dessa forma, pesquisas dirigidas à produção, tanto da CGTase quanto da CD que resultem em menor custo, são importantes para viabilizar de maneira econômica o uso de CD em escala comercial.

O sucesso para prevenir o escurecimento de frutas é ainda um desafio depois da proibição do uso do bissulfito de sódio. É evidente que isto terá efeito mesmo no Brasil onde ainda se utiliza o bissulfito, considerando as restrições impostas a produtos importados pelos E.U.A que tenham na sua composição o uso desta substância química. Com isso as ciclodextrinas naturais podem ser uma alternativa, muito embora sejam necessários estudos complementares para viabilizar sua produção em larga escala. As grandes possibilidades de aplicação da CGTase e do principal produto obtido de sua ação, as ciclodextrinas, explicam o interesse na produção em larga escala.

I.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELYAN, V. A.; AFYAN, K. B.; AVAKYAN, Z. G.; MELKUMYAN, A. G.; AFRIKYAN, E. G. Cyclomaltodextrin glucotransferases from thermophilic actinomycetes. **Biochemistry-Moscow (Biokhimiya)**, v. 60, p. 1223-1229, 1995.

AGUIAR, C. L. Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 19, p. 119-138, 2001.

ALLEGRE, M.; DERATANI, A. Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. **Agro Food Industry Hi Technology**, January / February, p. 9-17, 1994.

ALVES-PRADO, H. F.; HILÁRIO, E.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 189-196, 2002.

ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) microbiana e aplicação de ciclodextrinas em alimentos-Revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, p. 43-54, 2002.

ALVES-PRADO, H. F. **Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e *Bacillus clausii* E16: caracterização das ciclodextrinas, clonagem e seqüenciamento do gene da CGTase de *Bacillus clausii*.** 2005. 150 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos -Teoria e Prática**, 2. ed. Viçosa: UFV, 1999, p. 416.

ASHOOR, S. H.; ZENT, J. B. Maillard reaction of common amino acids and sugars. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1206-1207, 1984.

BACHEM, C. W. B.; SPECKMANN, G. F.; VAN DER LINDE, P. C. G.; BERHEGGEN, F. T. M.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C.; ZABEAU, M. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. **Bio/Technologie**, v. 12, p. 1101-1105, 1994.

BARBANTI, D.; MASTROCOLA, D.; LERICE, C. R. Early indicators of chemical changes in foods due enzymic or non enzymic browning reactions. 2. **Lebensmittel-wissenschaft und- Technologie**, v. 23, p. 494-498, 1990.

BECALSKI, A.; LAU, B. P. Y.; LEWIS, D.; SEAMAN, S. W. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 802-808, 2003.

BELL, A. A. The time sequence of defence. In: J. G. Horsfall and E. B. Cowling (Ed), **Plant 7 disease, an advanced treatise**. New York: Academic Press, p. 53-73, 1980.

BENDER, H. Cyclodextrin glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae*. I. Synthese, Reinigung und eigenschaften des enzymes von *K. pneumoniae* M5a1. **Archives of Microbiology**, v. 111, p. 271-281, 1977.

BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 6, p. 31-71, 1986.

BILLAUD, C.; REGAUDIE, E.; FAYAD, N.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. Effect of cyclodextrins on polyphenol oxidation catalyzed by apple polyphenol oxidase. In: ACS SYMPOSIUM SERIES 600, ENZYMATIC BROWNING AND ITS PREVENTION, 1994, Washington: American Chemical Society, 1995. p. 295-312.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001, p. 143.

BOVETTO, L. J.; BACKER, D. P.; VILLETTE, J. R.; SICARD, P. J.; BOUQUELET, S. J-L. Cyclomaltoextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E192. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 15, p. 48-58, 1992.

BUERA, M. D. P.; CHIRIFE, J.; RESNIK, S. L. WETZLER, G. Nonenzymatic browning in liquid model system of high water activity: kinetics of colour changes due to Maillard's reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1063, 1987.

BUSCH, J. M. Enzymic browning in potatoes: a simple assay for a polyphenol oxidase catalysed reaction. **Biochemical Education**, v. 27, p. 171-173, 1999.

BUSCHMANN, H. J.; SCHOLLMMEYER, E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. **Journal Cosmetic Science**, v. 53, p. 575-592, 2002.

CAI, Y.; GAFFNEY, H. G.; LILLEY, T. H.; MAGNOLATO, D.; MARTIN, R.; SPENCER, C. M.; HASLAM, E. Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. **Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions II. Physical, Organic Chemistry**, v. 2, p. 2197-2209, 1990.

CÄMMERER, B.; KROH, L. W. Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. **Food Chemistry**, v. 53, p. 55-59, 1995.

CASTILLO, N.; BOYD, R. J. The host-guest inclusion complex of *p*-chlorophenol inside α -cyclodextrin: An atoms in molecules study. **Chemical Physics Letters**, v. 416, p. 70-74, 2005.

CHIN, Y. G.; TSAI, L. J. Cholesterol removal from a lard-water mixture with β -cyclodextrin. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 561-564, 1995.

CROUZET, J.; BASTIER, P.; SIGNORET, A.; MENTINK, L. Enzymatic browning inhibition by cyclodextrin. **Food Ingredients Europe: Conference Proceedings**; Expoconsult Publishers: Maarsen, The Netherlands; p. 293-295, 1991.

CUCOLO, G. R. **Produção e caracterização da CGTase de *Bacillus sp* subgrupo *alcalophilus* E16 e aplicação da enzima em produtos de panificação**. 2004. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2004.

CYCLOLAB. **What are CDs?** Disponível em: [http:// www.cyclolab.hu.online/what.html](http://www.cyclolab.hu.online/what.html).

EICHNER, K.; CİNER-DORUK, M. Formation and decomposition of browning intermediates and visible sugar-amine browning reactions. In: L. B. Rockland & G. Stewart (Ed), **Water activity: influences on Food Quality**. New York: Academic Press, p. 567, 1981.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989, p.652.

FAYAD, N.; MARCHAL, L.; BILLAUD, C.; NICOLAS, J. Comparison of β -cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenoloxidase from different sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2442-2446, 1997.

FISELIER, K.; GROB, K.; PFEFFERLE, A. Brown potato croquettes low in acrylamide by coating with egg/ breadcrumb. **Food Technology**, v. 219, p. 111-115 2004.

FOOD and DRUG ADMINISTRATION (FDA). Chemical preservatives. **Food and Drug Administration**. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 182, Part 101, 1986.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1523-1540, 1997a.

FRIEDMAN, M. Potato polyphenols: role in the plant and in the diet. In: F. Shaide (Ed), **Antinutrients and phytochemicals in food**, Washington, DC: American Chemical Society, p. 61-93, 1997b.

FUJISHIMA, N.; KUSAKA, K.; UMINO, T.; URUSHINATA, T.; TERUMI, K. **Flour based foods containing highly branched cyclodextrins**. Japanese Patent JP 136,898, 2001.

HASHIMOTO, H. Present status of industrial application of cyclodextrins in Japan. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 44, p. 57-62, 2002.

HAWLADER, M. N. A.; PERERA, C. O.; TIAN, M. Properties of modified atmosphere heat pump dried foods. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 392-401, 2006.

HEDGES, R. A. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2035-2044, 1998.

HEDGES, A.; McBRIDE, C. Utilization of β -cyclodextrin in food. **Cereal Foods World**, v. 44, p. 700-704, 1999.

HICKS, K. B.; SAPERS, G. M.; SEIB, P. A. **Process for preserving raw fruit and vegetables juices using cyclodextrins and compositions thereof**. U.S. Patent, 1990.

HICKS, K. B.; HAINES, R. M.; TONG, C. B. S.; SAPERS, G. M.; EI-ATAWY, Y.; IRWIN, P. L.; SEIB, P. A. Inhibition of enzymatic browning in fresh fruit and vegetable juices by soluble and insoluble forms of β -cyclodextrin alone or in combination with phosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2591-2594, 1996.

HIROSE, T.; YAMAMOTO, Y.; HINOKITOL, Y. **Containing ciclo-olefin polymer compositions and their molding with excellent antimicrobial and gas barrier properties**. Japanese Patent JP 55480, 2001.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles-from an industrial point of view. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 18, p. 259-270, 1996.

IRWIN, P. L.; PFEFFER, P. E.; DONER, L. W.; SAPERS, G. M.; BREWSTER, J. D.; NAGAHASHI, G.; HICHS, K. B. Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomaltooligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. **Carbohydrate Research**, v. 256, p. 13-27, 1994.

JAYARAMAN, K. S.; DAS GUPTA, D. K. Drying of fruits and vegetables. **Handbook of Industrial Drying**, v. 1, p. 643-690, 1995.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 210-218, 2004.

KAWASHIMA, K. **Prevention of discoloration of food colorants**. Jpn. Kokai JP 8071464, 1980.

KIM, H. O.; HILL, R. D. Modification of wheat flour dough characteristics with cyclodextrin, **Cereal Chemistry**, v. 61, p. 406-407, 1984.

KITAHATA, S.; TSUYAMA, N.; OKADA, S. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 38, p. 387-393, 1974.

LABUZA, T. P.; LILLEMO, J. H.; TAOUKIS, P. S. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzyme. **Fruit Processing**, v. 2, p. 9-13, 1992.

LAMBRECHT, H. S. Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods. In: ACS SYMPOSIUM SERIES 600, ENZYMATIC BROWNING AND ITS PREVENTION, 1994, Washington: American Chemical Society, 1995. p. 313-323.

LARSEN, K. L.; ENDO, T.; UEDA, H.; ZIMMERMANN, W. Inclusion complex formation constants of α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -, η - and θ -cyclodextrins determined with capillary zone electrophoresis. **Carbohydrate Research**, v. 309, p. 153-159, 1998.

LAURITA, E.; KERVINEN, R.; AHVENAINEN, R. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. **Postharvest News and Information**, v. 4, p. 53-65, 1998.

LEE, J. H.; CHOI, K. H.; LEE, Y. S.; KWON, I. B.; YU, J. H. Enzymatic production of α -cyclodextrin with the cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 1017-1020, 1992.

LERICE, C. R.; BARBANTI, D.; MANZANO, M.; CHERUBINI, S. Early indicators of chemical changes in foods due to non enzymatic and enzymatic browning reactions. I. **Lebensmittel-wissenschaft und-technologie**, v. 23, p. 289-294, 1990.

LINGENERT, H. Development of the Maillard reaction during food processing. In: The Maillard reaction in food processing. **Human Nutrition and Physiology**. Basel: Birkhauser Verlag, 1990. p. 171-185.

MARQUÉS, L.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. J. Fruit polyphenol oxidase. New data on and old problem. In: ACS SYMPOSIUM SERIES 600, ENZYMATIC BROWNING AND ITS PREVENTION, 1994, Washington: **American Chemical Society**, 1995. p. 90-102.

MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 195-200, 1995.

MARTIN DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

MARTINS, R. F.; HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 116-124, 2002.

McEvily, A. J.; IYENGAR, R.; OTWELL, W. S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, p. 253-273, 1992.

MOLNAR-PERL, I.; FRIEDMAN, M. Inhibition of browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1648-1651, 1990a.

MOLNAR-PERL, I.; FRIEDMAN, M. Inhibition of browning by sulfur amino acids. Part. 3. Apples and potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1652-1656, 1990b.

MONDY, N. I.; GOSSELIN, B. Effect of peeling on total phenols, total glycoalkaloids, discoloration and flavour of cooked potatoes. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 756-759, 1988.

MONSALVE-GONZALEZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V.; CAVALIERI, R. P.; McEVILY, A. J.; IYENGAR, R. Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-Hexylresorcinol as anti-browning agent. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 797-800, 1993.

MOON, K. D.; SON, S.; LEE, C. Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. IFT Annual Meeting Book of Abstracts, v. 79 D-45, p. 227, 1999.

MORI, S.; HIROSE, S.; OYA, T.; KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp 9605. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 58, p. 1968-1972, 1994.

MORI, S.; GOTO, M.; MASE, T.; MATSUURA, A.; OYA, T.; KITAHATA, S. Reaction conditions for the production of cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp 9605. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 59, p. 1012-1015, 1995.

MUÑOZ-BOTELLA, S.; DEL CASTILLO, B.; MARTYN, M. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. **Ars Pharmaceutica**, v. 36, p. 187-198, 1995.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 753-757, 1976a.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 935-941, 1976b.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 104-157, 1994.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; LERICE, C. R. Influence of pH on the kinetics of non-enzymatic browning in heat-treated glucose-glycine models systems. **Italian Journal of Food Science**, v. 2, p. 139-146, 1993.

NUÑEZ-DELICADO, E.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCIA-CARMONA, F. Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2830-2835, 1997.

O'DONNELL, C. D. Fats and oils: forces in fried food quality. **Prepared Foods**, v. 164, p. 77-78, 1995.

OTA, T.; TAKEDA, F. **Cyclodextrins as cheese additives**, Jpn. Kokai JP 8175060, 1981.

ÖZOGLU, H.; BAYMDIRH, A. Inhibition of enzymatic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. **Food Control**, v. 13, p. 213-221, 2002.

PARRISH, M. Cyclodextrins- a review. England: sterling Organics; 1988 (Newcastle-upon-Tyne NE 3 3TT).

PEREZ-GAGO, M. B.; SERRA, M.; DEL RÍO, M. A. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, article in press, 2006.

PERKINS, E. G.; AKKEREN, V. L. A. Heated fats. IV. Chemical changes in fats subjected to deep fat frying processes: cottonseed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 42, p. 782-786, 1965.

PILIŽOTA, V.; ŠUBARIĆ, D. Control of enzymatic browning of foods. **Food Technology Biotechnology**, v. 36, p. 219-227, 1998.

PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. **Food Technology**, v. 42, p. 96-100, 1988.

PURDY, W. C. Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. **Chemical Reviews**, v. 92, p. 1457-1470, 1992.

RICHARD-FORGET, F. C.; GAUILLARD, F. A. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: A possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2472-2476, 1997.

SAPERS, G. M.; HICKS, K. B.; PHILLIPS, J. G.; GARZARELLA, L.; PONDISH, D. L.; MATULAITIS, R. M.; McCORMACK, T. J.; SONDEY, S. M.; SEIB, P. A.; Ei-Atawy, Y. S. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenoloxidase inhibitors, and complexing agents. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 997-1002, 1989.

SAPERS, G. M.; HICKS, K. B. Inhibition of enzymatic browning in fruits and vegetables. In: QUALITY FACTORS OF FRUITS AND VEGETABLES: CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, Washington: **American Chemical Society**, 1989. p. 29-41.

SAPERS, G. M. Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. **Food Technology**, v. 47, p. 75-84, 1993.

SATAKE, T.; SATAKE, S.; HOSAKA, Y. **Cooking of rice with glucono delta-lactone or carboxylic acids for taste improvement**, Jpn Kokai JP 81131349, 1991.

SCHMID, G. Cyclodextrin glucanotransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. **Trends Biotechnology**, v. 7, p. 244-248, 1989.

SHAW, P. E.; BUSLIG, B. S. Selective removal of bitter compounds from grapefruit juice and from aqueous solution with cyclodextrin polymers and with Amberlite XAD-4. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 837, 1986.

SHUKLA, T. P. Industrial research on cyclodextrins. **Cereal Foods World**, v. 36, p. 387, 1991.

SIAN, H. K.; SAID, M.; HASSAN, O.; KAMARUDDIN, K.; ISMAIL, A. F.; RAHMAN, R. A.; MAHMOOD, N. A. N.; ILLIAS, R. M. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *alkalophilic Bacillus* sp. G1. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1101-1111, 2005.

SMITH, D. M.; AWAD, A. C.; BENNINK, M. R.; GILL, J. L. Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -cyclodextrin. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 691-694, 1995.

SOJO, M. M.; NUÑEZ-DELICADO, E.; GARCIA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A. Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenoloxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 518-523, 1999.

STARNES, R. L. Industrial potential of cyclodextrin glycosyltransferases. **Cereal Foods World**, v. 35, p. 1094-1099, 1990.

SUZUKI, Y. **Elimination of bitterness of protein hydrolysates**, Jpn Kokai JP 7569100, 1975.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. **Starch/Stärke**, v. 34, p. 379-385, 1982.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins in pesticides. **Starch/Stärke**, v. 37, p. 382-386, 1985.

SZEJTLI, J. The properties and potential uses of cyclodextrin derivatives. **Journal Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry**, v. 14, p. 25-36, 1992.

SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, p. 575-587, 1997.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrins chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 115-125, 2005.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 137-142, 2004.

TAKEDA Chem. Int. Ltd: **Removal of off-flavor from old rice**, Jpn Kokai JP 81127058, 1980.

TAYLOR, S. L. Sulfites as food ingredients. **Food Technology**, v. 40, p. 47-52, 1986.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 678-686, 1998.

UITDEHAAG, J. C. M.; KALK, K. H.; VAN DER VEEN, B. A.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. W. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8- Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 34868-34876, 1999.

UMANO, K.; SHIBAMOTO, K. Analysis of acrolein from heated cooking oils and beef fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 909-912, 1987.

VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VAMOS-VIGYAZO, L. Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables. In: ACS SYMPOSIUM SERIES 600, ENZYMATIC BROWNING AND ITS PREVENTION, 1994, Washington: American Chemical Society, 1995. p. 49-62.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction-Review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 230-233, 2006.

VAN DER VEEN, B. A.; VAN ALEBEEK, G. J. W. M.; UIDEHAAGE, J. C. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 521) proceed via different kinetic mechanisms. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 658-665, 2000.

VIHINEN, M.; MÄNTSÄLA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, p. 329-418, 1989.

WALKER, J. R. L. Enzymatic browning in fruits: its biochemistry and control. In: ACS SYMPOSIUM SERIES (600). ENZYMATIC BROWNING AND ITS PREVENTION, 1994, Washington: American Chemical Society, 1995. p. 8-22.

WHISTER, R. L.; BEMILLER, J. N. Starch. In: **Carbohydrate Chemistry For Food Scientists**. St. Paul: Eagan, 1997. Cap. 6, p. 117-123.

WIND, R. D.; LIBL, W.; BUITELAAR, R. M.; PENNINGA, D.; SPREINAT, A.; DIJKHUIZEN, I.; BAHL, H. Cyclodextrin formation by the thermostable α -amylase of *Thermotoga thermophilus* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1257-1265, 1995.

WIND, R. D. Starch-converting enzymes from thermophilic organisms. **Thesis/Dissertation**, University of Groningen, The Netherlands, 1997.

CAPÍTULO II

Aplicação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) como inibidor do escurecimento em batatas

Aplicação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) como inibidor do escurecimento em batatas

Andréia A. J. CARNEIRO¹, Heloiza F. ALVES PRADO¹, Eleni GOMES¹,
Roberto DA SILVA^{1, *}

Universidade Estadual Paulista - UNESP- Laboratório de Bioquímica e Microbiologia
Aplicada, São José do Rio Preto, SP.

E-mail: dasilva@ibilce.unesp.com.br

Resumo

As reações de escurecimento são um dos principais problemas na indústria alimentícia. As restrições ao uso do sulfito, impõe a busca por novos agentes anti-escurecimento. A enzima CGTase age sobre o amido produzindo ciclodextrinas (CDs). As CDs podem ser uma alternativa para controlar o escurecimento de batata devido a sua capacidade de formar complexo de inclusão com componentes da reação de escurecimento. Este trabalho teve como objetivos empregar a enzima CGTase diretamente em batatas, visando controlar o seu escurecimento não enzimático. Além disso, avaliou-se o uso da CD diretamente na inibição do escurecimento enzimático de batatas. Este trabalho mostrou pela primeira vez que tanto a CGTase produzida por *Bacillus clausii* E16 quanto à enzima comercial Toruzyme®, comercializada por Novozymes, foram capazes de controlar o escurecimento químico de batata.

Palavras-chave: CGTase; Ciclodextrina; Reação de Maillard; Fritura; Polifenoloxidase.

Abstract

The browning reactions are one of the principal problems in the food industry. The restrictions on the use of sulfite impose the search for new antibrowning agents. The enzyme CGTase acts on the starch producing cyclodextrins (CDs). The cyclodextrins (CDs) may be an alternative to control the browning of potato due to their capacity to form inclusion complex with the components of the browning reaction. This work had as objectives to use the enzyme CGTase straight in potatoes, aiming to control the their non-enzymatic browning. In addition, evaluated the use of the CD straight in the inhibition of the enzymatic browning of potatoes. This work showed for the first time that both the CGTase produced by *Bacillus clausii* E16 and commercial Toruzyme, commercialized by Novozymes, was able to control the chemical browning of potato.

Keywords: CGTase; Cyclodextrins; Maillard reaction; Frying; Polyphenoloxidase.

* Author to whom correspondence should be addressed.

II.1. INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são maltooligossacarídeos cíclicos não-redutores com 6 a 13 unidades de glicose (BENDER, 1986; KOMTHONG; IGURA; SHIMODA, 2006) ligadas entre si, por ligações glicosídicas α -1,4, produzida pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), uma enzima microbiana que converte o amido em ciclodextrina por meio da reação de ciclização (BENDER, 1986; SOJO et al., 1999). As CDs mais comuns são do tipo α -, β - e γ -, constituídas de seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (SIAN et al., 2005).

A CD foi recentemente estudada como uma alternativa para inibir o escurecimento de alimentos. Os principais grupos de reações de escurecimento são conhecidos como reações de escurecimento enzimático (REE) da polifenoloxidase (PPO) e reações de escurecimento não enzimático (RENE), causado pela reação de Maillard (RM).

O escurecimento enzimático inicia-se com a oxidação dos fenóis endógenos em o-quinona por ação da enzima PPO na presença de oxigênio, formando pigmentos escuros denominados melaninas (ÖZOGLU; BAYMDIRH, 2002).

A prevenção ou a inibição do escurecimento enzimático é a maior preocupação da indústria de alimentos e trabalhos têm sido realizados para eliminar alguns dos fatores essenciais da reação, como o oxigênio, a enzima, o cobre ou os polifenóis (compostos fenólicos) (SOJO et al., 1999).

A RM é uma reação química entre os grupos aminos de aminoácidos e açúcares redutores formando compostos intermediários que resultam nos pigmentos escuros conhecidos como melanoidinas. Recentemente relatou-se a produção de acrilamida em batatas fritas e assadas, em consequência da RM. Com base em numerosos estudos esse composto foi classificado como provável carcinógeno em humanos, causando uma preocupação mundial (FISELIER; GROB; PFEFFERLE, 2004).

As batatas estão sujeitas tanto ao escurecimento enzimático quanto ao não enzimático, sendo assim um importante produto modelo para estudo de controle das duas vias de escurecimento em alimentos.

As batatas (*Solanum tuberosum*) são consumidas diariamente por milhões de pessoas de diversas origens culturais. O consumo de batatas aumentou em aproximadamente 80% em todos os países e a produção excedeu os 300 milhões de toneladas/ano (CLARK, 2003; GARAYO; MOREIRA, 2002). É a hortaliça de maior importância econômica nacional, sendo comercializada quase exclusivamente “in natura”. Seu processamento mínimo tem-se revelado uma importante alternativa para sua industrialização no Brasil. A cor da batata frita é o resultado seja da falta de controle inicial do processo para o escurecimento enzimático, seja da reação de Maillard que depende do conteúdo de açúcares redutores e aminoácidos, da temperatura e do tempo de fritura (MÁRQUEZ; AÑÓN, 1986).

Os nutrientes mais importantes presentes em batatas são os carboidratos, como o amido e açúcar, os ácidos orgânicos e fenóis, como o ácido clorogênico. A concentração de ácido clorogênico representa cerca de 90% do total de compostos fenólicos em batatas (BELL, 1980; FRIEDMAN, 1997a; MONDY; GOSSELIN, 1988). Em batatas, os compostos fenólicos estão principalmente distribuídos nos tecidos entre o córtex e a pele. Na verdade, cerca de 50% dos compostos fenólicos estão localizados na pele e tecidos adjacentes, enquanto que os outros 50% estão no centro do tubérculo (FRIEDMAN, 1997b).

É necessário que a indústria de alimentos encontre métodos alternativos para prevenir o escurecimento de frutas e vegetais, depois da proibição do uso de

bissulfito de sódio pelo FDA em 1986. Com isso as ciclodextrinas naturais podem ser uma alternativa. A sua cavidade interna hidrofóbica é capaz de formar complexo de inclusão com uma variedade de moléculas orgânicas, incluindo alguns polifenóis (CAI et al., 1990). As moléculas de CDs foram propostas como agentes no controle do escurecimento enzimático de produtos de maçã causado pela PPO (SAPERS; HICKS, 1989; BACHEM et al., 1994; CROUZET et al., 1991; BILLAUD et al., 1995; FAYAD et al., 1997) e seu uso na prevenção do escurecimento foi patenteado (HICHS; SAPERS; SEIB, 1990).

O presente estudo teve como objetivo analisar a aplicação da enzima CGTase diretamente em batatas, visando controlar as reações de escurecimento enzimático e não enzimático; bem como analisar o uso direto de CD na inibição da reação de escurecimento enzimático em batatas.

Neste trabalho estudou-se a ação de inibição do escurecimento usando extrato bruto da matéria prima e não componentes individuais.

II.2. MATERIAL E MÉTODOS

II.2.1. Microrganismo e enzima

Foram utilizados o filtrado enzimático (CGTase) produzido pelo *Bacillus clausii* E16, pertencente ao banco de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada-IBILCE/UNESP (ALVES-PRADO, 2002; 2005) e a CGTase comercial Toruzyme® produzida pela Novozymes.

II.2.2. Produção e purificação da CGTase

Utilizou-se o meio proposto por Alves-Prado et al. (2002), composto por 1,35% de amido solúvel (Mallinckrodt Baker); 0,49% de peptona (BioBrás); 0,59% de extrato de levedura (BioBrás); 0,1% de K_2HPO_4 (Nuclear); 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,3% de Na_2CO_3 (Synth), (esterilizado separadamente e adicionado ao meio após resfriado), pH final 10,10. Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL do meio de cultivo foram inoculados com 1 mL de pré inóculo e incubados em Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc) a 35°C, com agitação de 200 rpm por 48 h. O meio foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. As células foram descartadas e o sobrenadante contendo a CGTase foi reservado para os procedimentos experimentais. O sobrenadante foi concentrado pelo sistema Pelicon® (Millipore, Belford, MA, USA) e submetido ao processo de purificação. Assim a CGTase concentrada 40 vezes foi

aplicada em coluna de vidro empacotada com resina Sephadex G-50 e eluída com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, a um fluxo de 0,3 mL/min. Foram coletadas frações de 5 mL, usando coletor de frações (Pharmacia, Biotech Frac-100, Sweden). As frações protéicas foram monitoradas por absorção a 280 nm e por atividade específica para a CGTase. As frações que apresentaram atividade para CGTase, foram unidas, em seguida filtrada em membrana de 0,22 µm de poro (Millipore) e armazenada sob refrigeração.

II.2.3. Batatas

As batatas (*Solanum tuberosum*) foram obtidas no comércio varejista de São José do Rio Preto, SP e foram uniformes no tamanho e na cor. Após a seleção foram lavadas, descascadas e fatiadas com uma faca de aço inoxidável.

II.2.4. Métodos de determinação da atividade enzimática

II.2.4.1. Método fenoltaleína da CGTase

O método aplicado foi o proposto por Mäkelä et al. (1998), modificado por Alves-Prado et al. (2002), onde 0,1 mL de solução enzimática diluída, foi adicionado a 0,8 mL de solução de maltodextrina, a 1,0% (p/v), em tampão acetato 0,1 M, pH 5,6. Após incubação, a 55°C, por 10 minutos a reação foi paralisada com a adição de 4,0 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 0,25 M. Posteriormente, foi acrescentado 0,1 mL de solução de fenoltaleína, a 1 mM. (A absorbância foi determinada a 550 nm, em espectrofotômetro. Porém, somente no momento da leitura e após a adição da solução de Na_2CO_3 que a enzima foi adicionada). O controle foi preparado segundo o processo descrito acima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1 µmol de β-CD, por minuto.

II.2.4.2. Atividade da polifenoloxidase (PPO)

As atividades da PPO foram determinadas a partir da metodologia descrita por González; De Ancos; Cano (2000) com pequenas modificações. Tubos de ensaio contendo 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5, 0,3 mL de catecol 0,2 M e finalmente 0,3 mL do extrato enzimático foram incubados a 25° C. Decorridos 5 minutos da reação, a atividade enzimática foi medida a uma taxa inicial de aumento de absorbância a 540 nm, com o uso de espectrofotômetro. Uma unidade de

atividade foi determinada como a mudança na absorbância por minuto por miligrama de proteína extraída (atividade específica).

II.2.5. Determinação de proteína

A proteína foi determinada pelo método de Hartree-Lowry, usando soro albumina bovina como padrão (HARTREE, 1972). A absorbância foi determinada a 650 nm em espectrofotômetro.

II.2.6. Aplicação da CGTase nos ensaios de escurecimento da batata

II.2.6.1. Escurecimento não enzimático

Para avaliar o efeito da CGTase no escurecimento não enzimático as batatas foram incubadas em solução enzimática em banho-maria a 55°C por diferentes tempos e em seguida foram fritas a 180°C, controles foram incubados apenas em água destilada. Foram utilizadas a CGTase produzida por *Bacillus clausii* E16 (3,5 U/mL) e a CGTase comercial Toruzyme® (4,5 U/mL). Foi mantido um mesmo padrão de fritura por observação visual. O óleo selecionado para a fritura foi o óleo de soja Liza®, obtido do comércio varejista de São José do Rio Preto-SP, em latas de 900 mL. A fritura foi realizada em panela de aço inoxidável, sendo que todas as amostras foram fritas juntas e retiradas após o desenvolvimento da cor típica.

II.2.6.2. Escurecimento enzimático

Para avaliar o escurecimento enzimático as batatas foram incubadas com as enzimas por 30 minutos em banho-maria a 55°C, em seguida foram incubadas por 24 h em estufa de secagem com ventilação a 60°C. Foram preparados controles com ausência de enzimas. O escurecimento na superfície das batatas foi determinado visualmente.

II.2.7. Aplicação da CD nos ensaios de escurecimento enzimático da batata

II.2.7.1. Batata fatiada

A batata foi fatiada no formato de fritura (0,5 x 1 x 5cm) e incubadas com a ciclodextrina comercial (Não pura) na concentração de 100 mg/mL por 30 minutos em banho-maria a 55°C, em seguida foram incubadas por 24 h em estufa de secagem com ventilação a 60°C. Controles foram feitos sem a presença de ciclodextrina. Os resultados foram analisados visualmente.

II.2.7.2. Efeito da β -ciclodextrina no escurecimento do extrato de batata

Para avaliar a complexação da β -CD com o substrato natural foram preparados os extratos enzimáticos de batata utilizando tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5 e água destilada, ambos gelados. Para preparação do extrato foram utilizados 5 g de batata, homogeneizadas em almofariz com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5 e 2 g de areia lavada. Uma outra extração foi realizada com água destilada. Após homogeneização as amostras foram centrifugadas a 13.700 g por 10 minutos a 4°C. Um mililitro do sobrenadante foi transferido para microtubos plásticos de 2 mL contendo diferentes concentrações de β -CD variando de 0-250 mg/mL, mantidos no gelo por 30 minutos e em seguida incubados em banho-maria a 30°C pelo mesmo período. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (Eppendorf centrifuge 5415D) e a absorbância foi determinada a 450, 500 e 540 nm.

II.2.7.3. Efeito da β -ciclodextrina sobre a atividade da PPO

Foi realizada extração enzimática de batatas conforme descrito no item anterior e 0,3 mL dos extratos foram transferidos para microtubos plásticos de 2 mL contendo diferentes concentrações de CD (0, 10, 50, 100 mg/mL). A mistura da reação foi mantida no gelo por 5 minutos e em seguida a temperatura ambiente por 15 minutos. As atividades da PPO foram determinadas a partir da metodologia descrita por González; De Ancos; Cano (2000) com pequenas modificações. Adicionou-se tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5 até completar um volume de 2,4 mL e 0,3 mL de catecol 0,2 M. Essa mistura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e em seguida foi centrifugada e a absorbância foi determinada a 500 e 540 nm.

II.2.7.4. Efeito da combinação da β -ciclodextrina e ácido ascórbico no escurecimento do extrato de batatas e sobre a atividade da PPO

Aproximadamente 25 g de batatas foram trituradas em almofariz com 25 mL de água destilada gelada e 50 ppm de ácido ascórbico (AA), após homogeneização as amostras foram filtradas com gases e o sobrenadante foi coletado em Erlenmeyer contendo 4% de β -CD. As amostras foram mantidas sob agitação e alíquotas de 1 mL foram retiradas de hora em hora, até se completarem 2 h. O material foi centrifugado a 2.500 g por 5 minutos. A taxa de escurecimento foi determinada no sobrenadante

por medida de absorbância a 450, 500, 540 nm e pela determinação da atividade da PPO. O controle foi preparado conforme o processo descrito, sem a adição da β -CD.

II.2.7.5. Teste qualitativo da presença de ciclodextrina em batatas

As amostras de batatas tratadas ou não com a enzima foram incubadas em banho de ebulição a 100°C por 5 minutos, posteriormente foram incubadas em 8 mL de uma solução de carbonato de sódio 0,25 M contendo 0,2 mL de solução de fenolftaleína 2 mM (em etanol 50%), em seguida foi visualizada a intensidade da coloração. As amostras controles sem adição de CGTase, foram comparados com as amostras incubadas em presença de CGTase e assim, foi relacionada à diminuição da cor rosa. Partindo do princípio da metodologia para determinação da atividade da CGTase, quando há formação de CD pela ação da CGTase, esta forma um complexo CD-fenolftaleína ocasionando diminuição da cor rosa.

II.2.7.6. Efeito da CGTase na reação de Maillard a partir de aminoácidos

Verificou-se a ação da CGTase produzida por *Bacillus clausii* E16 e da CGTase comercial Toruzyme® na reação de Maillard, com os aminoácidos glicina e lisina. Foram analisadas 6 diferentes misturas de reação em presença dos aminoácidos lisina e glicina a 1M, conforme tabela 1. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho-maria a 100°C por 2 horas. Os resultados foram analisados visualmente.

Tabela 1- Síntese das 6 diferentes misturas da reação de Maillard.

Tubos	1	2	3	4	5	6
		1 mL de aa 1M	1 mL de aa 1M		1 mL de aa 1M	1 mL de aa 1M
	1 mL de aa 1M	+	+	1 mL de aa 1M	+	+
Lisina e Glicina	+	0,5 mL de glicose 1M	0,5 mL de glicose 1M	+	0,5 mL de arabinose 1M	0,5 mL de arabinose 1M
	1 mL de glicose 1M	+	+	1 mL de arabinose 1M	+	+
		0,5 mL de metabissulfito de sódio 0,1M	0,5 mL de CGTase <i>B. clausii</i>		0,5 mL de metabissulfito de sódio 0,1M	0,5 mL de CGTase Toruzyme®

II.2.7.7. Efeito da ciclodextrina na reação de Maillard a partir de aminoácidos

Analizou-se a ação da β -CD na reação de Maillard com aminoácidos glicina, prolina, valina, fenilalanina, ácido aspártico e triptofano, associada aos açúcares glicose e arabinose. Em microtubo plástico de 2 mL adicionou-se 0,05 g de β -CD e 0,05 g de cada aminoácido separadamente. Estes foram homogeneizados por 5 minutos, em seguida adicionou-se 0,1 mL de água destilada, formando uma pasta, que foi homogeneizada em agitador de tubos. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 9.300 g por 10 minutos, após 1 h de incubação a 65°C os tubos foram transferidos para a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se a glicose (0,09 g) ou a arabinose (0,08 g) e 0,9 mL de água destilada. As amostras foram incubadas em banho-maria a 100°C por 4 h, realizando leituras em intervalos de 2 h. Antes da leitura, as amostras foram resfriadas e a absorbância foi determinada a 420, 500 e 540 nm. O controle foi preparado sem a β -CD.

II.2.7.8. Efeito da ciclodextrina com o aminoácido tirosina

A tirosina foi incubada com a β -CD a 20°C em Shaker com agitação de 200 rpm por 24 h. A solução de tirosina e CD foi preparada a 1mM (em etanol 50%). A absorbância foi determinada por meio do espectro de absorção. Os controles (sem β -CD) foram comparados com as amostras (com β -CD).

II.2.7.9. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Amostras de batatas (2 mg) tratadas ou não com ambas as CGTases em estudo, e amostras de β -CD foram pesadas em cápsulas padrão de alumínio (0219-0062, PERKIN- ELMER), seladas, aquecidas a uma razão de 10°C por minuto, na faixa de temperatura de 35° a 250°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio em 20 mL por minuto. As amostras foram feitas em duplicata (FICARRA et al., 2002). O tratamento da amostra foi realizado adicionando a enzima ou água destilada diretamente em fatias de batatas, foram maceradas em almofariz e a massa formada foi incubada em banho a 55°C por 30 minutos. Posteriormente as amostras foram liofilizadas e armazenadas no freezer a - 80°C.

II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.3.1. Purificação parcial da enzima

Observou-se um pico bem isolado mostrando atividade da CGTase, portanto pode-se considerar que esta purificação parcial foi eficaz no isolamento da CGTase, como pode ser verificado na Figura 1. O uso da CGTase parcialmente purificada teve como objetivo evitar a presença de outras enzimas de menor peso molecular e outros compostos da fermentação, como pigmento e toxinas, tornando-as mais puras. A Tabela 2 sintetiza os processos de purificação parcial da CGTase. As frações coletadas no volume da eluição que apresentaram atividade da CGTase foram unidas e concentradas, este concentrado foi utilizado nas análises subseqüentes. O processo de purificação da enzima apresentou um rendimento final de 29,5% e um fator de purificação 4,4 vezes.

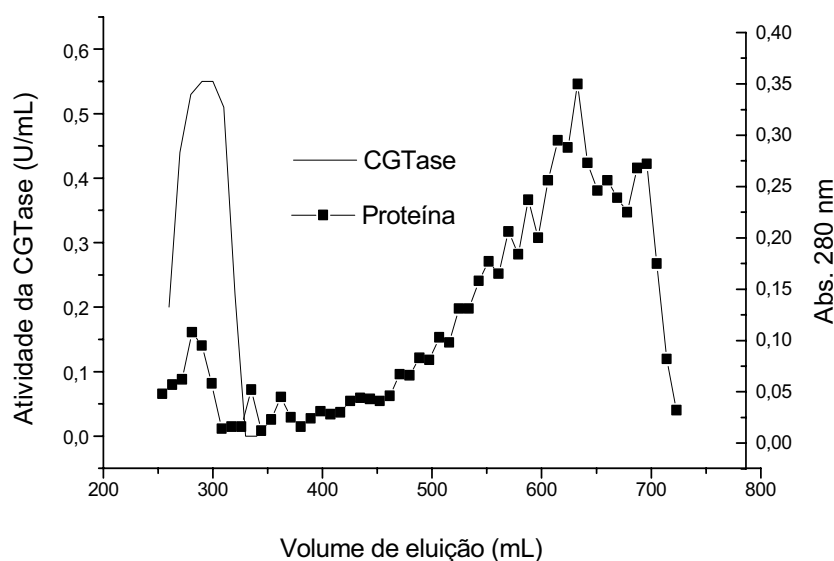


Figura 1- Perfil de eluição da CGTase de *Bacillus clausii* E16 em gel filtração.

Tabela 2- Síntese do processo de purificação parcial da CGTase produzida por *Bacillus clausii* E16.

<i>Etapas</i>	<i>Volume total (mL)</i>	<i>Atividade da CGTase (U/mL)</i>	<i>Atividade total da CGTase (U)</i>	<i>Proteína (mg/mL)</i>	<i>Proteína total (mg)</i>	<i>Atividade específica (U/mg)</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Fator de purificação</i>
CGTase bruta	425	1,05	446,25	1,40	595,0	0,75	100	1
Concentração por Pelicon®	45	3,32	149,40	1,61	72,45	2,06	33,5	2,8
Gel filtração Sephadex G-50	80	1,64	131,20	0,50	40,0	3,28	29,4	4,4

*atividade da CGTase foi determinada pelo método fenoltaleína.

II.3.2. Efeito da CGTase no escurecimento de batata

a) Escurecimento não enzimático

Observou-se que o tratamento das amostras com a CGTase produzida por *B. clausii* E16 e com a CGTase comercial Toruzyme® inibiram o escurecimento das batatas, interferindo na reação de Maillard, quando comparado com a amostra controle sem enzima. Verificou-se também, que os tempos de tratamento de 10 e 60 minutos foram efetivos na inibição do escurecimento, para ambas as enzimas testadas.

Como pode ser verificado na Figura 2, a amostra tratada previamente com CGTase apresentou coloração mais clara em relação às amostras não tratadas. Existe uma co-relação direta do desenvolvimento da cor e a reação de Maillard, portanto pode-se concluir que a ação da CGTase inibiu esta reação. Isso provavelmente ocorreu devido a dois fatores: a) diminuição de seus açúcares redutores, necessário para a RM, por meio da ação transglicosidase desta enzima e a CD formada por ação enzimática pode ter complexado os intermediários da reação de Maillard e reduzido à formação final do pigmento melanoidina responsável pela cor escura.

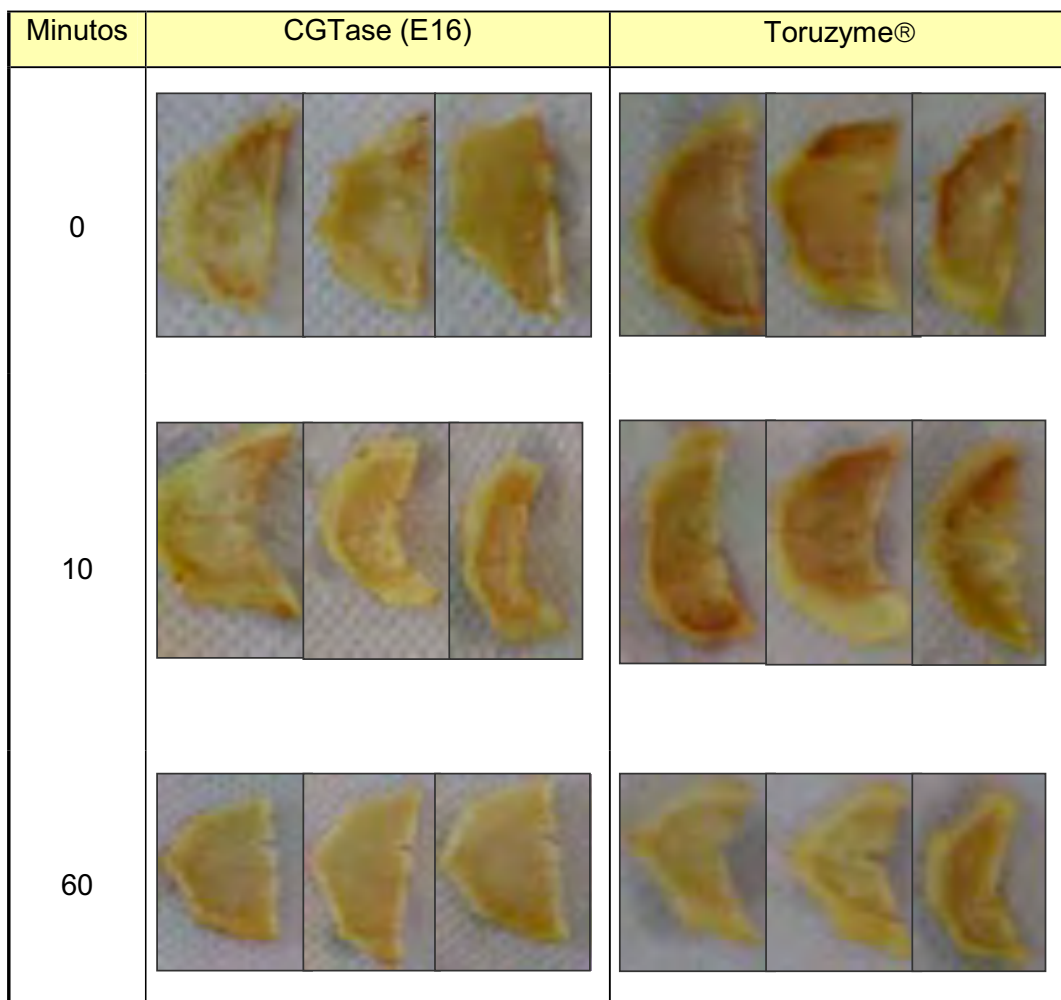


Figura 2- Ação da CGTase produzida por *B. clausii* E16 e da CGTase Toruzyme® no escurecimento não enzimático de batata. O tempo 0 corresponde ao controle, sem tratamento enzimático.

b) Escurecimento enzimático

Assim como na reação de escurecimento não enzimático, verificou-se que tanto a CGTase de *B. clausii* E16 quanto à enzima comercial Toruzyme® apresentaram efeito inibidor do escurecimento da batata durante a secagem. Entretanto, a enzima comercial apresentou melhor efeito comparado com a CGTase produzida no nosso laboratório, como pode ser visualizado na Figura 3. Isso provavelmente ocorreu devido à maior atividade da CGTase no extrato comercial. Possivelmente por causa da ação da CGTase no amido ocorreu a formação da CD, ocasionando a diminuição do escurecimento e conseqüente complexação com algum dos substratos.



Figura 3- Ação da CGTase produzida por *B. clausii* E16 e da CGTase Toruzyme® no escurecimento enzimático de batata.

II.3.3. Aplicação da CD nos ensaios de escurecimento enzimático de batata

II.3.3.1. Batata fatiada

A adição direta da ciclodextrina mostra que a mesma atuou de forma significativa na superfície de batata, Figura 4. Pode-se considerar que ocorreu a complexação da CD com o substrato natural (tirosina, ácido clorogênico ou caféico) ocasionando a diminuição na tonalidade da cor. Estes resultados são diferentes do relato de SAPERS et al. (1989) que não foram efetivos em maçãs fatiadas, devido à lenta difusão da CD para o interior das camadas celulares, a qual resultou na falta da formação do complexo com os substratos da PPO. Alvarez-Parilla et al. (2006), também observaram este tipo de comportamento em maçãs fatiadas tratadas com β -CD em combinação com o metil jasmonato (MJ).



Figura 4- Ação da ciclodextrina no escurecimento enzimático de batata.

II.3.3.2. Efeito da β -ciclodextrina no escurecimento do extrato de batata

Verificou-se que na presença de β -CD houve uma redução na formação de cor do extrato, avaliado por meio de suas respectivas absorbâncias. À medida que aumentou-se a concentração de CD observou-se um contínuo decréscimo na coloração, acompanhou ao aumento da concentração de CD, Figura 5. Isto ocorreu tanto na extração aquosa quanto em presença de tampão fosfato. Essa inibição de formação de cor ocorreu provavelmente devido à formação do complexo de inclusão com algum produto ou substrato da PPO, prevenindo assim a oxidação das quinonas e a sua subsequente polimerização em pigmentos escuros.

Sojo et al. (1999), apresentaram resultados semelhantes com a extração de polpa de banana, utilizando o 2-hidroxipropil- β -CDs. A oxidação da dopamina, o substrato natural da banana, em presença de CD não foi afetado, porque este fenol hidrofílico não forma complexo de inclusão com a CD, entretanto, com a adição de fenol hidrofóbico como o tert-butilcatecol (TBC) ocorreu à inibição do escurecimento, por ação de β -hidroxipropil- β -CD e maltosil- β -CD.

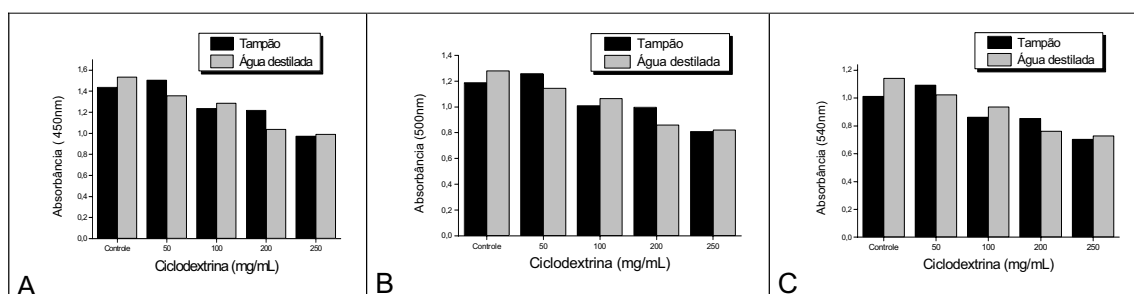


Figura 5- Ação da β -ciclodextrina com o extrato enzimático de batata. A) 450 nm, B) 500 nm e C) 540 nm.

II.3.3.3. Efeito da β -ciclodextrina na atividade da PPO

O extrato enzimático bruto da PPO obtido como descrito no item 2.7.2 de materiais e métodos foi ensaiado na presença da CD. Verificou-se um contínuo aumento na inibição do escurecimento, acompanhado a concentração de CD, Figura 6. Esse fato pode ser devido a encapsulação de produtos ou substratos da PPO pela CD, prevenindo a oxidação das quinonas e a sua polimerização em pigmentos escuros.

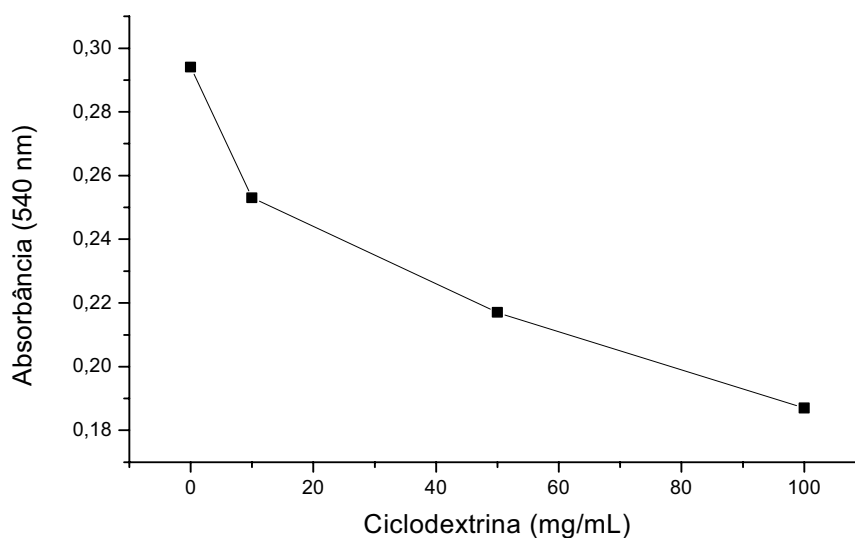


Figura 6- Ação da β -ciclodextrina na atividade da PPO.

Os resultados encontrados mostraram-se condizentes com aqueles obtidos por Billaud et al. (1995), que encontraram em suco de maçã uma redução do oxigênio consumido pela PPO por ação da β -CD, utilizando-se o ácido clorogênico e a catequina como substrato fenólico. Resultados similares também foram encontrados por Laveta et al. (2000), onde avaliaram o efeito entre os substratos dopamina e TBC com o dodecil sulfato de sódio (SDS) na cavidade de 2-hidroxipropil- β -CD para determinação da atividade da PPO de pêssego. A enzima foi primeiramente ativada pelo SDS e com o aumento da concentração de CD houve diminuição da atividade enzimática, indicativo da complexação com o SDS, o que permitiu a enzima de retornar a seu estado latente. Quando se utilizou o TBC, a atividade da enzima foi interrompida com o aumento da concentração de CD. Esse efeito foi atribuído a complexação do TBC na cavidade hidrofóbica da CD. Resultado semelhante também foi encontrado por Núñez-Delicado et al. (1999) na inibição da atividade da hidroperoxidase usando o TBC como substrato. Para constatar que a complexação entre o TBC e a CD foi o único fator envolvido neste processo inibitório, foi realizada uma análise similar onde a enzima foi ativada com choque ácido em pH 4,0 ao invés de se usar o SDS. Observou-se a diminuição na atividade enzimática com o aumento da concentração de CD. Isto indica que o único fator na inibição da PPO foi a encapsulação do TBC pela CD.

II.3.3.4. Efeito da combinação de β -ciclodextrina e ácido ascórbico no escurecimento do extrato de batatas e sobre a atividade da PPO

A fim de avaliar o efeito sinérgico dos inibidores na ação da enzima, AA e CD foram ensaiados simultaneamente. Observou-se que a combinação de 4% de β -CD com 50 ppm de AA resultou na diminuição do escurecimento por até 2 h em condições refrigeradas, Figura 7. Esse efeito sinérgico apresentou maior inibição em relação a tratamentos utilizando apenas o AA. A eficiência do AA como inibidor do escurecimento é temporário, porque o escurecimento pode ser reativado depois do AA ser completamente reduzido a ácido dehidroascórbico (KOMTHONG; IGURA; SHIMODA, 2006).

Esse trabalho apresentou coerência com os resultados encontrados por Hicks et al. (1996), onde verificaram o efeito sinérgico na prevenção do escurecimento de suco de maçã tratado com derivados de CD em combinação com o fosfato ao longo de 2-3 semanas a 4°C e por mais de 25 h a temperatura ambiente. SAPERS et al. (1989), encontraram efeito semelhante em suco de maçã tratado com β -CD ou sua combinação com o ácido ascórbico, ácido-2-fosfato ou ascorbil palmitato.

López-Nicolás et al. (2006), verificaram que a combinação de maltosil- β -CD e AA apresentou efeito sinérgico semelhante ao nosso, este efeito foi melhor do que a soma dos dois. A fase lag na presença de 60 mM de maltosil- β -CD e 2,28 mM de AA foi de 32 minutos, enquanto que para maltosil- β -CD foi de 6 minutos e ausência da fase lag para o AA. A fase lag representa o tempo que o AA é protegido pela CD, com o término deste período o AA pode ser completamente oxidado a ácido dehidroascórbico e as o-quinonas podem acumular e iniciar o escurecimento do suco de maçã.

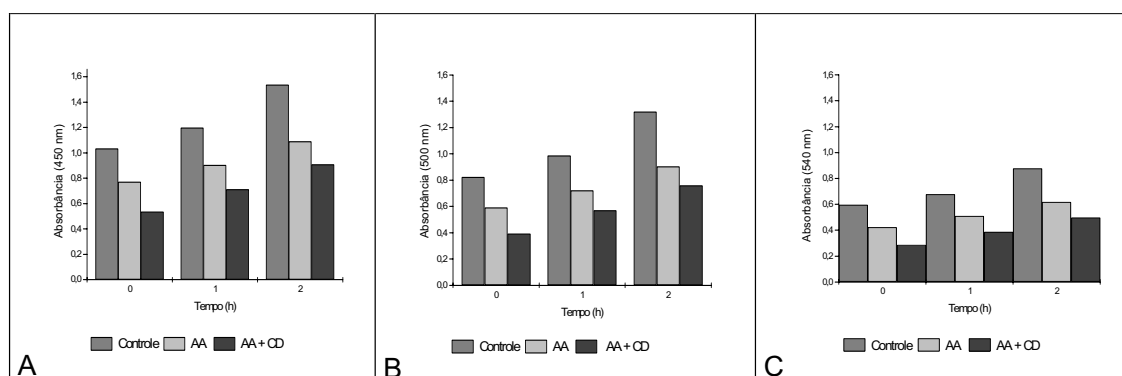


Figura 7- Ação da β -ciclodextrina em combinação com o ácido ascórbico no extrato enzimático de batata. A) 450 nm, B) 500 nm e C) 540 nm.

Durante o tratamento do extrato enzimático de batatas com a combinação de AA e β -CD, observou-se uma diminuição na atividade da PPO, Figura 8. Nota-se também que a combinação AA e β -CD foi mais efetiva na atividade da PPO. Resultados similares mostraram a inibição da PPO (GACCHE; ZORE; GHOLE, 2003) e lipoxigenase (NÚÑEZ-DELICADO et al., 1997), onde derivados de β -CD foram combinados com AA e seus derivados. Estes autores avaliaram o efeito do 2-H- β -CD em sinergismo com o ácido ascórbico extraído do Kiwi, onde este derivado de CD agiu contra a oxidação do PMC (pentametilcromo-6-ol) causado pela lipoxigenase extraída de semente de soja. López-Nicolás et al. (2006), observaram que a maltosil- β -CD apresentou melhores resultados quanto a inibição da atividade da PPO de suco de maçã, comparada com α -, β - e γ -CD, provavelmente porque a maltosil- β -CD apresentou maior afinidade com os compostos fenólicos responsáveis pelo escurecimento. Alvarez-Parilla et al. (2006), observaram efeito semelhante em seus estudos com β -CD contra a oxidação do ácido clorogênico consumido pela PPO de maçã, este efeito foi menos evidente com o aumento da concentração do substrato. Em contraste aos resultados acima, o efeito sinérgico da β -CD combinado com 4-hexilresorcinol foi mais evidente com o aumento da concentração do substrato. Portanto a CD reduziu a concentração de ácido clorogênico livre que poderia ter sido oxidado, enquanto que o 4-hexilresorcinol interagiu diretamente com a enzima pelo mecanismo competitivo, conseqüentemente a combinação dos dois inibidores reduziu a atividade da PPO a um nível maior. Resultados semelhantes foram constatados por Alvarez-Parilla et al. (2005), o efeito inibitório da β -CD na atividade da PPO de maçã

foi atribuído à redução do substrato livre como consequência do processo de complexação entre os compostos fenólicos e a CD.

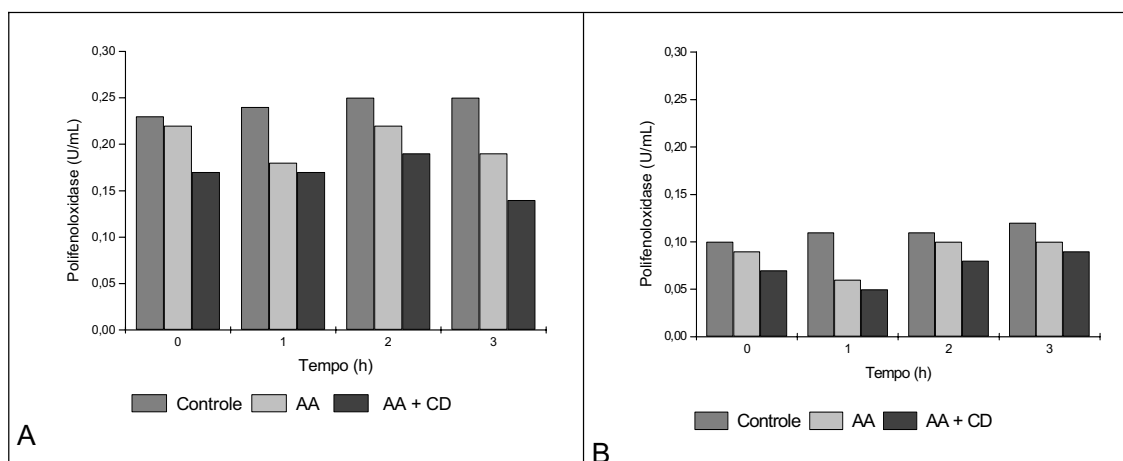


Figura 8- Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico na atividade da PPO. A) 500 nm e B) 540 nm.

II.3.4. Teste qualitativo da presença de ciclodextrina em batatas

Após tratamento enzimático, as batatas foram incubadas em solução de fenolftaleína, que é um corante usado como um indicador ácido-base, em pH alcalino tem coloração rosa escuro e pH ácido é incolor. A intensidade de coloração foi analisada mediante observação visual. As amostras controles, sem exposição às enzimas, foram comparadas às amostras submetidas a tratamento enzimático. Observou-se uma diminuição da cor rosa nas batatas tratadas com a CGTase produzida pelo *Bacillus clausii* E16 (3,5 U/mL) e na CGTase comercial Toruzyme® (4,5 U/mL), Figura 9. A diminuição da coloração provavelmente foi devida à formação de CD, pela ação das CGTases no amido da batata, que por sua vez complexou com fenolftaleína causando a redução da coloração rosa.

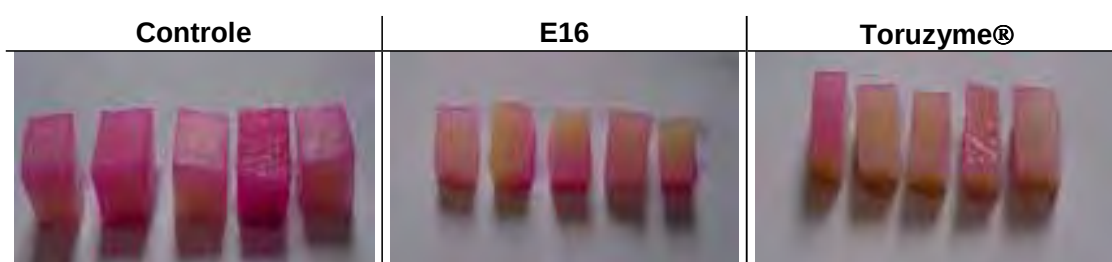


Figura 9- O efeito das enzimas com o substrato natural de batata.

II.3.5. Efeito da CGTase na reação de Maillard a partir de aminoácidos

Após o tratamento enzimático os aminoácidos foram incubados em banho-maria a 100°C por 2 h, os resultados foram observados visualmente. Observou-se que na presença das enzimas CGTase e Toruzyme® houve uma diminuição do escurecimento na presença do aminoácido glicina em relação aos respectivos controles sem inibidor (glicose e arabinose) conforme a Figura 10. Isso se deve provavelmente a diminuição dos açúcares redutores, necessários para a reação de Maillard por meio da ação de desproporcionamento desta enzima, ocasionando menor escurecimento. A velocidade da reação depende muito da molécula de carboidrato, uma vez que os açúcares têm diferentes pesos moleculares, dessa forma a velocidade está relacionada com a quantidade de forma acíclica que cada açúcar tem em solução. Assim como para os carboidratos, a estrutura molecular dos aminoácidos é importante para a velocidade da reação, sendo esta afetada pelo pH e dependente do ponto isoelétrico de cada aminoácido.

	CGTase						Toruzyme®					
Tubos	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Glicina												
Lisina												

Figura 10- Efeito das enzimas E16 e Toruzyme® na velocidade da reação de Maillard. Tubos: 1- glicose; 2- glicose + metabissulfito; 3- glicose + enzima; 4-arabinose; 5- arabinose + metabissulfito e no tubo 6- arabinose + enzima.

II.3.6. Efeito da ciclodextrina na reação de Maillard a partir de aminoácidos

Durante a reação de Maillard os açúcares e os aminoácidos reagem formando componentes complexos conhecidos como melanoidinas. Utilizando-se 0,05 g de β -ciclodextrina e 0,5 M dos açúcares, observou-se uma diminuição da formação de melanoidinas ocorrendo uma considerável mudança de cor, conforme Figuras 11, 12 e 13. Isto ocorreu provavelmente devido a encapsulação dos aminoácidos pela CD, resultando em um menor teor de aminoácido para reagir com o açúcar redutor. A coloração foi mais intensa no intervalo de 4 h principalmente na reação que envolvia a arabinose. Porém, os resultados mais significativos foram para os aminoácidos prolina e triptofano no intervalo de 2 h e ácido aspártico em 4 h, na absorbância de 450, 500 e 540 nm.

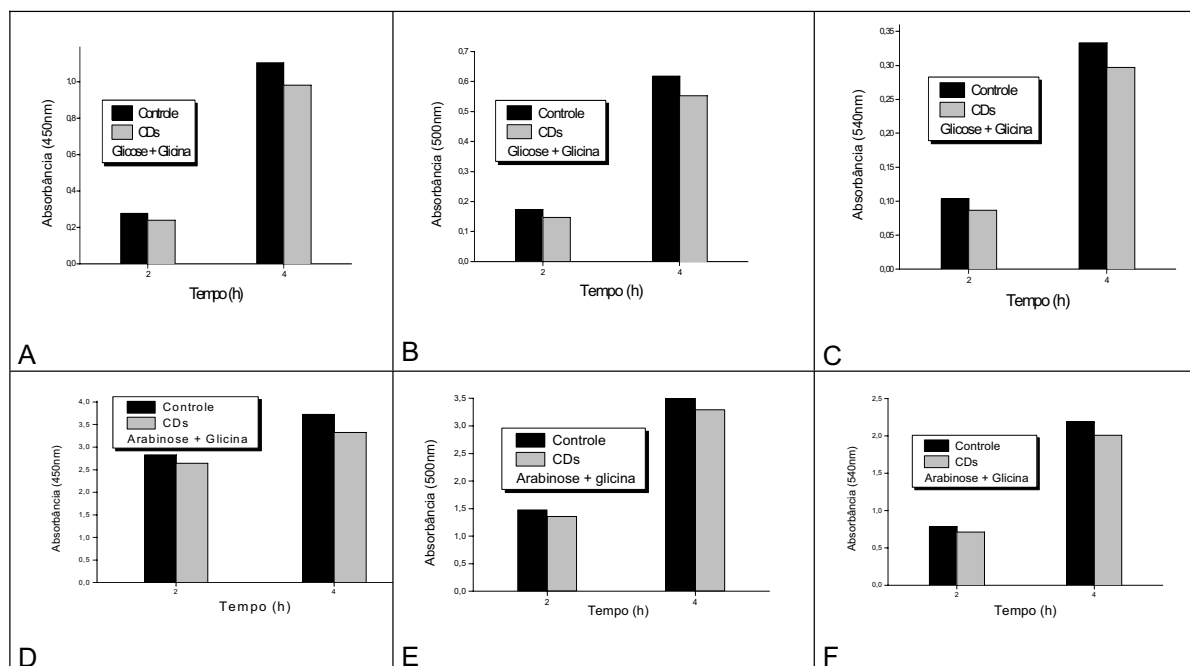


Figura 11- Efeito da β -ciclodextrina na reação de Maillard em presença de glicose e glicina (A, B e C) e de arabinose e glicina (D, E e F) ao longo do tempo.

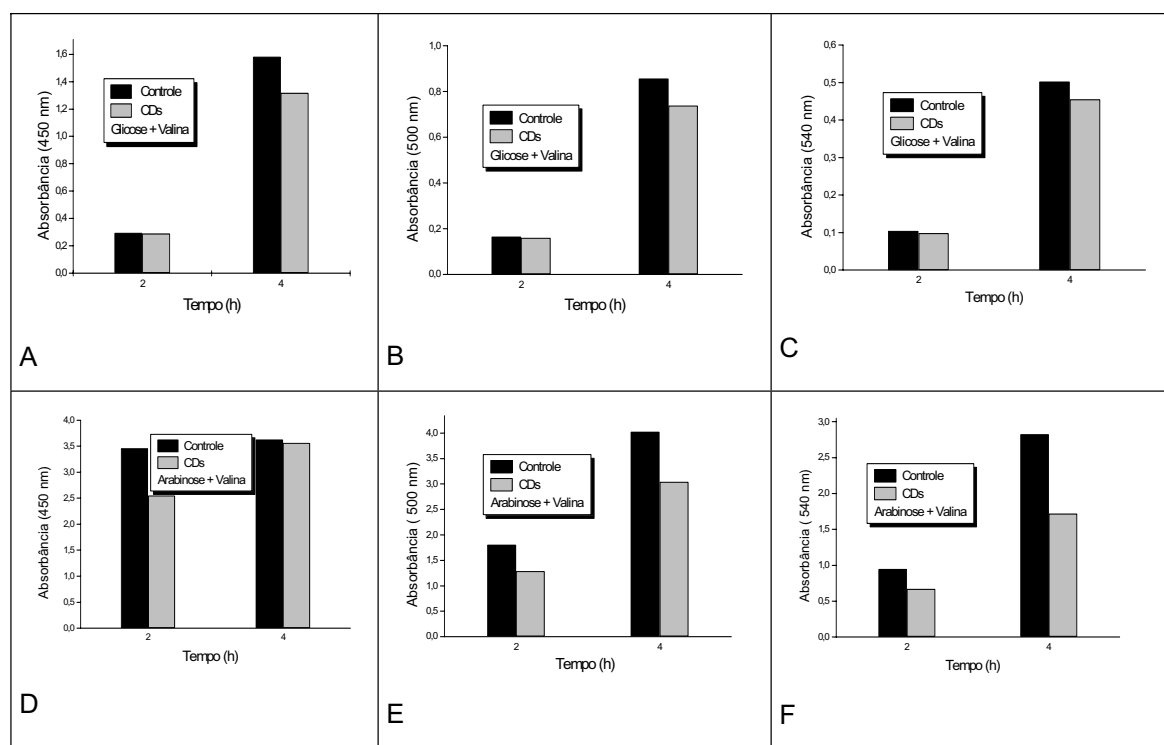


Figura 12- Efeito da β -ciclodextrina na reação de Maillard em presença de glicose e valina (A, B e C) e de arabinose e valina (D, E e F) ao longo do tempo.

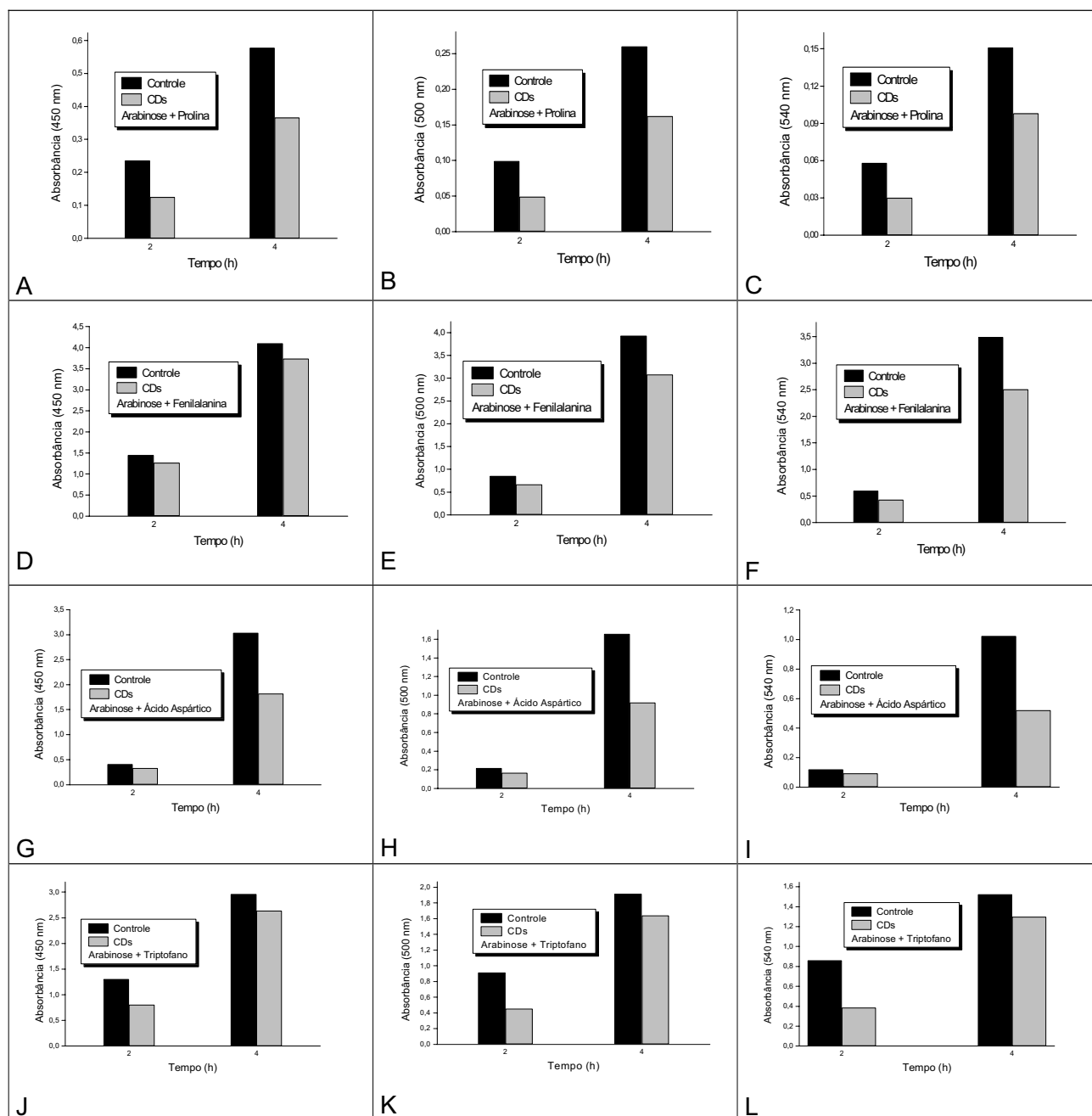


Figura 13- Efeito da β -ciclodextrina na reação de Maillard em presença de arabinose e prolina (A, B C) arabinose e fenilalanina (D, E e F) arabinose e ácido aspártico (G, H e I) arabinose e triptofano (J, K e L) ao longo do tempo.

II.3.7. Efeito da ciclodextrina com o aminoácido tirosina

A tirosina é um dos compostos fenólicos mais abundantes em batata, sua concentração provavelmente influencia a taxa de escurecimento desse tubérculo, devido a essa característica foi incubada com e sem a β -CD, com a finalidade de formar complexo de inclusão com esse aminoácido aromático. As amostras analisadas pelo espectro de absorção apresentaram uma diminuição na absorbância a 275 nm, em relação à amostra com água destilada, convenientemente diluída (2x), conforme a Figura 14. Esta característica pode ser atribuída a formação do complexo de inclusão da CD com a “molécula hospéde”, onde as CDs e seus derivados são conhecidos por encapsular uma variedade de compostos, incluindo aminoácidos aromáticos. Na literatura há exemplos de como esse complexo é formado com o L-tirosina, L-fenilalanina, L-triptofano (LEWIS; HANSEN, 1973; INOUE; OKUDA; MIYATA, 1982; GASTRONUOVO, 1995 citado por KORALEWSKA et al. 2004).

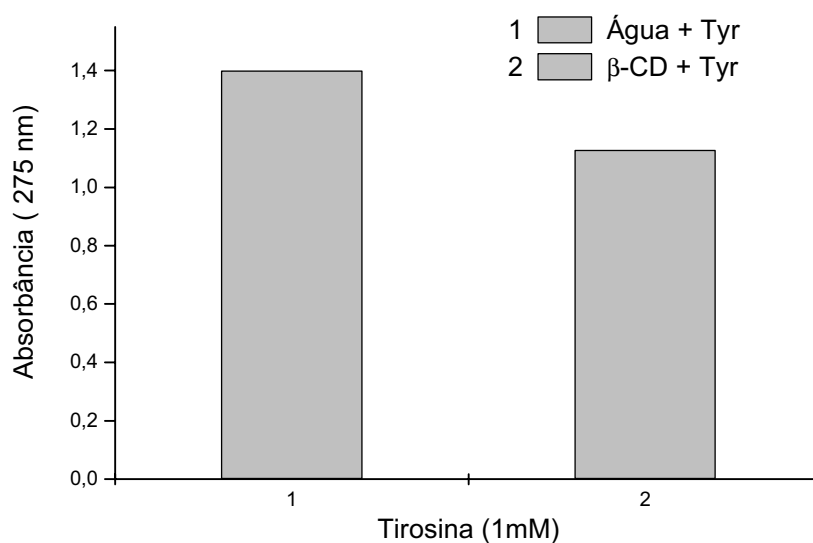


Figura 14- Ação da β -ciclodextrina com o aminoácido tirosina.

II.3.8. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise de DSC foi utilizada com o propósito de avaliar a formação do complexo de inclusão da CD formada pela ação da CGTase em batatas, com intermediários da reação de escurecimento.

Segundo Szejtli (1988) e Liu et al. (2006) a complexação é geralmente verificada pelo desaparecimento do pico endotérmico, característica da molécula encapsulada, fato esse atribuído ao estado amorfo, à formação do complexo, ou a ambos. Além disso, a temperatura de início de decomposição da β -CD pode ser também responsável por este resultado.

Analisando-se as curvas de DSC (Figuras 15a, 15b e 15c) na faixa de temperatura (185-190°C) observa-se que o pico referente à batata tratada com a enzima comercial diminuiu, em relação a β -CD e batata pura, e, portanto, pode-se considerar que ocorreu a formação do complexo. Essa característica se deve provavelmente à produção de CD pela ação de CGTase em presença do substrato natural (amido de batata) e conseqüentemente sua ação complexante interagindo com os agentes responsáveis pelo escurecimento, tais como o ácido clorogênico, tirosina e ácido caféico. Este comportamento também foi observado por Bergamasco (2003) onde os termogramas de DSC para os produtos (sulfluramida: β -CD) obtidos a partir dos métodos de co-precipitação, *Kneading* e mistura física foram menores que a temperatura da β -CD, indicando a inclusão da sulfluramida na sua cavidade. Segundo Alvarez-Parrilla et al. (2005) e Ficarra et al. (2002), as análises de DSC dos produtos (polifenóis: β -CD) obtidos pelos métodos de co-precipitação e mistura física não apresentaram pico de fusão do ácido clorogênico a 212°C, quercetina a 323°C, rutina a 184°C, hesperitina a 227°C, hesperidina a 263°C, naringenina a 247°C e naringina a 249°C como resultado da interação da “molécula hospede” na cavidade da CD. As ciclodextrinas não apresentam ponto de fusão definido (SZEJTIL, 1988). Para análise dos complexos, a “molécula hóspede” deverá ter ponto de fusão menor que 300°C, visto que é a temperatura que a CD se decompõe (HEDGES, 1998).

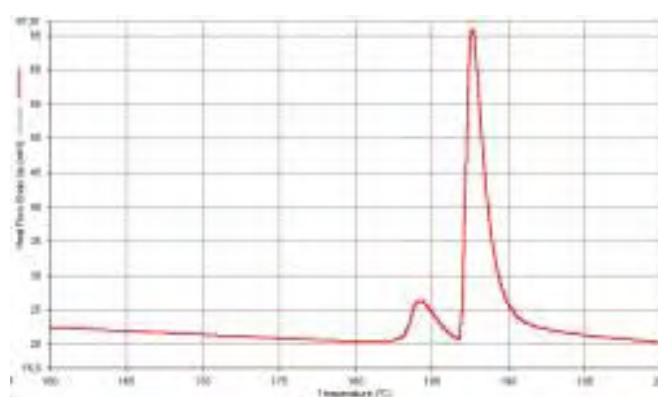
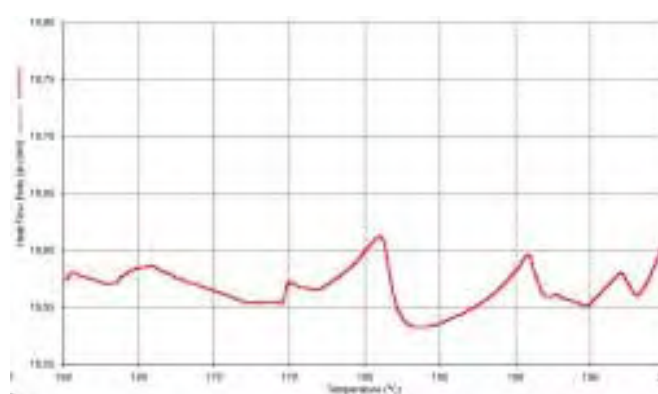
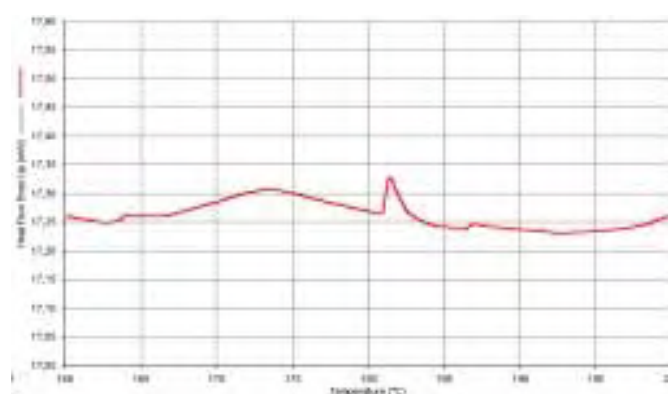
a**b****c**

Figura 15- Curvas de DSC. a: β -ciclodextrina; b: somente batata; c: batata tratada com CGTase comercial.

II.4. CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi empregar a ciclodextrina (CD) como inibidor do escurecimento em alimentos. O ineditismo da proposta é que não aplicamos a CD diretamente no alimento, mas sim a enzima responsável por sua produção, a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), diminuindo assim o custo do processo. O fato de ainda não ter relatos da aplicação da CGTase diretamente nos alimentos no que se refere a controle de cor motivou nossa proposição. Resultados até agora obtidos, mostraram que ambas as CGTases foram capazes de controlar o escurecimento enzimático e não enzimático de batatas. Isso ocorreu provavelmente devido à produção de CD pela ação da CGTase no próprio substrato natural (amido de batata) e por consequência sua ação complexante junto aos agentes responsáveis pelo escurecimento. Pode ser considerada ainda, a diminuição da reação de Maillard tenha ocorrido simplesmente devido à presença dos açúcares redutores disponíveis, consumidos pela reação de transglicosilação da CGTase. O teste com fenoltaleína, onde observou-se a diminuição da cor rosa nas batatas tratadas com ambas as CGTases evidenciou a produção de CD e sua complexação com a fenoltaleína.

A fim de avaliar o efeito sinérgico dos inibidores na ação da PPO, AA e CD foram ensaiados simultaneamente. Foi observada uma redução significativa na cor do extrato de batata tratado com a combinação β -CD e AA, onde provavelmente ocorreu complexação da CD com os compostos fenólicos responsáveis pelo escurecimento.

O efeito da CD na reação de Maillard a partir de aminoácidos e açúcares, foi de redução do escurecimento, ocorrido provavelmente pela encapsulação dos aminoácidos ou compostos da reação com a CD, ocasionando diminuição na formação de melanoidinas.

Os termogramas do DSC indicaram a possível formação do complexo de inclusão polifenóis/CD referente à diminuição do pico da batata tratada com CGTase.

Testes utilizando a CD foram necessários para correlacionar aos resultados da enzima CGTase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L. A.; TORRES-RIVAS, F.; RODRIGO-GARCÍA, J.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD). **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 53, p. 121-129, 2005.

ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L. A.; RODRIGO-GARCÍA, J.; ESCOBEDO-GONZÁLEZ, R.; MERCADO-MERCADO, G.; MOYERS-MONTOYA, E.; VÁZQUEL-FLORES, A.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Dual effect of β -cyclodextrin (β -CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ). **Food Chemistry**, 2006. In press.

ALVES-PRADO, H. F. **Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e *Bacillus clausii* E16: caracterização das ciclodextrinas, clonagem e seqüenciamento do gene da CGTase de *Bacillus clausii***. 2005. 150 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

ALVES-PRADO, H. F.; HILÁRIO, E.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 189-196, 2002.

BACHEM, C. W. B.; SPECKMANN, G. F.; VAN DER LINDE, P. C. G.; BERHEGGEN, F. T. M.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C.; ZABEAU, M. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. **Bio/Technologie**, v. 12, p. 1101-1105, 1994.

BELL, A. A. The time sequence of defence. In: J. G. Horsfall and E. B. Cowling (Ed), **Plant 7 disease, an advanced treatise**. New York: Academic Press, p. 53-73, 1980.

BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 6, p. 31-71, 1986.

BERGAMASCO, R. D. C. **Complexação de sulfluramida em ciclodextrina**. 2003. 74. p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2003.

BILLAUD, C.; REGAUDIE, E.; FAYAD, N.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. Effect of cyclodextrins on polyphenol oxidation catalyzed by apple polyphenol oxidase. In:

ACS SYMPOSIUM SERIES 600. **Enzymatic browning and its prevention**, 1994, Washington: American Chemical Society, 1995, p. 295-312.

CAI, Y.; GAFFNEY, H. G.; LILLEY, T. H.; MAGNOLATO, D.; MARTIN, R.; SPENCER, C. M.; HASLAM, E. Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. **Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions II. Physical, Organic Chemistry**, v. 2, p. 2197-2209, 1990.

CLARK, J. P. Happy birthday, potato chip! and other snack developments. **Food Technology**, v. 57, p. 89-92, 2003.

CROUZET, J.; BASTIER, P.; SIGNORET, A.; MENTINK, L. Enzymatic browning inhibition by cyclodextrin. **Food Ingredients Europe: Conference Proceedings**; Expoconsult Publishers: Maarsen, The Netherlands, 1991, p. 293-295.

FAYAD, N.; MARCHAL, L.; BILLAUD, C.; NICOLAS, J. Comparison of β -cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenoloxidase from different sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2442-2446, 1997.

FICARRA, R.; TOMMASINI, S.; RANERI, D.; CALABRÓ, M. L.; DI BELLA, M. R.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, M. C.; FICARRA, P. Study of flavonoids/ β -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 1005-1014, 2002.

FISELIER, K.; GROB, K.; PFEFFERLE, A. Brown potato croquettes low in acrylamide by coating with egg/ breadcrumb. **Food Technology**, v. 219, p. 111-115, 2004.

FRIEDMAN, M. Potato polyphenols: role in the plant and in the diet. In: F. Shaid (Ed), **Antinutrients and phytochemicals in food**, Washington, DC: American Chemical Society, p. 61-93, 1997a.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1523-1540, 1997b.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.

GACCHE, R. N.; ZORE, G. B.; GHOLE, V. S. Kinetics of inhibition of polyphenol oxidase mediated browning in apple juice by beta-cyclodextrin and L-ascorbate-2-triphosphate. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1-5, 2003.

GARAYO, J.; MOREIRA, R. Vacuum frying of potato chips. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 181-191, 2002.

GONZÁLEZ, E. M.; DE ANCOS, B.; CANO, M. P. Partial characterization of peroxidase and polyphenoloxidase activities in blackberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5459-5464, 2000.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HEDGES, R. A. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2035-2044, 1998.

HICKS, K. B.; SAPERS, G. M.; SEIB, P. A. **Process for preserving rawfruit and vegetables juices using cyclodextrins and compositions** thereof. U.S. Patent 4,975,293, 1990.

HICKS, K. B.; HAINES, R. M.; TONG, C. B. S.; SAPERS, G. M.; EI-ATAWY, Y.; IRWIN, P. L.; SEIB, P. A. Inhibition of enzymatic browning in fresh fruit and vegetable juices by soluble and insoluble forms of β -cyclodextrin alone or in combination with phosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2591-2594, 1996.

KOMTHONG, P.; IGURA, N.; SHIMODA, M. Effect of ascorbic acid on the odours of cloudy apple juice. **Food Chemistry**, 2006. In press.

KORALEWSKA, A.; AUGUSTYNIAK, W.; TEMERIUŚ, A.; KANSKA, M. Effects of cyclodextrin derivatives on the catalytic activity of tyrosine phenol-lyase. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 49, p. 193-197, 2004.

LAVEDA, F.; NÚÑEZ-DELICADO, E.; GARCÍA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, p. 1-6, 2000.

LIU, J.; QIU, L.; GAO, J.; JIN, Y.; Preparation, characterization and in vivo evaluation of formulation of baicalein with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, 2006. In press.

LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; NÚÑEZ-DELICADO, E.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCÍA-CARMONA, F. Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins, the use of maltosyl- β -cyclodextrins as secondary antioxidant. **Food Chemistry**, 2006. In press.

MÄKELÄ, M. J.; KORPELA, T. K.; PUISTO, J.; LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 83-88, 1988.

MÁRQUES, G.; AÑÓN, M. C. Influence of reducing sugars and amino acids in the color development of fried potatoes. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 157-160, 1986.

MONDY, N. I.; GOSSELIN, B. Effect of peeling on total phenols, total glycoalkaloids, discoloration and flavour of cooked potatoes. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 756-759, 1988.

NUÑEZ-DELICADO, E.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCIA-CARMONA, F. Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2830-2835, 1997.

NÚÑEZ-DELICADO, E.; MAR SOJO, M.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCÍA CARMONA, F. Hydroperoxidase activity of lipoxygenase in the presence of cyclodextrins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, p. 274-280, 1999.

ÖZOGLU, H.; BAYMDIRH, A. Inhibition of enzymatic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. **Food Control**, v. 13, p. 213-221, 2002.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, p. 463-467, 1987.

SAPERS, G. M.; HICKS, K. B.; PHILLIPS, J. G.; GARZARELLA, L.; PONDISH, D. L.; MATULAITIS, R. M.; McCORMACK, T. J.; SONDEY, S. M.; SEIB, P. A.; EI-ATAWY, Y. S. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenoloxidase inhibitors, and complexing agents. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 997-1002, 1989.

SAPERS, G. M.; HICKS, K. B. Inhibition of enzymatic browning in fruits and vegetables. In: **QUALITY FACTORS OF FRUITS AND VEGETABLES: Chemistry and technology**, Washington: American Chemical Society, 1989. p. 29-41.

SIAN, H. K.; SAID, M.; HASSAN, O.; KAMARUDDIN, K.; ISMAIL, A. F.; RAHMAN, R. A.; MAHMOOD, N. A. N.; ILLIAS, R. M. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *alkalophilic Bacillus* sp. G1. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1101-1111, 2005.

SOJO, M.; NUÑEZ-DELICADO, E.; GARCIA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ- FERRER, A. Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenoloxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 518-523, 1999.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin technology. Dordrecht: Klumer Academic publishers, 1988. p. 1-185.

CAPÍTULO III

Efeito da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) e ciclodextrina (CD) como inibidor do escurecimento enzimático em maçã, banana e pêra

Efeito da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) e ciclodextrina (CD) como inibidor do escurecimento enzimático em maçã, banana e pêra

Andréia A. J.CARNEIRO¹, Eleni GOMES¹, Roberto DA SILVA^{1, *}

Universidade Estadual Paulista - UNESP- Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, São José do Rio Preto, SP.

E-mail: dasilva@ibilce.unesp.com.br

Resumo

O escurecimento enzimático em frutas, vegetais e sucos é um dos problemas mais constantes encontrados na indústria alimentícia. Dada a frequência que ocorre essa reação, é interessante pesquisar novos métodos alternativos de inibição e/ou controle mais adequado, uma vez que o sulfito teve seu uso controlado por causa dos efeitos adversos à saúde humana. Tendo em vista que a população necessita de alimentos mais saudáveis, as ciclodextrinas (CDs) podem ser uma alternativa para controlar o escurecimento de frutas devido a sua capacidade de encapsular os componentes da reação de escurecimento. O objetivo desse trabalho foi verificar a diminuição do escurecimento enzimático em maçã, banana e pêra, utilizando a enzima CGTase e a CD diretamente no processamento das frutas. Este trabalho mostrou que tanto a CGTase produzida por *Bacillus clausii* E16 quanto à enzima comercial Toruzyme®, comercializada por Novozymes e a CD (Corn Products) foram capazes de controlar o escurecimento enzimático de maçãs.

Palavras-chave: CGTase; Ciclodextrina; Polifenoloxidase; Escurecimento enzimático

* dasilva@ibilce.unesp.com.br

III.1. INTRODUÇÃO

O escurecimento enzimático inicia-se com a oxidação de fenóis endógenos por ação da enzima polifenoloxidase (PPO) na presença de oxigênio e a subsequente polimerização da o-quinona, formando pigmentos escuros denominados melaninas (ÖZOĞLU; BAYMDIRH, 2002).

O escurecimento tem um impacto significativo na qualidade de bananas e maçãs porque resulta na alteração da cor, "flavour", textura e valor nutricional (SAPERS, 1993; NICOLAS et al., 1994; GOODING; BIRD; ROBINSON, 2001).

As frutas são propensas ao escurecimento enzimático durante a manipulação e processamento, dessa maneira a indústria frutífera possui grande interesse em métodos para prevenir o escurecimento (YORUK et al., 2004).

A reação de escurecimento enzimático pode ser prevenida pela eliminação de certos produtos, tais como, a enzima, o substrato, o cobre (grupo prostético) ou o-quinonas (SAPERS, 1993; NICOLAS et al., 1994; YORUK; MARSHALL, 2003).

O sulfito é o agente mais difundido usado no controle do escurecimento. No entanto, por causa dos efeitos adversos à saúde o FDA em 1986 proibiu o seu uso em frutas e vegetais para o consumo humano. No entanto, mudança nos hábitos alimentares aumentou a demanda por alimentos naturais e seguros. Com isso, aumentou-se o interesse pela pesquisa por agentes naturais antiescurecimento (SOJO et al., 1999).

Entre os mais promissores agentes estão as ciclodextrinas, que são oligossacarídeos cíclicos não redutores com 6 a 13 unidades de glicose (BENDER, 1986; LARSEN et al., 1998) ligadas entre si, por ligações glicosídicas (α -1,4), produzida pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) sobre o amido. As principais CDs são do tipo α -, β -, e γ -, constituída de seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (SIAN et al., 2005). A sua cavidade interna hidrofóbica é capaz de formar complexo de inclusão com uma variedade de moléculas orgânicas, incluindo alguns polifenóis (CAI et al., 1990).

Szejtli (1982) observou a coloração de algumas frutas, causada pela oxidação enzimática dos polifenóis sendo que os mesmos foram inibidos pelas ciclodextrinas. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito da CGTase e da CD diretamente na redução do escurecimento enzimático de maçã, banana e pêra.

III.2. MATERIAL E MÉTODOS

III.2.1. Microrganismo e enzima

Foram utilizados o filtrado enzimático (CGTase) produzido pelo *Bacillus clausii* E16, pertencente ao banco de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada-IBILCE/UNESP (ALVES-PRADO, 2002; 2005) e a CGTase comercial Toruzyme® produzida pela Novozymes.

III.2.2. Seleção de frutas

Maçãs (*Malus communis*), bananas (*Musa acuminata*) e pêras (*Pyrus communis*) uniformes no tamanho e na cor, foram obtidas no comércio varejista de São José do Rio Preto, SP. Após a seleção foram lavadas, descascadas e fatiadas com uma faca de aço inoxidável.

III.2.3. Escurecimento enzimático de frutas

III.2.3.1. Efeito da CGTase

Para avaliar o escurecimento enzimático porções de maçã, banana e pêra foram incubadas com e sem as enzimas por 30 minutos em banho-maria a 55°C, em seguida foram incubadas por 24 h em estufa de secagem com ventilação a 60°C. Os resultados foram analisados visualmente.

III.2.3.2. Efeito da CD

Porções de maçã, banana e pêra foram incubadas com e sem ciclodextrina comercial (Não pura) na concentração de 100 mg/mL por 30 minutos em banho-maria a 55°C, em seguida foram incubadas por 24 h em estufa de secagem com ventilação a 60°C. Os resultados foram analisados visualmente.

III.2.4. Extração da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POP) de polpas de maçã, banana e pêra

A solução extratora foi preparada utilizando-se tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5 com 4% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP insolúvel) e 0,5% (p/v) de Triton-x-100 (Sigma), a mesma permaneceu na câmara fria em repouso e após 2 h foi centrifugada a 9.000 g por 20 minutos a 4°C, em seguida filtrada em tecido de algodão.

Para preparação do extrato bruto pesaram-se 5 g das amostras congeladas, sendo estas homogeneizadas com 20 mL da solução extratora preparada anteriormente. Após homogeneização as amostras foram colocadas em Erlenmeyers, seqüencialmente em shaker sob agitação de 150 rpm, a 4°C por 24 h. Em seguida foram filtradas e centrifugadas a 10.000 g, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da PPO e POP.

III.2.5. Determinação da atividade enzimática

III.2.5.1. Atividade da polifenoloxidase

As atividades da PPO foram determinadas a partir da metodologia descrita por González; De Ancos; Cano (2000), com pequenas modificações. Tubos de ensaio contendo 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5, 0,3 mL de catecol 0,2 M e 0,3 mL do extrato enzimático foram incubados a 25°C. Decorridos 5 minutos da reação, a atividade enzimática foi medida a uma taxa inicial de aumento de absorbância a 420 nm, com o uso de espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi determinada como a mudança na absorbância por minuto por miligrama de proteína extraída (atividade específica).

III.2.5.2. Atividade da peroxidase

As atividades da POP foram determinadas a partir da metodologia descrita por González; De Ancos; Cano (2000), com pequenas modificações. Tubos de ensaio contendo 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5, 0,2 mL de guaiacol 0,2 M, 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 20% (v/v) (preparado na hora da análise) e 0,3 mL do extrato enzimático foram incubados a 25°C. Decorridos 5 minutos da reação, a atividade enzimática foi medida a uma taxa inicial de aumento de absorbância a

485 nm, com o uso de espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi determinada como a mudança na absorbância por minuto por miligrama de proteína extraída (atividade específica).

III.2.6. Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico

Aproximadamente 25 g de pêras foram trituradas em almofariz com 25 mL de água destilada gelada e 50 ppm de ácido ascórbico (AA), após homogeneização as amostras foram filtradas com gases e o sobrenadante foi coletado em Erlenmeyer contendo 4% de β -CD. As amostras foram mantidas sob agitação e alíquotas de 1 mL foram retiradas de hora em hora, até se completarem 3 horas. O material foi centrifugado a 2.500 g por 5 minutos e no sobrenadante obtido foi determinada a taxa de escurecimento pela medida de absorbância a 450, 500, 540 nm. O controle foi preparado conforme o processo descrito, sem a adição da β -CD.

III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.3.1. Efeito da CGTase no escurecimento enzimático de maçã, banana e pêra

Com relação ao escurecimento enzimático, observou-se que os resultados foram significativos para maçãs, comparado com o escurecimento desenvolvido em bananas e pêras, Figura 1. Isso provavelmente ocorreu devido a maior concentração de amido em maçãs, o substrato natural para a produção da CD pela ação da CGTase. Assim, houve formação de CD e esta se complexou com algum composto, o qual ocasionou a diminuição do escurecimento.

As maçãs acumulam amido no estágio inicial de maturação e progressivamente o amido degrada para acentuar a doçura durante o amadurecimento (WARRINGTON et al., 1999).

A composição de bananas muda dramaticamente durante o amadurecimento. O amido é o principal componente de bananas verdes, que sofre importantes mudanças durante o amadurecimento. A média de amido no pré-climatério é de 70-80% e no final deste período é menor que 1%, enquanto que os açúcares, principalmente sacarose acumula mais de 10% sob o peso fresco da fruta (ZHANG et al., 2005).

	Controle	CGTase (E16)	Toruzyme®
Maçã			
Banana			
Pêra			

Figura 1 - Ação da CGTase produzida por *B. clausii* E16 e da CGTase comercial Toruzyme® no escurecimento enzimático de maçã, banana e pêra.

III.3.2. Efeito da ciclodextrina no escurecimento enzimático de maçã, banana e pêra

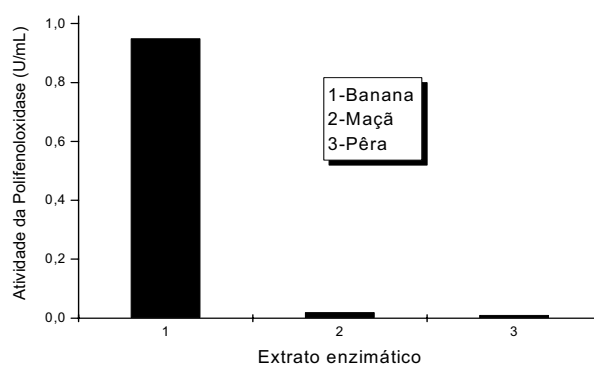
Após o tratamento enzimático, as frutas foram incubadas em estufa de ventilação a 60°C por 30 minutos e em seguida analisadas visualmente. Os experimentos com ciclodextrina estão apresentados na Figura 2. A ciclodextrina atuou de forma significativa em maçã não ocorrendo o mesmo com as pêras e bananas. Pode-se considerar que ocorreu complexação da CD com o substrato natural, ocasionando a diminuição na tonalidade da cor. Os substratos presentes em maçãs são *o*-catequina e ácido clorogênico e a dopamina em bananas. Estes resultados são diferentes do relato de SAPERS et al. (1989) que não foram efetivos em maçãs fatiadas, devido à lenta difusão da CD para o interior das camadas celulares, a qual resultou na falta da formação do complexo com os substratos da PPO.

	Controle	Ciclodextrina
Maçã		
Banana		
Pêra		

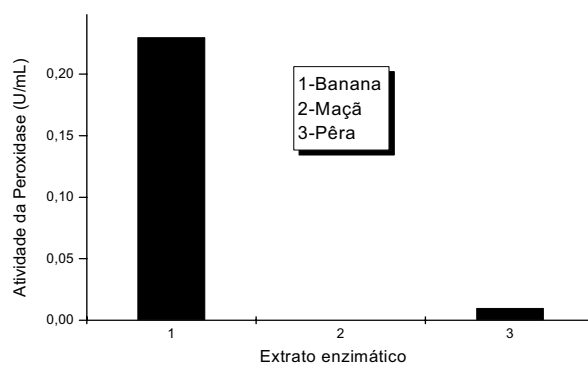
Figura 2 - Ação da ciclodextrina no escurecimento enzimático em maçã, banana e pêra.

III.3.3. Atividade da polifenoloxidase e da peroxidase

Determinou-se a atividade enzimática da PPO e POP a partir do extrato enzimático de polpas de banana, maçã e pêra, convenientemente diluídas (5x), conforme a Figura 3a e 3b, o extrato de banana foi o mais representativo.



a



b

Figura 3. Atividade da polifenoloxidase (a) e da peroxidase (b).

III.3.4. Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico em extrato enzimático de pêra

Em ordem de avaliar o efeito sinérgico dos inibidores na ação da enzima PPO, AA e CD foram ensaiados juntamente. Observou-se que a combinação de 4% de β -CD com 50 ppm de AA resultou na diminuição do escurecimento por até 2 h em condições refrigeradas, Figura 4. O efeito sinérgico apresentou maior inibição comparado ao tratamento com o AA.

O efeito do ácido ascórbico na prevenção do escurecimento enzimático é reduzir as *o*-quinonas formada pela oxidação dos compostos fenólicos antes que reaja e forma os pigmentos escuros. No entanto, a eficiência do ácido ascórbico como inibidor do escurecimento é temporário. O escurecimento enzimático pode regenerar-se depois do ácido ascórbico ser completamente reduzido a ácido dehidroascórbico (KOMTHONG; IGURA; SHIMODA, 2006).

O controle do escurecimento enzimático foi descrito por Nuñez-Delicado; Sánchez-Ferrer; Garcia-Carmona (1997), onde a CD agiu com a oxidação dos fenóis causado pela lipoxigenase, uma vez que a mesma atuou como antioxidante secundário em sinergismo com o ácido ascórbico.

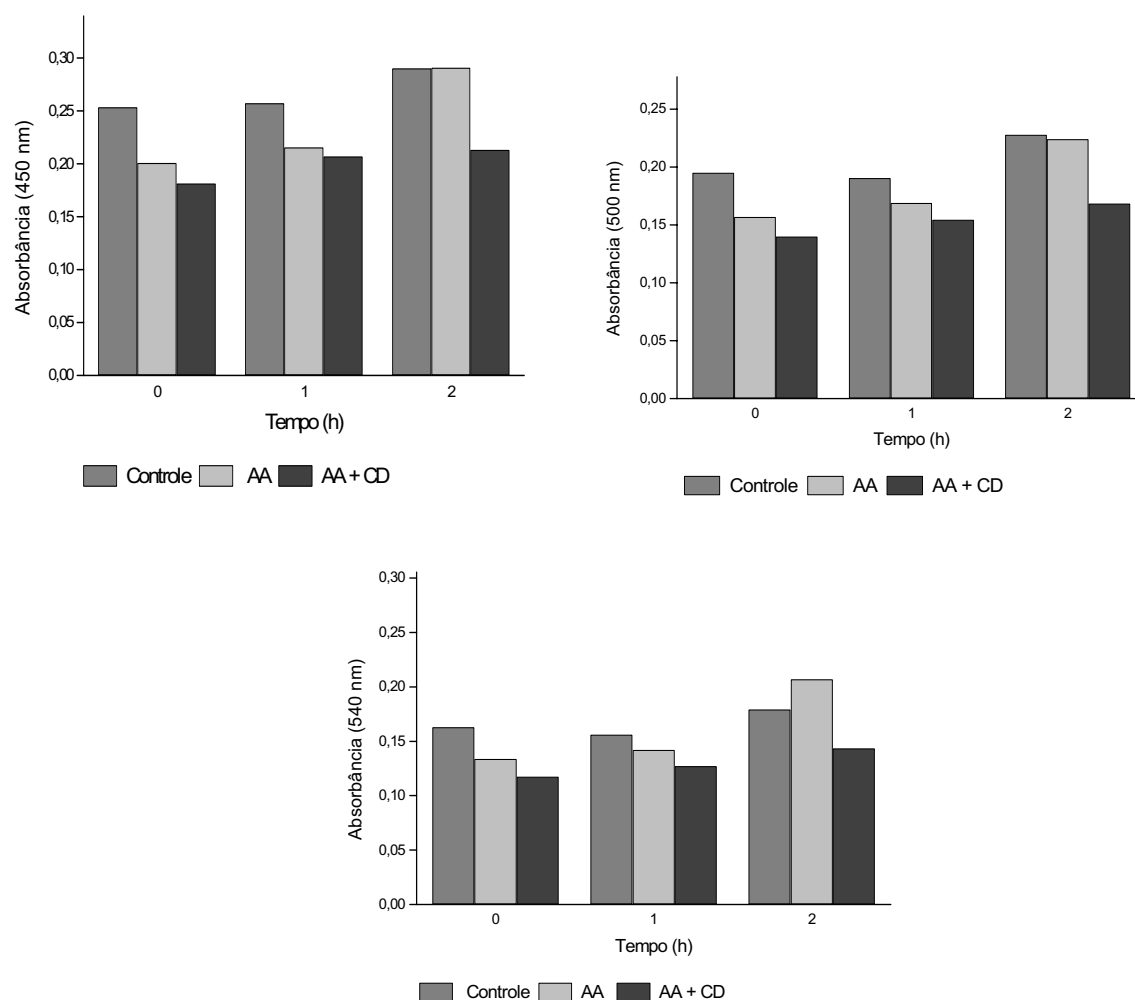


Figura 4 - Efeito da combinação β -ciclodextrina e ácido ascórbico no extrato enzimático de pêra. A) 450 nm, B) 500 nm e C) 540 nm.

III. 4. CONCLUSÕES

Os resultados foram satisfatórios para as maçãs, tanto para a enzima CGTase quanto para a CD. Pode-se inferir que ocorreu a produção da CD pela ação da CGTase em presença do substrato natural (amido de maçã) e por consequência sua ação complexante junto aos agentes responsáveis pelo escurecimento. Da mesma forma a CD atuou com os compostos fenólicos de maçãs.

No extrato enzimático de pêras tratado com β -CD e AA combinados, provavelmente ocorreu encapsulação de compostos fenólicos responsáveis pelo escurecimento, reduzindo a tonalidade da cor em relação ao controle.

O controle da atividade da polifenoloxidase e peroxidase é de grande importância para a ciência e tecnologia de alimentos, visando reduzir o escurecimento enzimático de alimentos processados, dessa forma o tratamento com CDs deverá ser otimizado para que produtos baseados nessas tecnologias possam ser aplicados na prática comercial.

O alto custo da CD é um fator que deve ser levado em consideração, dessa forma, pesquisas dirigidas à produção tanto da CGTase quanto da CD que resultem em menor custo, são importantes para viabilizar de maneira econômica o uso de CD em escala comercial.

III.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-PRADO, H. F. **Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e *Bacillus clausii* E16: caracterização das ciclodextrinas, clonagem e seqüenciamento do gene da CGTase de *Bacillus clausii*.** 2005. 150 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 6, p. 31-71, 1986.

CAI, Y.; GAFFNEY, H. G.; LILLEY, T. H.; MAGNOLATO, D.; MARTIN, R.; SPENCER, C. M.; HASLAM, E. Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. **Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions II. Physical, Organic Chemistry**, v. 2, p. 2197-2209, 1990.

GOODING, P. S.; BIRD, C.; ROBINSON, S. P. Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. **Planta**, v. 213, p. 748-757, 2001.

GONZÁLEZ, E. M.; DE ANCOS, B.; CANO, M. P. Partial characterization of peroxidase and polyphenoloxidase activities in blackberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5459-5464, 2000.

KOMTHONG, P.; IGURA, N.; SHIMODA, M. Effect of ascorbic acid on the odours of cloudy apple juice. **Food Chemistry**, 2006. In press.

LARSEN, K. L.; ENDO, T.; UEDA, H.; ZIMMERMANN, W. Inclusion complex formation constants of α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -, η - and θ -cyclodextrins determined with capillary zone electrophoresis. **Carbohydrate Research**, v. 309, p. 153-159, 1998.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reactions in apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 109-157, 1994.

NUÑEZ-DELICADO, E.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCIA-CARMONA, F. Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2830-2835, 1997.

ÖZOGLU, H.; BAYMDIRH, A. Inhibition of enzymatic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. **Food Control**, v. 13, p. 213-221, 2002.

SAPERS, G. M.; HICKS, K. B.; PHILLIPS, J. G.; GARZARELLA, L.; PONDISH, D. L.; MATULAITIS, R. M.; McCORMACK, T. J.; SONDEY, S. M.; SEIB, P. A.; EI-ATAWY, Y. S. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenoloxidase inhibitors, and complexing agents. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 997-1002, 1989.

SAPERS, G. M. Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. **Food Technology**, v. 47, p. 75-84, 1993.

SIAN, H. K.; SAID, M.; HASSAN, O.; KAMARUDDIN, K.; ISMAIL, A. F.; RAHMAN, R. A.; MAHMOOD, N. A. N.; ILLIAS, R. M. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *alkalophilic Bacillus* sp. G1. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1101-1111, 2005.

SOJO, M.; NUÑEZ-DELICADO, E.; GARCIA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ- FERRER, A. Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenoloxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 518-523, 1999.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrins and their inclusion compounds**. Akademiai Kiado, 1982. 254 p.

WARRINGTON, I. J.; FULTON, T. A.; HALLIGAN, E. A.; De SILVA, H. N. Apple fruit growth and maturity are affected by early season temperatures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, p. 468-477, 1999.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal Food Biochemistry**, v. 27, p. 361-422, 2003.

YORUK, R.; YORUK, S.; BALABAN, M. O.; MARSHALL, M. R. Machine vision analysis of antibrowning potency for oxalic acid: A comparative investigation on banana and apple. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 69, p. 281-289, 2004.

ZHANG, P.; WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; HAMAKER, B. R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility - a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 443-458, 2005.

CONCLUSÃO GERAL

A proposta deste trabalho foi empregar a ciclodextrina (CD) como agente inibidor do escurecimento em batatas e frutas. A novidade da proposta não foi à aplicação da CD diretamente no alimento, mas sim a enzima responsável pela sua produção, a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), esse trabalho mostrou pela primeira vez que a CGTase foi capaz de inibir o escurecimento de batatas e maçãs, uma vez que há na literatura o uso de ciclodextrina atuando como inibidor do escurecimento, principalmente em frutas e sucos de maçã e pêra, dados semelhantes ao nosso trabalho. Isso foi possível devido à sua capacidade de formar complexo de inclusão com os compostos fenólicos, evitando assim o desenvolvimento da reação.

As ciclodextrinas naturais são uma das alternativas para substituir o uso de agentes químicos em alimentos processados que tendem ao escurecimento, uma vez que não traz prejuízos a saúde humana, sua aplicação aumentará se os custos forem reduzidos, dessa forma, estudos da produção de ciclodextrinas a partir da CGTase explicam o grande interesse dos pesquisadores. Para que isso seja possível é necessário conseguir novas linhagens de microrganismos com rendimentos elevados na produção de CGTase e que estas sejam mais termoestáveis. Estudos são requeridos para otimizar sua produção e conseqüentemente seu uso em alimentos sujeito ao escurecimento.