

ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO

**ESTRESSE OXIDATIVO EM BANANA ‘PRATA’ MINIMAMENTE
PROCESSADA TRATADA COM ANTI-OXIDANTES E AVALIADO EM
CAMUNDONGO APO-E-/-**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M528e
2010

Melo, Anderson Adriano Martins, 1980-
Estresse oxidativo em banana 'Prata' minimamente
processada tratada com anti-oxidantes e avaliado em
camundongo Apo-E-/- / Anderson Adriano Martins Melo.
– Viçosa, MG, 2010.
ix, 76f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Rolf Puschanm
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Banana - Processamento. 2. Antioxidantes. 3. Banana.
4. Stress oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. II.
Título.

CDD 22. ed. 634.772

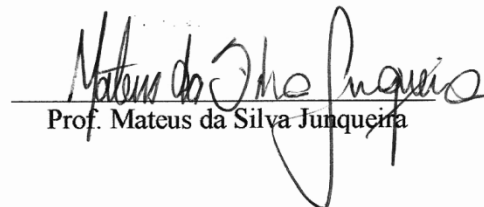
ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO

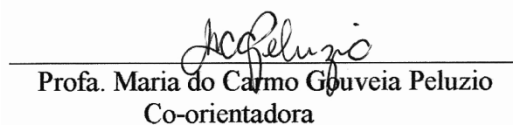
**ESTRESSE OXIDATIVO EM BANANA 'PRATA' MINIMAMENTE
PROCESSADA TRATADA COM ANTI-OXIDANTES E AVALIADO EM
CAMUNDONGO APO-E-/-**

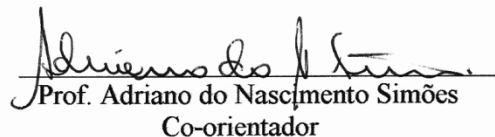
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*

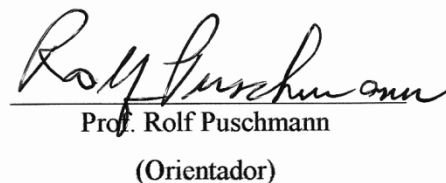
APROVADA EM 29 de outubro de 2010


Profa. Maria Goreti de Almeida Oliveira


Prof. Mateus da Silva Junqueira


Profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Co-orientadora


Prof. Adriano do Nascimento Simões
Co-orientador


Prof. Rolf Puschmann
(Orientador)

Aos meus pais, Paulo Tadeu e Maria das Graças, e avós, Geraldo e Adriana,

Aos meus irmãos Paulinho, Graciane, Isabel e Gabriel, com carinho,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devo a minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por todo o apoio nestes quatro anos de aprendizagem, em especial ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade e pelo apoio durante o período de realização do curso de Doutorado.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Rolf Puschmann, pela amizade, pela oportunidade, credibilidade e confiança, que foram fundamentais para meu crescimento acadêmico, e para a realização deste trabalho, e pelo exemplo de vida durante estes anos de convivência.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pela co-orientação e parceria, disponibilizando estrutura física e recursos humanos para as análises.

Ao Professor Adriano do Nascimento Simões, pelo convívio, amizade, co-orientação e apoio durante a maior parte do meu doutoramento.

Ao Professor Mateus da Silva Junqueira, pelas valiosas contribuições neste trabalho e, acima de tudo pelo convívio, amizade e apoio constante.

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pelos ensinamentos de enzimologia, e pela orientação nas análises enzimáticas.

Aos Professores Fernando Luiz Finger e Raimundo Santos Barros, pelos ensinamentos durante o curso e valiosas contribuições para este trabalho.

Aos Professores do Departamento de Biologia Vegetal, pelos ensinamentos e colaboração constante.

Ao Professor Antonio José Natali e seus orientados no Departamento de Educação Física pela cessão de espaço físico e apoio na montagem e condução de experimento.

Às gêmeas bolsistas de Iniciação Científica Ana Carolina e Natália Machado da Fonseca, pela imensa contribuição em todas as etapas deste trabalho.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Fisiologia Pós-colheita Aline, Kelem, Antonio, Daniele, Luiz Paulo, Thomás, Leonardo, Franciscleudo, Eber. Obrigado a todos pelo apoio, paciência e pela convivência agradável do dia a dia.

Aos alunos integrantes do Laboratório de Bioquímica Nutricional.

Aos funcionários Geraldo, Zé Antonio, Reginaldo, Antonio Cordeiro, Carlos Raimundo, Ângelo, Francine e Luciene, pelo apoio e boa vontade em ajudar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com essa singular oportunidade de crescimento pessoal e profissional e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

BIOGRAFIA

ANDERSON ADRIANO MARTINS MELO, filho de Paulo Tadeu de Melo e Maria das Graças Martins Melo, nasceu em 21 de fevereiro de 1980, em Itumirim-MG. Coursou o ensino fundamental e o primeiro ano do ensino médio nas escolas estaduais Castro Alves e Dom Delfim, naquela cidade, e os dois últimos anos do ensino médio no Colégio Cenecista Cel. Juventino Dias, na cidade de Lavras, concluindo-o em 1997. Em julho de 1999, ingressou no curso de Agronomia, na Universidade Federal de Lavras, MG, onde participou de estágios na Secretaria de Pós-Graduação em Fitotecnia, do Departamento de Agricultura, e no Laboratório de Fisiologia Pós-colheita do Departamento de Ciência dos Alimentos, nos dois primeiros anos da Graduação, trabalhando com Fisiologia Pós-colheita de nêspera. Foi bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq, por dois anos, naquele Departamento, pesquisando uso de aditivos químicos para conservação pós-colheita de banana minimamente processada. Em julho de 2004, graduou-se Engenheiro Agrônomo, ingressando em seguida no curso de Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da UFLA, na linha de pesquisa de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, com ênfase em Fisiologia de Plantas Mediciniais, concluindo-o em agosto de 2006. Em outubro daquele ano, ingressou no curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, colaborando em projetos de pesquisa e extensão. Em outubro de 2010, submeteu-se à defesa de tese de Doutorado.

Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1.....	4
QUALIDADE VISUAL, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO DE BANANA ‘PRATA’ MINIMAMENTE PROCESSADA SUBMETIDA A SUBSTÂNCIAS ANTI-ESCURECIMENTO	4
1. INTRODUÇÃO	4
2.1. Material vegetal e processamento mínimo	7
2.2. Avaliação de cor da superfície.....	8
2.3. Extração e quantificação de compostos fenólicos solúveis totais.....	8
2.4. Extração e determinação da atividade antioxidante.....	9
2.5. Extração e determinação da atividade da polifenoloxidase (PPO)	10
2.6. Extração e determinação da atividade da catalase (CAT).....	10
2.7. Extração e quantificação de aldeído malônico (MDA).....	11
2.8. Delineamento experimental e análise estatística.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1. Cor da superfície.....	12
3.2. Compostos fenólicos solúveis totais	17
3.3. Atividade Antioxidante.....	18
3.4. Atividade da polifenoloxidase	21
3.5. Atividade da catalase	22
3.6. Aldeído malônico.....	24
4. CONCLUSÕES	26
5. REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 2.....	31
EFEITO DO PROCESSAMENTO MÍNIMO E TRATAMENTO ANTI-ESCURECIMENTO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM BANANA ‘PRATA’	31
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1. Material vegetal e processamento mínimo	34
2.2. Avaliação de cor da superfície.....	35
2.3. Extração e quantificação de compostos fenólicos solúveis	35
2.4. Extração e determinação da atividade antioxidante.....	36
2.5. Extração e determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	36
2.6. Extração e determinação da atividade da catalase (CAT).....	37

2.7. Extração e quantificação de aldeído malônico (MDA).....	37
2.8. Extração e determinação da atividade da polifenoloxidase (PPO)	38
2.9. Delineamento experimental e análise estatística.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1. Cor da superfície.....	40
3.2. Compostos fenólicos solúveis totais	42
3.3. Atividade antioxidante	44
3.4. Atividade da polifenoloxidase	45
3.5. Atividade da superóxido dismutase	47
3.6. Atividade da catalase	48
3.7. Aldeído malônico.....	49
4. CONCLUSÕES	52
5. REFERÊNCIAS.....	53
CAPÍTULO 3.....	57
AÇÃO DA BANANA MINIMAMENTE PROCESSADA SUBMETIDA A TRATAMENTO ANTI-ESCURECIMENTO NA EVOLUÇÃO DE LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS APO-E-/-	57
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1. Material vegetal e processamento mínimo	59
2.2. Animais e dietas.....	59
2.3. Coleta dos tecidos	60
2.4. Avaliação da deposição lipídica das aortas.....	60
2.5. Extração e ensaio da catalase	61
2.6. Aldeído malônico.....	62
2.7. Atividade antioxidante	62
2.8. Dosagem de proteína	63
2.9. Análise estatística	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1. Área da lesão aterosclerótica aórtica.....	64
3.2. Aldeído malônico.....	66
3.3. Atividade da catalase	67
3.4. Atividade antioxidante	69
4. CONCLUSÕES	72
5. REFERÊNCIAS.....	73
CONCLUSÕES GERAIS	76

RESUMO

MELO, Anderson Adriano Martins, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2010. **Estresse oxidativo em banana ‘Prata’ minimamente processada tratada com anti-oxidantes e avaliado em camundongo Apo-E/-**. Orientador: Rolf Puschmann. Co-orientadores: Adriano do Nascimento Simões, Fernando Luiz Finger e Maria do Carmo Gouveia Peluzio

A banana sob a forma minimamente processada é altamente perecível, devido ao escurecimento enzimático e ao estresse oxidativo, que podem causar degradação de membranas do tecido vegetal. A imersão de rodela de banana em soluções de alguns compostos químicos pode aumentar sua conservação comercial, torná-la um produto mais saudável, com maior capacidade antioxidante, e evitar o desenvolvimento de doenças degenerativas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da imersão de rodela de banana minimamente processada em misturas de antioxidantes sobre aspectos físicos, fisiológicos e bioquímicos, relacionados à qualidade visual, e associá-los às alterações no potencial antioxidante e estresse oxidativo. Propôs-se também a avaliar a ação da banana minimamente processada sobre a redução do desenvolvimento da aterosclerose em camundongos susceptíveis à doença. Para avaliação dos efeitos no tecido vegetal, bananas da cultivar Prata no estágio de maturidade 6 (casca totalmente amarela) foram imersas em soluções contendo ácido ascórbico, cloreto de cálcio e cisteína ou ácido cítrico durante o processamento mínimo. Avaliaram-se o efeito da imersão em soluções com e sem controle de pH sobre o escurecimento enzimático e o efeito do corte e do tratamento químico sobre o estresse oxidativo e o potencial antioxidante durante a conservação. No tecido vegetal, a imersão em solução contendo cisteína na mistura sob pH 2,0 reduziu a atividade da polifenoloxidase, manteve a maior concentração de compostos fenólicos solúveis, e mais alta a capacidade antioxidante, mas induziu maior peroxidação lipídica. O potencial antioxidante da banana minimamente processada, não imersa, reduziu-se em 80%, enquanto as imersas exibiram redução de 50%. A redução do potencial antioxidante na polpa da banana mostrou-se correlacionada com a redução na concentração de fenóis solúveis ($r = 0,96$), enquanto a peroxidação de lipídeos esteve correlacionada com a atividade da catalase e da superóxido dismutase. O tratamento com antioxidantes proporcionou maior redução da atividade da catalase, bem como mostrou aumento na concentração de aldeído malônico nos tecidos. Para avaliação dos efeitos nos tecidos animais, rodela de banana

minimamente processada foram imersas em ácido ascórbico e cloreto de cálcio e fornecidas diariamente na suplementação alimentar de camundongos Apo-E^{-/-}, durante dez semanas. Foram avaliados o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em artérias e o estresse oxidativo no fígado. A suplementação da dieta com banana minimamente processada evitou o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas nas aortas. A peroxidação lipídica no tecido hepático revelou que o tratamento com ácido ascórbico e cloreto de cálcio na solução causou maior estresse oxidativo, refletindo-se em menor capacidade antioxidante. O tratamento da banana minimamente processada com cloreto de cálcio 1% (p/v) + ácido ascórbico 1% (p/v) + cisteína 1% (p/v) foi benéfico para a manutenção da qualidade do produto, mas mostrou que pode acelerar processos degenerativos relacionados ao estresse oxidativo no tecido. A ingestão diária de banana minimamente processada não-tratada parece ter efeito positivo sobre o controle do desenvolvimento da aterosclerose em camundongos Apo-E^{-/-}.

ABSTRACT

MELO, Anderson Adriano Martins, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2010. **Oxidative stress in fresh-cut 'Prata' banana treated with antioxidants and evaluated in Apo E-/- mice.** Adviser: Rolf Puschmann. Co-advisers: Adriano do Nascimento Simões, Fernando Luiz Finger and Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Fresh-cut banana is highly perishable, due to enzymatic browning and oxidative stress, which can cause degradation of membranes of plant tissue. Immersion of banana slices in chemical treatments can increase its shelf-life, and turning it a healthier product with a higher antioxidant capacity, as well as preventing the development of degenerative diseases. The objectives of this work were to evaluate the effects of dipping banana slices in mixtures of antioxidants on physical, physiological and biochemical parameters related to visual quality, and associate them to changes in antioxidant and oxidative stress in plant tissue. It was also intended to evaluate the effect of fresh-cut banana on reducing the development of atherosclerosis in mice susceptible to this disease. To assess the effects on plant tissue, bananas from cultivar Prata at ripening stage 6 (fully yellow peel) were immersed in solutions containing ascorbic acid, calcium chloride and cysteine and citric acid during processing. We evaluated the effect of immersion in solutions with and without pH control on the enzymatic browning and the effect of cutting and chemical treatment on oxidative stress and antioxidant potential during storage. In plant tissue, immersion in the mixture containing cysteine at pH 2.0 promoted the decrease in the activity of polyphenoloxidase, maintained the highest concentration of soluble phenolics, and remained the highest antioxidant capacity, but induced higher lipid peroxidation. The antioxidant capacity of control (non-immersed) fresh-cut banana was reduced by 80%, while those immersed was decreased to 50%. The reduction of the antioxidant potential in banana pulp showed associated with a reduction in the concentration of soluble phenolics ($r = 0.96$), while lipid peroxidation was correlated with the activity of catalase and superoxide dismutase. Treatment with antioxidants promoted greater reduction of catalase activity with increased concentrations of malondialdehyde in the tissue. To assess the effects on animal tissues, fresh-cut banana slices were immersed in ascorbic acid and calcium chloride solution and supplied to the animals during 10 weeks, in a daily supplemental feeding for Apo-E-/- mice. The development of atherosclerotic

lesions in arteries and oxidative stress in the liver were evaluated. Dietary supplementation with fresh-cut banana prevented the development of atherosclerotic lesions in aortas. Lipid peroxidation in the liver tissue revealed that treatment with ascorbic acid and calcium chloride in the solution promoted increased oxidative stress, reflecting in lower antioxidant capacity. The treatment of fresh-cut banana with calcium chloride 1% (w/v) ascorbic acid + 1% (w/v) + cysteine 1% (w/v) was beneficial for the maintenance of product quality, however it might speed up degenerative processes related to oxidative stress in the tissue. Daily intake of minimally processed untreated banana seemed to promote a positive effect on the control of the development of atherosclerosis in Apo-E^{-/-} mice.

INTRODUÇÃO GERAL

Uma dieta rica em frutas e hortaliças tem sido associada a vários benefícios, incluindo prevenção de doenças crônicas como câncer, artrite e aterosclerose, dentre outras. Com o aumento das pesquisas científicas, associado à maior sensibilização pelo consumidor sobre os benefícios à saúde em decorrência do consumo de frutas e hortaliças frescas, observa-se um importante e rápido crescimento do mercado de produtos minimamente processados.

A banana é um fruto rico em vitamina C, α -tocoferol, β -caroteno, além de compostos antioxidantes polifenólicos tais como dopamina e galocatequina, compostos capazes de proteger o organismo contra os efeitos danosos dos radicais livres. Desse modo, o consumo de banana poderia auxiliar na prevenção e no tratamento de doenças, que se relacionam ao estresse oxidativo, como a aterosclerose.

Apesar desses benefícios à saúde, a série de operações necessárias para obterem-se produtos minimamente processados, tais como seleção, descascamento, fatiamento, e enxágue e/ou sanitização são fatores de estresses ao tecido do fruto. O processamento mínimo promove o aumento dos processos oxidativos catalisados por enzimas, como a polifenoloxidase, que promove o escurecimento dos tecidos cortados. Além disso, os estresses causados pelo processamento mínimo podem aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela desestruturação de membranas celulares. Por outro lado, os danos mecânicos do processamento mínimo desencadeiam respostas que podem alterar o metabolismo de compostos fenólicos, envolvidos no potencial funcional de banana minimamente processada.

Sob o ponto de vista sensorial e funcional, a cor dos frutos e das hortaliças provavelmente contribui mais para avaliação da qualidade do que qualquer outro fator isolado. O processamento mínimo de banana requer a imersão das fatias em misturas de substâncias anti-escurecimento como cloreto de cálcio, ácido ascórbico, cisteína e/ou ácido cítrico, para a manutenção da sua qualidade e prolongamento do período de conservação refrigerada. A imersão de banana em soluções contendo compostos químicos anti-escurecimento pode torná-la um veículo de substâncias antioxidantes, aumentando seu potencial antioxidante no tecido vegetal.

Sob o ponto de vista fisiológico, as mudanças na aparência desses produtos parecem relacionadas a processos degenerativos resultantes de sinalização celular desencadeados pelas injúrias do processamento mínimo. Apesar da grande quantidade

de pesquisas envolvendo a tecnologia da aplicação de substâncias anti-escurecimento em produtos minimamente processados, poucos trabalhos têm estudado as alterações no metabolismo que envolve as respostas ao estresse oxidativo. Sabe-se que antioxidantes aplicados durante o processamento mínimo podem reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio, além de alterar a atividade de enzimas responsáveis pela neutralização dessas espécies, como superóxido dismutase e catalase, portanto, evitando direta ou indiretamente os danos às membranas celulares.

O conteúdo de substâncias antioxidantes e a capacidade antioxidante medida *in vitro* respondem muito distintamente ao processamento mínimo, podendo diminuir ou aumentar em decorrência do status metabólico de cada tecido vegetal. No entanto, a capacidade antioxidante mostra tendências similares àquelas observadas no conteúdo de fenóis solúveis em diferentes tecidos, sugerindo que os compostos fenólicos são frequentemente os principais contribuintes para as mudanças na atividade antioxidante nos vegetais, quando medido por métodos que avaliam a capacidade antioxidante dos extrato hidrofílicos, nos quais os compostos fenólicos estão presentes.

A análise da capacidade antioxidante *in vitro* tem sido uma técnica muito utilizada para indicar aumento ou decréscimo no valor funcional de tecidos vegetais inteiros e minimamente processados. No entanto, a capacidade de os extratos de tecidos vegetais neutralizarem um radical em situação artificial (*in vitro*) pode não refletir a atividade antiperoxidativa em uma condição *in vivo*, ou seja, quando o alimento deve estar promovendo sua ação funcional no organismo que o ingere.

Em banana, não se conhecem os efeitos das injúrias ocasionadas pelo processamento mínimo sobre a sua capacidade antioxidante *in vitro*, com uso de radicais cromogênicos ou *in vivo*, com uso de cobaias. Alguns estudos conduzidos como bioensaios têm mostrado a alta capacidade antioxidante de compostos presentes na polpa e na casca da banana. Outros estudos *in vivo* têm mostrado que a ingestão de banana reduz a modificação oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), envolvidas no desenvolvimento da aterosclerose em humanos. Além disso, em ratos cuja dieta foi suplementada com compostos fenólicos antioxidantes extraídos da banana, verificou-se diminuição na peroxidação de lipídeos e aumento na atividade de superóxido dismutase e catalase.

Estudos *in vivo* são essenciais para auxiliar na compreensão dos efeitos da ingestão de banana minimamente processada tratada com substâncias antioxidantes sobre a manifestação de suas propriedades funcionais nos organismos. Essas

propriedades são caracterizadas pela atenuação de processos degenerativos que causam danos peroxidativos em membranas, resultando em prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares crônicas, como a aterosclerose.

Desse modo, considera-se relevante estudarem-se os efeitos do processamento mínimo associados à adição de substâncias anti-escurecimento como subsídio ao entendimento dos mecanismos fisiológicos de defesa do tecido de banana contra a injúria. Além disso, este produto minimamente processado pode contribuir como fonte de antioxidantes na dieta, para a prevenção do desenvolvimento da aterosclerose.

Portanto, os objetivos específicos deste trabalho foram: 1) Avaliar o efeito do tratamento com diferentes misturas de substâncias anti-escurecimento sobre a qualidade visual, o potencial antioxidante e o estresse oxidativo em polpa de banana minimamente processada; 2) Avaliar alterações na atividade de enzimas que atuam na proteção contra o estresse oxidativo na polpa de banana em resposta ao processamento mínimo; 3) Avaliar a contribuição da banana minimamente processada, tratada com ácido ascórbico como substância anti-escurecimento, na atividade antiperoxidativa e na redução de lesões ateroscleróticas em tecidos de camundongos susceptíveis àquela doença.

CAPÍTULO 1

QUALIDADE VISUAL, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO DE BANANA ‘PRATA’ MINIMAMENTE PROCESSADA SUBMETIDA A SUBSTÂNCIAS ANTI-ESCURECIMENTO

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um aumento no consumo de frutas e hortaliças tem se devido aos efeitos benéficos dos fitoquímicos antioxidantes sobre a saúde humana (Prior & Cao, 2000). Dentre vários fitoquímicos presentes, destacam-se os compostos fenólicos, cujo metabolismo pode ser alterado por fatores bióticos, como ataque de patógenos, e abióticos, como excesso de radiação luminosa, deficiência nutricional, baixa temperatura e danos mecânicos (Dixon & Paiva, 1995).

Alterações ocasionadas pelo processamento mínimo de frutas e hortaliças estão intimamente relacionadas ao metabolismo fenólico como resposta às injúrias, o que pode alterar a atividade antioxidante e, conseqüentemente, contribuir para o seu valor funcional (Saltveit, 2000; Reyes et al., 2007). Além disso, as injúrias inerentes ao processamento mínimo podem causar diversos tipos de estresse, dentre os quais o estresse oxidativo, que pode ser detectado diretamente pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio, aumento nos produtos da peroxidação de lipídeos, ou indiretamente, a partir de mudanças nos componentes ou nas enzimas dos sistemas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase (Toivonen, 2004).

A catalase (CAT) é uma das enzimas responsáveis pela redução dos níveis de peróxido de hidrogênio nas células (Mittler, 2002), os quais estão diretamente envolvidos na peroxidação de membranas celulares (Haliwell, 1996). Segundo Bailly et al. (1996), existe uma alta correlação entre a perda da atividade da CAT e o aumento na peroxidação de lipídeos, expresso pelo maior conteúdo de aldeído malônico (MDA) em tecidos vegetais sob estresse.

Sob o ponto de vista tecnológico, frutas e hortaliças minimamente processadas sofrem escurecimento enzimático e amolecimento do tecido, além de contaminação microbiana, o que reduz a sua vida-de-prateleira em relação aos similares inteiros (Soliva-Fortuny & Martin-Belloso, 2003).

A banana, fruta mais comercializada do mundo, é um potente antioxidante, uma vez que possui razoáveis concentrações de vitamina C e também devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos (Lim et al., 2007). Alguns estudos conduzidos em bioensaios têm mostrado a alta capacidade antioxidante de compostos presentes na polpa e na casca da banana (Kanazawa & Sakakibara, 2000; Someya et al., 2008). No entanto, a banana fatiada é muito sensível ao escurecimento fisiológico, o que tem excluído seu uso em saladas de minimamente processados (Moline et al., 1999). Esse escurecimento se dá principalmente devido à atividade da polifenoloxidase (PPO), enzima que catalisa a hidroxilação de monofenóis a o-difenóis, e a oxidação destes a quinonas, levando à formação de pigmentos marrons (Zawistowski et al., 1991).

Uma vez que o pH ótimo para a atividade da PPO em banana está em torno de 6,5 (Yang et al., 2000), a atividade dessa enzima em banana minimamente processada poderia ser altamente inibida por sua imersão em misturas de substâncias químicas anti-escurecimento, as quais possuem pH muito baixo, em função de conterem altas quantidades de diferentes ácidos orgânicos (Sapers, 1993).

O ácido ascórbico é um antioxidante “universal”, podendo atuar reduzindo o-quinonas de volta a o-difenóis, após a reação da PPO, ou mantendo o α -tocoferol presente nas membranas celulares na forma reduzida, protegendo-as contra a propagação da peroxidação lipídica (Shewfelt & Purvis, 1995; Lurie, 2003). O cloreto de cálcio possui relevante papel na estabilização de membranas e paredes celulares (Poovaiah, 1986). A cisteína pode reduzir o escurecimento enzimático por reduzir o-quinonas (Richard et al., 1991), e reagir com produtos primários de oxidação pela PPO, dando origem a conjugados incolores cisteíno-quinona que atuam como inibidores da enzima (Richard-Forget et al., 1992). O ácido cítrico é um sequestrante altamente efetivo em inibir o escurecimento enzimático (Dziezak, 1986), reduzindo a disponibilidade de Cu^{2+} no sítio de ação da PPO.

Muitos trabalhos mostram que o tratamento por imersão em misturas de substâncias antioxidantes tem sido bem sucedido em reduzir o escurecimento e o amaciamento e prolongar a vida pós-colheita de diferentes frutas, tais como kiwis (Carvalho & Lima, 2002), maçãs (Lee et al., 2003), peras (Gorny et al., 2002) e bananas (Melo & Vilas Boas, 2006; Vilas Boas & Kader, 2006). Em banana ‘Maçã’ minimamente processada, a imersão em misturas contendo ácido ascórbico, cloreto de cálcio e cisteína foi mais eficiente em manter a qualidade e estender a vida útil pós-

processamento mínimo durante quatro dias do que a aplicação isolada destes compostos (Melo & Vilas Boas, 2008).

Resultados divergentes têm sido observados quanto à eficiência proporcionada pelo pH da solução de imersão contendo substâncias anti-escurecimento sobre o controle do escurecimento enzimático em diferentes frutas após o processamento mínimo. Em maçãs (Sapers & Miller, 1998) e peras (Gorny et al., 2002) minimamente processadas, verificou-se efeito mais eficiente do tratamento sob pH neutro do que sob pH ácido; Vilas Boas & Kader (2006), contudo, observaram que o tratamento por imersão em misturas químicas ácidas proporcionou maior firmeza e reduziu o escurecimento de bananas ‘Grand Naine’ minimamente processadas.

Se por um lado, o baixo pH das soluções de imersão inibe a atividade da PPO e o escurecimento, por outro, pode induzir injúrias nas membranas (Toivonen, 2004), além de induzir a atividade de enzimas relacionadas com a hidrólise de materiais da parede celular (Knee, 1982). Poucos trabalhos têm avaliado o efeito da imersão em substâncias anti-escurecimento e suas implicações sobre o estresse oxidativo e o potencial antioxidante em tecidos minimamente processados.

Comparativamente às soluções ácidas que contém misturas de antioxidantes, as soluções com pH neutro pouco alteram o meio em que ocorrem a maioria das reações enzimáticas nas células vegetais, e assim, podem funcionar como meio para se avaliar o efeito antioxidante inerente aos compostos da mistura, isolando-se o efeito de pH, além de fazer evitarem-se os efeitos danosos da alta acidez sobre as membranas celulares. Adicionalmente, o ácido cítrico poderia ser utilizado como um eventual substituto da cisteína na solução de tratamento, evitando problemas na cor e sabor, funcionando pelo efeito sinérgico ou aditivo com as demais substâncias na mistura.

Em produtos que sofrem escurecimento enzimático após o corte, como a banana, há a necessidade de um melhor entendimento das respostas bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo no tecido vegetal, as quais podem ser influenciadas pela imersão em misturas de substâncias anti-escurecimento. Desse modo, este trabalho objetivou avaliar o efeito da imersão de banana ‘Prata’ minimamente processada em soluções compostas por cloreto de cálcio, ácido ascórbico e cisteína/ácido cítrico sob diferentes pHs sobre a qualidade visual, a atividade antioxidante e sobre indicadores do estresse oxidativo do tecido, durante quatro dias de conservação a 5 °C.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e processamento mínimo

Bananas da cultivar Prata-anã, provenientes da região Norte do Estado de Minas Gerais, foram obtidas no mercado local de Viçosa-MG, selecionadas segundo homogeneidade de cor da casca, tamanho e ausência de defeitos. Para a cor da casca, foram selecionados frutos com “grau de coloração 6” (totalmente amarela), segundo Von Loesecke (1950).

O processamento ocorreu na Unidade de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa, onde os frutos foram pré-resfriados a 14°C por 12 horas. Logo após, os buquês foram lavados em solução de água e sabão neutro e cuidadosamente despencados com uso de facas, mergulhados por 10 minutos em solução sanitizante contendo 400 mg.L⁻¹ de cloro ativo. Os frutos foram descascados e fatiados com auxílio de facas em rodela com espessura de aproximadamente 10 mm.

Após o corte, as rodela foram divididas em cinco tratamentos, aleatoriamente, sendo cada um deles imerso por 3 min em diferentes soluções. Com exceção do tratamento controle (imersão em água destilada a 5°C), as soluções foram constituídas por combinações com 1% (p/v) de cada componente da mistura: ácido ascórbico + cloreto de cálcio + ácido cítrico, em pH 2,5 e em pH 7,0; ácido ascórbico + cloreto de cálcio + L-cisteína, em pH 2,0 e em pH 7,0, listados na Tabela 1:

Tabela 1: Detalhamento das diferentes soluções de tratamento de banana ‘Prata’ minimamente processada por imersão.

Codificação	Componentes da solução	pH
Controle	Água destilada	7,0
ACC 2,5	Ácido ascórbico, cloreto de cálcio e ácido cítrico	2,5
ACC 7,0	Ácido ascórbico, cloreto de cálcio e ácido cítrico	7,0
ACL 2,0	Ácido ascórbico, cloreto de cálcio e L-cisteína	2,0
ACL 7,0	Ácido ascórbico, cloreto de cálcio e L-cisteína	7,0

As soluções a pH baixo foram preparadas pela diluição dos componentes em água destilada, enquanto aquelas sob pH 7,0 foram obtidas pela neutralização com

hidróxido de sódio 0,1 N. Após a imersão, as rodela permaneceram por um minuto em bandejas perfuradas para drenagem do excesso de solução e acondicionadas em bandejas de polietileno tereftalato (PET), contendo aproximadamente 100 g (10 rodela) de banana minimamente processada. As bandejas foram envoltas com três camadas de filme de PVC de 12 µm e imediatamente conservadas a 5 °C durante 4 dias. Amostras para as análises foram tomadas no início (dia 0), 1, 2, 3 e 4 dias após o processamento mínimo. Com exceção da avaliação de mudanças na cor da polpa, que foi feita em tecido fresco, as demais avaliações foram feitas em tecidos das dez rodela de cada bandeja homogeneizados em triturador de frutas doméstico, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -86 °C, até o momento das análises.

2.2. Avaliação de cor da superfície

A cor nas duas superfícies cortadas da rodela de banana foi medida com um colorímetro de reflectância portátil digital CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japão), com uso do iluminante C, após a calibração em uma placa branca padrão (Y = 93,8; x = 0,3130; y = 0,3191). Foram obtidas as coordenadas L*, a* e b*, segundo o modelo tridimensional de coordenadas cromáticas preconizado pelo CIE (Commission Internationale de L'Eclairage, 1978) em 10 rodela de cada uma das três repetições. O valor de L* representa a luminosidade da cor (0 indica preto e 100 indica branco), e foi utilizado como um indicativo do escurecimento das superfícies cortadas, segundo Gorny et al. (2002). A coordenada a* indica a posição da cor entre verde (-a) e vermelho (+a) e a coordenada b* indica a cor entre azul (-b) e amarela (+b). A diferença total de cor (ΔE) foi calculada pela equação: $\Delta E = [(L_{final} - L_{inicial})^2 + (a_{final} - a_{inicial})^2 + (b_{final} - b_{inicial})^2]^{0,5}$, de acordo com Martin-Diana et al. (2006).

2.3. Extração e quantificação de compostos fenólicos solúveis totais

Compostos fenólicos solúveis totais foram extraídos homogeneizando-se 3 g de tecido de banana em 15 mL de metanol, com uso de homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik), durante 1 minuto. A solução metanólica foi mantida para a extração em ambiente escuro a 2 °C por 14 h. O extrato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 32.000 g, por 15 min, a 2 °C, em centrífuga Himac CR-21

(Hitachi, Tóquio, Japão). O sobrenadante foi coletado para quantificação de compostos fenólicos totais, de acordo com Swain & Hillis (1959). Uma alíquota de 150 µL de extrato metanólico foi adicionada a 2400 µL de água destilada. Foram adicionados 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu 0,5 N ao extrato diluído e a mistura foi agitada. A mistura permaneceu reagindo por 3 minutos. A seguir, acrescentaram-se 300 µL de carbonato de sódio 1,0 N, e permitiu-se a reação por 2 h. Simultaneamente, um controle foi preparado com metanol puro e tratado da mesma maneira que as demais amostras. As absorvâncias foram obtidas a 725 nm em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi). A concentração de compostos fenólicos solúveis totais foi expressa como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG), por kg de matéria fresca, utilizando-se de curva padrão.

2.4. Extração e determinação da atividade antioxidante

A partir do extrato dos compostos fenólicos solúveis totais, a atividade antioxidante foi determinada, de acordo com Brand-Williams et al. (1995), com modificações. A uma alíquota de 200 µL de extrato metanólico filtrado foi adicionada 2800 µL de solução metanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), à concentração de 96 µM, apresentando uma absorvância inicial de 1,1 a 515 nm. No controle, o extrato metanólico foi substituído por 200 µL de metanol puro. As soluções permaneceram reagindo no escuro, durante 30 minutos, em tubos de ensaio e, em seguida, foram transferidas para cubetas de 10 mm. As leituras ocorreram a 515 nm em espectrofotômetro UV-Visível U-2910 (Hitachi, Tóquio, Japão). A atividade antioxidante foi calculada por medida do decréscimo da absorvância das amostras em comparação com a amostra de metanol (controle), e quantificada como mg de equivalentes ácido ascórbico (EAA) por 100 g de matéria fresca, a partir de uma curva padrão, utilizando-se da equação: $Atividade\ Antioxidante\ (mg\ EAA/100g) = [IC_{50}(AA)/IC_{50}(amostra)] \times 100.000$, em que, $IC_{50}(AA)$ e $IC_{50}(amostra)$ denotam a quantidade (mg) de ácido ascórbico e de matéria fresca, respectivamente, presente em 1 mL de solução, capaz de reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (Lim & Quah, 2007).

2.5. Extração e determinação da atividade da polifenoloxidase (PPO)

A atividade da polifenoloxidase foi determinada de acordo com Bico et al. (2009), com modificações. Em banho de gelo, foram homogeneizados 2,0 g de tecido com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,5) e 0,1 g polivinilpirrolidona (PVPP), durante 5 min, com intervalos de um minuto, em um homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik). Foram adicionadas duas gotas de Triton X-100 antes do último minuto de homogeneização. A mistura foi centrifugada a 16.500 g, por 20 minutos, a 2 °C em centrífuga Himac CR-21 (Hitachi, Tóquio, Japão). O meio de reação continha 2,3 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5; 0,3 mL de catecol, 56 mM; e 0,4 mL de extrato enzimático. A concentração final de catecol no meio de reação foi de 5,6 mM. A taxa de aumento da absorvância foi acompanhada, por 2 minutos, a 420 nm em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi). A temperatura do ensaio foi mantida a 25 °C, com uso de banho termostatizado (Thermomix-BM B. Braun Biotech International, Allentown, EUA). Utilizou-se como referência 2,7 mL de tampão e 0,3 mL de solução de substrato. A seção linear da curva da atividade em função do tempo foi usada para determinar-se a atividade da enzima ($U \cdot \mu g^{-1}$ de proteína $\cdot min^{-1}$). A unidade (U) para a atividade da PPO foi definida como uma alteração de 0,001 na absorvância nas condições do ensaio. O conteúdo de proteínas foi determinado com a técnica de Bradford (1976). Os valores obtidos foram interpolados graficamente com curva padrão, utilizando albumina de soro bovina (BSA), a 595 nm.

2.6. Extração e determinação da atividade da catalase (CAT)

A extração e a determinação da atividade da catalase seguiram o método de Zhang et al. (2005), com modificações. Foram homogeneizados 2 g de tecido fresco em 6 mL de tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,5, contendo EDTA 500 μM ; ácido ascórbico 10 mM; e 0,1 g de polivinilpirrolidona (PVPP), com uso de homogeneizador de tecidos modelo Turrax T-18 (IKA Labortechnik), durante 3 minutos, com intervalos de um minuto. O homogenato foi centrifugado a 15.000 g, por 20 minutos, a 2 °C, em centrífuga Himac CR-21 (Hitachi, Tóquio, Japão). O sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática. O meio de reação (3 mL) foi constituído por 1 mL de água destilada; 1,7 mL de tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0; 200 μL de extrato enzimático; e 100 μL de H_2O_2 , 100 mM. A redução linear na

absorvância a 240 nm foi medida a cada 10 segundos, durante 2 minutos, em espectrofotômetro UV-Visível U-2910 (Hitachi, Tóquio, Japão). A temperatura do ensaio foi mantida a 25 °C com uso de banho termostatizado (Thermomix-BM B. Braun Biotech International, Allentown, EUA). Uma unidade da catalase foi definida como a quantidade de enzima que causou um decréscimo de 0,1 em absorvância por minuto.

2.7. Extração e quantificação de aldeído malônico (MDA)

A concentração de MDA nas fatias foi determinada segundo Zhang et al. (2005), com modificações. Homogeneizaram-se 2 g de banana em homogeneizador de tecido Turrax T-18 (IKA Labor Technik), com 6 mL de ácido tricloroacético (TCA 10% p/v), durante 3 minutos. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min, a 4 °C, em centrífuga Himac CR-21 (Hitachi, Tóquio, Japão). A seguir, 500 µL do sobrenadante foram adicionados a tubos de vidro com tampa contendo 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5% em TCA 20%), preparado no momento da análise. Para a solução usada como branco, substituíram-se 500 µL da amostra por TCA 10%. As amostras e o branco foram incubados por 20 minutos a 100 °C em banho-maria. Em seguida, os tubos foram imersos em banho de gelo, por 2 minutos, para interromper-se a reação. As amostras foram centrifugadas a 13.000 g, por 4 minutos, a 25 °C, em micro-centrífuga Heraeus Fresco-21 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Após a centrifugação, as leituras foram obtidas em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi), a 532, 600 e a 450 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se da equação: $6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}$ e expressa como nmol de MDA por g de matéria fresca. Foram utilizadas três repetições para cada amostra.

2.8. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5 x 5, sendo cinco tratamentos de imersão, cinco tempos de avaliação, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, com uso do programa estatístico Sisvar versão 5.3 (Ferreira, 2008). As correlações entre as variáveis foram avaliadas pelo uso do coeficiente de correlação (*r*) de Pearson, a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cor da superfície

Em todos os tratamentos durante a conservação ocorreu redução nos valores de L^* , indicando escurecimento da banana minimamente processada (Figura 1). O escurecimento mostrou-se significativamente mais acentuado no tratamento controle e nas rodela previamente imersas em ácido cítrico pH 7,0, os quais mostraram escurecimento semelhante a partir do primeiro dia de conservação.

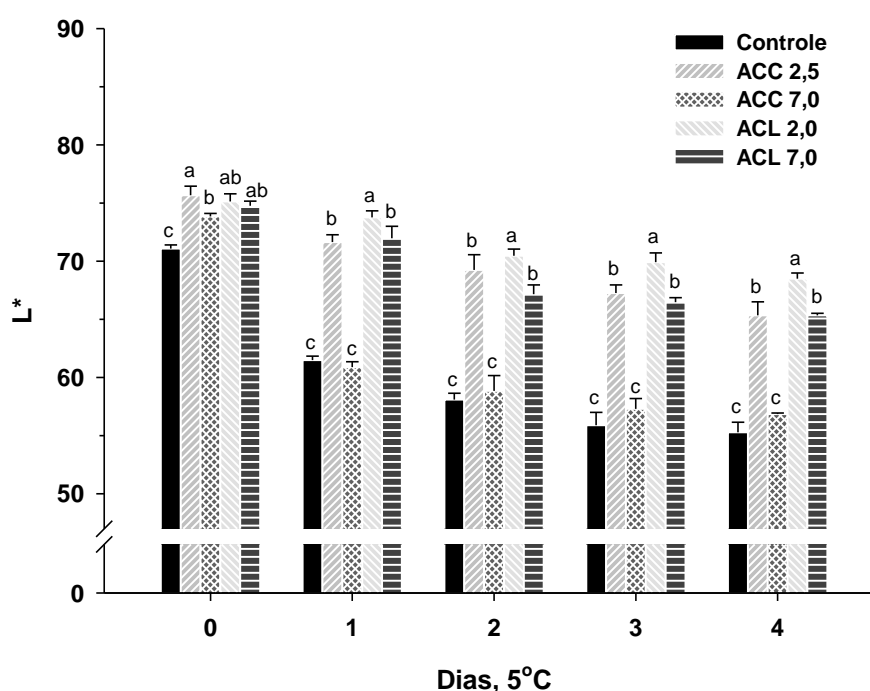


Figura 1 – Coordenada L^* em banana minimamente processada imersa nos tratamentos [Controle – água destilada; ACC 2,5 e ACC 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl_2 1% + ácido cítrico 1% sob pH 2,5 e pH 7,0, respectivamente; ACL 2,0 e ACL 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl_2 1% + L-cisteína 1% sob pH 2,0 e pH 7,0, respectivamente] conservada durante quatro dias, a 5 °C.

As imersões em soluções contendo cisteína pH 2,0 e pH 7,0 ou ácido cítrico pH 2,5 resultaram em maiores valores de L^* e, conseqüentemente, o escurecimento superficial foi menos intenso nas rodela de banana minimamente processadas. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Vilas Boas & Kader (2006), em que o banho químico por 2 minutos em CaCl_2 1% + ácido ascórbico 1% + cisteína 0,5%, pH

2,5 ou 7,0, mostrou-se extremamente efetivo em atrasar o escurecimento e manter a qualidade visual de bananas 'Grand Naine' (grupo Cavendish) minimamente processadas conservadas a 5 °C, sendo os melhores resultados observados com a mistura sob pH 2,5.

Os resultados observados evidenciam que o pH mais alto da solução de tratamento causou maior diminuição no valor L*, tanto nos tratamentos contendo ácido cítrico, quanto naqueles com cisteína na mistura. O ácido cítrico não diferiu do controle durante a conservação refrigerada, o que pode ser explicado pelo fato deste composto ter ação predominantemente acidulante, que provavelmente foi neutralizada pela elevação do pH a 7,0.

Comparando-se os tratamentos contendo cisteína em ambos os pH, verificou-se pequena diferença na redução do valor L* (Figura 1). Esse resultado provavelmente se deve à ação antioxidante específica deste aminoácido sulfurado. A cisteína pode reduzir o-quinonas de volta a o-dihidroxifenóis ou, quando em concentrações adequadas, reagir com o-quinonas, dando origem a conjugados incolores cisteíno-quinonas, os quais podem agir como inibidores competitivos da polifenoloxidase, evitando a formação de pigmentos marrons (Richard-Forget et al., 1992).

A coordenada a* (incidência de avermelhamento nas fatias) foi afetada pelos fatores tratamento químico e tempo de conservação. Houve aumento pronunciado nessa variável a partir do primeiro dia de conservação, sobretudo nos tratamentos controle e no tratamento contendo ácido cítrico, sob pH 7,0 na mistura (Figura 2). O tratamento contendo cisteína pH 2,0 foi mais eficiente em inibir o aumento de a* até o terceiro dia de conservação.

Foi observado efeito do pH nos tratamentos contendo cisteína sobre a formação de cor avermelhada na superfície das rodelas, semelhantemente aos resultados observados por Vilas Boas & Kader (2006), que relataram a formação de coloração rósea nas rodelas de banana tratadas com cisteína sob pH 7,0. Ao final do período de conservação, observou-se o desenvolvimento de coloração avermelhada em todas as rodelas, mesmo naquelas tratadas com pH baixo, de modo semelhante ao encontrado por Melo & Vilas Boas (2006), em banana 'Maçã'.

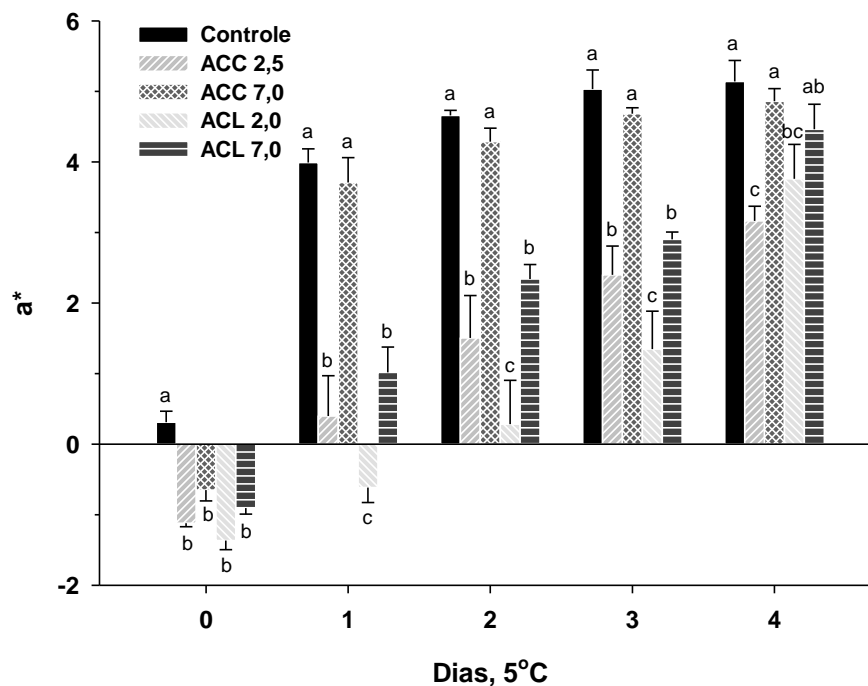


Figura 2 – Coordenada a^* em banana minimamente processada imersa nos tratamentos [Controle – água destilada; ACC 2,5 e ACC 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl_2 1% + ácido cítrico 1% sob pH 2,5 e pH 7,0, respectivamente; ACL 2,0 e ACL 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl_2 1% + L-cisteína 1% sob pH 2,0 e pH 7,0, respectivamente] conservada durante quatro dias, a 5 °C.

O uso de cisteína em misturas de compostos químicos para imersão de produtos minimamente processados está limitado à concentração do aminoácido na solução. Baixos níveis de cisteína na mistura são capazes de desenvolver coloração rósea ou avermelhada, enquanto altos níveis podem não ser compatíveis com as boas características sensoriais dos produtos (Richard-Forget et al., 1992). Em banana minimamente processada, Melo & Vilas Boas (2006) mostraram que a concentração de 0,5% de cisteína na mistura causou avermelhamento nas rodela durante a conservação refrigerada.

O tratamento contendo cisteína sob pH 7,0 causou visível avermelhamento nas regiões em que se encontram tecidos lignificados, conforme a Figura 3.

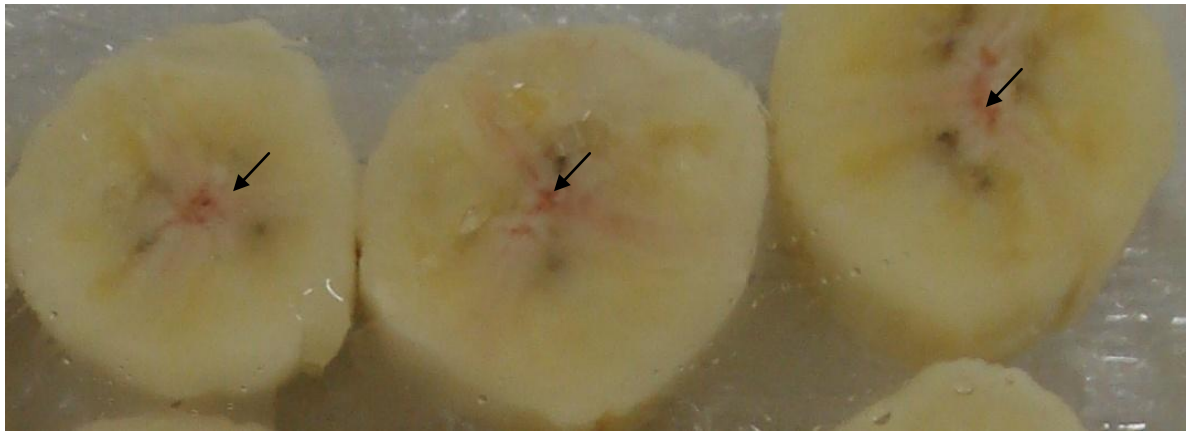


Figura 3: Banana ‘Prata’ minimamente processada, e tratada com solução de ácido ascórbico + CaCl_2 + cloridrato de L-cisteína (1% p/v) no interior da embalagem após 3 dias de conservação a 5 °C. As setas indicam as áreas nos quais se concentram vasos condutores, com coloração avermelhada.

O avermelhamento pode ser devido a uma provável baixa relação cisteína/fenólicos indicando que nessas regiões da polpa devem predominar fenólicos solúveis, sendo a concentração de cisteína nesses locais insuficiente para reagir proporcionalmente com o-quinonas formadas pela ação da PPO sobre os compostos fenólicos. Segundo Richard-Forget et al. (1992), essa condição permite a formação de excesso de o-quinonas pela PPO, as quais reagem com conjugados cisteíno-quinona, dando origem a pigmentos avermelhados.

As soluções de baixo pH (2,0 ou 2,5) foram mais eficientes em retardar a diferença total de cor (ΔE) (Figura 4). O tratamento contendo cisteína na mistura sob pH 2,0 promoveu menor variação na cor ao longo da conservação em relação ao tempo 0. Esta variável composta pelas coordenadas cromáticas L^* , a^* e b^* representa os desvios em relação à coloração original das rodela. O controle e a mistura contendo ácido cítrico sob pH 7,0 determinaram maiores mudanças na coloração das rodela durante os quatro dias de conservação. Esse resultado deve estar associado às alterações mais pronunciadas nas coordenadas L^* e a^* , observadas nas rodela do controle e do tratamento contendo ácido cítrico sob pH 7,0, as quais já se apresentavam visualmente inaceitáveis para o consumo logo após 24 horas de conservação.

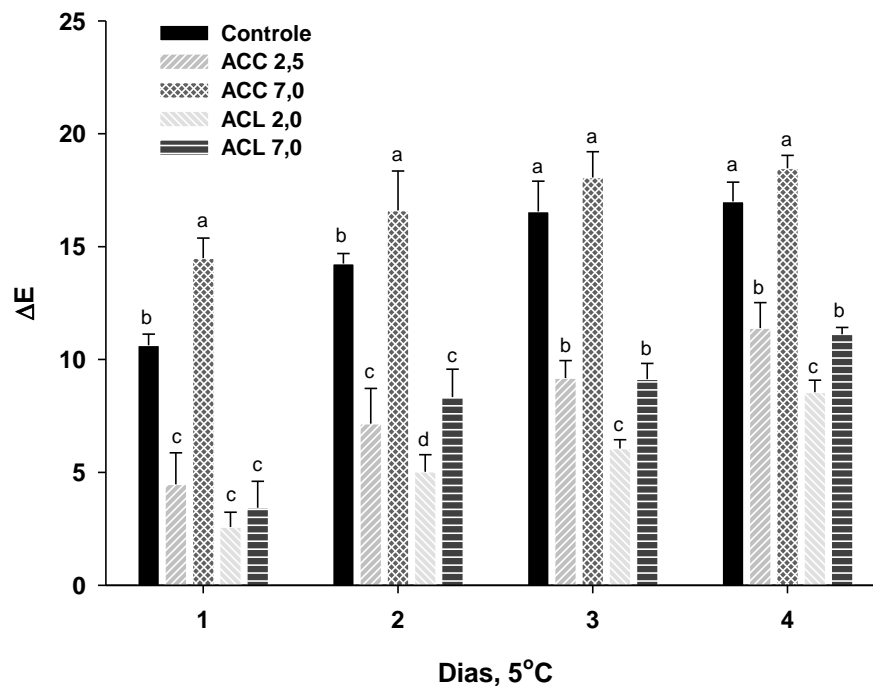


Figura 4 - Diferença total de cor (ΔE) em banana minimamente processada imersa nos tratamentos [Controle – água destilada; ACC 2,5 e ACC 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl_2 1% + ácido cítrico 1% sob pH 2,5 e pH 7,0, respectivamente; ACL 2,0 e ACL 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl_2 1% + L-cisteína 1% sob pH 2,0 e pH 7,0, respectivamente] e conservada durante quatro dias, a 5 °C.

Diniz (2009) observou aumento pronunciado na diferença de cor de banana ‘Prata’ minimamente processada sem tratamento antioxidante, logo nas 48 horas após o processamento mínimo. O autor verificou menor aumento da diferença total de cor (ΔE) ao utilizar um sistema em que a banana foi conservada imersa em solução contendo polpa de maracujá em sacarose.

No presente trabalho, o tratamento por imersão em solução com cisteína sob pH 2,0 mostrou-se eficiente em reduzir a variação total da cor a partir do 2º dia de conservação. O uso de antioxidantes por imersão durante o processamento mínimo parece vantajoso em relação ao sistema de imersão em solução contendo sacarose e polpa de maracujá durante a conservação. No primeiro caso, o produto é mantido em sua forma natural, sem adição de açúcar, com menor alteração no sabor e aroma característico da banana.

3.2. Compostos fenólicos solúveis totais

A concentração de compostos fenólicos em banana ‘Prata’ minimamente processada foi influenciada pelos fatores tratamento de imersão e tempo de conservação (Figura 5).

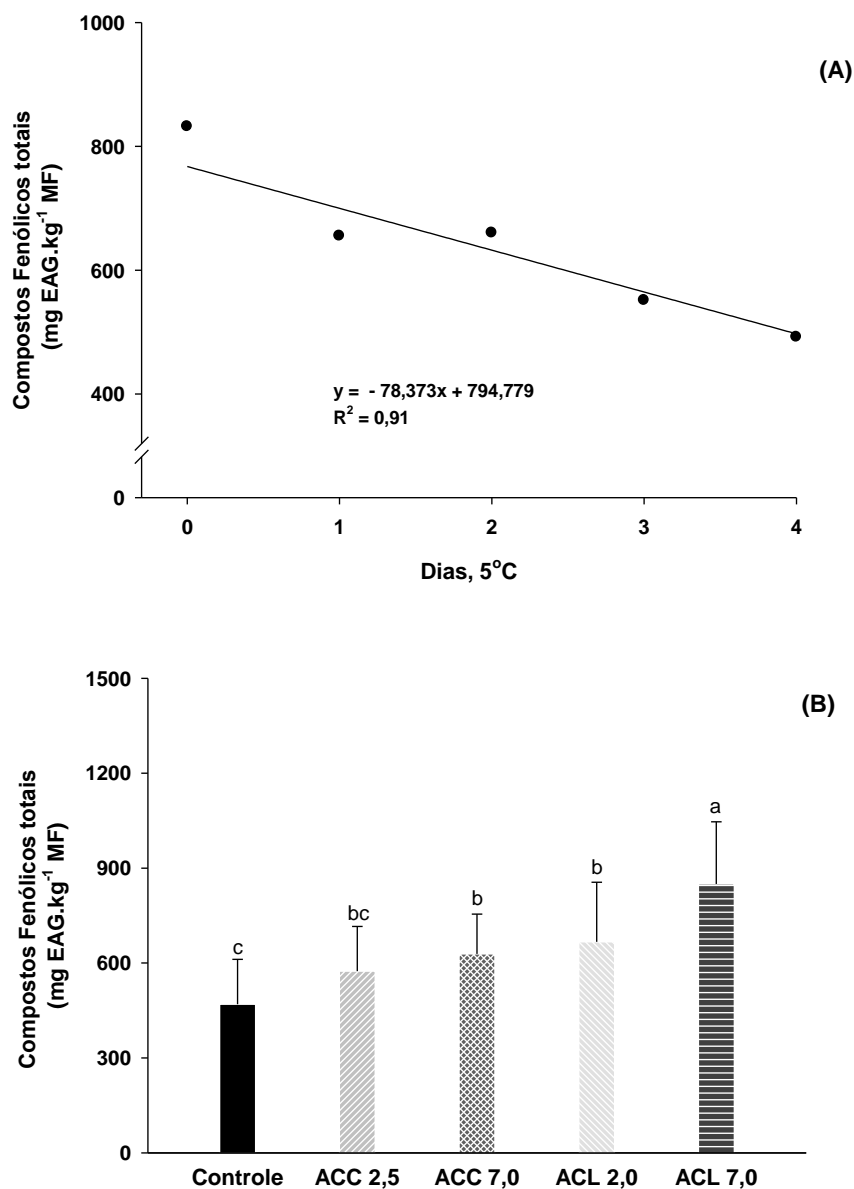


Figura 5 - Concentração média de compostos fenólicos totais durante o período de conservação (A) e nos diferentes tratamentos (B) de banana ‘Prata’ minimamente processada imersa em [Controle – água destilada; ACC 2,5 e ACC 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + ácido cítrico 1% sob pH 2,5 e pH 7,0, respectivamente; ACL 2,0 e ACL 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + L-cisteína 1% sob pH 2,0 e pH 7,0, respectivamente] e mantida durante quatro dias, a 5 °C.

Houve tendência de redução no conteúdo de compostos fenólicos ao longo da conservação em todos os tratamentos. As amostras que apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos totais foram aquelas tratadas com solução contendo cisteína a pH 7,0 (Figura 5).

As rodela de banana tratadas com ácido cítrico ou com cisteína em solução ácida não diferiram entre si, sendo, no entanto, superiores àquelas do tratamento controle. A cisteína é um aminoácido que contém um grupo tiol, com ação redutora. A cisteína pode reagir com o-quinonas formadas durante a fase inicial das reações de escurecimento enzimático, reduzindo-as a o-difenóis (Richard et al., 1991). No entanto, devido à neutralização do pH da solução de tratamento, os grupos sulfidríla da cisteína podem estar na forma oxidada, portanto, incapazes de exercer diretamente a função antioxidante. Nesse caso, o efeito da cisteína como inibidora da redução na concentração de compostos fenólicos, mesmo sob pH 7,0, pode ser atribuído à sua ação na formação de conjugados incolores, que inibem a ação da PPO, mantendo maior concentração de fenóis totais na forma reduzida (Richard-Forget et al., 1992).

3.3. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das rodela de banana apresentou tendência geral de redução ao longo dos dias de conservação. Essa redução foi de cerca de 50% ao final do período de quatro dias. Observa-se que a redução na atividade antioxidante foi mais intensa nas primeiras 24 h de processamento mínimo, o que pode ser relacionado à queda na concentração de compostos fenólicos totais (Figuras 6 e 7).

Os tratamentos que receberam cisteína na mistura química sob pH 2,0 e pH 7,0 mostraram maior atividade antioxidante média em relação aos demais tratamentos (Figura 6).

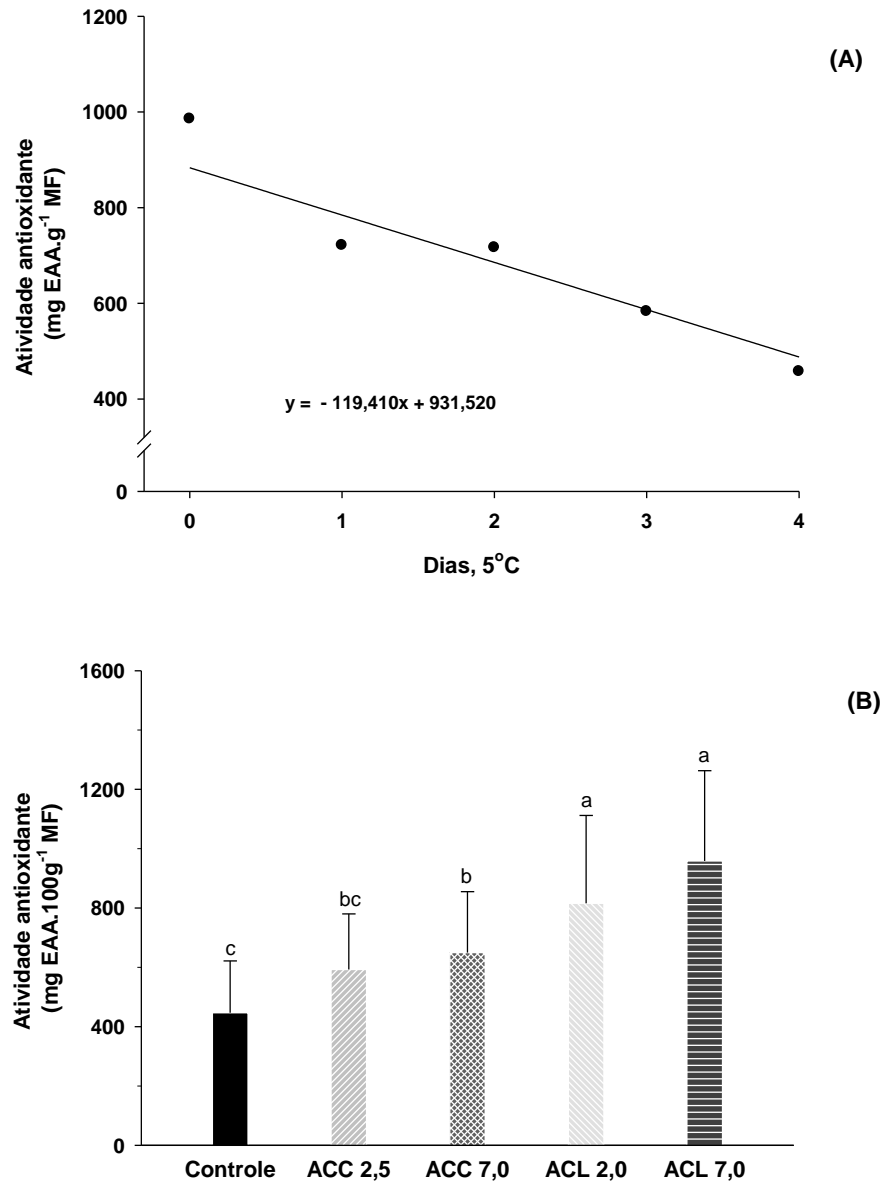


Figura 6 – Atividade antioxidante média durante o período de conservação (A) e nos diferentes tratamentos (B) de banana ‘Prata’ minimamente processada imersa em [Controle – água destilada; ACC 2,5 e ACC 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + ácido cítrico 1% sob pH 2,5 e pH 7,0, respectivamente; ACL 2,0 e ACL 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + L-cisteína 1% sob pH 2,0 e pH 7,0, respectivamente] e mantida durante quatro dias, a 5 °C.

A manutenção da maior atividade antioxidante na banana sob esses tratamentos pode estar relacionada ao maior conteúdo de compostos fenólicos totais observado nas rodela imersas em soluções contendo cisteína. A correlação entre a concentração de

fenóis e a atividade antioxidante foi significativa, considerando-se a média dos tratamentos em função do tempo de conservação (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficiente de correlação (*r*) entre o teor de compostos fenólicos solúveis totais e a atividade antioxidante em banana minimamente processada conservada a 5 °C por 4 dias.

Parâmetro	Tratamento				
	Controle	ACC 2,5	ACC 7,0	ACL 2,0	ACL 7,0
Ativ. antioxidante	0,924*	0,890*	0,827	0,746	0,982*

*correlação significativa a $p \leq 0,05$

A imersão nas diferentes misturas de agentes anti-escurecimento, sobretudo naquelas sem controle do pH, foi capaz de evitar a perda da coloração original em relação ao controle. No entanto, esses tratamentos não evitaram a tendência de diminuição da concentração de compostos fenólicos ou da atividade antioxidante que ocorreu em todos os tratamentos.

As alterações no conteúdo de compostos fenólicos estão correlacionadas à atividade antioxidante em diversos frutos e hortaliças minimamente processados. Os fenóis podem ser utilizados como doadores de elétrons, no seqüestro de espécies reativas de oxigênio, ou em rotas metabólicas de síntese de polímeros insolúveis como lignina e suberina, como parte da rota de sinalização de defesa contra a injúria. Uma vez que os compostos fenólicos são sintetizados após a injúria, suas concentrações nos tecidos podem ser resultado de um balanço entre a taxa de síntese (*ks*) e sua taxa de utilização (*ku*) (Reyes et al., 2007). No presente estudo não se verificou aumento na capacidade antioxidante. Logo, a diminuição da concentração de fenólicos e da capacidade antioxidante podem sugerir um $ks < ku$, sendo os fenólicos resultantes preferencialmente desviados em direção à formação de lignina e suberina, ou à polimerização subsequente à oxidação pelas polifenoloxidasas, dando origem a compostos marrons.

3.4. Atividade da polifenoloxidase

A atividade da polifenoloxidase foi afetada pela interação entre os tratamentos de imersão e o tempo de conservação. Verificou-se maior atividade enzimática nas rodela não tratadas (controle) em relação às dos demais tratamentos apenas no mesmo dia em que ocorreu o processamento mínimo (Figura 7). A mistura contendo cisteína sob pH 2,0 foi mais eficiente em reduzir a atividade da PPO durante todo o período de conservação, resultado que mostrou-se correlacionado com o menor escurecimento superficial da fatias de banana (Tabela 3). A atividade enzimática foi, em parte, confirmada pela mudança de cor total, mais evidente nas rodela do controle e do tratamento com ácido cítrico na mistura sob pH 7,0 (Figura 4).

Segundo Moline et al. (1999), tanto a mudança no pH quanto a presença de compostos sulfurados na mistura química de imersão podem desempenhar um papel importante na redução da atividade da PPO. Comparando-se a atividade da PPO nos tratamentos contendo cisteína, pode-se atribuir este resultado principalmente ao efeito do baixo pH do tratamento, que pode ter reduzido a atividade enzimática.

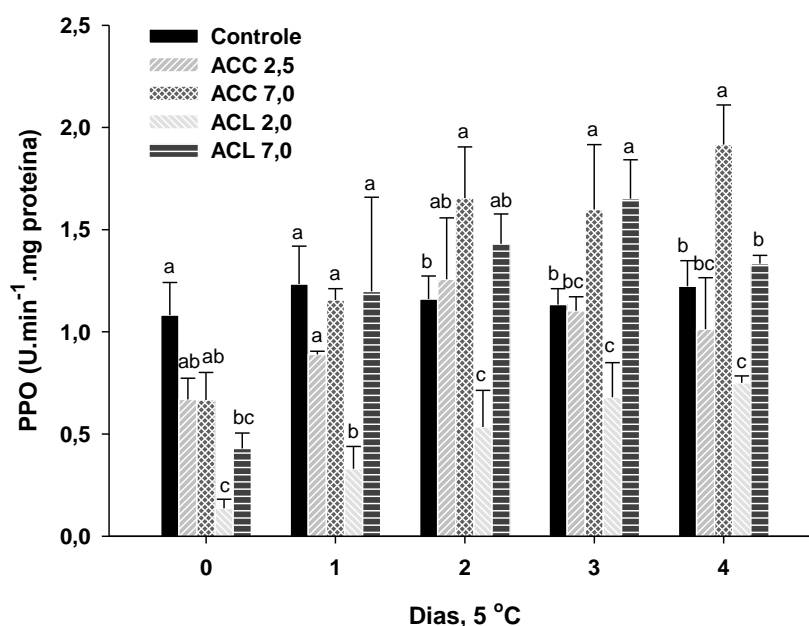


Figura 7 - Atividade específica da polifenoloxidase (PPO) em banana ‘Prata’ minimamente processada imersa nos tratamentos [Controle – água destilada; ACC 2,5 e ACC 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + ácido cítrico 1% sob pH 2,5 e pH 7,0, respectivamente; ACL 2,0 e ACL 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + L-cisteína 1% sob pH 2,0 e pH 7,0, respectivamente] conservada durante quatro dias, a 5 °C.

Tabela 3 - Coeficiente de correlação (*r*) entre a atividade da PPO, e parâmetros relacionados ao escurecimento em banana ‘Prata’ minimamente processada conservada a 5 °C por 4 dias.

Parâmetro	Tratamento				
	Controle	ACC 2,5	ACC 7,0	ACL 2,0	ACL 7,0
Valor L*	-0,584	-0,73	-0,923*	-0,986*	-0,865
Compostos fenólicos totais	-0,638	-0,436	-0,84	-0,906*	-0,8

*correlação significativa a $p \leq 0,05$

A baixa atividade da PPO nos tratamentos imersos em cisteína sob pH 2,0 mostrou-se correlacionada com o maior conteúdo de fenóis nas bananas deste tratamento durante a conservação (Tabela 3). Bico et al. (2009) também encontraram alta correlação linear inversa, porém não significativa, entre a atividade da PPO e o teor de fenóis em banana Cavendish imersa na mesma combinação de antioxidantes. Rocha & Morais (2001) encontraram correlação moderada entre a atividade da PPO e os valores de L* em maçãs da cultivar Jonagored minimamente processadas.

No presente estudo, a diminuição da atividade da PPO conferida pela imersão em solução com cisteína sob pH 2,0 pode ser atribuída a uma maior proteção contra a oxidação dos substratos fenólicos proporcionada pelo tratamento, uma vez que a redução na concentração desses compostos foi menor nesse tratamento durante a conservação. No entanto, a solução contendo cisteína sob pH 7,0, mesmo não havendo reduzido a atividade da PPO tão eficientemente quanto sob pH 2,0, permitiu manter maiores níveis de compostos fenólicos totais e de capacidade antioxidante. Possivelmente, a solução de pH neutro contendo cisteína não inibiu a ação da PPO pela formação de complexos conjugados com quinonas, como relatado por Richard-Forget et al. (1992). A diminuição na atividade da enzima pode então estar mais relacionada ao pH baixo do que ao efeito inibitório da cisteína em banana minimamente processada.

3.5. Atividade da catalase

Houve influência dos fatores tempo e tratamento sobre a atividade da enzima catalase, que aumentou ao longo do tempo em todos os tratamentos (Figura 8). As

bananas sob o tratamento com cisteína em solução ácida apresentaram atividade significativamente menor em relação às aquelas sob os demais tratamentos, do primeiro ao terceiro dia de conservação. Esse resultado pode ser atribuído ao efeito sinérgico entre os antioxidantes presentes na mistura e a um possível efeito inibitório da cisteína sobre a enzima. Além disso, o pH da solução de tratamento pode ter alterado a atividade da catalase no tecido da polpa da banana minimamente processada.

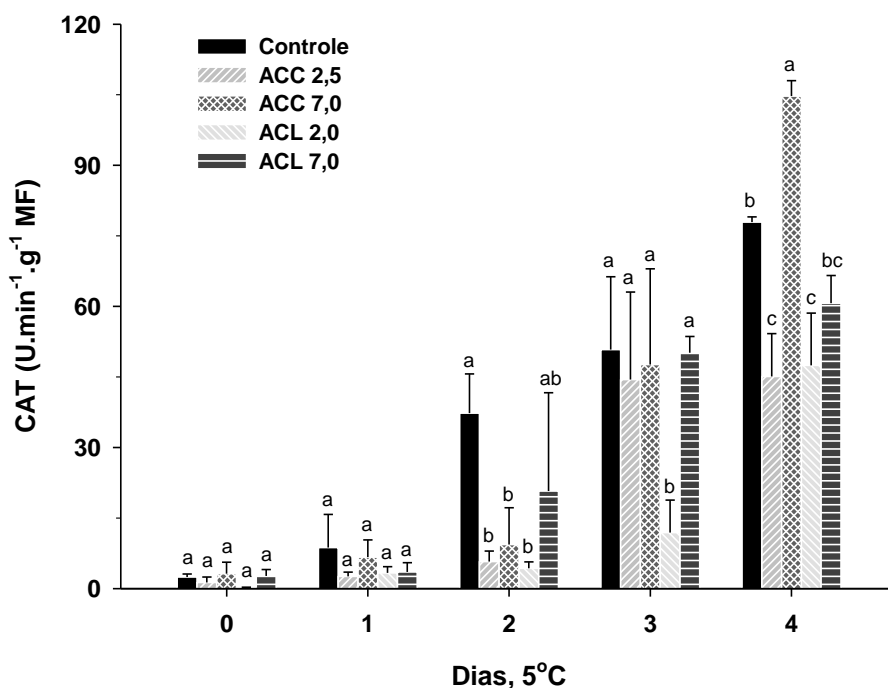


Figura 8 - Atividade da catalase (CAT) em banana ‘Prata’ minimamente processada imersa nos tratamentos [Controle – água destilada; ACC 2,5 e ACC 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + ácido cítrico 1% sob pH 2,5 e pH 7,0, respectivamente; ACL 2,0 e ACL 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + L-cisteína 1% sob pH 2,0 e pH 7,0, respectivamente] conservada durante quatro dias, a 5 °C.

O tratamento com ácido cítrico sob pH 7,0 causou elevada atividade da catalase no quarto dia de conservação, sendo maior do que as rodela sob o tratamento controle. O pH neutro na solução contendo ácido cítrico pode ter impedido a atividade quelante/acidulante do ácido cítrico, e o controle no aumento da atividade da CAT observado até o terceiro dia deve ser atribuído à ação antioxidante transitória do ácido ascórbico.

3.6. Aldeído malônico

Observou-se maior concentração de aldeído malônico (MDA) nas rodela de banana que receberam cisteína no tratamento de imersão, independentemente do pH da solução, notadamente a partir do primeiro dia de conservação (Figura 9). Supõe-se que as bananas sob esses tratamentos tenham sofrido maior injúria no processamento mínimo, uma vez que o MDA é subproduto da peroxidação de lipídeos e indicador de danos em membranas. De modo geral, os tratamentos com ácido cítrico produziram efeito semelhante ao controle, após o primeiro dia de conservação.

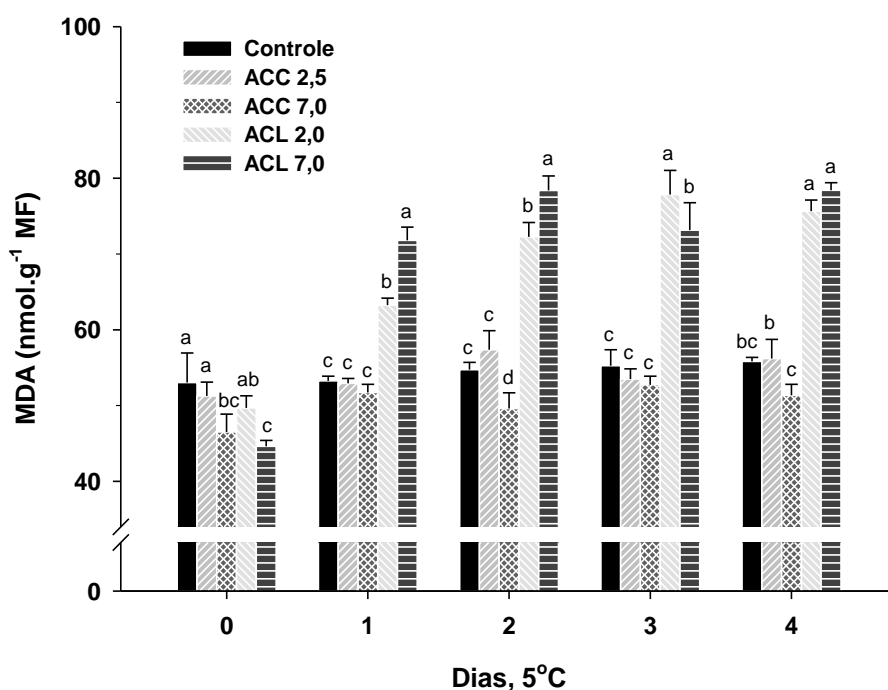


Figura 9 – Concentração de aldeído malônico (MDA) em banana ‘Prata’ minimamente processada imersa nos tratamentos [Controle – água destilada; ACC 2,5 e ACC 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + ácido cítrico 1% sob pH 2,5 e pH 7,0, respectivamente; ACL 2,0 e ACL 7,0 – ácido ascórbico 1% + CaCl₂ 1% + L-cisteína 1% sob pH 2,0 e pH 7,0, respectivamente] conservada durante 4 dias, a 5 °C.

O maior conteúdo de MDA nos tecidos das bananas sob os tratamentos com cisteína na mistura pode ser consequência de uma maior injúria química causada pela alta concentração desse aminoácido, capaz de alterar o metabolismo celular. O elevado conteúdo de MDA pode estar relacionado com a menor atividade da catalase

apresentada pelas fatias sob tratamentos contendo cisteína, resultado atribuído, ao menos parcialmente, a um estado de colapso ou exaustão de sistemas de defesa antioxidantes no tecido, induzido pelo estresse (Toivonen, 2004).

A menor atividade da catalase nas rodelas tratadas com mistura contendo cisteína sob pH 2,0 pode indicar uma maior concentração de H_2O_2 nos tecidos. Em sistemas biológicos, o peróxido de hidrogênio, na presença de metais de transição na forma reduzida, tais como o Fe^{2+} , tende a reagir com o H_2O_2 na reação de Fenton, dando origem ao radical hidroxil (OH^\bullet), oxidante altamente inespecífico, capaz de iniciar reações em cadeia com moléculas orgânicas, particularmente ácidos graxos poliinsaturados em lipídeos de membranas (Blokina, 2000).

A variação da concentração de MDA no presente trabalho foi menor do que a verificada por Chen et al. (2009). Esses autores relataram aumento na concentração de MDA ao longo do tempo de conservação de banana Cavendish minimamente processada de $40 \text{ nmol.g}^{-1} \text{ MF}$ até cerca de $120 \text{ nmol.g}^{-1} \text{ MF}$ nas primeiras 48 horas a partir do processamento mínimo. A menor variação encontrada no presente trabalho pode ser devida às diferenças entre cultivares, além da temperatura de conservação.

Apesar de seus efeitos desejáveis na redução do escurecimento enzimático causado pela PPO, o tratamento com cisteína parece ter um aspecto pró-oxidativo, uma vez que nas rodelas tratadas com este aminoácido houve um significativo maior conteúdo de MDA. Esses resultados são diferentes daqueles observados por Larrigaudière et al. (2008), os quais estudaram isoladamente a aplicação de cisteína e ácido ascórbico em maçã minimamente processada, e verificaram que o ácido foi o responsável pelo aumento na peroxidação lipídica e concentração de H_2O_2 nos tecidos.

Segundo Toivonen (2004), os efeitos danosos do baixo pH das soluções dos banhos sobre as membranas poderiam ser compensados pelos componentes do banho, os quais podem incluir antioxidantes que elevem a capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio e/ou sais de cálcio, para estabilizar as membranas e paredes celulares contra a ação enzimática. No entanto, nas bananas sob os tratamentos contendo cisteína, isso não foi verificado, visto que em ambas as condições de pH, houve maior peroxidação lipídica.

4. CONCLUSÕES

A imersão de banana minimamente processada nas soluções contendo cloreto de cálcio, ácido ascórbico e cisteína ou cloreto de cálcio, ácido ascórbico e ácido cítrico sob pH baixo minimizou as variações no escurecimento e avermelhamento das rodela, sobretudo no tratamento sob pH 2,0. A cisteína, como componente das soluções foi mais eficiente do que o ácido cítrico, principalmente sob pH baixo, na manutenção da coloração, e na redução da atividade da polifenoloxidase.

Os tratamentos com soluções contendo ácido cítrico e cisteína como antioxidantes incrementaram o conteúdo de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante de rodela de banana conservadas a 5 °C, por quatro dias. Além disso, em banana, parece que os fenóis são os principais reguladores da atividade antioxidante, uma vez que a concentração de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante reduziram com tendências similares durante a conservação.

O tratamento por imersão em solução contendo cloreto de cálcio, ácido ascórbico e cisteína afetou negativamente o metabolismo relacionado ao estresse oxidativo no tecido de banana, por reduzir a atividade da catalase e aumentar a peroxidação lipídica indicada pela maior concentração de aldeído malônico.

5. REFERÊNCIAS

Bailly, C.; Benamar, A.; Corbineau, F.; Come, D. Changes in malonaldehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. **Physiologia Plantarum**, v.97, n.1, p.104-109, May.1996.

Blokhina, O. **Anoxia and oxidative stress: lipid peroxidation, antioxidant status and mitochondrial functions in plants**. 2000. 79p. Dissertation (Plant Physiology) – University of Helsinki, Helsinki.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

Comission Internationale de L'Éclairage (CIE). **Recommendations on uniform color spaces – color-difference equations, psychometric color terms**. Paris. Publ. 15, Suppl. 2, 1978.

Diniz, L. T. **Respostas da banana ‘Prata anã’ minimamente processada e conservada em solução de sacarose com polpa de maracujá**. 2009. 57p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Dixon, R. A.; Paiva, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7, n.7, p.1085-1097, July, 1995.

Dziezak, J. D. Antioxidants. **Food Technology**, v.40, p.94-102, 1986.

Ferreira, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium (Lavras)**, v.6, p.36-41, 2008.

Gorny, J. R.; Hess-Pierce, B.; Cifuentes, R. A.; Kader, A. A. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by controlled atmospheres and chemical preservatives. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n.3, p.271-278, Apr. 2002.

Haliwell, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, July 1996.

Knee, M. Fruit softening III. Requirement for oxygen and pH effects. **Journal of Experimental Botany**, v.33, n.6, p.1263-1269, 1982.

Larrigaudière, C.; Ubach, D.; Soria, Y.; Rojas-Graü, M. A.; Martín-Belloso, O. Oxidative behaviour of fresh-cut 'Fuji' apples treated with stabilising substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, 1170-1176, 2008.

Lim, Y. Y.; Quah, E. P. L. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. **Food Chemistry**, v.103, n.3, p.734-740, 2007.

Lurie, S. Antioxidants In: Hodges, D. M. (Ed.). **Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops**, New York, Food Products Press, p.131-144, 2003.

Martin-Diana, A. B.; Rico, D.; Frias, J.; Mulcahy, J.; Henehan, G. T. M.; Barry-Ryan, C. Whey permeate as a bio-preservative for shelf life maintenance of fresh-cut vegetables. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.7, p.112-123, 2006.

Melo, A. A. M.; Vilas Boas, E. V. de B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.110-115, 2006.

Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n.9, p.405-410, 2002.

Moline, H. E.; Buta, J. G.; Newman, I. M. Prevention of browning of banana slices using natural products and their derivatives. **Journal of Food Quality**, v. 22, p.499-511, 1999.

Poovaiah, B. W. Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.10, n. 1, p.86-89, Jan. 1986.

Prior, R. L.; Cao, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.83, p.950-956, 2000.

Reyes, L. F.; Villarreal, J. E.; Cisneros-Zevallos, L. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. **Food Chemistry**, v.101, n.3, p.1254-1262, 2007.

Richard, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J.; Lacombe, J-M; Paiva, A.A. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39 n.5, p.841-847, 1991.

Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning: 2. Kinetic studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.11, p.2108-2113, 1992.

Rocha, A. M. C. N.; Morais, A. M. M. B. Polyphenoloxidase activity and total phenolic content as related to browning of minimally processed 'Jonagored' apple. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p.120-126, 2001.

Saltveit, M. E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, v.21, p.61-69, 2000.

Sapers, G.M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. **Food Technology**, v.47, n.10, p.75-84, 1993.

Sapers, G. M.; Miller, R. L. Browning inhibition in fresh-cut pears. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 342-346, 1998.

Shewfelt, R. L.; Purvis, A. C. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. **Hortscience**, v.30, n.2, p.213-218, 1995.

Soliva-Fortuny, R. C.; Martin-Belloso, O. New Advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A Review. **Trends in Food Science and Technology**, v.14, n.9, 341-353, 2003.

Swain, T.; Hillis, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, n.63-68, 1959.

Toivonen, P. M. A. Postharvest Storage Procedures and Oxidative Stress. **Hortscience**, v.39, n.5, p.938-942, Aug. 2004.

Vilas Boas, E. V. de B.; Kader, A. A. Effect of atmospheric modification, 1-MCP and chemicals on quality of fresh-cut banana. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, n.2, p.155-162, Feb. 2006.

Von Loesecke, H. W. **"Bananas": Chemistry, Physiology, Technology**. 2nd Review. New York: Interscience Publishers. Inc, 1950, 189p.

Yang, C.P.; Fujita, S.; Ashrafuzzman, M. D.; Nakamura, N.; Hayashi, N. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.7, p.2732-2735, July 2000.

Zawistowski, J.; Biliaderis, C. G.; Eskin, N. A. M. Polyphenol oxidases. In: Robinson, D. S.; Eskin, N. A. M. (Eds.), **Oxidative enzymes in Foods**. 1991. London: Elsevier, p. 217-273.

Zhang, J.; Huang, W.; Pan, Q.; Liu, Y. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment. **Postharvest Biology and Technology**, v.38, n.1, p.80-90, 2005.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO PROCESSAMENTO MÍNIMO E TRATAMENTO ANTI-ESCURECIMENTO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM BANANA ‘PRATA’

1. INTRODUÇÃO

A produção de frutas minimamente processadas é um segmento importante na indústria de alimentos. Isso se deve à sua conveniência como produtos prontos, e aos benefícios à saúde associados ao seu consumo por serem frescos (Soliva-Fortuny & Martin-Belloso, 2003). Os danos físicos que ocorrem durante a colheita, o manuseio pós-colheita e o processamento mínimo de frutas e hortaliças desencadeiam um conjunto de mudanças em processos bioquímicos e fisiológicos em decorrência do estresse que causam (Saltveit, 2000). Uma vez iniciado um estresse físico ou um processo deteriorativo, a compartimentalização das células é prejudicada, com consequente contato entre substratos e enzimas que aceleram processos degenerativos (Rolle & Chism 1987).

A banana é um fruto rico em compostos fenólicos, dentre outras substâncias endógenas bioativas (Someya et al., 2002). A banana minimamente processada, no entanto, possui curta vida-de-prateleira por sofrer acentuado escurecimento enzimático poucas horas após o processamento mínimo, sendo esse escurecimento um indicador de perda da qualidade que evidencia a oxidação de compostos fenólicos solúveis nos tecidos catalisado pela polifenoloxidase (Vilas Boas & Kader, 2006; Bico et al., 2009).

O escurecimento que ocorre após a injúria mecânica dos tecidos é um processo oxidativo que está relacionado ao colapso de membranas das células de tecidos vegetais decorrente da peroxidação de lipídeos e, portanto, se expressa além das células diretamente danificadas (Toivonen, 2004). Assim, embora parte deste escurecimento possa ser atribuída ao dano celular direto causado pelo corte, a maior parte do escurecimento ocorre após processos secundários induzidos pela injúria devido ao dano nas membranas em tecidos próximos às superfícies cortadas (Rolle & Chism, 1987; Ke & Saltveit, 1989).

Os compostos fenólicos solúveis estão relacionados à injúria de produtos minimamente processados. Esses compostos podem funcionar como antioxidantes naturais, reduzindo espécies reativas de oxigênio; serem desviados para rotas de síntese de lignina e suberina como resposta de defesa; ou constituírem substratos para oxidação pelas polifenoloxidasas (Reyes et al., 2007). Além da presença de compostos fenólicos solúveis, que neutralizam espécies reativas de oxigênio, o complexo sistema de proteção antioxidante em tecidos vegetais requer o balanço de vários componentes enzimáticos e não-enzimáticos (Mittler, 2002), tais como as atividades da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e compostos antioxidantes como ácido ascórbico e compostos fenólicos (Figura 1).

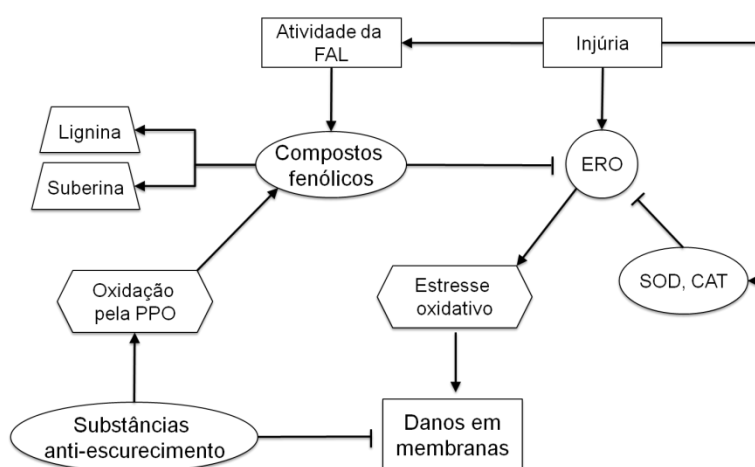


Figura 1 - Relações entre os efeitos da injúria do processamento mínimo sobre o metabolismo de compostos fenólicos e seus papéis no controle do estresse oxidativo. ERO = espécies reativas de oxigênio; FAL = fenilalanina amônia-liase; PPO = polifenoloxidase; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase. Adaptado de Buchanan et al. (2000) e Reyes et al. (2007).

A SOD, enzima presente no citosol, mitocôndria, peroxissomos e cloroplastos (Alscher et al., 2002) é considerada enzima-chave na regulação das concentrações intracelulares dos radicais superóxidos, os quais podem formar radicais hidroxil, envolvidos na peroxidação de lipídeos (Halliwell, 1996). A CAT, enzima majoritariamente presente nos peroxissomos, está implicada na remoção do H_2O_2 , por meio da sua redução a água. Para a manutenção de um balanço homeostático entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de neutralizá-las, as superóxido dismutases e catalases devem trabalhar em sincronia com compostos

antioxidantes, além de outras enzimas que removem o H₂O₂ (Halliwell, 1996; Toivonen, 2004).

Algumas técnicas vêm sendo empregadas no controle do escurecimento enzimático em banana minimamente processada, como: conservação de banana imersa em calda comestível de maracujá contendo sacarose (Diniz, 2009); imersão rápida durante o processamento mínimo em soluções contendo cisteína, ácido ascórbico e sais de cálcio (Moline et al., 1999; Melo & Vilas Boas, 2006; Vilas Boas & Kader, 2006) e aplicação de revestimentos comestíveis durante o processamento mínimo (Bico et al., 2009). Dentre estas técnicas, o emprego combinações de agentes anti-escurecimento tem sido altamente eficiente, sobretudo em relação à aplicação dos referidos compostos de forma isolada (Melo et al., 2009).

Em trabalho anterior (Capítulo 1), foi observado que a imersão de banana 'Prata' minimamente processada soluções mistas contendo cloreto de cálcio, ácido ascórbico e cisteína ou ácido cítrico (à concentração de 1% p/v, de cada), foi capaz de minimizar a evolução do escurecimento, principalmente por diminuir a atividade da polifenoloxidase, durante a conservação. A solução contendo cisteína contribuiu para evitar a diminuição da concentração de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante. Por outro lado, essa mistura química causou redução da atividade da catalase, e incremento nos níveis de aldeído malônico, indicando desestabilização de membranas ocasionada pelo elevado estresse oxidativo.

Embora mudanças na qualidade de produtos minimamente processados tenham sido extensivamente descritas na literatura, pouco se sabe a respeito dos efeitos que o uso de estabilizantes químicos pode ter na fisiologia do fruto, com ênfase na degradação de membranas (Larrigaudière et al., 2008). O papel da oxidação na qualidade pós-colheita de banana e de outros frutos é bastante estudado. No entanto, a perda de qualidade devido à senescência acelerada pelo processamento mínimo, e as alterações metabólicas associadas ao estresse oxidativo são ainda pouco relacionadas às mudanças na concentração de antioxidantes ou na atividade antioxidante (Hodges, 2003).

A pesquisa executada neste trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da injúria mecânica e do tratamento por imersão em mistura de cloreto de cálcio, ácido ascórbico e cisteína durante o processamento mínimo, sobre e o potencial antioxidante associado ao estresse oxidativo no tecido da polpa de banana 'Prata' durante a sua conservação refrigerada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e processamento mínimo

Bananas da cultivar Prata-anã, provenientes da região Norte do Estado de Minas Gerais, foram obtidas no mercado local de Viçosa-MG, selecionadas segundo homogeneidade de cor da casca, tamanho e ausência de defeitos. Os frutos foram conduzidos à Unidade de Processamento Mínimo do Departamento de Biologia Vegetal, e selecionados de acordo com a coloração da casca (“grau de coloração 6” - totalmente amarela), segundo Von Loesecke (1950).

Os buquês foram pré-resfriados a 14 °C por 12 horas. Em seguida, foram lavados em solução de água e sabão neutro, e os frutos cuidadosamente removidos com uso de facas, e separados aleatoriamente em 3 grupos – Inteira, Controle e Tratada. Os grupos “Controle” e “Tratada” foram imersos por 10 minutos em solução sanitizante contendo 400 mg.L⁻¹ de cloro ativo, a 5 °C, e o grupo “Inteira” foi sanitizado a 20 °C. Os grupos sanitizados a 5 °C foram descascados e fatiados manualmente em rodela com espessura de aproximadamente 1 cm, enquanto os frutos do grupo “Inteira” foram mantidos intactos. O grupo “Controle” foi imerso, por 3 min, em água destilada gelada e o grupo “Tratada” foi imerso em solução contendo ácido ascórbico 1% (p/v) + cloreto de cálcio 1% (p/v) + cloridrato de L-cisteína 1% (p/v), por 3 minutos. Em seguida, as fatias e as bananas do grupo “Inteira” foram drenadas por um minuto em bandejas perfuradas. Aproximadamente 100 g (10 fatias) de produto minimamente processado ou 5 frutos inteiros foram acondicionados em cada bandeja de polietileno tereftalato (PET). As bandejas de todos os tratamentos foram envolvidas em 3 camadas de filme de PVC de 12 µm e imediatamente armazenadas a 13 °C, por 2 dias. As avaliações ocorreram nos tempos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 h após o processamento. Com exceção da avaliação de mudanças na cor da polpa, que foi feita em tecido fresco, as demais avaliações foram feitas em tecidos das dez rodela de cada bandeja homogêneos em triturador de frutas doméstico, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -86 °C, até o momento das análises.

2.2. Avaliação de cor da superfície

A cor de cada fatia de banana em cada parcela experimental foi medida com uso de colorímetro portátil digital CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japão), com uso do iluminante C, após a calibração em uma placa branca padrão ($Y = 93,8$; $x = 0,3130$; $y = 0,3191$). As leituras foram obtidas segundo o modelo tridimensional de coordenadas cromáticas preconizada pelo CIE ($L^*a^*b^*$). O valor L^* representa a luminosidade da cor (0 indica preto e 100 indica branco), e foi utilizado como um indicativo do escurecimento das superfícies cortadas, segundo Gorny et al. (2002). A coordenada a^* indica a posição da cor entre verde (-a) e vermelho (+a), e a coordenada b^* indica a cor entre azul (-b) e amarela (+b). O índice de escurecimento (IE) foi calculado a partir da equação proposta por Palou et al. (1999):

$$IE = [100 (X - 0,31)]/0,172; \text{ em que } X = (a + 1,75L)/(5,645L + a - 3,021b)$$

O Chroma (C), que indica o grau de saturação de cor e é proporcional à intensidade desta, foi calculado pela equação: $C = (a^2 + b^2)^{1/2}$, de acordo com Martin-Diana et al. (2006).

2.3. Extração e quantificação de compostos fenólicos solúveis

Os compostos fenólicos solúveis totais foram extraídos homogeneizando-se 3 g de amostra de banana em 15 mL de metanol em homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik), durante 1 minuto. A solução metanólica foi armazenada em ambiente escuro, a 2 °C, por 14 h. O extrato foi filtrado em 4 camadas de gaze e centrifugado a 2 °C em centrífuga Himac CR-21 (Hitachi, Tóquio, Japão) a 32.000 g, por 15 min, sendo coletado o sobrenadante. Os fenóis totais foram quantificados de acordo com Swain & Hillis (1959) com modificações. Uma alíquota de 150 µL de extrato metanólico foi adicionada a 2400 µL de água destilada. Adicionaram-se 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu 0,5 N ao extrato diluído e a mistura foi agitada. A mistura permaneceu reagindo por 3 min. A seguir, adicionaram-se 300 µL de carbonato de sódio 1 N e a reação ocorreu por 2 horas. Simultaneamente, uma amostra do branco foi preparada com metanol puro e tratada da mesma maneira que as outras amostras. As absorvâncias a 725 nm foram obtidas em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi). Os compostos fenólicos solúveis totais foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por kg de matéria fresca, por meio de curva padrão.

2.4. Extração e determinação da atividade antioxidante

O procedimento de extração seguiu o mesmo protocolo de extração de compostos fenólicos solúveis totais. A capacidade antioxidante foi determinada de acordo com Brand-Williams et al. (1995). Uma alíquota de 100 µL de extrato metanólico filtrado foi adicionada a 2900 µL de solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), à concentração de 96 µM, apresentando uma absorvância inicial de 1,1 a 515 nm. Quanto ao controle, o extrato metanólico foi substituído por 200 µL de metanol puro. Após agitação vigorosa, as soluções permaneceram reagindo no escuro, durante 30 min em tubos de ensaio. As leituras ocorreram a 515 nm em espectrofotômetro UV-Visível U-2910 (Hitachi, Tóquio, Japão). A atividade antioxidante foi calculada por medida do decréscimo da absorvância das amostras em comparação com o controle, e quantificada como mg de equivalentes ácido ascórbico (EAA) por 100 g de matéria fresca, a partir de uma curva padrão, utilizando-se a equação:

Atividade Antioxidante (*mg EAA/100g*) = $[IC_{50}(AA)/IC_{50}(amostra)] \times 100.000$, onde, $IC_{50}(AA)$ e $IC_{50}(amostra)$ denotam, respectivamente, a quantidade de ácido ascórbico e de matéria fresca presentes em 1 mL de solução, e capazes de reduzirem a concentração inicial de DPPH em 50% (Lim & Quah, 2007).

2.5. Extração e determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi medida de acordo com Giannopolitis & Ries (1977), com leves modificações: foram homogeneizados 2,0 g do tecido de banana em 10 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,8 contendo 1,0 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF), 100 µM de EDTA, e 10 g.L⁻¹ de polivinilpolipirrolidona (PVPP). A homogeneização ocorreu durante 3 minutos com intervalos de um minuto, em homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 15.000 g, por 20 minutos a 2 °C, em centrífuga Himac CR-21 (Hitachi, Tóquio, Japão), e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática. Todo o procedimento de extração foi conduzido em temperatura entre 0 e 4 °C. O meio de reação foi preparado em tubos de ensaio uniformemente transparentes, e continha

100 μM de EDTA, 75 μM de azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT), 13 mM de metionina, 2 μM de riboflavina e 200 μL de extrato enzimático, em um volume total de 3 mL. A reação ocorreu em temperatura ambiente, e foi iniciada pela exposição do meio de reação a 10 cm de uma fonte de luz composta por duas lâmpadas fluorescentes de 32 W, por 15 min. A reação foi paralisada pelo desligamento das lâmpadas. As absorvâncias foram medidas a 560 nm em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi). Tubos contendo meio de reação não-irradiados foram utilizados como controle. Os meios de reação que não continham enzima desenvolveram coloração máxima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que inibiu a fotorredução do NBT sob as condições de ensaio, por g de matéria fresca. Cada meio de reação foi analisado em triplicata.

2.6. Extração e determinação da atividade da catalase (CAT)

A extração e a determinação da atividade da catalase seguiram o método de Zhang et al. (2005). Foram homogeneizados 2 g de tecido fresco com 10 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, contendo 500 μM de EDTA, 10 mM de ácido ascórbico e 1% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), com uso de homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik), durante 3 minutos, com intervalos de um minuto. O homogenato foi centrifugado a 15.000 g, por 20 min a 2 °C em centrífuga Himac CR-21 (Hitachi, Tóquio, Japão). O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima. O meio de reação (3 mL) foi constituído por 1 mL de água destilada; 1,7 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; 200 μL de extrato enzimático e 100 μL de H_2O_2 100 mM. A absorvância foi medida a 240 nm em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi) antes e depois da incubação por 90 minutos a 25 °C. Uma unidade da catalase foi definida como a quantidade de enzima que causou um decréscimo de 0,1 em absorvância por minuto.

2.7. Extração e quantificação de aldeído malônico (MDA)

O conteúdo de aldeído malônico nas fatias foi determinado segundo Zhang et al. (2005) com modificações. Homogeneizaram-se 2 g de banana em homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA-Labortechnik), com 6 mL de ácido tricloroacético (TCA 10%

p/v), durante 3 min. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min, a 4 °C, em centrífuga Himac CR-21 (Hitachi, Tóquio, Japão). A seguir, 500 µL do sobrenadante foram adicionados a tubos de vidro com tampa contendo 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5%, em TCA 20%), preparada no momento da análise. Na solução usada como branco, substituíram-se 500 µL da amostra por TCA 10%. As amostras e o branco foram incubados por 20 minutos, a 97 °C, em banho termostatizado com agitação. Em seguida, a reação foi paralisada em banho de gelo por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 g, por 10 minutos, a 25 °C em micro-centrífuga Heraeus Fresco-21 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Após a centrifugação, as amostras tiveram suas absorvâncias lidas em espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi), a 532, 600 e a 450 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando equação: $6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}$ e expressa como nmol de MDA por g de matéria fresca. Utilizaram-se três repetições para cada amostra.

2.8. Extração e determinação da atividade da polifenoloxidase (PPO)

A enzima polifenoloxidase foi extraída e determinada de acordo com Bico et al. (2009). Todo o procedimento de extração foi conduzido entre 0 e 4 °C. Homogeneizaram-se 2 g de tecido fresco com 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,5) e 0,1 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), com uso de um homogeneizador de tecidos Turrax T-18 (IKA Labortechnik), durante 5 min, com intervalos de um minuto. Foram adicionadas duas gotas de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Switzerland) antes do último minuto de homogeneização. O homogenato foi centrifugado a 2 °C, em centrífuga Himac CR-21 (Hitachi, Tóquio, Japão), a 16.500 g, por 20 minutos, registrando-se o volume do sobrenadante. O meio de reação continha 2,3 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5; 0,3 mL de catecol 56 mM; e 0,4 mL de extrato enzimático. A concentração de catecol no meio de reação foi de 5,6 mM. A taxa de aumento da absorvância foi acompanhada a 420 nm durante 2 minutos, usando-se um espectrofotômetro UV-Visível (U-2910, Hitachi). A temperatura do ensaio foi mantida a 25 °C com uso de banho termostatizado (Thermomix-BM B. Braun Biotech International, Allentown, EUA). Utilizaram-se como referência 2,7 mL de tampão e 0,3 mL de solução de substrato. A seção linear da curva de atividade em função do tempo foi utilizada para determinar-se a velocidade da atividade enzimática ($M.s^{-1}$), com uso

do coeficiente de extinção molar para o-quinonas, proveniente da oxidação do pirocatecol ($1417.M^{-1}.cm^{-1}$), segundo Waite (1976).

2.9. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 6, composto por três tratamentos (Inteira, Controle e Tratada), seis tempos de avaliação (0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas), com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com uso do programa estatístico Sisvar versão 5.3 (Ferreira, 2008). As correlações entre as variáveis foram avaliadas pelo uso do coeficiente de correlação (r) de Pearson a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cor da superfície

As coordenadas L^* (luminosidade da cor) e a^* (avermelhamento) foram significativamente afetadas pelo tratamento de imersão. O tratamento mostrou-se eficiente em evitar a redução do valor L^* e o aumento da coordenada a^* nas rodela de banana ‘Prata’ conservada a 13 °C, principalmente nas primeiras três horas subsequentes ao processamento mínimo (Figura 2 a, b). A diminuição de L^* , que representa escurecimento, foi mais acentuada nas primeiras três horas após o processamento mínimo. O aumento de a^* foi causado pelo avermelhamento das rodela, sendo esse maior a partir das primeiras 12 h e visualmente mais intenso após 24 h de processamento mínimo.

Melo & Vilas Boas (2006) e Vilas Boas & Kader (2006), que avaliaram respectivamente o tratamento de banana das cultivares ‘Grand Naine’ e ‘Maçã’ minimamente processadas por imersão naquelas misturas químicas, mas em diferentes concentrações dos aditivos, relataram tendências similares nas coordenadas cromáticas L^* e a^* , sendo o tratamento altamente efetivo para evitar o escurecimento, porém com desenvolvimento de coloração avermelhada. No entanto, os autores conservaram a banana 5 °C, temperatura menor que a utilizada no presente estudo, o que pode ter contribuído para menor intensidade dos sintomas visíveis.

A temperatura de 13 °C, escolhida no presente estudo em função de se evitar a injúria pelo frio, que poderia causar danos peroxidativos nas membranas, determinou um escurecimento intenso nas primeiras 24 horas após o processamento. O avermelhamento, no entanto, foi mais intenso apenas a partir das 12 horas de conservação. Comparando-se os valores de L^* das rodela do controle com o valor a^* das tratadas, pode-se, provavelmente, atribuir a defasagem entre o escurecimento e o avermelhamento à ação da cisteína, pela formação de complexos cisteíno-quinona incolores, subsequente à ação da PPO, os quais têm capacidade de inibir a enzima. Uma vez consumida a cisteína da mistura, a relação cisteína/fenólicos tende a diminuir nos tecidos, favorecendo reações secundárias entre o conjugado cisteíno-quinona e outros fenóis presentes, formando pigmentos avermelhados (Richard-Forget et al., 1992).

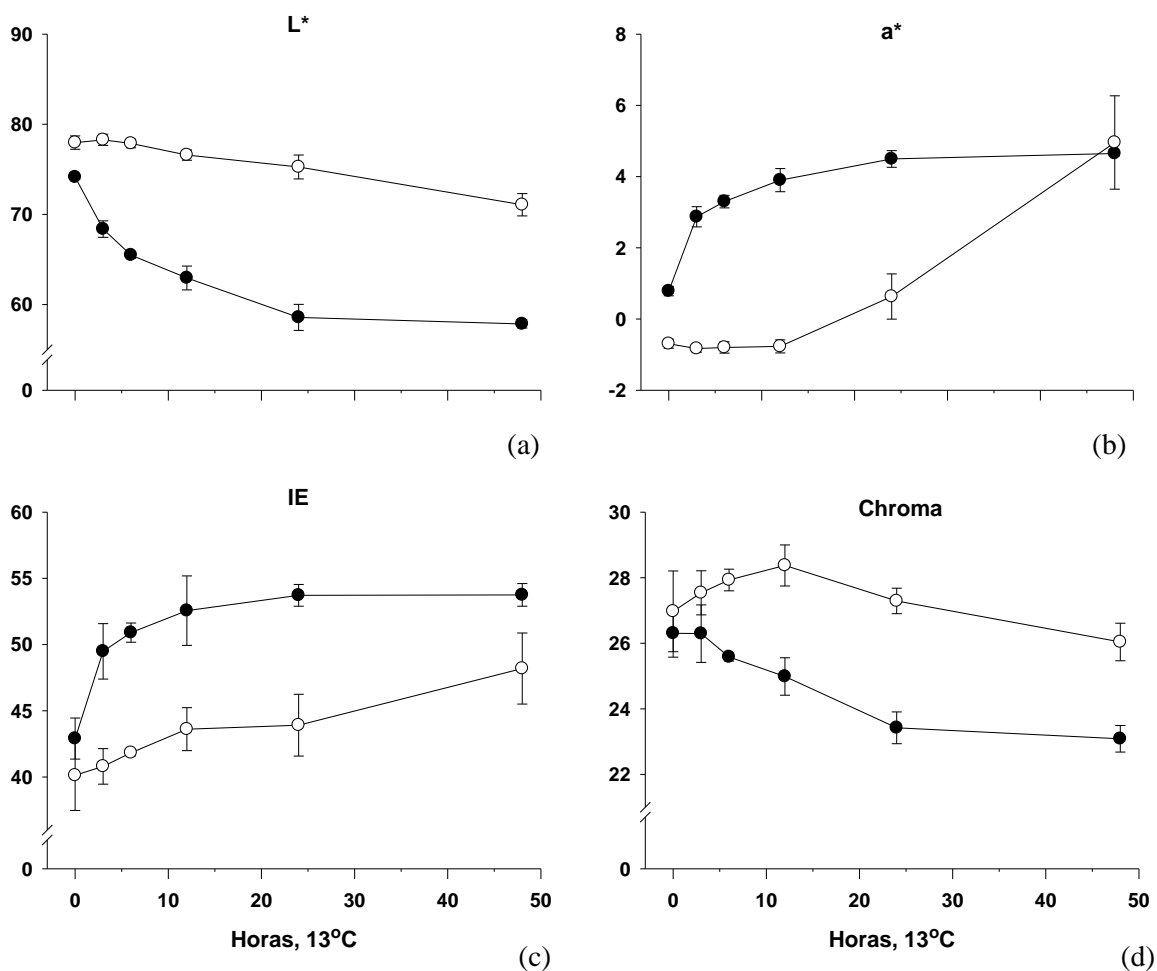


Figura 2 – Coordenadas L*, a*, índice de escurecimento (IE) e Chroma em banana ‘Prata’ minimamente processada imersa nos tratamentos: (●) Controle – água destilada e (○) Tratada – ácido ascórbico 1% (p/v) + cloreto de cálcio 1% (p/v) + cloridrato de L-cisteína 1% (p/v), conservadas a 13 °C, durante 48 h. As barras representam o desvio-padrão da média.

O índice de escurecimento (IE) e Chroma (cromaticidade, ou índice de saturação da cor), variáveis derivadas das coordenadas cromáticas L*, a* e b*, mostraram aumento no escurecimento e degradação da cor das rodela em ambos os tratamentos (Figura 2 c, d). O índice de escurecimento representa a pureza da cor marrom e é relatado como um importante parâmetro que reflete a ocorrência de processos enzimáticos e não enzimáticos (Buera et al., 1986; Palou et al., 1999).

No tratamento controle, o índice de escurecimento foi mais pronunciado nas primeiras 12 h, tornando-se estável a partir de 24 h de conservação a 13 °C, indicado pela coloração marrom. O índice de escurecimento foi significativamente retardado nas

fatias de banana imersas em solução antioxidante contendo ácido ascórbico, cloreto de cálcio e L-cisteína à concentração de 1% (p/v) de cada componente, durante todo o período de conservação. O comportamento dessa variável foi semelhante ao controle até as 12 h. A partir de 24 h de conservação observou-se um aumento no IE, provavelmente devido ao aumento na coordenadas a*, um dos componentes do índice (Figura 2).

O tratamento com substâncias anti-escurecimento inibiu significativamente a redução do Chroma das fatias; esse parâmetro até mesmo aumentou nas primeiras 12 h de conservação, possivelmente em decorrência do aumento na coordenada b*, relacionada ao amarelecimento das rodela (dado não mostrado). Os resultados observados estão de acordo com os encontrados por Bico et al. (2009), em que o tratamento por imersão em ácido ascórbico (1% p/v) + cloreto de cálcio (1% p/v) + L-cisteína (0,75% p/v), com ou sem uso de atmosfera controlada inibiram a redução do Chroma em rodela de banana ‘Cavendish’ minimamente processada.

3.2. Compostos fenólicos solúveis totais

Houve efeito dos fatores tempo e tratamento sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais em banana ‘Prata’ minimamente processada. A concentração de fenóis reduziu-se na polpa da banana, em média, cerca de 50% durante os dois dias subsequentes ao processamento mínimo (Figura 3 A). O processamento mínimo promoveu uma menor concentração dessas substâncias nas rodela em relação às não fatiadas, enquanto o tratamento das rodela de banana foi eficiente em evitar a redução na concentração de compostos fenólicos totais (Figura 3 B).

Rodela de banana imersas em solução anti-escurecimento exibiram um pico transiente na concentração de fenóis nas 3 h após o processamento mínimo, com subsequente queda, com menor intensidade em comparação com as bananas dos tratamentos que não receberam substâncias anti-escurecimento.

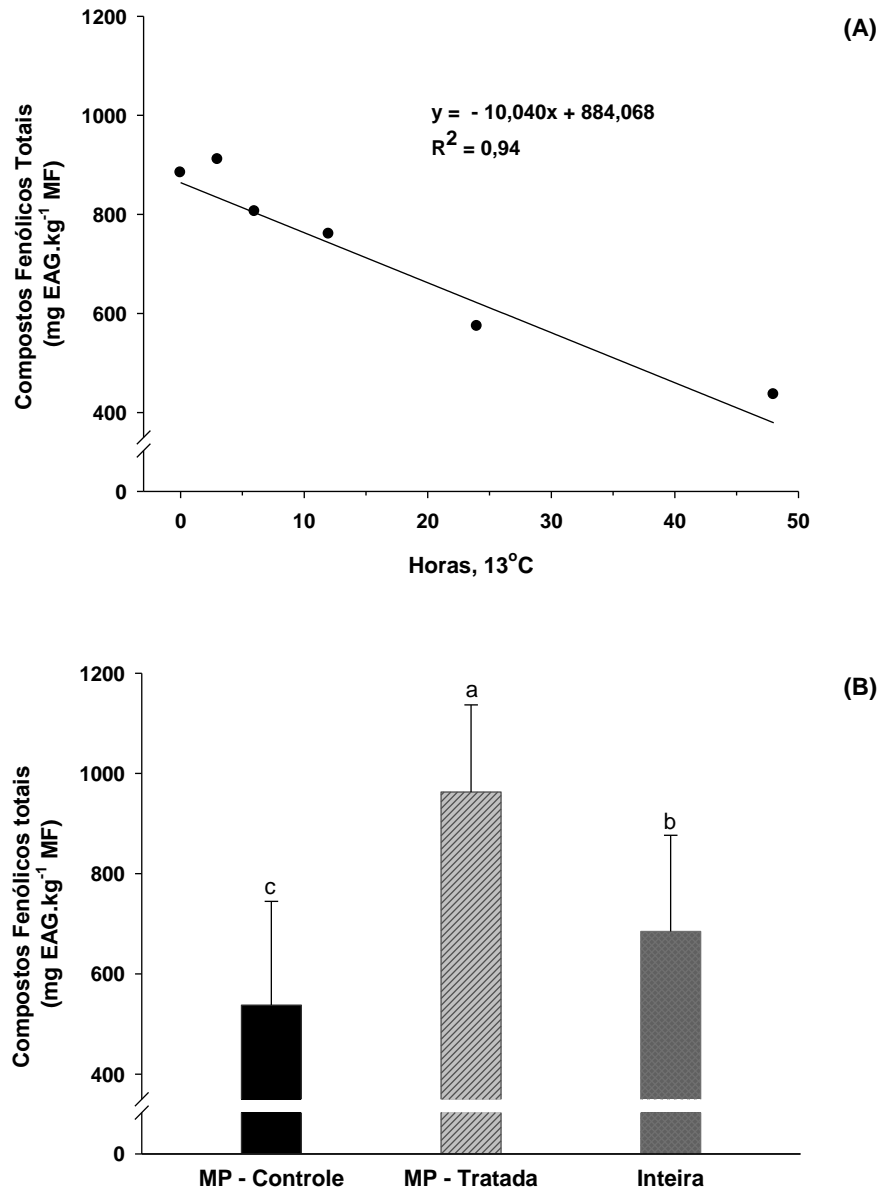


Figura 3 – Concentração média de compostos fenólicos solúveis totais em banana ‘Prata’, em função do tempo de conservação – 48 horas (A), e do tratamento – inteira (Não processada) ou minimamente processada e imersa em água destilada (M P - Controle) ou em solução contendo ácido ascórbico 1% (p/v) + cloreto de cálcio 1% (p/v) + cloridrato de L-cisteína 1% (p/v) (M P - Tratada) (B). As barras representam o desvio-padrão da média.

Mudanças no metabolismo de compostos fenólicos, e conseqüente concentração desses nos tecidos são comumente associadas à injúria, uma vez que os compostos fenólicos solúveis encontram-se compartimentalizados no vacúolo, e as enzimas PPO ancoradas nas membranas dos plastídeos e mitocôndrias (Murata et al., 1997).

De acordo com Saltveit (2000), há variações no controle da taxa de síntese e acúmulo de fenóis em tecido de alface em função da injúria. Os compostos fenólicos totais podem ter sua concentração aumentada ou reduzida nos tecidos, de acordo com as necessidades metabólicas específicas. O declínio, observado no presente estudo, poderia sugerir que fenóis estariam preferencialmente desviados no sentido de formação de substâncias insolúveis como lignina e suberina, ou polimerização subsequente à oxidação pelas polifenoloxidasas (Reyes et al. 2007).

3.3. Atividade antioxidante

A atividade de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) diminuiu ao longo da conservação nas rodelas de banana dos três tratamentos (Figura 4), sendo aqueles que envolveram injúria mecânica do tecido significativamente distintos quanto à intensidade desta redução. O tratamento de imersão em substâncias anti-escurecimento foi eficiente em manter a capacidade antioxidante do tecido relativamente constante, até as 12 horas após o processamento (Figura 4).

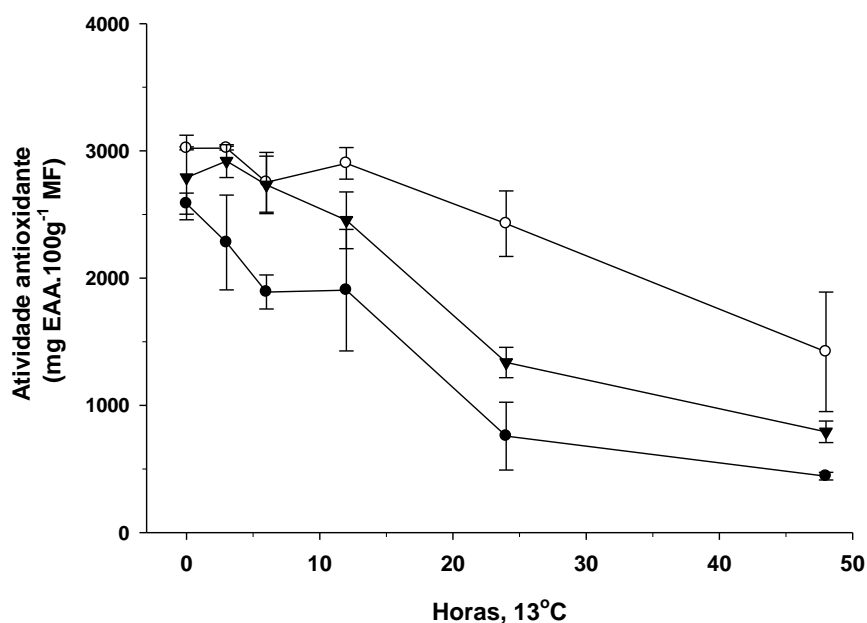


Figura 4 – Atividade antioxidante em banana ‘Prata’ inteira (▼), ou minimamente processada e imersa em água destilada (●), ou em solução contendo ácido ascórbico 1% (p/v) + cloreto de cálcio 1% (p/v) + cloridrato de L-cisteína 1% (p/v) (○), conservada a 13 °C, durante 48 h. As barras representam o desvio-padrão da média.

Esse resultado pode ser correlacionado com o maior conteúdo de compostos fenólicos totais nesse período. Os resultados encontrados estão de acordo com os verificados por Aguayo et al. (2010), em maçãs minimamente processadas, em que a aplicação de ácido ascórbico na forma de ascorbato de sódio foi eficiente em inibir a perda da capacidade antioxidante.

3.4. Atividade da polifenoloxidase

O tratamento de imersão em substâncias anti-escurecimento mostrou-se efetivo em reduzir a atividade da PPO em bananas, até 12 horas após o processamento mínimo (Figura 5). As rodela de banana fatiadas e imersas em água destilada exibiram alta atividade enzimática logo após o processamento, o que coincide com o maior escurecimento observado (Figura 1). Os frutos inteiros mostraram aumento da atividade da PPO, atingindo um patamar 12 horas após o processamento, valor semelhante ao verificado nas bananas fatiadas controle.

O tratamento com agentes anti-escurecimento foi capaz de conter a atividade da PPO pela redução da atividade enzimática, não somente pelo reduzido pH do meio de tratamento, mas também pela ação antioxidante proporcionada pelos componentes da mistura, os quais, podem agir de modo sinérgico e/ou aditivo. O cloreto de cálcio possui papel na manutenção da integridade de membranas (Poovaiah, 1986), evitando indiretamente o escurecimento. O ácido ascórbico possui capacidade antioxidante, reduzindo o-quinonas de volta aos fenóis precursores (McEvily et al. 1992). A cisteína é capaz de reduzir o-quinonas a o-difenóis (Richard et al. 1991), além de reagir com produtos primários de oxidação, dando origem a conjugados incolores que podem inibir competitivamente a PPO (Richard-Forget et al., 1992).

Saltveit (2000) atribui o escurecimento de alface ao resultado de um processo de indução da síntese da PAL, e acúmulo de compostos fenólicos, em detrimento de uma oxidação passiva de fenóis pré-existentes. Em banana, Chen et al. (2009) verificaram que o acúmulo de compostos fenólicos no fruto fatiado ocorre concomitantemente ao aumento da expressão do mRNA da PAL, e aumento transiente na atividade da enzima. No presente trabalho, observou-se inibição da atividade da PPO e no escurecimento, além da manutenção de maior concentração de compostos fenólicos em rodela tratadas com substâncias anti-escurecimento. Pode-se inferir que em banana, a imersão em

solução mista foi capaz de inibir a oxidação enzimática de fenóis; estes poderiam estar sendo utilizados nas rotas metabólicas de síntese de lignina e suberina como resposta de defesa (Dixon & Paiva, 2005), ou mesmo como antioxidantes para neutralização de espécies reativas de oxigênio.

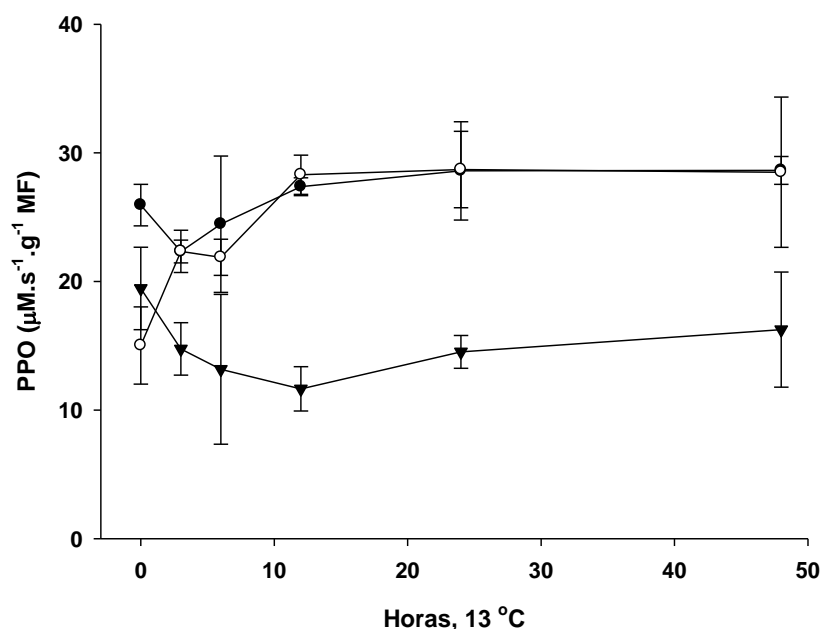


Figura 5 – Atividade da polifenoloxidase (PPO) em banana ‘Prata’ inteira (▼), ou minimamente processada e imersa em água destilada (●), ou em solução contendo ácido ascórbico 1% (p/v) + cloreto de cálcio 1% (p/v) + cloridrato de L-cisteína 1% (p/v) (○), conservada a 13 °C, durante 48 h. As barras representam o desvio-padrão da média

Bico et al. (2009) verificaram uma redução na concentração de compostos fenólicos em banana minimamente processada, mesmo naquelas tratadas com solução antioxidante. Os autores atribuem a diminuição na concentração de compostos fenólicos à sua oxidação pela polifenoloxidase, mostrando alta correlação entre os fatores. No presente estudo, não foi observada correlação significativa entre a diminuição na concentração de compostos fenólicos solúveis e a atividade da PPO. Por outro lado, os compostos fenólicos solúveis totais mostraram alta correlação com a capacidade antioxidante (Tabela 1), dados que concordam com Reyes & Cisneros-Zevallos (2003), que encontraram alta correlação entre esses fatores em batata, após a injúria mecânica.

Tabela 1 - Coeficiente de correlação (r) entre o teor de compostos fenólicos solúveis totais, a atividade antioxidante e a atividade da polifenoloxidase (PPO) em banana minimamente processada conservada a 13 °C, por 48 horas.

Parâmetro	Tratamento		
	Inteira	M P Controle	M P Tratada
Ativ. antioxidante	0,988*	0,994*	0,909*
PPO	-0,793	-0,728	-0,083

*correlação significativa a $p \leq 0,05$

3.5. Atividade da superóxido dismutase

O tempo de conservação foi o único fator a influenciar a atividade da superóxido dismutase (SOD) nas rodela de banana minimamente processada, aumentando ao longo da conservação refrigerada, sem diferença significativa entre os tratamentos, conforme o perfil de atividade mostrado na Figura 7.

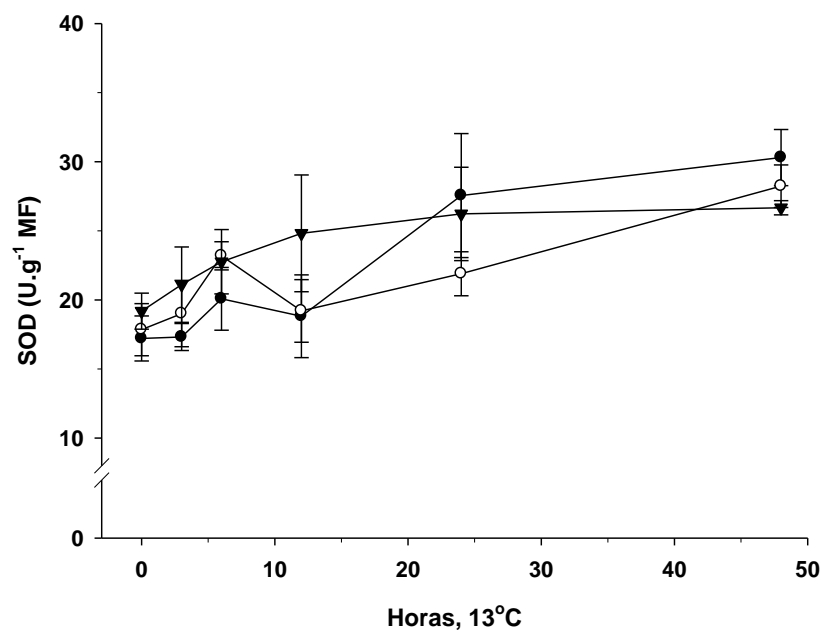


Figura 7 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em banana ‘Prata’ inteira (▼), ou minimamente processada e imersa em água destilada (●), ou em solução contendo ácido ascórbico 1% (p/v) + cloreto de cálcio 1% (p/v) + cloridrato de L-cisteína 1% (p/v) (○), conservada a 13 °C, durante 48 h. As barras representam o desvio-padrão da média.

O corte do tecido ou a aplicação de substâncias anti-escurecimento não parecem ter influenciado a tendência de aumento da atividade da SOD no tecido de banana. As superóxido dismutases são metaloproteínas que catalisam a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Giannopolitis & Ries, 1977), sendo uma das primeiras linhas de defesa de danos causados por espécies reativas de oxigênio. Assim, o aumento das atividades da SOD, associado a outras enzimas antioxidantes pode ajudar a proteger os tecidos de plantas contra o estresse oxidativo e, conseqüentemente, podem desacelerar o processo de senescência induzido pela injúria (Mittler, 2002).

Larrigaudière et al. (2008) também verificaram aumento na atividade da SOD em fatias de maçã, e não encontraram diferenças significativas entre aquelas tratadas com ácido ascórbico e cisteína isoladamente ou em mistura, após o processamento mínimo e durante a conservação por sete dias, a 4 °C.

3.6. Atividade da catalase

A atividade da catalase, uma das enzimas responsáveis pela desintoxicação celular, que faz parte do sistema antioxidante natural dos tecidos vegetais e animais, foi afetada significativamente pelo tratamento de imersão, que foi capaz de inibir o aumento da sua atividade durante a conservação refrigerada (Figura 6).

As rodelas de banana fatiadas e não tratadas mostraram aumento pronunciado da atividade da catalase após 12 h de conservação, indicando que o tecido pode ter sofrido um maior estresse oxidativo em relação aos tecidos sob os demais tratamentos.

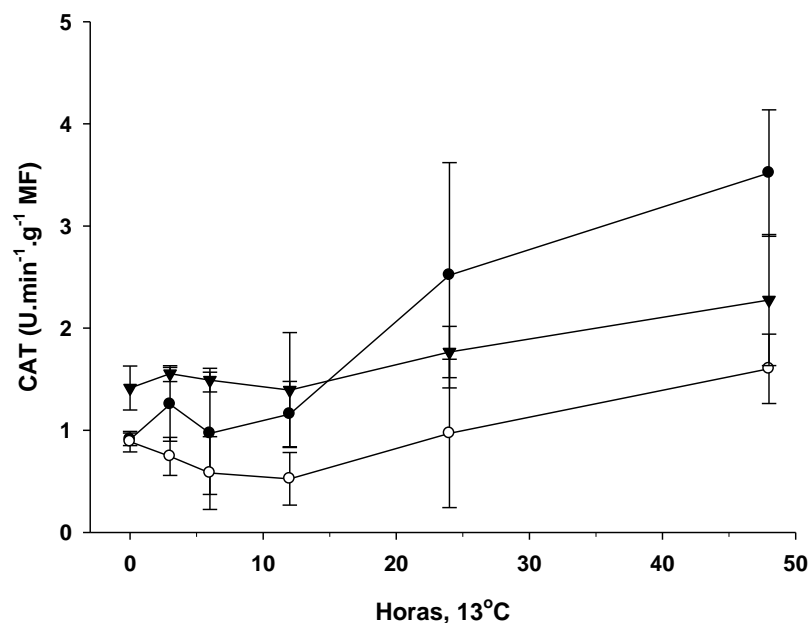


Figura 6 – Atividade da catalase (CAT) em banana ‘Prata’ inteira (▼), ou minimamente processada e imersa em água destilada (●), ou em solução contendo ácido ascórbico 1% (p/v) + cloreto de cálcio 1% (p/v) + cloridrato de L-cisteína 1% (p/v) (○), conservada a 13 °C, durante 48 h. As barras representam o desvio-padrão da média.

Larrigaudière et al. (2008) encontraram aumento acentuado na concentração de H_2O_2 , sem concomitante aumento na atividade da CAT, durante a conservação refrigerada de maçã minimamente processada tratada com soluções contendo ácido ascórbico e cisteína. Esses autores atribuem esse efeito à ação isolada do ácido ascórbico, em detrimento da cisteína. No entanto, Vanlerberghe et al. (2002), ao tratarem células de tabaco com cisteína, verificaram que o aminoácido afetou negativamente a capacidade de transporte de elétrons na rota do citocromo mitocondrial em poucas horas, o que pode estar associado à formação de espécies reativas de oxigênio e aumento do estresse oxidativo.

3.7. Aldeído malônico

Os produtos da peroxidação de lipídeos de membrana, expressa como concentração de aldeído malônico nos tecidos de banana minimamente processada, foram afetados significativamente pelos fatores tratamento e tempo de conservação

(Figura 8). O tratamento contendo antioxidantes elevou a concentração de aldeído malônico nos tecidos, desde o processamento mínimo, de modo significativamente superior aos demais tratamentos.

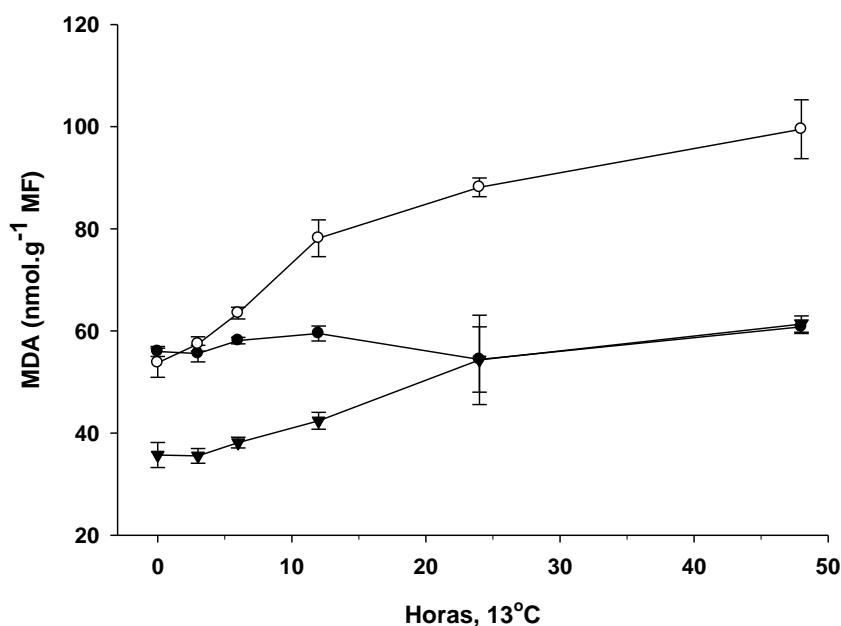


Figura 8 – Concentração de aldeído malônico (MDA) em banana ‘Prata’ inteira (▼), ou minimamente processada e imersa em água destilada (●), ou em solução contendo ácido ascórbico 1% (p/v) + cloreto de cálcio 1% (p/v) + cloridrato de L-cisteína 1% (p/v) (○), conservada a 13 °C, durante 48 h. As barras representam o desvio-padrão da média.

A formação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é característica do estágio terminal da peroxidação de lipídeos, e indica o colapso de lipídeos peroxidados na membrana. Considerando-se que não houve diferença significativa na atividade da enzima SOD, responsável pela formação de peróxido de hidrogênio, uma menor atividade de catalase verificada nas fatias imersas em antioxidantes pode ter contribuído para a manutenção de níveis mais elevados de peróxido de hidrogênio nos tecidos. Essa espécie reativa de oxigênio pode aumentar a peroxidação lipídica, o que foi refletido em maior conteúdo de MDA (Figura 8).

As rodela de banana minimamente processadas mostraram pouca variação na concentração de MDA, enquanto aquelas que não foram processadas exibiram aumento durante todo o período de conservação refrigerada. Esse aumento pode estar relacionado à intensa degradação das rodela que, possivelmente, aconteceu logo após sofrerem injúria mecânica, uma vez que a banana é um fruto altamente perecível.

O aumento no conteúdo de MDA nas bananas inteiras pode ser devido ao processo de maturação natural do fruto, ou mesmo de aceleração da senescência, uma vez que os frutos utilizados no experimento encontravam-se próximo ao final da maturação, pela coloração da casca. De modo semelhante, Larrigaudière et al. (2008), que observaram um aumento significativo no conteúdo de MDA e de H_2O_2 nas primeiras 24 h após o processamento mínimo de maçãs tratadas com solução contendo ácido ascórbico e N-acetilcisteína à concentração de 1% de cada.

Uma maior concentração de MDA observada nas fatias sob tratamento de imersão constitui indicativo de danos nas membranas causados por excesso de H_2O_2 , uma vez que a atividade da catalase foi inibida nos tecidos que receberam tratamento com substâncias preservativas. O resultado observado parece estar relacionado a um efeito pró-oxidativo dos componentes da mistura anti-escurecimento, indicando a necessidade de se avaliar, separadamente, o efeito desses compostos sobre o estresse oxidativo na polpa de banana minimamente processada.

4. CONCLUSÕES

O potencial antioxidante do tecido da polpa de banana 'Prata' reduziu-se durante dois dias de conservação a 13 °C, independentemente do processamento mínimo. No entanto, o processamento mínimo intensifica a redução na concentração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante.

A imersão de banana minimamente processada em solução anti-escurecimento é capaz de inibir a redução na concentração de compostos fenólicos e da atividade antioxidante de banana minimamente processada durante a conservação à temperatura de 13 °C.

O tratamento de banana minimamente processada por imersão em mistura de ácido ascórbico, cloreto de cálcio e cisteína promoveu aumento na peroxidação de lipídeos, indicado pela maior concentração de aldeído malônico e menor atividade da catalase.

Necessita-se estudar o efeito isolado dos tratamentos químicos sobre o conteúdo de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, bem como os mecanismos de defesa relacionados à peroxidação de lipídeos em membranas do tecido da polpa de banana minimamente processada.

5. REFERÊNCIAS

- Alscher, R. G.; Erturk, N.; Heath, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n.372, p.1331-1341, 2002.
- Bico, S. L. S.; Raposo, M. F. J.; Morais, R. M. S. C.; Morais, A. M. M. B. Combined effects of chemical dip and/or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh-cut banana. **Food Control**, v.20, n.5, p.508-514, May 2009.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.
- Buera, M. P.; Lozano, R. D.; Petriella, C. Definition of colour in the non enzymatic browning process. **Die Farbe**, v.32/33, p.318-322, 1986.
- Diniz, L. T. **Respostas da banana ‘Prata anã’ minimamente processada e conservada em solução de sacarose com polpa de maracujá**. 2009. 57p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Ferreira, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.
- Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59, 309-314, 1977.
- Gorny, J. R.; Hess-Pierce, B.; Cifuentes, R. A.; Kader, A. A. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by controlled atmospheres and chemical preservatives. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p.271-278, 2002.
- Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, July 1996.
- Hodges, M. Overview: oxidative stress and postharvest produce. In: Hodges, D. M. (Ed.). **Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops**, New York: Food Products Press, p.1-14, 2003.

Ke, D.; Saltveit, M. E. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.412-418, 1989.

Kays, S. J. Stress in harvested products. In S. J. Kays (Ed.). **Postharvest physiology of perishable plant products**. 1997, Athens: Exon Press, p. 335-407.

Larrigaudière, C.; Ubach, D.; Soria, Y.; Rojas-Graü, M. A.; Martín-Belloso, O. Oxidative behaviour of fresh-cut 'Fuji' apples treated with stabilising substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.1170-1176, 2008.

Lemoine, M. L.; Chaves, A. R.; Martínez, G. A. Influence of combined hot air and UV-C treatment on the antioxidant system of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.43, n.9, p.1313-1319, nov.2010.

Lim, Y. Y.; Quah, E. P. L. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. **Food Chemistry**, v.103, n.3, p.734-740, 2007.

Martin-Diana, A. B.; Rico, D.; Frias, J.; Mulcahy, J.; Henehan, G. T. M.; Barry-Ryan, C. Whey permeate as a bio-preservative for shelf life maintenance of fresh-cut vegetables. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.7, p.112-123, 2006.

McEvily, A. J.; Iyengar, R.; Otwell, S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.32, n.3, p.253-273, 1992.

Melo, A. A. M.; Vilas Boas, E. V. de B.; Justo, C. F. Uso de aditivos químicos para a conservação pós-colheita de banana "Maçã" minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.1, p.228-236, jan/fev. 2009.

Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n.9, p.405-410, 2002.

Moline, H. E.; Buta, J.G.; Newman, I. M. Prevention of browning of banana slices using natural products and their derivatives. **Journal of Food Quality**, v. 22, p.499-511, 1999.

Murata, M.; Tsurutani, M.; Hagiwara, S.; Homma, S. Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.61, n.9, p.1495-1499, 1997.

- Palou, E.; López-Malo, A.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Welti-Chanes, J.; Swanson, B. G. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. **Journal of Food Science**, v.64, p.42-45, 1999.
- Poovaiah, B. W. Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.10, n. 1, p.86-89, Jan. 1986.
- Proteggente, A. R.; Pannala, A. S.; Paganga, G.; Van Buren, L.; Wagner, E.; Wiseman, S.; Van de Put, F.; Dacombe, C.; Rice-Evans, C.A. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radical Research**, v.36, n.2, p.217-233, Feb. 2002.
- Reyes, L. F.; Cisneros-Zevallos, L. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.18, p.5296-5300, 2003.
- Reyes L. F.; Villarreal, J. E.; Cisneros-Zevallos, L. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. **Food Chemistry**, v.101, n.3, p.1254-1262, 2007.
- Richard, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J.; Lacombe, J-M; Paiva, A.A. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39 n. 5, p. 841-847, 1991.
- Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning: 2. Kinetic studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 11, p. 2108-2113, 1992.
- Rolle, R. S.; Chism III, G. W. Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, v.10, n.3, p.157-177, 1987.
- Sapers, G.M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. **Food Technology**, v.47, n.10, p.75-84, 1993.
- Soliva-Fortuny, R. C.; Martin-Belloso, O. New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A Review. **Trends in Food Science and Technology**, v.14, n.9, 341-353, 2003.

Swain, T.; Hillis, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, n.63-68, 1959.

Toivonen, P. M. A. Postharvest storage procedures and oxidative stress. **Hortscience**, v.39, n.5, p.938-942, 2004.

Vanlerberghe, G.; Robson, C.; Yip, J. Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. **Plant Physiology**, v.129, p.1829-1842, 2002.

Vilas Boas, E. V. de B.; Kader, A. A. Effect of atmospheric modification, 1-MCP and chemicals on quality of fresh-cut banana. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, n.2, p.155-162, Feb. 2006.

Von Loesecke, H. W. **“Bananas”: Chemistry, Physiology, Technology**. 2nd Review. New York: Interscience Publishers. Inc, 1950, 189p.

Waite, J. H. Calculating extinction coefficients for enzymatically produced *o*-quinones. **Analytical Biochemistry**, v.75, n.1, p.211-218, 1976.

Zhang, J.; Huang, W.; Pan, Q.; Liu, Y. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment. **Postharvest Biology and Technology**, v.38, n.1, p.80-90, 2005.

CAPÍTULO 3

AÇÃO DA BANANA MINIMAMENTE PROCESSADA SUBMETIDA A TRATAMENTO ANTI-ESCURECIMENTO NA EVOLUÇÃO DE LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS APO-E-/-

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose, uma das principais doenças vasculares causadora de mortes no mundo ocidental, caracteriza-se pelo comprometimento do fluxo sanguíneo em vasos decorrente da diminuição da luz vascular (Ishigaki et al., 2008). A origem deste processo celular degenerativo está diretamente relacionada ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio, as quais oxidam lipídios presentes nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) acumuladas no interior de macrófagos, os quais se depositam na camada íntima de artérias e veias (Stocker & Keaney, 2004).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio suplanta os mecanismos de reparo proporcionados pelos antioxidantes naturais e sistemas enzimáticos relacionados (Robards et al., 1999). Desse modo, para controlar o processo de peroxidação lipídica, os organismos utilizam diversos mecanismos. Os sistemas antioxidantes animais são constituídos por compostos como o ácido ascórbico, glutathione reduzida, α -tocoferol, principalmente, e enzimas do ciclo ascorbato-glutathione, tais como superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase e desidroascorbato redutase (Blokina et al., 2003).

A banana é o fruto mais comercializado no mundo, possui alto valor nutricional, além de substâncias potencialmente antioxidantes, como compostos fenólicos, tais como a dopamina (Kanazawa & Sakakibara, 2000) e a galocatequina (Someya et al., 2002). A banana minimamente processada constitui opção nutritiva para compor saladas de frutas, embora o escurecimento das superfícies cortadas seja uma das causas de redução da sua qualidade e tempo de conservação (Vilas Boas & Kader, 2006).

A imersão de banana minimamente processada em misturas de substâncias anti-escurecimento tem sido amplamente empregada na pesquisa para se prolongar seu período e conservação (Melo & Vilas Boas, 2006; Vilas Boas & Kader, 2006). Melo & Vilas Boas (2009) verificaram que a mistura de ácido ascórbico 1% + CaCl_2 1% foi

mais eficiente do que o emprego isolado destes compostos em evitar o escurecimento e prolongar a vida pós-colheita de banana ‘Maçã’ minimamente processada.

O ácido ascórbico, reconhecido por sua ação como substância antioxidante, é um dos principais compostos químicos para o uso em frutas e hortaliças e seus sucos, visando prevenir escurecimento e outras reações oxidativas (Wiley, 1994). O ácido ascórbico, em sua forma reduzida, possui importante papel na prevenção do dano peroxidativo pela neutralização de espécies reativas de oxigênio e pela manutenção do ciclo ascorbato-glutationa, atuando em conjunto com peroxidases para reduzir a concentração intracelular de H_2O_2 , e para manter o *pool* de α -tocoferol reduzido nas membranas lipídicas (Lurie, 2003).

Alguns estudos *in vitro* conduzidos como bioensaios, e outros *in vivo*, em humanos ou com uso de animais experimentais, têm mostrado o potencial antioxidante de compostos presentes no tecido da polpa da banana. Em humanos, compostos fenólicos extraídos da banana minimizaram o aumento pós-prandial da peroxidação de lipídeos no plasma sanguíneo, e a susceptibilidade à oxidação de LDL, por proteger contra a formação de novos peróxidos no trato digestivo e/ou por contribuir para a capacidade antioxidante no plasma sanguíneo (Yin et al., 2008). Vijayakumar et al. (2008) trabalhando com ratos, observaram decréscimo no conteúdo de produtos da peroxidação de lipídeos em órgãos dos animais tratados com dieta suplementada com extrato bruto de flavonóides de banana.

Estudos do desenvolvimento da aterosclerose *in vivo* exigem modelos animais específicos, que apresentem proximidade com o metabolismo humano, sendo um deles o camundongo Apo-E^{-/-}, deficiente para o gene da apolipoproteína E (Hofker et al., 1998). O uso deste modelo constitui atualmente uma importante ferramenta para ensaios que envolvam tratamentos contra as desordens cardiovasculares, como a aterosclerose.

A banana minimamente processada contendo ácido ascórbico como substância anti-escurecimento pode contribuir para a redução do estresse oxidativo no organismo que a ingere, tendo efeito protetor contra o processo de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação da dieta de camundongos Apo-E^{-/-} com banana minimamente processada imersa em solução contendo ácido ascórbico e cloreto de cálcio e conservada por quatro dias, como um modelo de estudo de sua funcionalidade, pela sua ação sobre o estresse oxidativo e no desenvolvimento da aterosclerose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e processamento mínimo

Os frutos de banana da cultivar Prata-anã utilizados no experimento foram provenientes da região Norte do Estado de Minas Gerais, e obtidos no mercado local de Viçosa-MG, selecionados segundo tamanho e ausência de defeitos e homogeneidade de cor da casca. Quanto à cor da casca, foram selecionados frutos com “grau de coloração 6” (totalmente amarela), segundo Von Loesecke (1950).

A banana fornecida aos animais foi minimamente processada diariamente na Unidade de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa. Os frutos foram lavados em solução de água e sabão neutro, mergulhados em solução sanitizante contendo 400 mg.L⁻¹ de cloro ativo por 10 minutos. Em seguida, foram descascados e fatiados em rodela de cerca de 1 cm de largura, e imediatamente imersos durante 4 minutos em: água destilada ou solução contendo ácido ascórbico 1% (p/v) + CaCl₂ 1% (p/v). Após a imersão, o excesso de solução foi drenado por 1 minuto, e as rodela embaladas em bandejas de polietileno tereftalato (PET) envoltas por três camadas de filme de PVC de 12 µm. A banana minimamente processada foi fornecida aos animais no período noturno, entre 19:00 e 20:00, logo após o processamento (0 d) e após 4 dias de conservação a 5 °C (4 d).

2.2. Animais e dietas

O modelo animal escolhido para esse estudo foi o camundongo Apo-E^{-/-}, que é deficiente no gene para a apolipoproteína E (Apo-E^{-/-}), alteração que confere susceptibilidade ao desenvolvimento de aterosclerose. Animais machos (n = 28, com peso inicial de 26,71 ± 3,12 g) e fêmeas (n = 10, com peso inicial de 20,75 ± 1,94 g) com 14 semanas e meia de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, foram separados em cinco diferentes grupos: Controle (n = 8) – recebendo apenas dieta normal e água; Banana H₂O 0 d (n = 8) – recebendo rodela de banana imersas em água, minimamente processadas no mesmo dia; Banana H₂O 4 d (n = 8) – recebendo rodela imersas em água, conservadas a 5 °C durante 4 dias; Banana AC 0 d (n = 7) – recebendo rodela

imersas em solução de ácido ascórbico 1% (p/v) + CaCl₂ 1% (p/v), fornecidas no mesmo dia do processamento mínimo; Banana AC 4 d (n = 7) – recebendo rodela imersas em solução de ácido ascórbico 1% (p/v) + CaCl₂ 1% (p/v), conservadas a 5 °C durante 4 dias. Todos os animais do experimento foram alimentados com dieta normal, constituída por ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos às dietas durante 10 semanas. O peso dos animais foi acompanhado semanalmente, e a quantidade de banana minimamente processada ingerida avaliada diariamente.

2.3. Coleta dos tecidos

Para a eutanásia e coleta dos tecidos, os animais foram submetidos a jejum prévio por 12 horas. O sangue foi removido por punção na aorta abdominal e imediatamente centrifugado a 870 g por 10 minutos a 4 °C. Fígado e rim, coletados durante a eutanásia, foram lavados em tampão fosfato de sódio, 10 mM, pH 7,0. O soro, o fígado e o rim coletados foram armazenados a -80 °C para posteriores análises. O coração e a aorta (retirada até a porção torácica descendente) foram perfundidos com tampão fosfato de sódio, fixados em solução de paraformaldeído e mantidos a temperatura ambiente até o momento das análises.

2.4. Avaliação da deposição lipídica das aortas

A deposição lipídica foi determinada na artéria aorta na porção torácica, abdominal e no arco aórtico, utilizando a análise *en face* pela coloração Sudan IV (Palinski, 1994). No momento da eutanásia, o coração foi perfundido com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4 para limpeza da aorta. Em seguida, as aortas foram fixadas em solução de paraformaldeído e armazenadas até posteriores análises.

Antes de se realizar a coloração, as aortas foram dissecadas: o tecido foi retirado da solução de paraformaldeído e colocado sobre placa de Petri contendo tampão fosfato de sódio. Com auxílio de uma lupa (Olympus SZ-4045), pinça e tesoura cirúrgicas, foram retiradas as camadas de tecido adiposo e conjuntivo que envolviam a aorta. Nesse processo, removeu-se ainda a camada adventícia em toda a extensão da artéria, e o vaso foi aberto longitudinalmente.

Após a limpeza e abertura das aortas, estas foram mantidas em solução de formol-sacarose [solução fixadora – 4% de paraformaldeído, 5% de sacarose, 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de hidroxitolueno butilado (BHT), e 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ EDTA, pH 7,4] durante 12 horas, a 4 °C. As aortas fixadas foram transferidas para uma solução de etanol 70%, permanecendo nela durante 5 min. Logo depois, realizou-se a coloração do material com a solução aquosa filtrada de Sudan IV (0,5% de Sudan IV, 35% de etanol, 50% de acetona) durante 10 minutos, sob agitação constante. Para a retirada do excesso de corante, as aortas foram imersas durante 5 minutos em solução de etanol 80%, também sob agitação. Após essa etapa, elas foram novamente coradas com Sudan IV e fotografadas com câmera digital de resolução 8.1 megapixels, com função macro ativada e distância, foco e luminosidade padronizados. Foram selecionadas as fotos de cada amostra com maior nitidez e, em seguida, elas foram analisadas com uso do programa Image-Pro Plus, versão 4.5 (Media Cybernetics – Silver Spring, USA). Após a calibração do software com uma escala métrica padrão aplicada às fotografias, os *pixels* na imagem foram convertidos em mm^2 . A soma dos locais em que houve deposição lipídica (áreas de lesões ateroscleróticas) em relação à área total da aorta foi calculada pelo programa, sendo o resultado expresso em milímetros quadrados.

2.5. Extração e ensaio da catalase

A atividade da enzima catalase foi quantificada no fígado dos animais seguindo protocolo descrito por Aebi (1984), com modificações. Aproximadamente 100 mg do tecido foi macerado em solução de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,0. O homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 3.500 g, a 4°C, em centrífuga de eppendorf (Hermle Labnet Z216 MK). Para determinação da atividade enzimática, adicionaram-se 30 μL do sobrenadante a 3 mL do tampão fosfato de sódio acrescido de H_2O_2 a 0,16%. As leituras de absorvância foram obtidas em espectrofotômetro UV-Visível U-2910 (Hitachi, Tóquio, Japão) a 240 nm. O branco foi composto por 30 μL do sobrenadante e 3 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0. As absorvâncias foram obtidas nos tempos 0 e 60 segundos. A atividade da catalase foi obtida pela redução na absorvância, e expressa em unidades de atividade por mg de proteína.

2.6. Aldeído malônico

O procedimento para extração de aldeído malônico (MDA) seguiu o protocolo para a extração da enzima catalase. A determinação seguiu técnica proposta por Buege & Aust (1978). Uma alíquota de 150 µL de sobrenadante foi acrescentada a 1,5 mL de reagente de T-BARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e ácido clorídrico 0,25 N). Em seguida, a mistura foi homogeneizada por 5 s e a reação ocorreu em banho-maria, a 80 °C, por 15 min. Logo após, os tubos contendo a mistura foram resfriados por cerca de 3 min e centrifugados por 10 min, a 1.120 g. Adicionaram-se 200 µL do sobrenadante em placa de ELISA, e as leituras foram obtidas em leitor de micro-placas (ASYS UVM 340, Biochrom), a 535 nm. O branco continha tampão fosfato de sódio 0,01 M no lugar da amostra. A concentração de MDA foi expressa em nanomoles por mg de proteína, levando-se em consideração o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.7. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi mensurada pela técnica de Brand-Williams et al. (1995), com modificações. Para a extração, pesaram-se 100 mg de fígado, que foi macerado em almofariz e pistilo, com 10 mL de solução de metanol 60%. O macerado foi transferido para frasco Erlenmeyer e agitado por 30 minutos a 180 rpm. Após a agitação, a mistura foi transferida para tubos de ensaio e centrifugada por 10 min em centrífuga marca Quimis modelo Q-222T, a 1.200 g. O sobrenadante resultante foi colocado em vidros âmbar e mantido sob refrigeração, por aproximadamente 14 h até o momento da análise. Para a determinação da atividade antioxidante, acrescentaram-se 1,5 mL de solução metanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) 0,1 mM a tubos de ensaio contendo 100 µL do extrato e agitou-se por 1 minuto. A mistura permaneceu em local escuro por 30 minutos, a temperatura ambiente. A leitura foi obtida em espectrofotômetro UV-Visível U-2910 (Hitachi, Tóquio, Japão), utilizando-se o comprimento de onda de 517 nm. O branco foi constituído por 100 µL de metanol 60% em substituição ao extrato, e o controle continha somente 1,5 mL de solução metanólica de DPPH 0,1 mM. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade de redução do radical DPPH, conforme a equação descrita por Lim & Quah (2007):

$$\% \text{ redução do radical} = (1 - A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100, \text{ em que } A = \text{absorvância.}$$

2.8. Dosagem de proteína

A quantidade de proteína nas amostras utilizadas nas análises de catalase (CAT) e aldeído malônico (MDA) foi mensurada pelo método de Lowry et al. (1951). Para a determinação, os homogenatos preparados para cada uma das análises foi diluído 20 vezes com água destilada. Uma alíquota de 200 µL do homogenato (determinada por meio curva-padrão com albumina de soro bovino - BSA) foi acrescida de 2 mL de solução, contendo CuSO₄ 1,23 mM, tartarato de Na e K 1,39 mM, Na₂CO₃ 277 mM e NaOH 98,0 mM. A mistura foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 200 µL da solução de Folin-Ciocalteu 1 N, homogeneizou-se novamente e deixou-se reagir por mais 10 min. As leituras foram obtidas em leitor de micro-placas (ASYS UVM 340, Biochrom) a 700 nm.

2.9. Análise estatística

Em todas as análises foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Quando a distribuição dos dados apresentou distribuição 'normal', realizou-se o teste ANOVA *one way* complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. Foi admitido um nível de significância de 5%. O software utilizado para as análises foi o SigmaPlot versão 11.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Área da lesão aterosclerótica aórtica

A análise das aortas revelou que os animais que não receberam banana na dieta, assim como aqueles que receberam banana tratada com solução antioxidante no mesmo dia do fornecimento (Banana AC 0 d) apresentaram maior área de tecido lesionado (Figuras 1 e 2). Os animais dos grupos que receberam banana imersa em água, fornecida logo após o processamento mínimo (Banana H₂O 0 d) apresentaram menor área lesionada em relação aos tratamentos contendo antioxidante e àqueles com dieta sem suplementação (Controle).

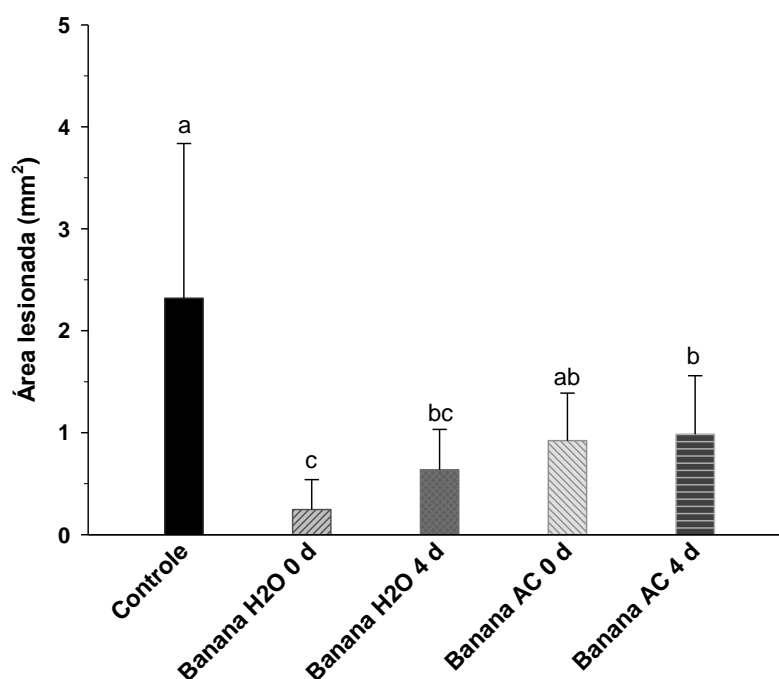


Figura 1 – Área lesionada por deposição lipídica em aortas de camundongos alimentados com dieta normal (Controle) ou suplementada com banana minimamente processada imersa em água destilada e fornecida recém-processada (Banana H₂O 0 d) ou após quatro dias de conservação a 5 °C (Banana H₂O 4 d), e imersa em solução de ácido ascórbico 1% (p/v) + CaCl₂ 1% (p/v), processadas no mesmo dia (Banana AC 0 d), ou conservadas por quatro dias (Banana AC 4 d). Letras distintas representam diferença significativa a p<0,05.

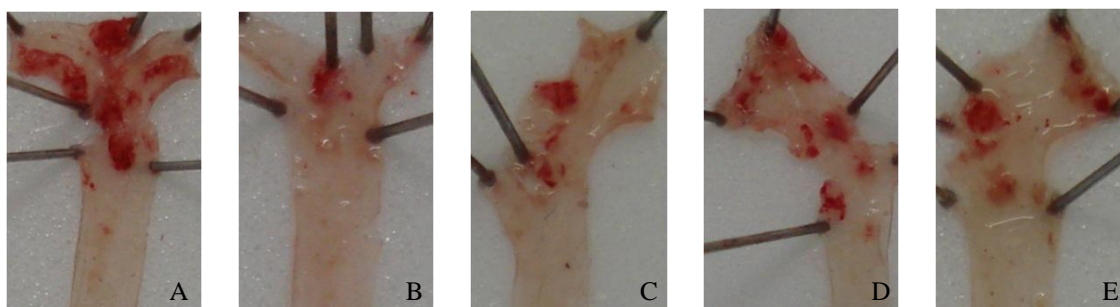


Figura 2 – Fotografia das aortas de camundongos lesionadas por deposição lipídica. Animais alimentados com dieta normal (A), ou suplementada com banana minimamente processada imersa em água destilada e fornecida recém-processada (B), ou após quatro dias de conservação a 5 °C (C); imersa em ácido ascórbico 1% (p/v) + CaCl₂ 1% (p/v), processadas no mesmo dia (D), ou conservadas por 4 dias (E).

Passados quatro dias do processamento mínimo, a banana apresentou escurecimento superficial, o que é um indício de processo de degradação oxidativa de compostos fenólicos. Apesar disso, os animais dos grupos Banana H₂O 4 d e Banana AC 4 d apresentaram uma área total de lesão significativamente menor em relação a o grupo Controle, que foi alimentado somente com ração comercial. Isso pode indicar que a banana minimamente processada, mesmo após quatro dias de conservação refrigerada, pode ter efeito benéfico na redução no desenvolvimento da lesão aterosclerótica. A lesão é formada por lipídios, radicais livres, enzimas e/ou produtos liberados pelas células do sistema imune (Lusis, 2000); os metabólitos resultantes do processo oxidativo na banana provavelmente não alteram negativamente esse metabolismo. Além disso, o escurecimento parece ser um processo eminentemente superficial. Desse modo, os compostos protetores, como fenóis e vitamina C em suas formas reduzidas podem ter sido preservados no interior da banana.

É possível inferir que a banana, mesmo sem o tratamento com ácido ascórbico, por ser um fruto rico em antioxidantes como vitamina C e E, β -caroteno e, principalmente, compostos polifenólicos como os flavonóides (Someya et al., 2002), pode contribuir para evitar a formação e desenvolvimento de placas ateroscleróticas.

De maneira geral, os flavonóides possuem estrutura química adequada para o sequestro de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, constituindo-se antioxidantes altamente efetivos por exibir potenciais de redução da ordem de 590 a 700 mV, enquanto várias espécies reativas de oxigênio apresentam potenciais de 1900 mV

(radical hidroxil) a 940 mV (ânion superóxido) (Lin et al., 1998). Os compostos fenólicos podem agir por vários mecanismos: seqüestro de radicais livres, doação de elétrons, dissipação do oxigênio singleto, quelatação de íons metálicos, ou como substratos para o ataque de superóxidos (Halliwell, 1996; Robards et al., 1999).

3.2. Aldeído malônico

A análise da concentração de aldeído malônico (MDA) no fígado dos camundongos Apo-E revelou que houve elevada peroxidação lipídica (0,013 nmoles/mg de proteína) nos animais que receberam dieta suplementada com banana minimamente processada imersa em solução anti-escurecimento no mesmo dia do fornecimento (Banana AC 0 d) (Figura 3).

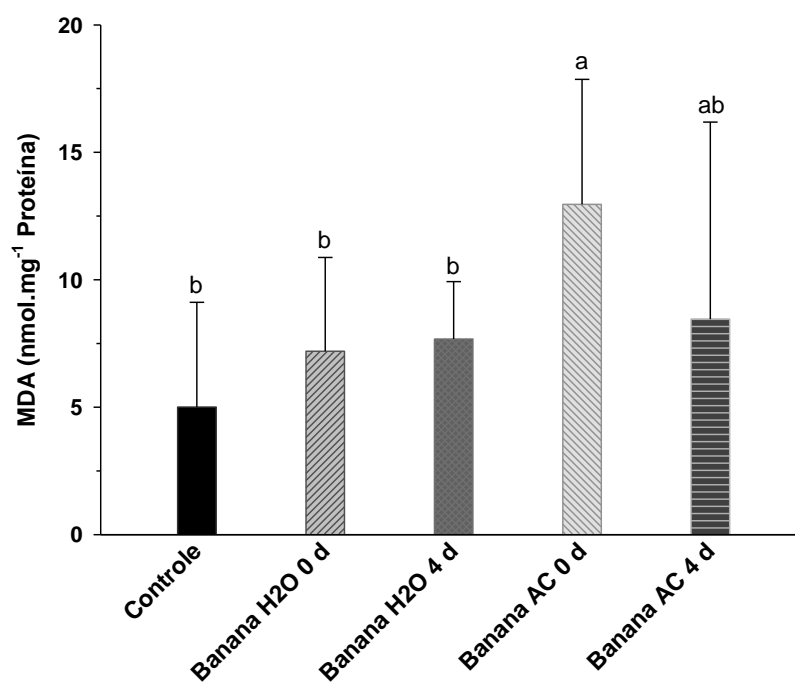


Figura 3 - Concentração de aldeído malônico (MDA) no tecido hepático de camundongos alimentados com dieta normal (Controle), ou suplementada com banana minimamente processada imersa em água destilada e fornecida recém-processada (Banana H₂O 0 d) ou após quatro dias de conservação a 5 °C (Banana H₂O 4 d), e imersa em solução de ácido ascórbico 1% (p/v) + CaCl₂ 1% (p/v), processadas no mesmo dia (Banana AC 0 d), ou conservadas por quatro dias (Banana AC 4 d). Letras distintas representam diferença significativa a p<0,05.

A concentração de MDA no tecido hepático dos animais desse tratamento foi significativamente maior em comparação aos tratamentos que não receberam imersão em antioxidantes. Esse fato pode ser devido à concentração utilizada de ácido ascórbico para retardar o escurecimento da banana. Possivelmente a concentração de vitamina C, absorvida pelos tecidos da banana excedeu a recomendação desse micronutriente para que ele tivesse atuação como antioxidante nos camundongos, apresentando efeito pró-oxidativo, o que explica a maior peroxidação lipídica no tecido hepático.

Nesse sentido, no tecido animal, Horsley et al. (2007) propõem que a atividade pró-oxidante do desidroascorbato sobre a LDL é devida à sua conhecida interconversão espontânea para eritroascorbato e ascorbato, que reduzem Cu^{2+} a Cu^+ e, assim, promovem a decomposição de hidroperóxidos lipídicos. Além disso, estudos *in vitro*, como o de Cai et al. (2001), indicam que, na presença de ferro em grandes quantidades, a atividade pró-oxidante da vitamina C seria devida à sua participação na redução do Fe^{+3} a Fe^{+2} , pela reação de Fenton, produzindo radicais hidroxil (OH^\bullet), que aumentariam o estresse oxidativo.

Os animais que não receberam banana imersa em antioxidantes, não diferiram significativamente quanto à concentração média de MDA nos tecidos hepáticos, em relação àqueles que receberam banana tratada com ácido ascórbico e CaCl_2 e conservada sob refrigeração por quatro dias. Apesar disto, as médias foram menores, indicando que o efeito do ácido ascórbico pode ser transitório, não apenas no tecido vegetal (que se mostrou mais escurecido após 4 dias de conservação) como no tecido animal, onde não diminuiu a peroxidação lipídica. O ácido ascórbico, apesar de ser um eficiente antioxidante, possui efeito transitório, uma vez que esse pode rapidamente ser oxidado a ácido desidroascórbico, perdendo sua função protetora (Sapers, 1993).

3.3. Atividade da catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) no tecido hepático de camundongos foi afetada significativamente ($p > 0,05$) pelo tratamento de imersão e pelo tempo de conservação da banana minimamente processada (Figura 4).

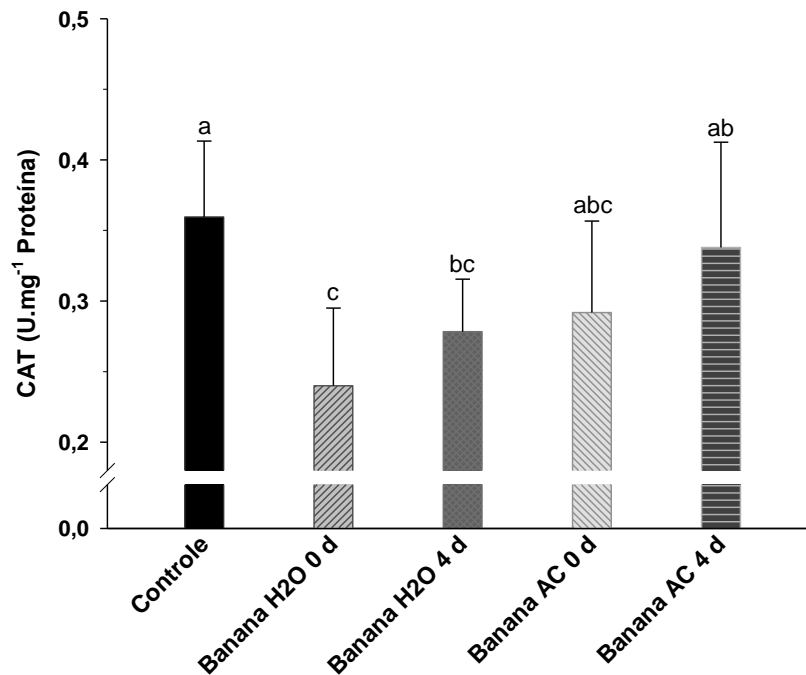


Figura 4 – Atividade da catalase (CAT) no tecido hepático de camundongos alimentados com dieta normal (Controle) ou suplementada com banana minimamente processada imersa em água destilada e fornecida recém-processada (Banana H₂O 0 d) ou após quatro dias de conservação a 5 °C (Banana H₂O 4 d), e imersa em solução de ácido ascórbico 1% (p/v) + CaCl₂ 1% (p/v), processadas no mesmo dia (Banana AC 0 d) ou conservadas por quatro dias (Banana AC 4 d). Letras distintas representam diferença significativa a p<0,05.

Os tecidos dos animais tratados com rodela de banana imersa em água (Banana H₂O 0 d e 4 d) exibiram menor atividade da catalase em relação aos tecidos de animais que não receberam banana na dieta. Esses resultados são diferentes daqueles verificados por Vijayakumar et al. (2008) em fígado de ratos alimentados com dieta suplementada com flavonóides extraídos de banana. Os autores mencionados observaram que a inclusão de flavonóides de banana na dieta dos animais causou aumento na atividade da enzima hepática, e atribuíram o resultado à maior atividade de redução do H₂O₂, com desintoxicação de células e diminuição da peroxidação e concentração de dienos conjugados no tecido. Neste trabalho, verificou-se que a suplementação da dieta com banana diminuiu a atividade da catalase, provavelmente por ter reduzido o estresse oxidativo e a formação de espécies reativas de oxigênio, incluindo o peróxido de

hidrogênio, por meio da ação antioxidante dos compostos fenólicos do tecido da banana.

A atividade da catalase pode ser comparada à área do tecido lesionado. As artérias dos animais com maior área de tecido lesionada (Controle) foram também os que manifestaram maior atividade da catalase, indicando que a banana minimamente processada pode ter efeito na redução do estresse oxidativo e no consequente aumento da lesão aterosclerótica.

Quanto ao sistema antioxidante do organismo mediado por enzimas, não se verificou diferenças significativas na atividade da enzima catalase entre os grupos. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de a lesão se encontrar em fase inicial de desenvolvimento, não sendo ainda suficiente para detectar alteração da atividade dessa enzima no fígado dos animais. O processo inflamatório é exacerbado à medida que o animal fica mais velho (Lusis, 2000).

3.4. Atividade antioxidante

A análise da atividade antioxidante no tecido hepático revelou que o percentual de redução do radical DPPH apresentado pelos animais do grupo que recebeu banana imersa em mistura anti-escurecimento logo após o processamento mínimo (Banana AC 0 d) foi significativamente inferior ($6,5 \pm 0,5\%$) aos observados nos grupos Banana AC 4 d (imersa em anti-escurecimento fornecida após quatro dias de conservação), Controle e Banana H₂O 0 d (Figura 5).

Os resultados mostram que a solução anti-escurecimento contendo ácido ascórbico e cloreto de cálcio à concentração de 1% (p/v) de cada, pode ter determinado maior estresse oxidativo, com ação pró-oxidante nos tecidos dos camundongos. Esse resultado está coerente com o anteriormente apresentado para o aldeído malônico, que indica ação peroxidativa do tratamento com ácido ascórbico.

Segundo Bianchi & Antunes (1999), a importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter-se proteção. Assim, um antioxidante poderia atuar protegendo determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos. Além disso, doses que excedam a necessidade diária de vitamina C em um determinado organismo podem causar efeitos adversos, pois existem

muitos componentes orgânicos e inorgânicos nas células que podem modular a atividade da vitamina C, afetando sua ação antioxidante.

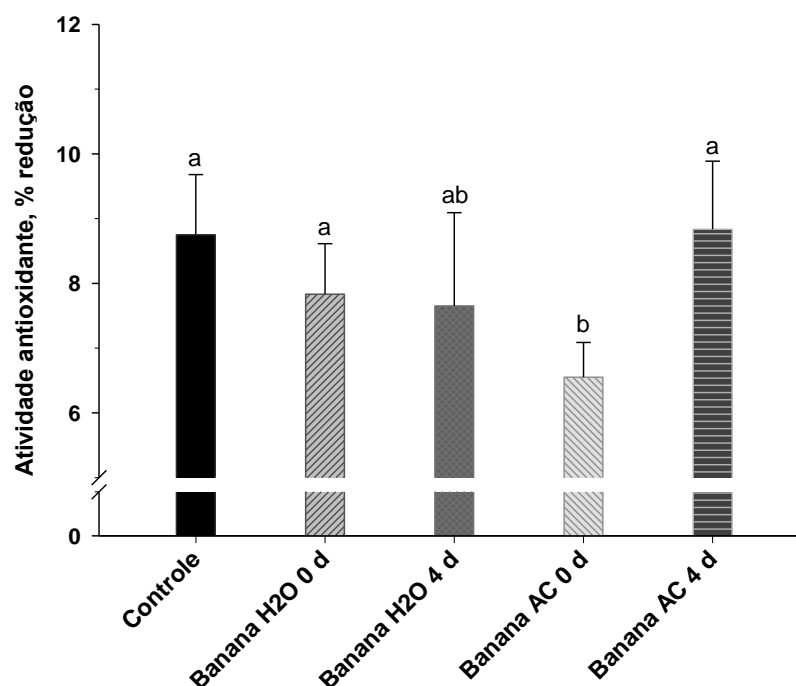


Figura 5 - Atividade antioxidante no tecido hepático de camundongos alimentados com dieta normal (Controle) ou suplementada com banana minimamente processada imersa em água destilada e fornecida recém-processada (Banana H₂O 0 d), ou após quatro dias de conservação a 5 °C (Banana H₂O 4 d), e imersa em solução de ácido ascórbico 1% (p/v) + CaCl₂ 1% (p/v), processadas no mesmo dia (Banana AC 0 d), ou conservadas por quatro dias (Banana AC 4 d). Letras distintas representam diferença significativa a $p < 0,05$.

Os resultados observados neste trabalho permitem inferir que o tratamento por imersão em ácido ascórbico a 1% pode ser o fator determinante para um maior estresse oxidativo no tecido de frutos minimamente processados. Larrigaudière et al. (2008) relatam que o tratamento de maçã minimamente processada com ácido ascórbico, por imersão, mostrou efeito pró-oxidativo, com aumento de atividades de enzimas como a catalase e na concentração de peróxido de hidrogênio nos tecidos. O estresse oxidativo manifestado no fruto em decorrência do tratamento químico poderia ser também manifestado nos tecidos de animais que dele se alimenta.

Novos estudos são necessários para se obter mais informações sobre a funcionalidade que produtos minimamente processados podem vir a desempenhar sobre a saúde animal e humana, por meio da avaliação da atividade de outras enzimas e compostos antioxidantes envolvidos no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo.

4. CONCLUSÕES

Observou-se, no presente estudo, que a banana apenas minimamente processada e não tratada com ácido ascórbico apresentou influência positiva sobre o retardamento do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos Apo-E^{-/-}.

A suplementação da dieta de camundongos Apo-E^{-/-} com banana minimamente processada imersa em solução de ácido ascórbico e cloreto de cálcio durante o processamento mínimo agravou o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas nas artérias destes animais.

O tratamento por imersão da banana não produziu o efeito esperado de redução do estresse oxidativo, uma vez que a suplementação alimentar de camundongos com banana minimamente processada, tratada com substâncias antioxidantes no mesmo dia, causou maior peroxidação lipídica, com reflexo negativo na capacidade antioxidante.

5. REFERÊNCIAS

- Aebi, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- Bianchi, M. de L. P.; Antunes, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.
- Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p.302-310, 1978.
- Cai, L.; Koropatnick, J.; Cherian, M. G. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA-damage in presence and absence of copper. **Chemico-Biological Interactions**, v.137, p.75-88, 2001.
- Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, 1996.
- Hofker, M. H.; Van Vlijmen, B. J. M.; Havekers, L. M.; Transgenic models to study the role of ApoE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.137, n.1, p.1-11, 1998.
- Horsley, E. T.; Burkitt, M. J.; Jones, C. M.; Patterson, R. A.; Harris, L. K.; Moss, N. J.; Del-Rio, J. D.; Leake, D. S. Mechanism of the antioxidant to pro-oxidant switch in the behavior of dehydroascorbate during LDL oxidation by copper(II) ions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.465, n.2, p.303-314, 2007.
- Ishigaki, Y. et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. **Circulation**, v.118, n.1, p.75-83, 2008.
- Kanazawa, K.; Sakakibara, H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.3, p.844-848, 2000.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p.265-75, 1951.

Lim, Y. Y.; Quah, E. P. L. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. **Food Chemistry**, v.103, n.3, p.734-740, 2007.

Lin, W. Z.; Navaratnam, S.; Yao, S. D.; Lin, N. Y. Anti-oxidative properties of hydroxycinnamic acid derivatives and a phenylpropanoid glycoside – a pulse radiolysis study. **Radiation Physics and Chemistry**, v.53, p.425-430, 1998.

Lurie, S. Antioxidants. In: Hodges, D. M. (Ed.). **Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops**, New York: Food Products Press, 2003, p.131-144.

Lusis, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v.407, n. 6801, p.233-241, 2000.

Media Cybernetics. **Image-Pro Plus - application notes**. Silver Spring: Media Cybernetics; 2002. Disponível em: URL:<<http://www.mediacy.com>> acesso em 21-mai-2009.

Melo, A. A. M.; Vilas Boas, E. V. de B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.110-115, 2006.

Melo, A. A. M.; Vilas Boas, E. V. de B.; Justo, C. F. Uso de aditivos químicos para a conservação pós-colheita de banana ‘Maçã’ minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.1, p.228-236, 2009.

Palinski, W.; Ord, V. A.; Plump, A. S.; Breslow, J. L.; Steinberg, D.; Witztum, J. L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v.14, n.4, p.605-616, 1994.

Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v.66, n.4, p.401-436, 1999.

Stocker, R.; Keaney J. F. Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v.84, p.1381-1478, 2004.

Someya, S.; Yoshiki, Y.; Okubo, K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). **Food Chemistry**, v.79, n.3, p.351-354, 2002.

Vijayakumar, S.; Presannakumar, G.; Vijayalakshmi, N. R. Antioxidant activity of banana flavonoids. **Fitoterapia**, v.79, n.4, p.279-282, 2008.

Vilas Boas, E. V. de B.; Kader, A. A. Effect of atmospheric modification, 1-MCP and chemicals on quality of fresh-cut banana. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, n.2, p.155-162, 2006.

Von Loesecke, H. W. **“Bananas”: Chemistry, Physiology, Technology**. 2nd Review. New York: Interscience Publishers. Inc, 1950, 189p.

Wiley, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. London: Chapman & Hall, 1994. 357p.

Yin, X, Jishu Quan, J.; Kanazawa, T. Banana prevents plasma oxidative stress in healthy individuals. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.63, n.2, p.71-76, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

O processamento mínimo de banana foi determinante para a diminuição da concentração de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante no tecido da polpa, variáveis ligadas ao seu potencial como alimento funcional.

O estresse oxidativo proporcionado pelo processamento mínimo foi agravado pela adição de mistura química contendo cisteína, que determinou maior peroxidação de lipídeos de membranas.

Os tratamentos contendo cisteína, e sem controle do pH, apesar de elevarem o estresse oxidativo do tecido, diminuíram a atividade da polifenoloxidase e mantiveram a coloração original das fatias, sendo indicados para o tratamento de banana minimamente processada, em detrimento daqueles em que se utilizou pH neutro ou com a substituição do aminoácido por ácido cítrico.

O tratamento de imersão em solução contendo ácido ascórbico e cloreto de cálcio em rodela de banana, durante o processamento mínimo, não teve o efeito esperado de redução do estresse oxidativo. Os resultados indicaram que a suplementação da dieta de camundongos Apo-E^{-/-} com banana minimamente processada tratada aumentaram o processo de peroxidação lipídica, e diminuíram a capacidade antioxidante nos tecidos do fígado.

O consumo de banana minimamente processada diminuiu a área de lesões ateroscleróticas em artérias de camundongos Apo-E^{-/-}. Os efeitos benéficos da banana minimamente processada podem ser atribuídos apenas aos compostos antioxidantes inerentes ao tecido da banana, como os compostos fenólicos.

Novos estudos devem ser feitos para que se possam obter mais informações sobre a funcionalidade que produtos minimamente processados e tratados com antioxidantes podem vir desempenhar sobre a saúde dos consumidores, sobretudo com vistas a adequar a relação entre a concentração aplicada na solução de imersão e à necessidade dietária dos indivíduos.