



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA
DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO AMIDO DO SUCO DE MAÇÃ**

GABRIEL AGOSTINI

Orientador: Prof^a. Dr^a. Aline Schilling Cassini

Coorientador: Dr.^a Carolina Pereira Kechinski

Porto Alegre, Julho de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

TRABALHO DE CONCLUSÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Desenvolvimento de metodologia para avaliação da degradação enzimática do amido do suco de maçã

Gabriel Agostini

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para obtenção da
graduação em Engenharia Química

Orientadores:

Prof.^a. Dr.^a. Aline Schilling Cassini

Dr.^a Carolina Pereira Kechinski

Porto Alegre

Julho de 2011

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Amir e Carmelina, por terem sempre me proporcionado as melhores condições possíveis para que eu pudesse estudar, me incentivando, me ensinando a nunca desistir, a ser comprometido com o que faço, à educação que me deram que foi a base de um desenvolvimento sólido.

À minha namorada Roberta, que sempre esteve do meu lado, me dando carinho, apoio e incentivo para quando os experimentos não saíam exatamente como o esperado, me entendendo quando não estava muito animado para conversar.

Aos meus familiares que sempre ficaram muito orgulhos e sempre motivados a saber como estava indo meu TCC.

A Deus por sempre estar ao meu lado, me dando forças para levantar todos os dias o mais cedo possível e só voltar quando os dedos não sabiam mais o que digitar.

Aos meus amigos que entenderam e me apoiaram por não poder estar tão perto deles nesse momento.

As minhas orientadoras Aline Schilling e Carolina Keschinski que me incentivaram, me auxiliaram e sempre estavam dispostas a me ajudar em qualquer dúvida a qualquer momento que fosse necessário, não só nesse trabalho como em meu futuro profissional, me transmitindo conhecimentos que ainda não havia adquirido e que só aprenderia com o passar dos tempos.

A esta instituição de ensino, por me garantir um espaço estimulante para consolidar a conquista de minha formação acadêmica.

A todos os professores da UFRGS que sem os ensinamentos deles eu nada teria feito.

Aos funcionários da UFRGS que sempre estavam alegres mesmo eu sendo o primeiro a chegar e o último a sair.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CONCEITOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Maçã.....	3
2.2. Processo de fabricação.....	5
2.3. Carboidratos.....	7
2.4. Amido.....	7
2.4.1.....	Glicose
8	
2.4.2.....	Frutose
8	
2.4.3.....	Maltose
8	
2.5. Pectina.....	8
2.6. Enzimas.....	9
2.6.1.....	Amilase
12	
2.6.2.....	Enzimas Pécicas
12	
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Materiais.....	15
3.2. Métodos.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20

4.1. Preparação dos sucos	20
4.2. Curvas de calibração	20
4.2.1.....Análise do Teor de Açúcares	
20	
4.2.1..... Análise do Teor de Amido	
21	
4.3. Experimentos com suco <i>in natura</i>	22
4.3.1..... Efeito da concentração da enzima e suco sobre o teor de açúcares	
22	
4.3.1.....Efeito da concentração da enzima e suco sobre o teor de amido	
25	
4.4. Experimentos com suco de maçã adicionados de amido.....	26
4.4.1..... Efeito do tempo e da concentração de enzima sobre o teor de açúcares	
26	
4.4.2.....Efeito do tempo e da concentração de enzima sobre o teor de amido	
27	
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma do processo de fabricação de suco de maçã (SANT´ANA, 2007).	6
Figura 2 Estrutura da pectina (ácido poligalacturônico).	9
Figura 3 Ação das amilases em moléculas de amilose e amilopectina.(GAVA,1978)..	12
Figura 4 Posições de ataque de pectinesterase e poligalacturonase na pectina (GAVA,1978).....	13
Figura 5 Fluxograma do processo de obtenção das amostras.....	15
Figura 6 Shaker com as amostras e enzimas.	17
Figura 7 Gráfico da curva de calibração da glicose.....	21
Figura 8 Gráfico da curva de calibração da frutose.....	21
Figura 9 Gráfico da curva de calibração do amido.....	22
Figura 10 Gráfico do tempo de retenção dos açúcares feitas no HPLC com uma coluna para monossacarídeos,com vazão de 0,6 L/min, Temperatura de 80 °C, presa de 520 psi.	23
Figura 11 Degradação do amido em suco de maçã pela enzima AG 300L a 10 ppm durante 180 min.	26
Figura 12 Gráfico da porcentagem de conversão do amido em frutose das enzimas (A) AG 300 L e (B) AG XXL em função do tempo.	27
Figura 13 Gráfico da porcentagem de conversão do amido em glicose das enzimas (A) AG 300L e (B) AG XXL em função do tempo.	27
Figura 14 Degradação do amido em função do tempo pelas enzimas (A) AG 300L e (B) AG XXL.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das cultivares Fuji, Gala e Golden Delicious (TREPTOW, QUEIROZ e ANTUNES, 1995 <i>apud</i> SANT`ANA, 2007).	3
Tabela 2: Composição típica da maçã (por 100 g de fruto) (DFL, 1991).	4
Tabela 3: Concentrações das enzimas AG300 L e AG XXL adicionadas em cada experimento.	16
Tabela 4: Tempo de retirada das amostras para cada concentração de enzimas.	18
Tabela 5: Tempo de retirada das amostras para cada concentração de enzimas.	18
Tabela 6: Médias das áreas dos picos de cada açúcar (glicose e frutose) em relação à sua concentração.	21
Tabela 7 Dados utilizados para elaboração da curva padrão do amido, onde A e B representam as duplicatas das amostras de amido de trigo.	22
Tabela 8: Resultados para os teores de frutose e glicose para os sucos de maçã tratados com a enzima AG 300L em diferentes tempos e concentrações.	24
Tabela 9: Resultados para os teores de frutose e glicose para os sucos de maçã tratados com a enzima AG XXL em diferentes tempos e concentrações.	25

Resumo

A maçã é um dos frutos mais consumidos no Brasil e apresenta alto valor nutricional. Esses frutos, quando ainda verdes, possuem grande quantidade de amido que, durante a fase de maturação, tende a ser convertido em açúcares. A fruta pode ser consumida tanto *in natura*, como polpa, suco, e outros derivados. Devido ao seu baixo custo e a seu alto valor nutricional, geralmente, o suco de maçã é adicionado a outros sucos para agregar nutrientes. Entretanto, há algumas vezes a necessidade de colher a maçã antes de sua completa maturação, acarretando, assim, um excesso de amido no suco, que é insolúvel, causando um aumento de turbidez no mesmo e tornando o processo mais demorado e caro. O processo do suco mais turvo necessita de maiores filtrações, aumentando, desta forma, a perda de algumas de suas propriedades nutricionais. A maçã possui outro composto que é responsável pela formação de um suco mais encorpado, a pectina. Esse composto forma um gel junto com o amido, que dificulta a ação de qualquer enzima para degradação deste. Por causa disso faz-se a adição da pectinase, enzima responsável por romper as ligações entre a pectina e o amido e, em seguida, adiciona-se as enzimas que quebram o amido em compostos menores e solúveis. Essas enzimas são uma alternativa para a indústria poder utilizar as maçãs antes da sua completa maturação, pois como são adicionadas em pequenas quantidades e só durante o período de janeiro e fevereiro, o custo não é muito significativo, fazendo assim com que se diminua a necessidade de muitas filtrações e preservando, assim, as propriedades nutricionais do suco. O objetivo desse trabalho é desenvolver uma metodologia para avaliar a degradação enzimática do amido do suco de maçã. Para tanto a metodologia adotada para esse procedimento tentou seguir as etapas do processamento industrial do suco de maçã; foram realizadas análises dos teores de açúcares (glicose e frutose), por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), e amido pelo método da descoloração do iodo (espectrofotometria). Os resultados obtidos para essa metodologia apresentou excelentes resultados tanto na confecção do suco como nas análises realizadas. Os resultados mostraram que a enzima com uma maior concentração tem uma velocidade de degradação do amido superior, mesmo adicionada em menor quantidade, fazendo com o processo seja muito mais rápido para indústria diminuindo o tempo de espera para a realização das demais etapas.

1. INTRODUÇÃO

Existem mais de 7500 espécies e variedades de maçãs espalhadas pelo mundo. As diferentes espécies se encontram principalmente em climas temperados e subtropicais, uma vez que, devido à necessidade de um número importante de horas de frio, as macieiras não florescem em áreas tropicais. A maçã pode ser considerada um dos frutos há mais tempo conhecido pelo homem. Com exceção dos cítricos, a maçã é o fruto que pode ser conservado durante mais tempo, mantendo boa parte de seu valor nutricional.

O suco de maçã é um produto muito utilizado associado a outros sucos, pois, além de ser de barata obtenção, ele tem elevado valor nutricional, é rico em compostos fenólicos e em açúcares de fácil digestão (frutose e dextrose) e não altera a cor, a textura e o sabor do produto final (GIRARDI, 2004).

Muitas pesquisas comprovam os benefícios do suco de maçã - ou da maçã - na prevenção de problemas cardíacos, na redução dos níveis de colesterol ruim no sangue e, conseqüentemente, na diminuição dos riscos de infarto, na prevenção de cânceres como o de mama e o de cólon, no combate às doenças pulmonares, proporcionando uma atividade respiratória melhor e retardando o envelhecimento, além de auxiliar em dietas emagrecedoras.

No entanto, um dos problemas encontrados nesse suco está relacionado com sua fabricação. Quando ocorre a colheita do fruto antes que esse atinja o grau de maturação esperado, a maçã apresenta uma quantidade maior de amido que ainda não foi degradado a suas formas mais solúveis que são a glicose e a frutose, ocasionando uma turbidez indesejada no suco. Outro problema encontrado é a grande quantidade de pectina presente na maçã que, juntamente com o amido, formam um tipo de gel dificultando a ação das enzimas que degradam o amido, as amilases. Para que este suco possa ser vendido como um suco de qualidade, ou seja, tal como o suco produzido por maçãs completamente maduras, pode-se fazer o uso de enzimas que quebram esse amido degradando-o à frutose e glicose que são solúveis, diminuindo assim a turbidez e os gastos com a utilização de processos de filtração que acabam retirando alguns componentes importantes desse suco.

Enzimas são proteínas com formato espacial típico cuja principal função é a de catalisar reações químicas através do abaixamento da energia de ativação, (energia que

a reação necessita para que possa ocorrer), tornando assim a reação mais rápida. São muito utilizadas para gerar produtos de custo muito elevado ou de difícil produção. As enzimas geralmente têm um pH e uma temperatura que resulta em uma melhor ação; porém alguns valores de pH e temperatura podem levar a sua inativação ou degradação.

Dentro deste contexto, o objetivo desse trabalho é desenvolver uma metodologia que permita a avaliação da eficácia de um determinado tipo de enzima para se estabelecer a cinética da degradação enzimática do amido insolúvel presente no suco de maçã. Para tanto, serão utilizadas duas enzimas, as amilases, responsáveis pela quebra do amido com diferentes concentrações, combinadas com outra enzima, a pectinase, responsável pela quebra das ligações feitas entre o amido e a pectina para que as amilases possam degradar o amido. A pectinase será adicionada com um mesmo volume para todas as amostras. Desta forma, as amostras serão coletadas em tempos pré-estabelecidos visando a determinação das curvas de degradação do amido em seus açúcares solúveis, glicose e frutose, bem como a variação da concentração de amido no suco.

É importante salientar que o assunto deste trabalho surgiu a partir do interesse de uma indústria de suco de maçãs, que detectou elevada turbidez nos sucos produzidos no início da safra e necessitava de um tratamento eficiente de clarificação deste suco, e do interesse de um representante de enzimas que tentava encontrar a enzima apropriada para sugerir à indústria, a fim de promover sua clarificação.

2. CONCEITOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Maçã

A maçã é um dos frutos mais cultivados do mundo, com mais de 7500 espécies e variedades. Em 2005, o Brasil estava na terceira posição como maior produtor de frutos do mundo e apenas o 13º na produção de maçã. A produção se concentra na Região Sul, representando 98 % da produção nacional. Em 1974 a produção atingia apenas 1,53 mil toneladas, que chegou em 2005 a uma produção 843 mil toneladas (SANT'ANA, 2007).

Os cultivares mais produzidos no Brasil são os das variedades *Fuji*, *Gala* e *Golden Delicious*, isso se deve às boas propriedades de refrigeração destas variedades, permitindo que o mercado consumidor seja abastecido durante os meses subseqüentes ao final da colheita. As principais características de cada um destes cultivares podem ser observadas na Tabela 1 (TREPTOW, QUEIROZ e ANTUNES, 1995 *apud* SANT'ANA, 2007).

Tabela 1: Características das cultivares Fuji, Gala e Golden Delicious (TREPTOW, QUEIROZ e ANTUNES, 1995 *apud* SANT'ANA, 2007).

Variedade	% de ácido málico	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	pH
Fuji	0,34	12,86	3,58
Gala	0,29	16,73	3,75
Golden Delicious	0,21	13,76	3,81

Para fins industriais, as maçãs podem ser classificadas em função da razão entre os açúcares totais e a acidez titulável dos frutos; quanto mais baixa esta razão, mais adequada a variedade passa a ser ao uso industrial (TREPTOW, QUEIROZ e ANTUNES, 1995 *apud* SANT'ANA, 2007).

A maçã tem um elevado valor nutricional e vários componentes que auxiliam em diversas funções do organismo. Ela possui quantidades mínimas de gordura e açúcares de fácil digestão, como a glicose e a frutose. É um alimento importantíssimo porque ajuda na regularização do aparelho digestivo; pesquisas recentes concluíram que a maçã tem uma ação benéfica sobre o coração, pois apresenta um elevado teor de potássio e pectina, substância que, juntamente com os açúcares, forma um gel que previne a deposição de gordura na parede arterial, evitando a arteriosclerose. Observou-se também que a maçã auxilia a circulação sanguínea, reduzindo o trabalho cardíaco e outras funções do organismo. As maçãs contêm os minerais: cálcio, ferro, magnésio, fósforo, potássio, sódio, zinco, cobre, manganês e selênio e as vitaminas: A, B1, B2, B3,

B5, B6, B9, B12, C e E, essenciais para o organismo do ser humano. A composição média aproximada das maçãs (por 100 g de fruto) pode ser observada na Tabela 2 (DFL, 1991).

Tabela 2: Composição típica da maçã (por 100 g de fruto) (DFL, 1991).

Componentes	Vitaminas	Tyr 5 mg
Água 85,3 g	Caroteno 45 µg	Val 12 mg
Proteína 0,3 g	Vitamina E 490 µg	
Lipídios 0,4 g	Vitamina K 0-5 µg	Carboidratos
Carboidratos 11,8 g	Vitamina B1 35 µg	Glicose 2210 mg
Ácidos orgânicos 0,6 g	Vitamina B2 30 µg	Frutose 6040 mg
Fibras 2,3 g	Nicotinamida 300 µg	Sacarose 2470 mg
Minerais 0,3 g	Ác. Pantotênico 100 µg	Amido 600 mg
	Vitamina B6 45 µg	Sorbitol 510 mg
Minerais	Biotina 1-8 µg	
Sódio 3 mg	Ácido Fólico 7 µg	Lipídios
Potássio 145 mg	Vitamina C 12 mg	Ác. Palmítico 50 mg
Magnésio 6 mg		Ác. Estearico 10 mg
Cálcio 7 mg	Amino ácidos	Ác. Oleico 20 mg
Manganês 65 µg	Arg 8 mg	Ác. Linoleico 20 mg
Ferro 480 µg	His 6 mg	
Cobre 100 µg	Ile 10 mg	Outros
Zinco 120 µg	Leu 16 mg	Ác. Málico 550 mg
Fósforo 12 mg	Lys 15 mg	Ác. Cítrico 16 mg
Cloro 2 mg	Met 3 mg	Ác. Oxálico 500 µg
Fluor 7 µg	Phe 9 mg	Ác. Salicílico 310 µg
Iodo 2 µg	Thr 8 mg	Purinas 3 mg
Selênio 1-6 µg	Trp 2 mg	

De acordo com a finalidade dos frutos, as maçãs podem ser classificadas em comerciais ou industriais. As maçãs comerciais são cultivadas com o intuito de serem consumidas frescas e, portanto, devem atender a padrões rígidos de qualidade relacionados, principalmente à cor, ao tamanho e à presença de defeitos nos frutos. As maçãs industriais são aquelas que não poderiam ser aproveitadas na categoria comercial; esses frutos, entretanto, mantêm suas qualidades intrínsecas relacionadas ao teor de açúcar, ácidos e de compostos fenólicos e, por isso, são podendo ser interessantes para o uso industrial (fabricação de suco, vinagre, sidra, entre outros produtos derivados da maçã).

O mercado de sucos de frutas prontos para beber vem apresentando crescimento no país; o aumento do consumo destes produtos se deve à busca por alimentos mais saudáveis e ao aumento do poder aquisitivo da população.

A maçã é uma das frutas que oferecem as mais promissoras perspectivas para a produção de sucos de frutas, uma vez que apresenta características favoráveis para tal, sendo fonte de diversos componentes benéficos à saúde humana, tais como os antioxidantes.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o suco de maçã pode ser definido como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da maçã (*Malus domestica*), através de processo tecnológico adequado. A bebida deve possuir cor branca a translúcida, sabor e aroma próprio e a seguinte composição físico-química: teor de sólidos solúveis (°Brix, a 20 °C) mínimo de 10,5, acidez total expressa em ácido málico mínima de 0,15 g / 100 g, açúcares totais naturais da maçã máxima de 13,5 g / 100 g e acidez volátil em ácido acético máxima de 0,04 g / 100g (BRASIL, 2000). A seguir, apresenta-se uma descrição do processo produtivo do suco de maçã.

2.2. Processo de fabricação

O suco de maçã pode ser obtido de duas maneiras: de maçãs recém processadas ou de suco concentrado até o teor de sólidos solúveis desejados. É apresentado na Figura 1 o processo de fabricação do suco onde observa-se que as primeiras etapas do processo consistem na colheita, transporte e estocagem das frutas; as maçãs são colhidas manualmente e transportadas em caixas para seu destino final, seja ele armazenagem ou indústria para o processamento. A estocagem deve ser realizada com um tempo máximo de 18 h após a colheita. Antes do armazenamento são utilizados produtos antioxidantes, para prevenir problemas fisiológicos, e fungicidas, para prevenir o crescimento de bolores.

Após a estocagem, as frutas são levadas para a indústria onde os frutos são lavados a fim de remover as partes apodrecidas e sujeiras mais aderidas. As frutas apodrecidas podem ser totalmente descartadas ou cortadas, sendo aproveitada somente a parte que está em boas condições. Antes da prensagem, as frutas são trituradas para reduzir o tamanho e assim facilitar a prensagem. Após esta etapa, é comum a utilização de ácido ascórbico para prevenir o escurecimento enzimático.

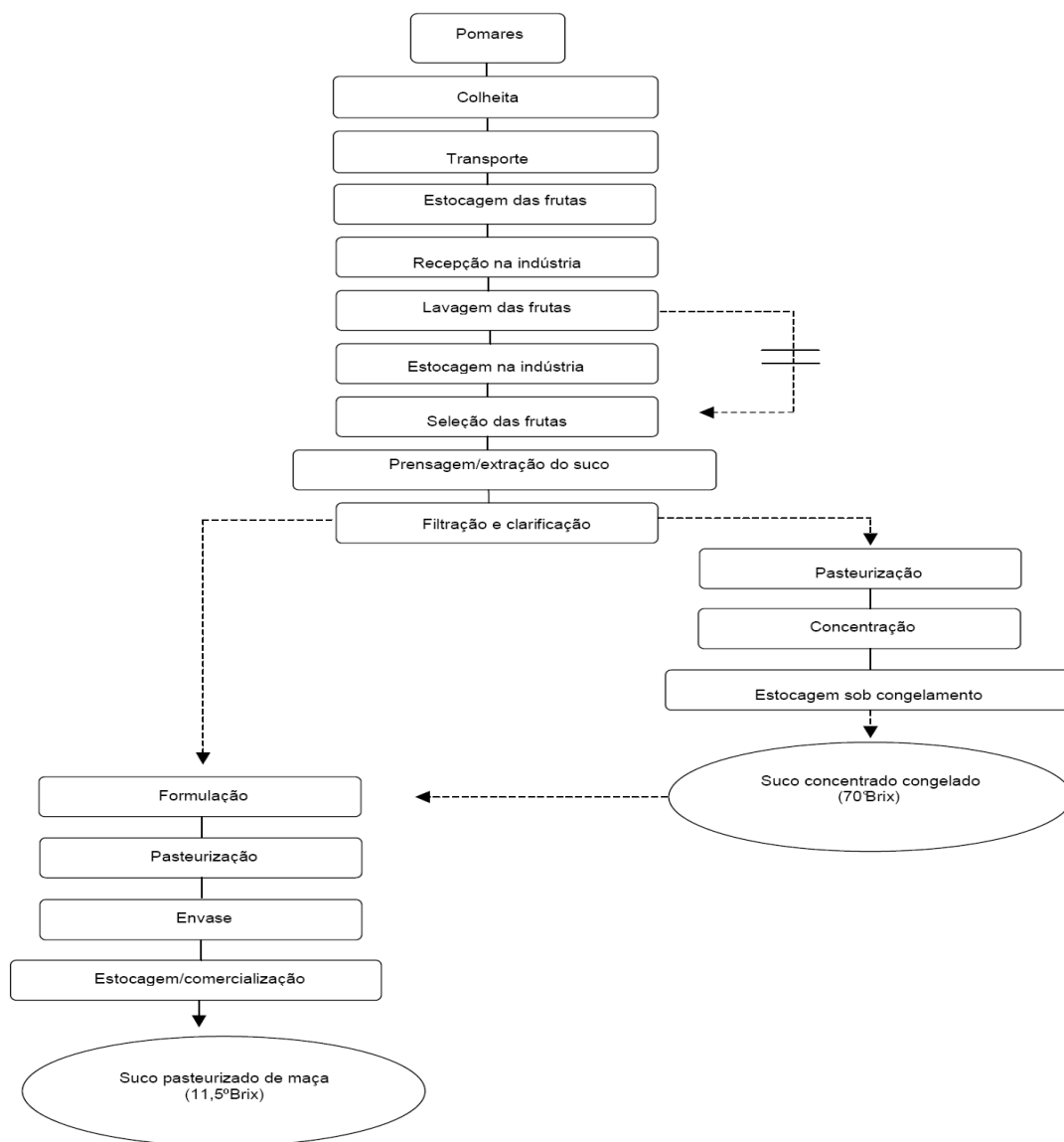


Figura 1 Fluxograma do processo de fabricação de suco de maçã (SANT'ANA, 2007).

A etapa de clarificação é uma etapa fundamental na fabricação do suco de maçã devido à turbidez existente no suco em função de alguns dos constituintes do mesmo. Segundo PETRUS (1997) a turbidez no suco pode ser de três tipos: (a) orgânica, em função da presença da pectina, do amido, dos polifenóis, das proteínas, dos microrganismos, entre outros, (b) orgânica-inorgânica, devido a combinações tais como metais-polifenóis, metais-componetes de cor, cobre-proteína, entre outras, e (c) inorgânica, devido à presença da terra diatomácea ou outro coadjuvante de filtração, à presença de fosfatos e à presença de partículas amorfas.

O suco de maçã pode ser clarificado por diferentes processos, que se dividem em processos físicos (decantação, centrifugação e filtração), químicos (agentes de

refinamento como terra diatomácea e gelatina) e bioquímicos (utilizando enzimas como as pectinases, as amilases, celulases e arabanases) (PETRUS, 1997). O processo bioquímico inclui o tratamento enzimático de despectinização e o acabamento que consiste na retirada dos compostos que deixam a aparência do suco afetada. As enzimas são adicionadas com o objetivo de quebrar parcial ou totalmente as partículas insolúveis que são as responsáveis pela turbidez do suco.

A seguir os principais componentes do suco de maçã serão apresentados mais detalhadamente.

2.3. Carboidratos

Os carboidratos são um dos componentes mais abundantes na natureza e podem ser obtidos de várias fontes renováveis. Desempenha um papel importante como fontes de energia, armazenadores de energia e unidades estruturais das células. Por terem uma combustão bioquímica completa, possuem uma energia metabolizável igual à energia total (AELHE, 2007).

Os carboidratos podem ser definidos como: poliidroxialdeídos, poliidroxiálcoois, poliidroxiácidos. Assim seus compostos simples ou derivados são classificados como: monossacarídeos (dentre os quais a glicose, a frutose e a galactose são os mais comuns), oligossacarídeos (onde a maltose, a sacarose e lactose são os mais comuns, sendo que cada oligossacarídeo pode gerar de dois a dez monossacarídeos) e os polissacarídeos (amido, glicogênio e celulose).

2.4. Amido

O amido é um polissacarídeo que funciona como uma fonte de energia para as plantas e também utilizado na dieta do ser humano como fonte primária de energia. O principal motivo para que as plantas convertam o açúcar em amido é que o amido, diferente do açúcar, é insolúvel em água a temperatura ambiente, não provocando assim um desbalanço osmótico que ocorreria se grandes quantidades de açúcar fossem armazenadas. Essa insolubilidade deve-se às pontes de hidrogênio inter e intramolecular entre os grupos hidroxil das moléculas de amido e de água.

O amido consiste de dois polissacarídeos estruturalmente diferentes: a amilose e a amilopectina. Estes componentes são responsáveis pelas propriedades do amido, em função da sua estrutura e de sua massa molar. A fração de amilose, dependendo do tipo

de amido, varia entre 14 e 27 % e esta se constitui de uma cadeia linear; a amilopectina apresenta, por sua vez, uma estrutura ramificada. O amido nativo contém, ainda, em torno de 20 % de água (ROUETTE, 2001).

2.4.1. Glicose

A glicose é um monossacarídeo de rápida digestão, sendo uma das substâncias mais importantes da biologia por ser utilizada pelas células como fonte de energia e intermediário metabólico. Sua fórmula molecular é $C_6H_{12}O_6$ e é um sólido de sabor adocicado.

2.4.2. Frutose

A frutose, assim como a glicose, também é um monossacarídeo e é mais encontrado nas frutas. Sua fórmula molecular é $C_6H_{12}O_6$ e tem um sabor mais doce do que a sacarose que é o açúcar refinada da cana-de-açúcar.

2.4.3. Maltose

A maltose é a união de duas ou mais moléculas de glicose. O amido, ao ser degradado, passa primeiramente à forma de maltose para depois chegar à forma mais simples que é a glicose. A maltose é encontrada principalmente em vegetais e tem função energética. É bastante solúvel em água e também conhecida como açúcar do malte ou maltobiose.

2.5. Pectina

Pectina é um dos principais componentes que constituem as paredes celulares das plantas e dos frutos e também principal componente da lamela média que tem a função de unir as células entre si, é um polissacarídeos ramificado que tem como função reter água a fim de tornar o meio ao seu redor gelatinizado. Em temperaturas um pouco acima da temperatura ambiente ela tende a se ligar com os açúcares formando um espessante natural utilizado na indústria alimentícia para formar sucos mais encorpados.

O processamento das maçãs exige a manutenção da polpa a uma temperatura média em torno de $50^{\circ}C$, e nessa condição, a pectina se liga ao açúcar presente no suco formando um meio mais gel e dificultando a ação das amilases. A adição da pectinase se faz necessária para quebra essa ligação entre açúcar e pectina permitindo que o amido

seja degradado pela amilase. A estrutura da pectina pode ser observada a seguir, na Figura 2.

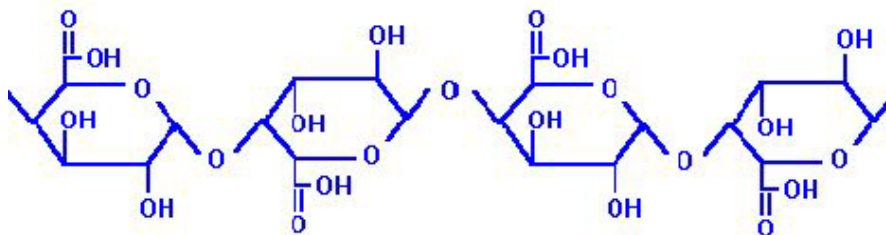


Figura 2 Estrutura da pectina (ácido poligalacturônico).

2.6. Enzimas

No final do século XVII e início do século XVIII sabia-se que o amido era convertido a açúcares; no entanto, não era conhecida, a razão dessa quebra. As enzimas foram descobertas por Pasteur, através dos estudos da fermentação do álcool pelas leveduras. O nome “enzima” foi usado pela primeira vez por Wilhem Kühne, em 1876 para descrever a atividade enzimática (AEHLE, 2004).

Enzimas são proteínas com atividade intra ou extracelular que catalisam reações químicas que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam. Isso é obtido através da diminuição da energia de ativação necessária para que ocorra a reação química, resultando no aumento da velocidade da reação. A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para diversas aplicações industriais, tais como na indústria farmacêutica e/ou alimentícia (ROUETTE, 2001).

Algumas enzimas podem alterar algumas características dos produtos que são importantes e, por isso, elas devem ser inativadas, podendo ser desnaturadas de várias maneiras, sendo a principal delas através da aplicação do calor; para tanto, temperaturas entre 70 °C a 90 °C, durante dois a cinco minutos são suficientes na maioria dos casos. Esse procedimento é largamente utilizado na indústria, recebendo o nome de branqueamento térmico.

No processamento de produtos derivados da maçã, duas enzimas são de vital importância, a amilase e a pectinase; estas enzimas são capazes de degradar a pectina facilitando a extração dos compostos fenólicos, sem perturbar o grupo éster que é responsável pelo aroma específico do suco; além disso, estas enzimas não levam à formação de compostos tóxicos (TARAGANO e PILOSOF, 1999).

Na produção de sucos, as enzimas pectinolíticas são utilizadas logo após a trituração do fruto a fim de facilitar a extração do suco. Essas enzimas rompem a rede da parede celular e o rendimento do suco é aumentado. Além disso, a extração dos compostos fenólicos da parede celular é potencializado pelo tratamento enzimático. Comercialmente, existem vários preparados enzimáticos para o processamento de frutas, sendo que a maioria destes produtos contém pectinases, celulases e hemicelulases em várias proporções (SPAGNA et al., 1994). Além destas enzimas, alguns preparados apresentam em sua formulação enzimas de ação exógena que afetam a química dos glicosídeos fenólicos extraídos (BUCHERT et al., 2005). Vários estudos reportam o uso de preparados enzimáticos para a fabricação de sucos como o de oxicoco (WIGHTMAN e WROLSTAD, 1996), maçã (ALVAREZ et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006), pera (TANRIÖVEN e EKSI, 2005), sapoti (SIN et al., 2006), banana (LEE et al., 2006a; b), carambola (LIEW ABDULLAH et al., 2007), cereja e romã (ÖZKAN, 2002), groselha preta (LANDBO e MEYER, 2004), sabugueiro (LANDBO et al., 2007) e uva (SREENATH e SANTHANAM, 1992).

CARRÍN et al. (2002) estudaram a influência da concentração de substrato e de uma enzima comercial (amilase) na cinética de degradação do amido de milho; avaliaram também o efeito do pH e da adição de íons Ca^{2+} na atividade da enzima estudada. A reação de degradação foi realizada a 50 °C e o pH variou entre 3,6 e 5,6. As soluções de amido continham concentrações entre 2,48 e 14,85 mg/mL de substrato. Os autores observaram que a degradação do amido aumentou com o aumento da concentração da enzima entre 0 e 4 mg/mL, não sendo detectada a atividade enzimática na concentração de 0,1 mg/mL, mas não atingindo-se, também, a atividade de saturação na concentração máxima testada. O pH ótimo para a enzima estudada mostrou-se no valor de 4,6 e a adição dos íons Ca^{2+} causou uma diminuição significativa na atividade desta. Os autores conseguiram propor, com sucesso, um modelo empírico capaz de prever a taxa de hidrólise do amido em função da concentração de substrato e enzima adicionada à reação.

CARRÍN et al. (2004) quantificaram, através do método iodométrico, os teores de amidos solúvel e insolúvel do suco de maçã preparados com frutos de diferentes graus de maturação. Para tanto, maçãs foram coletadas 15 dias antes da data prevista para a coleta e armazenadas a temperatura ambiente por diferentes períodos de tempo: 1 semana (A1) e três semanas (A3). Os sucos preparados foram pasteurizados a 90 °C por

5 min e, no tratamento enzimático, duas enzimas comerciais diferentes foram utilizadas (amilases), em diferentes concentrações, durante até 30 min. Antes da pasteurização o suco de maçã apresentava uma concentração mais elevada de amidos solúveis (0,51 g/L) e insolúveis (7,68 g/L); essa concentração reduziu-se drasticamente com a pasteurização e o amadurecimento dos frutos: os teores de amido solúvel e insolúvel dos sucos preparados com os frutos A1 foram de 0,1 g/L e 2,47 g/L, enquanto que o método utilizado para a quantificação do amido não foi capaz de detectar nada de amido solúvel nem insolúvel no suco preparado com as maçãs A3. A cinética de degradação do amido com as enzimas testadas mostrou a rápida conversão deste: em menos de 30 min praticamente todo o amido contido no suco era degradado pelas enzimas testadas.

MANTOVANI et al. (2005) avaliaram a atividade enzimática de enzimas pécnicas produzidas a partir de fungos selecionados na clarificação de diferentes tipos de sucos de frutas. As enzimas obtidas na sua forma natural mostraram-se eficientes na clarificação do suco de maçã; enzimas parcialmente purificadas também foram testadas e se mostraram promissoras na clarificação dos diferentes sucos de frutas estudados.

SORRIVAS et al. (2006) avaliaram a utilização de duas enzimas comerciais (pectinase e amilase) na diminuição da turbidez do suco de maçã através de diferentes técnicas de microscopia, em função da avaliação do tamanho de partícula e da determinação do potencial zeta em cada caso estudado. O objetivo dos autores era obter mais informações a respeito dos fenômenos que governam a formação das partículas coloidais estáveis, responsáveis pela turbidez no suco de maçã, e de que forma as enzimas específicas contribuem para a desestabilização destes coloides. O estudo revelou que o papel da enzima pectinase durante a clarificação está mais associado ao aumento da mobilidade das partículas, em função da desintegração das ligações peptídicas, do que à diminuição das forças de repulsão eletrostática entre elas.

DIANO et al. (2008) avaliaram o comportamento catalítico de uma mistura de enzimas pécnicas, imobilizadas por diferentes suportes (microesferas de vidro, de nylon e de poliacrilonitrila (PAN), na clarificação do suco de maçã. Os autores comprovaram como o melhor sistema catalítico dentre os testados as microesferas de PAN e avaliaram, a seguir, qual processo utilizar, um sistema de leite empacotado ou fluidizado. As condições testadas foram as seguintes: pH = 4, temperatura de 50 °C e 20 cm³ de material suporte (PAN). Os autores não observaram diferenças entre os dois processos quando baixas taxas de recirculação foram utilizadas; entretanto, o tempo

necessário para a hidrólise completa foi 25 % menor no reator de leito fluidizado quando altas taxas de recirculação foram utilizadas.

YANGA et al. (2011) estudaram uma enzima alternativa para a clarificação do suco de maçã. A enzima foi obtida a partir da clonagem de um gene de um fungo acidofílico e utilizando como suporte catalítico uma glico-hidrolase. Os autores observaram uma atividade enzimática máxima desta enzima em pH 3,5 e a 50 °C, mostrando ainda uma boa estabilidade na faixa de pH entre 2 e 7. Quando utilizada no tratamento do suco de maçã na concentração de 10 U/mL, a enzima diminuiu a viscosidade intrínseca do suco e aumentou o grau de clarificação, quando comparada a uma enzima (pectinase) comercial, mostrando-se promissora para a indústria de sucos.

2.6.1. Amilase

A amilase é uma enzima que atua diretamente nas moléculas de amido, transformando-as em moléculas de menores tamanho. Existem dois tipos importantes de amilases, as alfa-amilases e as beta-amilases. A alfa-amilase é responsável por fornecer uma mistura de substâncias chamadas de dextrinas, já a beta-amilase hidrolisa o amido formando a maltose. A Figura 3 mostra onde essas duas enzimas agem no amido.

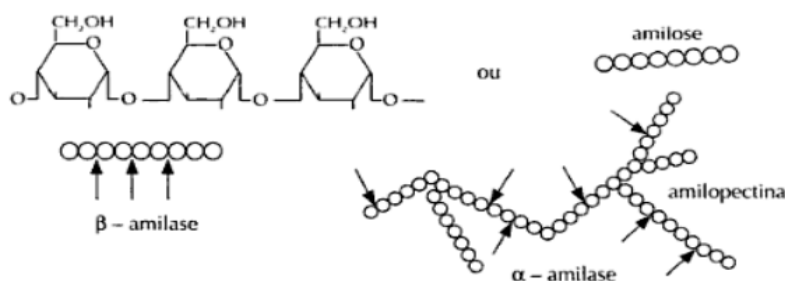


Figura 3 Ação das amilases em moléculas de amilose e amilopectina.(GAVA,1978).

2.6.2. Enzimas Pécnicas

As enzimas pécnicas são de bastante utilização na indústria de alimentos por facilitar a filtração e clarificação de sucos. Essas enzimas são indesejáveis quando se quer uma solução mais consistente. Podemos encontrar três enzimas pécnicas de maior importância: pectinesterase, poligalacturonase e pectina-transeliminase. A ação da pectinesterase (PE) e poligalacturonase (PG) está representada na Figura 4.

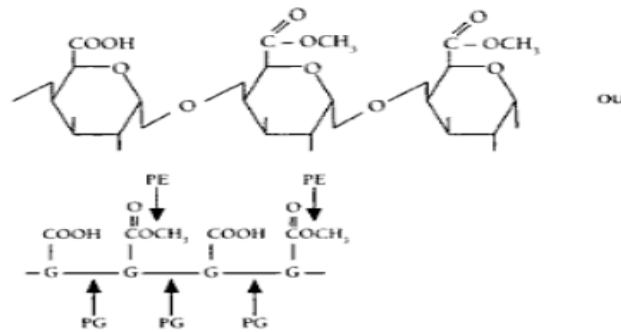


Figura 4 Posições de ataque de pectinesterase e poligalacturonase na pectina (GAVA,1978).

Outros trabalhos estudam, ainda, outros tipos de tratamento para a clarificação do suco de maçã, que não o tratamento enzimático. Alguns destes trabalhos são apresentados a seguir.

TULEK et al. (2006) avaliaram o efeito de oito diferentes métodos de tratamento do suco de maçã nos teores de ácido fumárico (FA) e hidroximetilfurfural (HMF) resultantes no suco, bem como na coloração e na clarificação do mesmo. Os tratamentos estudados foram a ultrafiltração (1), a utilização dos adsorventes charcoal (AC) (2) e a polivinilpolipirrolidona (PVPP) (3), a utilização de gelatina juntamente com o composto bentonite (4), a junção dos tratamentos (4) e (1) (5), a junção dos tratamentos (4) e (2) (6), a junção dos tratamentos (4) e (3) (7) e a utilização do tratamento (4) juntamente com terra diatomácea (8). Os autores observaram que a concentração de FA e HMF no suco clarificado diminuiu com o aumento da concentração de AC e PVPP. Os tratamentos que se mostraram mais eficientes na redução destes compostos foram o tratamento (6) e (7); para a clarificação do suco, entretanto, apenas os processos (5), (6) e (8) se mostraram eficientes.

A maioria dos trabalhos que estudam a utilização de membranas de ultrafiltração para a clarificação do suco de maçãs envolve a utilização de enzimas antes do processo de filtração a fim de obter um fluxo permeado mais adequado; HEA e SHUNXIN LI (2007) propuseram um processo alternativo de clarificação, usando membranas de ultrafiltração, mas sem a utilização de enzimas e nem mesmo a pasteurização prévia deste suco. Os autores utilizaram uma membrana de módulo placa e quadro, com massa molar de corte de 50 kDa, com a solução de alimentação na temperatura de 40-50 °C, variando a pressão de operação entre 1 e 3 bar e velocidade de escoamento entre 1,5 e 2,5 m/s. Os autores observaram que o tratamento enzimático e a pasteurização prévia ao uso das membranas exerce profunda influência no fluxo permeado obtido. As condições operacionais mais eficientes para a clarificação do suco foram as seguintes: pressão

transmembrana de 2 bar, velocidade de alimentação de 2,5 m/s e temperatura de 50 °C. Em testes longos de ultrafiltração, sem o prévio tratamento enzimático e pasteurização, foram obtidos fluxos permeados da ordem de 120 L/m².h.

ARAYA-FARIAS et al. (2008) avaliaram a utilização da técnica de eletroflotação como uma alternativa para a clarificação de sucos de maçã. Para tanto, diferentes densidades de correntes foram testadas (10, 20 e 40 mA/cm²), com e sem a adição de gelatina como agente auxiliar da clarificação (200 mg/L). Após os testes iniciais, os autores fixaram a densidade de corrente em 20 mA/cm² e avaliaram a concentração de gelatina adicionada, entre 0 e 200 mg/L. Os autores observaram que a eletroflotação só se mostrou eficiente na clarificação do suco quando enzimas (pectinases) eram utilizadas como um pré-tratamento. A utilização da gelatina como agente auxiliar da clarificação, entretanto, mostrou bons resultados junto com o processo de eletroflotação; quanto maior a concentração de gelatina adicionada, melhores foram os resultados obtidos.

RUNGSARDTHONG et al. (2006) estudaram um processo diferente de clarificação do suco de maçã, utilizando como agente clarificante, a quitosana, um composto largamente utilizado industrialmente. Comparou-se a eficiência na hidrólise do amido utilizando uma quitosana extraída de um fungo com uma quitosana comercial, extraída do camarão. As reações de hidrólise foram realizadas nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C, com concentrações de quitosana de 0,1, 0,5, 0,7 e 1,0 g/L; a máxima clarificação do suco foi obtida na temperatura de 40 °C, com 0,7 g/L de quitosana. A quitosana extraída do fungo se mostrou mais efetiva na redução da turbidez do suco de maçã do que a quitosana comercial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentada a metodologia empregada para determinação da cinética da degradação do amido, bem como os equipamentos utilizados, as etapas do processo de fabricação do suco e os métodos analíticos para determinação dos açúcares.

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios LATEPA (Laboratório de Tecnologia e Processos em Alimentos) e LASEM (Laboratório de Separação por Membranas) e na Central Analítica situados no Departamento de Engenharia Química desta Universidade.

3.1. Materiais

As maçãs utilizadas nos experimentos eram da variedade Fuji por ser abundante em nosso estado nessa época do ano. Com a finalidade de reduzir o erro experimental, as maçãs foram adquiridas de um mesmo fornecedor em comércio local e escolhidas de forma a apresentarem tonalidade (grau de maturação) e tamanho semelhantes.

As enzimas, amilase (Novozyme® AG 300 L e Novozyme® AG XXL) e pectinase (Novozyme® 33095), são preparados comerciais (amilases) e foram obtidas da Novozymes S/A® (Bagsvaerd, Dinamarca). Essas enzimas são ativas em uma temperatura entre 15-55 °C e para uma faixa de pH de 2,8 - 4,5. As alíquotas da enzima foram diluídas 100 vezes com água destilada (como recomendado pelo fabricante).

Os padrões de frutose, glicose, maltose foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) e o amido de trigo foi cedido pela SOLAE Company (Esteio, RS). Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza para análise.

3.2. Métodos

a) Preparo da amostra

O processo de obtenção do suco seguiu conforme o fluxograma apresentado na Figura 5. Cada etapa deste fluxograma será explicada melhor a seguir.

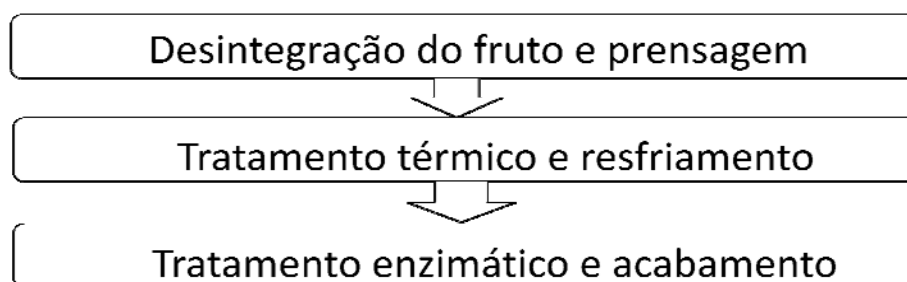


Figura 5 Fluxograma do processo de obtenção das amostras.

Desintegração do fruto e prensagem: como operação preliminar à desintegração dos frutos, as maçãs foram sanitizadas com uma solução de NaOCl (Hipoclorito de Sódio) a 0,01% a fim de evitar a contaminação do suco com qualquer microrganismo presente na casca da maçã ou com pesticidas utilizado na plantação. Depois de higienizadas as maçãs foram cortadas manualmente em cubos, desintegradas com o auxílio de um mixer (Ultra mixer, Britânia, Brasil) e prensadas manualmente com o auxílio de um saco de malha fina (inferior a 1 mm). O suco resultante foi armazenado congelado até o momento das análises e o bagaço resultante foi armazenado para estudos posteriores.

Tratamento Térmico e Resfriamento: o suco a ser utilizado nos testes passou por um tratamento térmico, conforme sugerido pelo fabricante das enzimas, em micro-ondas (Micro-ondas 17 Litros ME18S, Eletrolux) durante 6 minutos em potência máxima a fim de inativar microrganismos que pudessem intervir na ação das enzimas estudadas. Após esse aquecimento a solução foi resfriada em banho de gelo para que se alcançasse a temperatura ambiente o mais rápido possível evitando a degradação de nutrientes e a formação de compostos indesejáveis.

Tratamento Enzimático e acabamento: para o tratamento enzimático foi utilizado um banho tipo Dubnoff (Quimis, Q226M, Diadema/SP, Brasil) com agitação para manter a temperatura do mosto em 50 ± 2 °C. Essa temperatura foi escolhida para ser o suficientemente alta, a fim de evitar a proliferação microbiana e não ultrapassar a temperatura de inativação da enzima. Foram adicionadas duas enzimas, a AG 300 L e a AG XXL nas concentrações explicitadas na Tabela 3. O tratamento enzimático seguiu, também, as recomendações do fabricante das enzimas. Após o tratamento enzimático, as amostras foram filtradas e armazenadas a -18 ± 2 °C até o momento das análises. A Figura 6 mostra uma fotografia o banho térmico com agitação que foram submetidas as amostras com as enzimas adicionadas.

Tabela 3: Concentrações das enzimas AG300 L e AG XXL adicionadas em cada experimento.

Enzimas	Concentrações (ppm)		
AG 300 L	10	20	30
AG XXL	5	10	15



Figura 6 Shaker com as amostras e enzimas.

Para determinar o rendimento percentual do suco, calculou-se a razão entre a massa de suco em gramas (M_{suco}) e a massa de frutos em gramas (M_{fruto}) como mostra a Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{M_{\text{suco}}}{M_{\text{fruto}}} \times 100 \quad (1)$$

b) Planejamento dos Experimentos

Foram realizadas 6 experimentos, retirando-se 10 amostras em cada um. A fim de evitar a contaminação do suco, cada amostra foi separada em um erlemeyer contendo 50 mL de suco e adicionado um quantidade de enzimas (pectinase – 33095 e amilase – AG 330L e AG XXL). Essas amostras foram retiradas em tempos pré-determinados, em um total de 3 horas, conforme a Tabela 4. A seguir, e submetidas ao congelamento logo em seguida para diminuir a atividade enzimática até sua completa inativação. As amostras retiradas foram separadas em duas partes: a primeira foi analisada com o HPLC para determinação da quantidade de açúcar e, a segunda parte foi analisada pelo método proposto por CARRÍM (2004) para determinação da quantidade de amido.

Como o objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia a ser utilizada em maçãs antes de sua completa maturação, uma batelada de experimentos extras foi realizada. Nestes experimentos, foi adicionado amido de batata no momento da confecção do mosto, a fim de deixar-lo esse mosto com uma quantidade maior de amido tentando simular uma maçã que tivesse sido colhida antes de sua total maturação.

Tabela 4: Tempo de retirada das amostras para cada concentração de enzimas.

Enzima - Concentração	Tempo (min)									
AG 300 L - 10 ppm	0	30	60	90	105	120	135	150	165	180
AG 300 L - 20 ppm	0	30	60	90	105	120	135	150	165	180
AG 300 L - 30 ppm	0	30	60	90	105	120	135	150	165	180
AG XXL - 5 ppm	0	30	60	90	105	120	135	150	165	180
AG XXL - 10 ppm	0	30	60	90	105	120	135	150	165	180
AG XXL - 15 ppm	0	30	60	90	105	120	135	150	165	180

Todas as etapas realizadas descritas no fluxograma da Figura 6 foram adotadas nesse experimento variando o tempo e a enzima utilizada. As retiradas das amostras se procederam ao longo de 20 h. O objetivo era confeccionar um gráfico que mostrasse o trabalho enzimático por um período de tempo mais longo. A Tabela 5 mostra os tempos para cada concentração das enzimas utilizadas.

Tabela 5: Tempo de retirada das amostras para cada concentração de enzimas.

Enzima – Conc.	Tempo (min)														
AG 300 L – 20 ppm	0	30	70	120	160	190	220	270	340	390	440	480	1090	1150	1200
AG XXL – 10 ppm	0	30	70	120	160	190	220	270	340	390	440	480	1090	1150	1200

c) Análise de Açúcares

Para determinação da maltose, isomaltose, frutose e glicose utilizou-se a cromatografia em fase líquida, HPLC (High Performance Liquid Chromatography). O Cromatógrafo utilizado foi o da empresa PerkinElmer modelo Series 200, com aquecedor também da PerkinElmer modelo Series 200 e com detector de índice de refração também da PerkinElmer modelo Series 200. A coluna utilizada foi a Rezex RHM Monossacaride e a pré-coluna Holder KJO-4282, ambas da marca Phenomenex. A vazão da fase móvel foi de $0,60 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura da coluna de $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para a fase móvel utilizou-se a água Milli-Q (água mais pura que a deionizada e a destilada). O tempo aproximado de retenção da maltose e da isomaltose são de $8,22 \pm 0,23 \text{ min}$, da glicose é de $10,00 \pm 0,3 \text{ min}$ e da frutose de $10,80 \pm 0,37 \text{ min}$.

Para realização dessas análises foi realizado a diluição da amostra, pois ela apresentava uma concentração tal que ultrapassava o limite detectado pelo HPLC. Todas as amostras foram diluídas na proporção de 5 volumes de água para um volume

da solução. Para que as análises fossem mais precisas, foi realizado o processo de hidrólise em todas as amostras por uma hora em banho de água a 100 °C.

d) Análise de Amido

Para a determinação do teor de amido das amostras de suco, utilizou-se a metodologia proposta por CARRÍN et al. (2004), porém, foi utilizado o amido de trigo ao invés do amido de milho para a determinação da curva padrão. A curva de calibração para o amido foi realizada utilizando espectrofotômetro UV1600 (Pro-análise, Brasil) no comprimento de onda de 615 nm. A solução de amido foi preparada com a adição de 2 M de Hidróxido de Sódio (NaOH) e o mesmo volume de ácido clorídrico (HCl) 2 M. Essa solução foi aquecida até que estivesse totalmente clarificada e posteriormente filtrada. A solução final ficou com pH em torno de 4,6. Foi preparado também uma solução tampão de ácido acético com acetato de sódio com pH 4,6 para que pudesse ser feitas as diluições da solução de amido, em duplicata, em diferentes concentrações para produção da curva de calibração. Para que fosse possível analisar a concentração de amido foi preparado uma solução de Lugol que utiliza 1 % iodo (I₂) e 2 % iodeto de potássio (KI), que deixa uma coloração azul-violeta quando em contato com o amido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões são apresentados em três seções: primeiramente são apresentados os resultados obtidos para o preparo dos sucos; posteriormente, as curvas de calibração de glicose, frutose e amido, os resultados obtidos para os experimentos com suco *in natura* e, por fim, os resultados obtidos para o suco adicionado de amido.

4.1. Preparação dos sucos

Os resultados obtidos para o rendimento da produção do suco manualmente foram de aproximadamente 80 % de suco, sendo um valor acima do esperado pela técnica empregada. Os valores encontrados para rendimento de extração foram superiores daqueles descritos por AL-MASHAT e ZURITZ (1993) e VICENZI (2001) que encontraram valores de rendimento inferiores a 60 %.

4.2. Curvas de calibração

O método para a determinação das curvas de calibração baseou-se na padronização externa que compara a área ou absorvância da substância a ser quantificada na amostra com as áreas ou absorvâncias obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. Foram preparadas soluções da substância a ser quantificada (glicose, frutose e amido) em diversas concentrações; obtêm-se no cromatógrafo áreas correspondentes ou, no espectrofotômetro, absorvâncias que são relacionadas graficamente com as concentrações. Utilizando este gráfico ou a equação da curva resultante, pôde-se então calcular a concentração desta substância na amostra.

4.2.1. Análise do Teor de Açúcares

Foram realizadas curvas de calibração no HPLC para relacionar a área do pico à concentração. Na Tabela 6 estão apresentadas as médias das áreas dos picos de cada açúcar (glicose e frutose) em relação à sua concentração. Nas Figuras 7 e 8 estão apresentados os gráficos da curva de calibração para a glicose ($R^2 = 0,9977$) e frutose ($R^2 = 0,9964$), respectivamente.

Tabela 6: Médias das áreas dos picos de cada açúcar (glicose e frutose) em relação à sua concentração.

Concentração (g/L)	Área da Glicose ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Área da Frutose ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
0,4	$2,588 \times 10^5$	$2,458 \times 10^5$
1,0	$6,305 \times 10^5$	$6,083 \times 10^5$
2,0	$1,263 \times 10^6$	$1,215 \times 10^6$
3,0	$1,889 \times 10^6$	$1,821 \times 10^6$
4,0	$2,362 \times 10^6$	$2,263 \times 10^6$

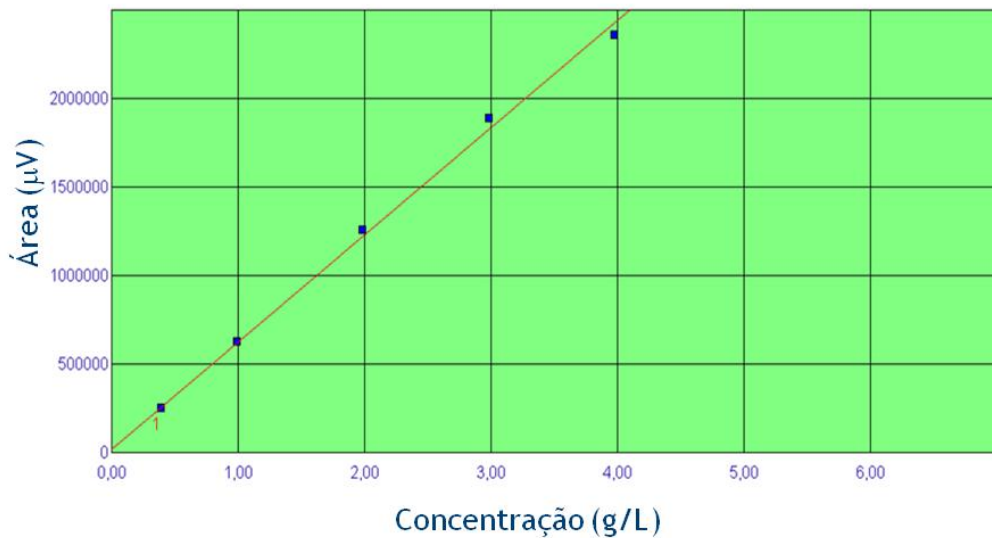


Figura 7 Gráfico da curva de calibração da glicose.

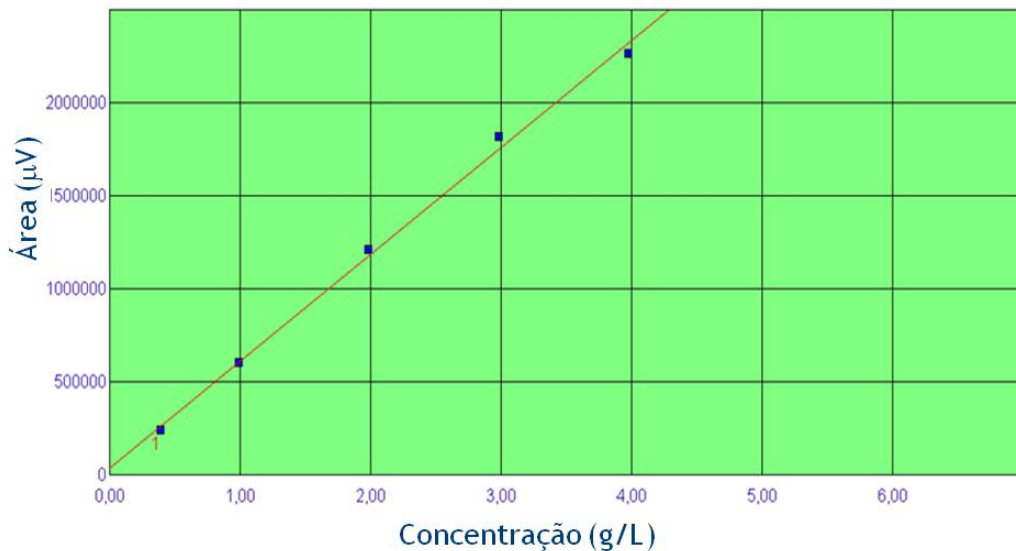


Figura 8 Gráfico da curva de calibração da frutose.

4.2.1. Análise do Teor de Amido

Para a elaboração da curva de calibração do amido fez-se uso do espectrofotômetro com um comprimento de onda de 615 nm, segundo metodologia proposta por CARRÍN et al. (2004). Os dados utilizados estão apresentados na Tabela 7,

onde A e B representam as duplicatas das amostras de amido de trigo, nas diferentes concentrações.

Tabela 7 Dados utilizados para elaboração da curva padrão do amido, onde A e B representam as duplicatas das amostras de amido de trigo.

Concentração (g/L)	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
A	0,156	0,303	0,364	0,570	0,766	0,960	1,172
B	0,152	0,302	0,360	0,547	0,770	0,965	1,180
Média	0,154	0,302	0,362	0,559	0,768	0,963	1,176

Os dados da Tabela 7 resultaram o gráfico da Figura 9. Nesta curva de calibração do amido, obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9981 e a correlação entre a absorvância e a concentração de amido (em g/L) é dada pela Equação 2, onde C_{con} é a concentração de amido (g/L) e A_{abs} é a absorvância.

$$C_{con} = 0,4998 \times A_{abs} - 0,0844 \quad (2)$$

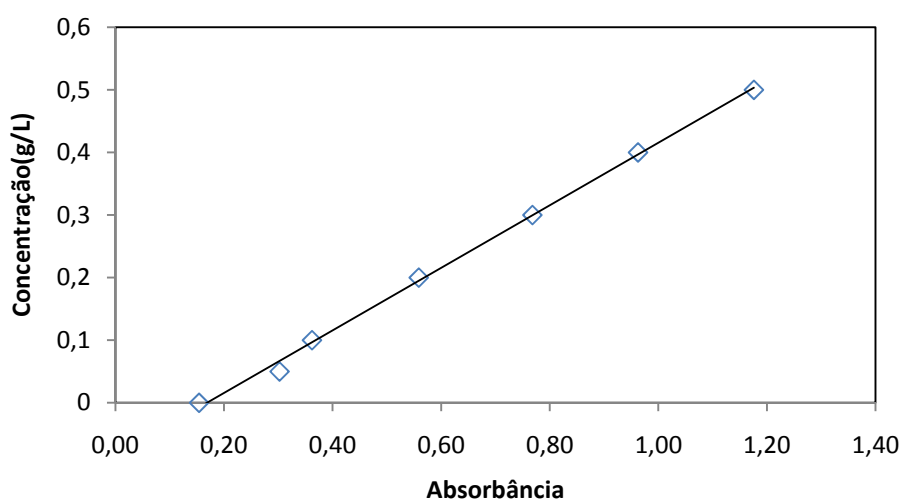


Figura 9 Gráfico da curva de calibração do amido.

4.3. Experimentos com suco *in natura*

4.3.1. Efeito da concentração da enzima e suco sobre o teor de açúcares

Conforme comentado anteriormente, cada amostra de suco submetida ao tratamento enzimático e coletada nos diferentes intervalos de tempo foi submetida à análise de seus teores de açúcares. Desejava-se obter a concentração de cada tipo de açúcar separadamente: glicose, frutose, maltose e isomaltose. O gráfico da Figura 10 demonstra um cromatograma típico do suco de maçã. Nele pode-se observar dois picos distintos e bem separados: o da glicose a 10,00 minutos e o da frutose a 10,80 minutos. Observam-se também outros picos com menor expressão e uma concentração

praticamente nula de isomaltose. Cabe destacar que entre todas as repetições das leituras (injetadas pelo menos em triplicata) houve uma variação inferior a 2 %.

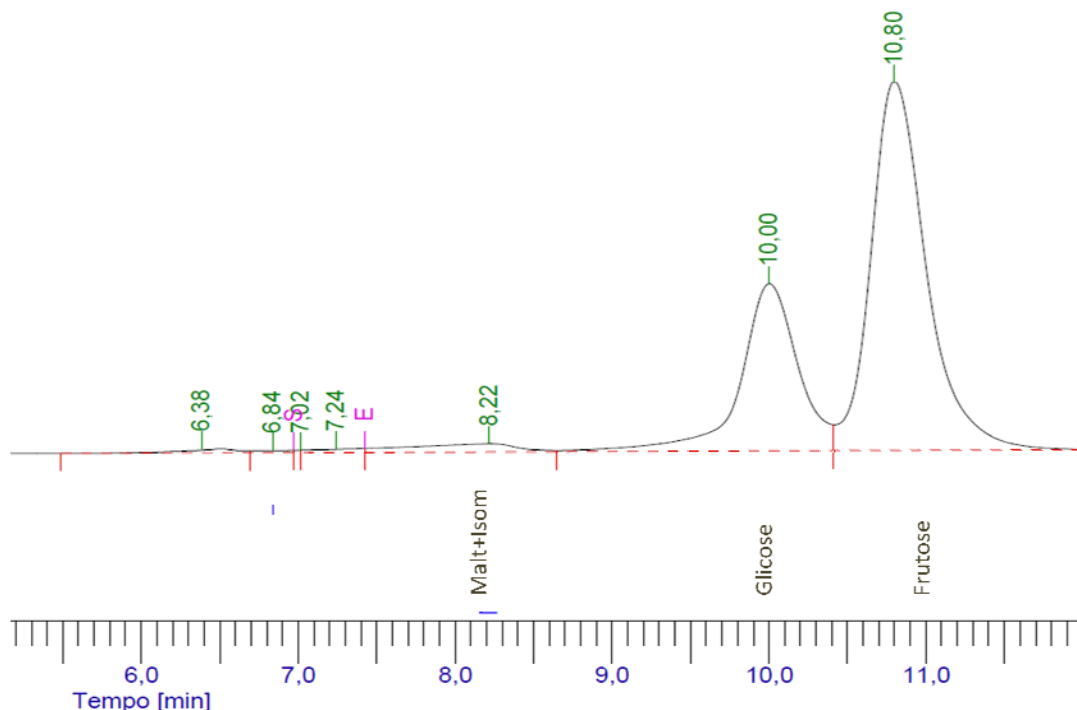


Figura 10 Gráfico do tempo de retenção dos açúcares feitas no HPLC com uma coluna para monossacarídeos, com vazão de 0,6 L/min, Temperatura de 80 °C, presa de 520 psi.

Um dos objetivos iniciais do trabalho foi determinar o conteúdo de maltose e isomaltose no suco, porém ambos os açúcares apresentaram o mesmo tempo de retenção (de 8,22 min) e a sua separação, com o uso desse tipo de coluna nas condições testadas, não foi possível. Ainda, a concentração de maltose+isomaltose nos frutos utilizados para os experimentos deste trabalho, apresentaram teores desses açúcares inferiores ao limite de detecção do método. Em virtude disso os valores encontrados para a maltose e isomaltose foram desconsideradas no decorrer das análises.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados para os teores de frutose e glicose nos sucos de maçã tratados com a enzima AG 300L em diferentes tempos e concentrações. Conforme pode ser observado, não é possível qualquer conclusão a respeito da influência da enzima, bem como do tempo de tratamento enzimático, na concentração de frutose e glicose presente nas amostras. Especula-se que este resultado possa ser decorrente de baixas concentrações de amido no suco *in natura*. Se essa concentração for realmente muito baixa, não há amido a ser degradado pelas enzimas e, por consequência, a ser convertido em glicose e frutose; a detecção do aumento do teor destes compostos nas amostras seria, portanto, prejudicada.

Tabela 8: Resultados para os teores de frutose e glicose para os sucos de maçã tratados com a enzima AG 300L em diferentes tempos e concentrações.

Amostra	Concentração da Enzima AG 300L (ppm)	Tempo (min)	Teor de Frutose (g/L)	Teor de Glicose (g/L)
1	10	0	51,95 ± 0,07	37,50 ± 0,06
2	10	30	53,37 ± 0,72	37,26 ± 0,52
3	10	60	46,11 ± 0,73	32,30 ± 0,41
4	10	90	49,36 ± 0,49	34,52 ± 0,32
5	10	105	52,60 ± 0,25	36,74 ± 0,23
6	10	120	48,39 ± 0,23	33,69 ± 0,16
7	10	135	44,33 ± 0,19	30,85 ± 0,13
8	10	150	52,23 ± 0,99	36,44 ± 0,82
9	10	165	46,25 ± 0,09	31,81 ± 0,53
10	10	180	54,28 ± 0,01	37,55 ± 0,01
11	20	0	38,72 ± 0,34	28,92 ± 0,23
12	20	30	37,51 ± 0,14	27,81 ± 0,08
13	20	60	38,75 ± 0,10	28,92 ± 0,10
14	20	90	38,29 ± 0,30	28,45 ± 0,25
15	20	105	36,50 ± 2,85	25,77 ± 0,30
16	20	120	41,72 ± 0,00	31,05 ± 0,01
17	20	135	34,17 ± 0,05	25,28 ± 0,07
18	20	150	40,51 ± 0,07	30,08 ± 0,05
19	20	165	38,31 ± 0,05	28,47 ± 0,04
20	20	180	39,30 ± 0,05	29,28 ± 0,02
21	30	0	41,69 ± 0,51	30,09 ± 0,39
22	30	30	38,27 ± 0,00	27,62 ± 0,09
23	30	60	40,06 ± 0,22	29,04 ± 0,18
24	30	90	40,34 ± 0,16	29,22 ± 0,17
25	30	105	37,93 ± 0,00	27,58 ± 0,04
26	30	120	42,88 ± 0,78	31,00 ± 0,53
27	30	135	36,85 ± 0,11	26,58 ± 0,06
28	30	150	35,41 ± 1,06	25,43 ± 0,83
29	30	165	35,98 ± 0,62	25,73 ± 0,43
30	30	180	39,71 ± 0,36	28,59 ± 0,27

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados para os teores de frutose e glicose nos sucos de maçã tratados com a enzima AG XXL em diferentes tempos e concentrações. Nessa tabela observa-se, novamente, que a adição da enzima AG XXL pouco afeta nos teores de glicose e frutose e, para maiores conclusões sobre a ação dessa enzima, mais repetições dos experimentos seriam necessárias. Novamente, especula-se sobre as baixas concentrações de amido nas amostras de suco utilizadas.

Tabela 9: Resultados para os teores de frutose e glicose para os sucos de maçã tratados com a enzima AG XXL em diferentes tempos e concentrações.

Amostra	Concentração da Enzima AG XXL (ppm)	Tempo (min)	Teor de Frutose (g/L)		Teor de Glicose (g/L)	
31	5	0	40,16	± 0,07	30,68	± 0,04
32	5	30	40,40	± 0,08	30,43	± 0,05
33	5	60	40,65	± 0,10	30,18	± 0,06
34	5	90	40,72	± 0,16	29,28	± 0,15
35	5	105	41,73	± 0,08	31,87	± 0,16
36	5	120	42,61	± 0,11	32,90	± 0,29
37	5	135	43,10	± 0,43	32,51	± 0,18
38	5	150	44,00	± 0,13	33,52	± 0,08
39	5	165	42,00	± 0,02	31,86	± 0,01
40	5	180	42,17	± 0,19	32,03	± 0,15
41	10	0	42,51	± 0,15	33,80	± 0,10
42	10	30	41,37	± 0,08	33,36	± 0,08
43	10	60	42,83	± 0,83	32,66	± 0,58
44	10	90	42,33	± 0,09	34,17	± 0,10
45	10	105	42,10	± 0,48	34,96	± 0,31
46	10	120	41,97	± 0,09	30,55	± 0,10
47	10	135	40,76	± 0,10	33,45	± 0,05
48	10	150	39,55	± 0,13	28,58	± 0,14
49	10	165	40,73	± 0,08	33,13	± 0,03
50	10	180	41,81	± 0,21	30,23	± 0,20
51	15	0	39,82	± 0,26	29,21	± 0,22
52	15	30	40,82	± 0,02	31,48	± 0,02
53	15	60	41,03	± 1,03	30,09	± 0,77
54	15	90	40,37	± 0,25	34,23	± 0,22
55	15	105	39,71	± 0,07	27,70	± 0,04
56	15	120	40,15	± 0,05	29,59	± 0,04
57	15	135	40,99	± 0,26	29,98	± 0,46
58	15	150	41,83	± 0,47	30,36	± 0,89
59	15	165	42,17	± 0,11	32,46	± 0,09
60	15	180	42,91	± 0,06	34,64	± 0,03

4.3.1. Efeito da concentração da enzima e suco sobre o teor de amido

Da mesma forma que quantificou-se os teores de açúcares das amostras de suco submetidas ao tratamento enzimático, avaliou-se também a concentração dos teores de amido dessas amostras. A Figura 11 mostra a variação da concentração de amido em função do tempo para o tratamento com a enzima AG 300L a 10 ppm. Pode se constatar que a quantidade de amido inicial é muito pequena perto do limite de detecção do método e, logo nos primeiros minutos, decai para níveis não detectáveis de concentração não podendo ser levado em consideração. Comportamento semelhante a este, foi apresentado para os demais experimentos, apresentando níveis de amido abaixo do limite de detecção (0,001 g/L).

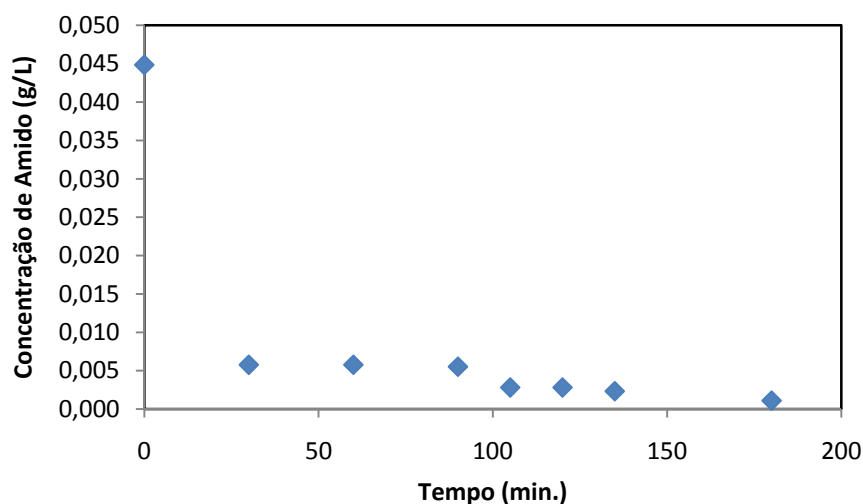


Figura 11 Degradação do amido em suco de maçã pela enzima AG 300L a 10 ppm durante 180 min.

Esse resultado vai ao encontro dos resultados obtidos por CARRÍN et al. (2004), que utilizaram maçãs colhidas 15 dias antes da data prevista para a colheita; as maçãs deixadas a temperatura ambiente por uma semana apresentaram concentrações mínimas de amido solúvel e insolúvel (0,1 e 2,47 g/L, respectivamente), enquanto que nenhuma fração de amido solúvel e insolúvel foi detectada nas maçãs deixadas a temperatura ambiente por três semanas.

Uma vez que a colheita das maçãs utilizadas neste estudo é prevista para os meses de janeiro e fevereiro, e o mesmo foi realizado nos meses de maio a julho, explica-se a ausência de amido nas amostras estudadas.

4.4. Experimentos com suco de maçã adicionados de amido

4.4.1. Efeito do tempo e da concentração de enzima sobre o teor de açúcares

Em função da ausência de amido detectada nas amostras de suco de maçã *in natura*, partiu-se para uma nova série de experimentos. Nessa etapa dos experimentos foi utilizado o suco com adição de amido para duas enzimas com concentrações diferentes (AG XXL e AG 300L). Os resultados de maltose e isomaltose continuaram com valores abaixo do limite de detecção, sendo novamente descartados. A partir dos dados obtidos para os teores de glicose e frutose, foram elaborados os gráficos das Figuras 12 e 13, nos quais a porcentagem de frutose e glicose, respectivamente, foi plotada em função do tempo. No gráfico da Figura 12 é possível observar a velocidade de formação de frutose pela enzima AG XXL demanda menos tempo para atingir os

mesmos resultados que a enzima AG 300L. Podendo-se concluir que o tempo necessário para se obter o mesmo resultado é menor.

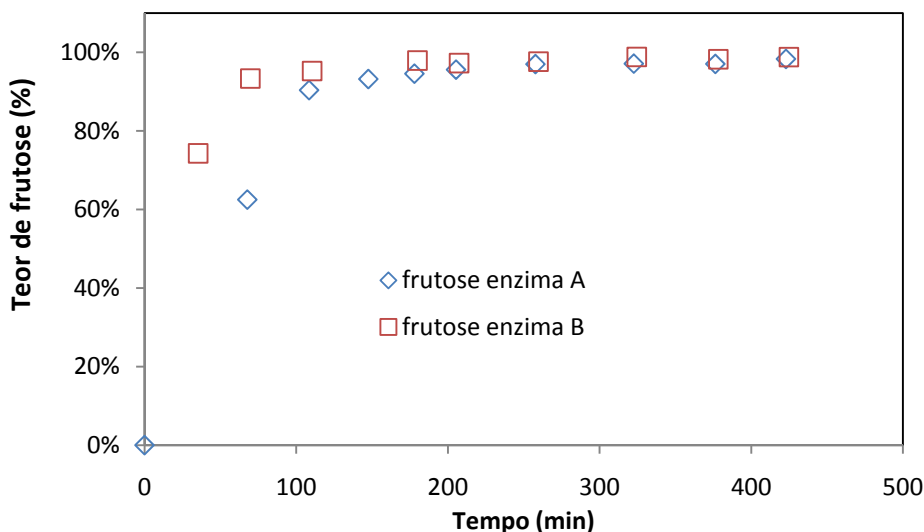


Figura 12 Gráfico da porcentagem de conversão do amido em frutose das enzimas (A) AG 300 L e (B) AG XXL em função do tempo.

O mesmo comportamento pôde ser observado na apuração dos dados de concentração da glicose, gráfico da Figura 13, que mostra uma formação de glicose mais rápida com enzima AG XXL do que com a enzima AG 300 L.

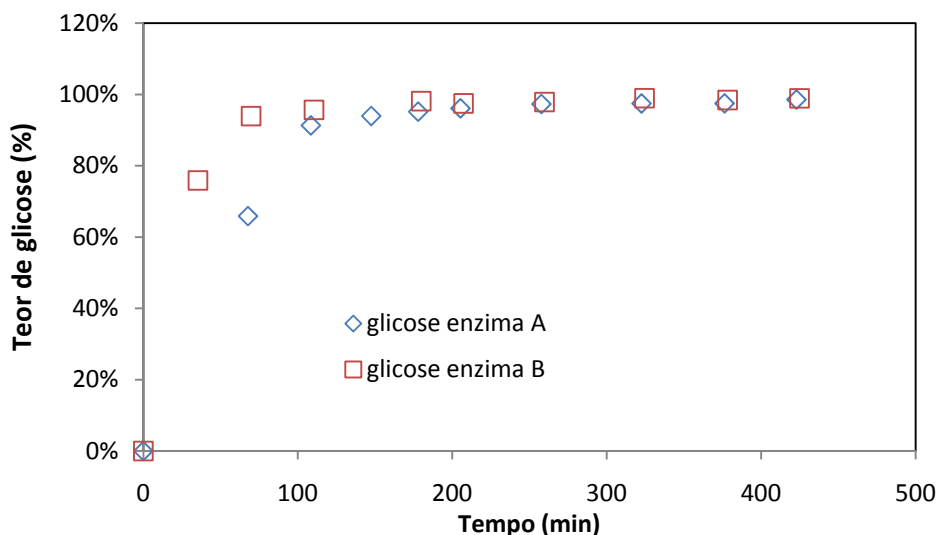


Figura 13 Gráfico da porcentagem de conversão do amido em glicose das enzimas (A) AG 300L e (B) AG XXL em função do tempo.

4.4.2. Efeito do tempo e da concentração de enzima sobre o teor de amido

Os dados resultantes da análise de amido possibilitaram a elaboração do gráfico mostrado na Figura 14 que apresenta o decaimento da concentração de amido em função do tempo. Comparando os resultados obtidos para a enzima AG 300L e

AG XXL, é possível constatar que a velocidade de degradação do amido com a enzima AG XXL é superior ao da enzima AG 300L, chegando a valores inferiores a 0,001 g/L para tempos superiores a 200 minutos para ambas as enzimas.

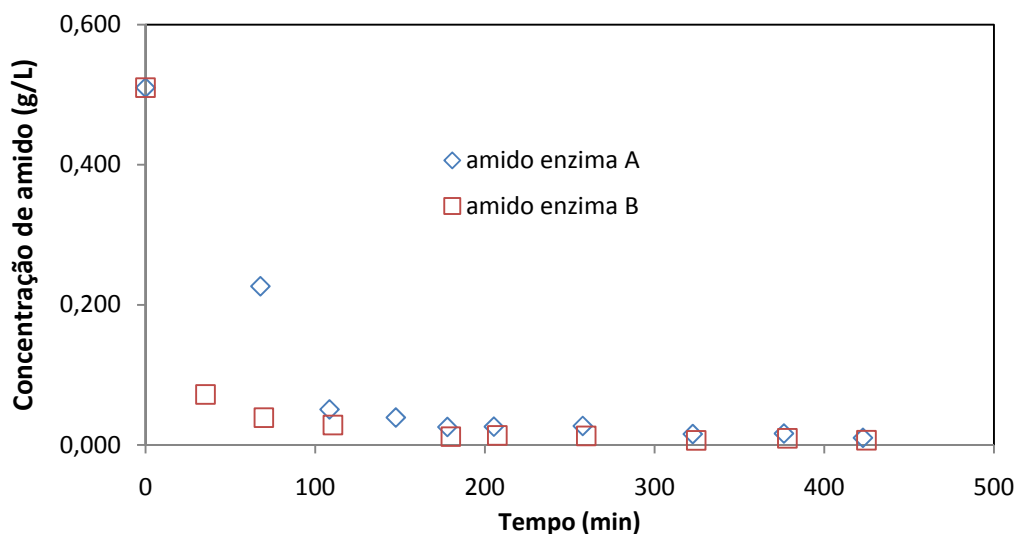


Figura 14 Degradação do amido em função do tempo pelas enzimas (A) AG 300L e (B) AG XXL.

Pode-se observar, portanto, que a enzima AG XXL apresentou uma atividade enzimática maior que a enzima AG 300L na degradação do amido presente no suco de maçã em suas frações solúveis de glicose e frutose. Esse resultado já era esperado, uma vez que a enzima AG XXL é mais concentrada que a enzima AG 300L.

Observa-se também que essa conversão se dá muito rapidamente nas condições em que o experimento foi realizado: nos primeiros 100 min de reação é possível observar que praticamente todo o amido presente no suco foi degradado as suas frações solúveis (Figura 14) e que, desta forma, após este tempo, praticamente não há mais a formação de glicose e frutose nas amostras de suco (Figuras 12 e 13).

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para avaliação da degradação enzimática do amido do suco de maçã e testar a aplicação de duas enzimas diferentes na velocidade de degradação.

Pode-se concluir que a metodologia empregada para a produção do suco de maçã em laboratório foi eficiente, pois foi obtido um valor de 80 % de suco, em peso, validando o método empregado.

As análises de concentração de açúcares por HPLC se mostraram muito confiáveis, com erros inferiores a 2 %.

As maçãs utilizadas, em função da época do ano (e, por consequência, do seu grau de maturação) continham um teor muito baixo de amido, inviabilizando a análise da curva de degradação, porém o teste com a adição de amido ao suco de maçã mostrou que o método fotométrico empregado para a análise do teor de amido foi adequado para quantificação dos teores de amido, apresentando resultados muito satisfatórios, podendo ser aplicada para maçãs menos maduras, com maior teor de amido.

A partir do experimento com adição de amido ao suco de maçã, pôde-se comprovar a eficiência da enzima testada na degradação do amido, pois pode ser observada uma diminuição drástica da quantidade de amido nas amostras estudadas, em um curto período do tempo. A enzima mais concentrada AG XXL, conforme era esperado, apresentou uma atividade enzimática superior que a enzima AG 300L.

Sugere-se, para trabalhos futuros: determinar a cinética de degradação do amido, realizando os testes no mês de janeiro (no máximo até 15 de fevereiro) em função do grau de maturação dos frutos e, por consequência, do seu teor de amido; avaliar a cinética de degradação a partir de soluções sintéticas modelos, com concentrações conhecidas de amido e reduzir o intervalo de coleta das amostras na primeira hora de experimento, em função da acelerada atividade das enzimas testadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEHLRe, W.. Enzymes in industry: production and applications. Editora Wiley –VCH, p 484, 2004.
- ALVAREZ, S.; ALVAREZ, R.; RIERA, F.A.; COCA, J. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 138, n. 2-3, p. 377-382, 1998.
- ARAYA, F, M., MONDOR, M., LAMARCHE, F., TAJCHAKAVIT, S., MAKHOUF, J., Clarification of apple juice by electroflotation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 320–327, 2008.
- AL-MASHAT, S. H. I.; ZURITZ, C. A. Stress relaxation behavior of apple pomace and effect of temperature, pressing aid and compaction rate on juice yield. *Journal of Food Engineering*, v. 20, n. 3, p. 247 266, 1993.
- BRASIL. Instrução Normativa N°1, de 07 de Janeiro de 2000. Aprova regulamento técnico geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. *Diário Oficial da União, Seção 1*, p.54, 10 jan., 2000.
- BUCHERT, J.; KOPONEN, J.M.; SUUTARINEN, M.; MUSTRANTA, A.; LILLE, M.; OUML; RR; OUML; NEN, R.; POUTANEN, K. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, p. 2548-2556, 2005.
- CARRÍN, M. E., CECI, L. e LOZANO, J. (2002), Kinetic Studies of an Amylase used Commercially for the Clarification of Apple Juice, *Journal of Food Processing Preservation* 26 153-163, 2002.
- CARRÍN, M. E., CECI, L. e LOZANO, J. (2004), Characterization of starch in apple juice and its degradation by amylases. *Food Chemistry* 87, 173–178, 2004.
- DFL - Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, *Lebensmitteltabelle für die Praxis* (1991). Disponível em [http://www.food-allergens.de/symposium-voll\(3\)/data/apple/apple-composition.htm](http://www.food-allergens.de/symposium-voll(3)/data/apple/apple-composition.htm). Acessado em junho, 2011.
- DIANO, N., GRIMALDI, T., BIANCO, M., ROSSI, S., GABROVSKA, K., YORDANOVA, G., GODJEVARGOVA, T., GRANO, V., NICOLUCCI, C., MITA, L., BENCIVENGA, U., CANCELIGLIA, P. e MITA, D.G. Apple Juice Clarification by Immobilized Pectolytic Enzymes in Packed or Fluidized Bed Reactors, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11471–11477, 2008.
- GAVA, A. J. ; DA SILVA, C. A. B. ; FRIAS , J. R. G. *Tecnologia de Alimentos – Principios e Aplicações*. Editora Nobel, São Paulo, p.512. 1978.
- GIRARDI, C. L. *Maçã: Pós-Colheita*. Editora Embrapa Informação Tecnológica, p. 109, 2004.

- HEA, Y., SHUNXIN Li, Z.J., Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment. *Separation and Purification Technology* 57, 366–373, 2007
- LANDBO, A.-K.; KAACK, K.; MEYER, A.S. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 8, n. 1, p. 135-142, 2007.
- LANDBO, A.-K.; MEYER, A.S. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 5, n. 4, p. 503-513, 2004.
- LEE, W.C.; YUSOF, S.; HAMID, N.S.A.; BAHARIN, B.S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, v. 73, n. 1, p. 55-63, 2006a.
- LIEW ABDULLAH, A.G.; SULAIMAN, N.M.; AROUA, M.K.; MEGAT MOHD NOOR, M.J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, v. 81, n. 1, p. 65-71, 2007.
- MANTOVANI, C.F., GEIMBA, M.P., BRANDELLI, A., Enzymatic Clarification of Fruit Juices by Fungal Pectin Lyase, *Food Biotechnology*. 19:173-181, 2005
- OLIVEIRA, M.C.S.D.; SILVA, N.C.C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 906-915, 2006.
- ÖZKAN, M. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chemistry*, v. 78, n. 4, p. 499-504, 2002.
- PETRUS, J.C.C. Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para clarificação de suco de frutas. Tese (Doutorado), 139 p., Campinas, SP, 1997.
- ROUETTE, H.K. (2001). *Encyclopedia of Textile Finishing*. Woodhead Publishing. Versão online disponível em: http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1225&VerticalID=0. Acessado em junho de 2011.
- RUNGSARDTHONG, V., WONGVUTTANAKUL, N., KONGPIEN, N. CHOTIWARANON, P., Application of fungal chitosan for clarification of apple juice, *Process Biochemistry* 41, 589–593,2006.
- SANT´ANA, A.S. Avaliação quantitativa do risco da patulina em suco de maçã. Dissertação (Mestrado), 373 p., Campinas, SP, 2007.

- SIN, H.N.; YUSOF, S.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; RAHMAN, R.A. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 73, n. 4, p. 313-319, 2006.
- SPAGNA, G.; PIFFERI, P.G.; TRAMONTINI, M.; ALBERTINI, A. Pectinlyase immobilization on polyamides for application in the food processing industry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 59, n. 4, p. 341-348, 1994.
- SORRIVAS, V., GENOVESE, D.B. e LOZANO, J.E., Effect of Pectinolytic and Amylolytic Enzymes on Apple Juice Turbidity, *Journal of Food Processing and Preservation* 30, 118–133,2006.
- SREENATH, H.K.; SANTHANAM, K. The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 73, n. 3, p. 241-243, 1992.
- TANRIÖVEN, D.; EKSI, A. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food Chemistry*, v. 93, n. 1, p. 89-93, 2005.
- TARAGANO, V.M.; PILOSOFF, A.M.R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, n. 3-5, p. 411-419, 1999.
- TREPTOW, R.O.; QUEIROZ, M.I.; ANTUNES, P.L. Caracterização físico-química e sensorial de quatro cultivares de maçãs (*Malus domestica* Borkh.). *Revista Brasileira de Agrociência*, v.1, n.3, p.170-184, 1995. Em Sant'Ana, A.S. Avaliação Quantitativa do Risco da Patulina em Suco de Maçã. Dissertação (Mestrado), 373 p., Campinas, SP, 2007.
- TULEK, Y. e YILMAZ, S., Use of Clarifying Agents and Ultra Filter to Decrease Fumaric Acid, HMF and Increase Clarity of Apple Juice, *Journal of Food Quality* 29, 216–228,2006.
- VICENZI, R.; BILHALVA, A. B.; TREPTOW, R. O. Avaliação sensorial do suco de maçã processado com casca de arroz como coadjuvante de prensagem. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 21(3): 257-261, 2001.
- WIGHTMAN, J.D.; WROLSTAD, R.E. b-glucosidase Activity in Juice-Processing Enzymes Based on Anthocyanin Analysis. *Journal of Food Science*, v. 61, n. 3, p. 544-548, 1996.
- YANGA, J., LUOA, H., Li, J., WANGA, K., CHENGA, HP., BAIA, Y., YUANA, T., FANC, Y., YAO, B., Cloning, expression and characterization of an acidic endo-polygalacturonase from *Bispora* sp. MEY-1 and its potential application in juice clarification. *Process Biochemistry* 46 (2011) 272–277, 2011.