

COMPOSTOS DE MAILLARD E PERFIL DE AMINOÁCIDOS DA PÊRA PASSA DE VISEU

Pedro RT Cunha^{1,2}; Raquel Guiné², Manuel A Coimbra¹

¹*QOPNA/Departamento de Química, Universidade de Aveiro (mac@ua.pt)*

²*CI&DETS/Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu (raquelguine@esav.ipv.pt)*

Resumo

A pêra de S. Bartolomeu (*Pyrus communis* L.) é um produto tradicional secado ao ar livre, de cor castanho-avermelhada e com propriedades elásticas únicas. Para desenvolver uma metodologia capaz de substituir a secagem solar tradicional sem que as suas propriedades organolépticas sejam alteradas, estão em fase de desenvolvimento metodologias alternativas como a utilização de estufas solares ou um túnel de ar quente.

É possível que os compostos castanhos formados por reacções entre aminoácidos e açúcares (reacções de Maillard) possam contribuir para a cor deste produto. Para avaliar esta hipótese, foram analisados os perfis de aminoácidos livres e de aminoácidos constituintes das proteínas em peras frescas e em peras provenientes de diferentes metodologias de secagem em duas colheitas, assim como foi quantificada a ocorrência de furosina, carboximetil-lisina (CML) e carboxietil-lisina (CEL), compostos diagnóstico da ocorrência de reacções de Maillard.

A secagem tradicional causou uma diminuição para cerca de metade do conteúdo de aminoácidos livres. A Pro foi o aminoácido livre detectado em maior quantidade nas peras secadas, contrastando com a quantidade elevada de Asx detectada nas peras frescas. Em relação aos aminoácidos das proteínas, não foram observadas modificações com a secagem.

Todos os tipos de peras secadas apresentaram furosina, CML e CEL. Os níveis mais elevados foram detectados para as peras secadas tradicionalmente, enquanto as peras secadas no túnel de ar quente, que não possuíam cor castanho-avermelhada, apresentaram os valores inferiores. Os valores detectados são semelhantes aos descritos para alimentos processados termicamente de forma moderada, como o leite UHT e carnes e peixes cozinhados. A secagem da pêra de S. Bartolomeu promove a ocorrência de reacções de Maillard características de produtos processados termicamente que podem contribuir para a coloração característica do produto.

1. INTRODUÇÃO

A Pêra Passa de Viseu é um produto tradicional secado ao ar livre, de coloração castanho-avermelhada e propriedades elásticas únicas. Para substituir a secagem tradicional sem que as propriedades organolépticas sejam alteradas foram desenvolvidas duas estufas solares e um túnel de ar quente. Contudo verificou-se que a coloração do produto secado em túnel (coloração acastanhada/creme) era diferente da dos restantes produtos secados. De maneira a estudar as diferenças verificadas na coloração do produto secado em túnel em relação aos restantes foi realizado o estudo do desenvolvimento da coloração característica. Deste estudo surgiu a hipótese de que durante o processo de secagem tradicional ocorrem reacções de acastanhamento não enzimático como as reacções de Maillard, descritas já largamente como resultado de reacções entre os açúcares e os aminoácidos a pH alcalino (ainda que já se tenham verificado estas reacções a pH neutro) e a temperaturas altas.

Durante o processo de secagem tradicional existe um passo intermédio, designado por embarrelamento, que consiste em remover os frutos da exposição solar à hora de maior calor,

colocá-los em cestos e de seguida “abafar” os frutos com recurso a mantas. Este passo intermédio poderá ser decisivo na ocorrência deste tipo de reacções uma vez que promove o surgimento de temperaturas e humidades relativamente altas durante o tempo suficiente para promover mudanças na coloração.

Assim sendo, foi aplicada uma metodologia com vista à detecção e quantificação dos resíduos de furosina, carboximetil-lisina (CEL) e frutossil-lisina (CML), uma vez que estes são descritos na literatura como indicadores da ocorrência de reacções de Maillard. Pretendia-se verificar quais as diferenças nesses teores entre o produto tradicional e os produtos secados pelos diferentes parceiros, de maneira a poder justificar as diferenças verificadas a nível da coloração.

A análise de aminoácidos foi realizada na sequência do estudo da ocorrência de reacções de Maillard, uma vez que a quantificação dos resíduos de CML, de CEL e de furosina foi efectuada relativamente ao teor de lisina presente em cada uma das amostras. Outro objectivo para a realização desta análise foi o de estudar o efeito dos diferentes processos de secagem no perfil de aminoácidos dos frutos secados em relação ao fresco.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Amostragem

As análises descritas foram realizadas usando os frutos frescos, os frutos secados tradicionalmente, secados em duas estufas solares (ESAV e ESTV) e secados num túnel de ar quente (UC). Para a análise de peras fresca, após a colheita, alguns frutos foram congelados. Os frutos restantes foram processados de acordo com as diferentes metodologias em estudo.

No processo tradicional de secagem ao sol, os frutos foram descascados e colocados a secar ao sol durante cerca de 5 dias. Em seguida, os frutos foram colocados à sombra em cestos cobertos com mantas por 2 dias, ao fim dos quais, foram novamente colocados a secar ao sol por mais 2 dias.

Nas secagens usando estufas solares, após descascados, os frutos foram colocados a secar em duas estufas que diferiam no tamanho, estrutura e localização. A estufa solar construída na ESAV encontrava-se ao nível do solo e possuía maior capacidade de carga, mas era tecnologicamente menos avançada. Esta estufa era constituída por painéis de vidro isolante e no seu interior possuía uma estrutura em forma de U, paralela ao chão, onde os frutos foram deixados a secar. O tempo de secagem foi de aproximadamente 7 dias. A estufa solar construída na ESTV encontrava-se ao nível do telhado de um edifício de 2 andares e no seu interior possuía uma estrutura com diferentes patamares revestidos com película reflectora, onde os frutos foram deixados a secar. Esta estrutura permitiu uma maior incidência da luz e conseqüentemente, o tempo de secagem foi reduzido para aproximadamente 5 dias. Para o túnel de ar quente

construído na UC, depois de descascados, os frutos foram deixados a secar numa estrutura pela qual passava um fluxo de ar de temperatura constante. Esta metodologia não usava a incidência directa da radiação solar e prolongou-se por cerca de 7 dias.

Antes da análise, as peras frescas e secas foram trituradas (após a remoção do caroço) e liofilizadas. As peras frescas foram descascadas antes de serem trituradas.

2.2. Análise de aminoácidos

Para um tubo de ensaio com uma tampa de rosca com revestimento de PTFE, foram rigorosamente pesados 10 mg de material liofilizado. Foi adicionado a cada amostra 2 mL de ácido clorídrico (HCl) 6 M, o conteúdo dos tubos foi congelado em azoto líquido e evacuados durante 1 minuto com bomba de vácuo. O vácuo foi desfeito com azoto e as suspensões, após descongelação, foram sonicadas durante 5 minutos num banho de ultra-som e o processo de congelação-vácuo-sonicação foi repetido mais duas vezes. As tampas de rosca com revestimento de PTFE foram colocadas sob azoto e a hidrólise ácida teve lugar durante 24 horas a 110 ° C num bloco de aquecimento. No caso de análise de aminoácidos livres, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente. Após arrefecimento à temperatura ambiente, foram adicionados 500 µL de solução do padrão interno (norleucina 5.0 mol mL⁻¹ em HCl 0,1 M) e o conteúdo de tubos foi evaporado até à secura sob vácuo no evaporador centrífugo. O material resultante foi dissolvido em 1 mL HCl 0,1 M e filtrado com filtros de poro 0,45 µm. O conteúdo dos tubos foi novamente levado à secura sob vácuo no evaporador centrífugo. Aos resíduos sólidos obtidos foram adicionados 200 µl da solução isobutanol-HCl 3 M. A mistura foi aquecida a 120 °C durante 10 minutos e, após agitação, foi aquecida por mais 30 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o excesso de reagente foi evaporado sob vácuo no evaporador centrífugo. Em seguida, foram adicionados 200 µL de uma solução de BHT em acetato de etilo (0,2 mg mL⁻¹) e o excesso de solvente removido sob vácuo no evaporador centrífugo. Foram adicionados 100 µL de anidrido heptafluorobutírico e a mistura foi aquecida durante 10 minutos a 150 °C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o excesso de solvente foi removido sob vácuo no evaporador centrífugo. O material obtido foi dissolvido em 50 µl de acetato de etilo e analisado imediatamente por cromatografia gás-líquido ou congelado a -20 °C até à sua análise. A quantificação dos aminoácidos baseou-se no método de padrão interno usando a l-norleucina e as 18 curvas de calibração determinadas. Inicialmente 21 aminoácidos foram analisados. Para a asparagina (Asn) e ácido aspártico (asp), bem como para a Glutamina (Gln) e ácido glutâmico (Glu) a metodologia não permite a distinção entre amida e o ácido carboxílico, por isso estes aminoácidos têm sido quantificados juntos como Asx e Glx, respectivamente. O limite de quantificação dos aminoácidos analisados foi determinado como

sendo dez vezes o valor do sinal residual. Este estudo foi realizado para o produto fresco e secados obtidos de duas secagens realizadas em 2008 e 2009. No caso da secagem de 2008 não foram analisados os frutos secados em estufa na ESTV por falta de amostra.

2.3. Análise de furosina, CML e CEL

Para um tubo de ensaio com uma tampa de rosca com revestimento de PTFE, foram pesados rigorosamente 75 mg de material liofilizado. Foram adicionados a cada amostra 3 mL de ácido clorídrico (HCl) 7,8 M, as tampas de rosca com revestimento de PTFE foram colocadas sob azoto e a hidrólise ácida teve lugar durante 24 horas a 110 ° C num bloco de aquecimento. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o conteúdo de tubos foi evaporado até à secura sob vácuo no evaporador centrífugo. O material resultante foi dissolvido em 4 mL HCl 2 M e filtrado com filtros de 0,45 µm. Os hidrolisados ácidos foram purificados por extração fase sólida (SPE) para melhorar a linha de base no processo de quantificação por GC-MS. Os resíduos de CML, CEL e furosina de resíduos foram derivatizados por esterificação com isobutanol e acilação com anidrido heptafluorobutírico segundo a metodologia descrita na análise de aminoácidos, com a excepção de que não foi adicionada a solução BHT após a esterificação com isobutanol. Depois de derivatizados os resíduos foram analisados GC-MS. A quantificação dos compostos foi realizada utilizando os resíduos lisina como padrão interno. Este estudo foi realizado para os frutos da colheita de 2009, frescos e secados.

3. ANÁLISE E DISCUSSÃO

3.1 Análise de aminoácidos

Em relação aos resultados deste estudo para as amostras da secagem de 2008, verificou-se alguma inconsistência dos resultados na sequência de erros na manipulação dos frutos durante os processos de secagem que terá levado à sua contaminação/degradação (Figura 1).

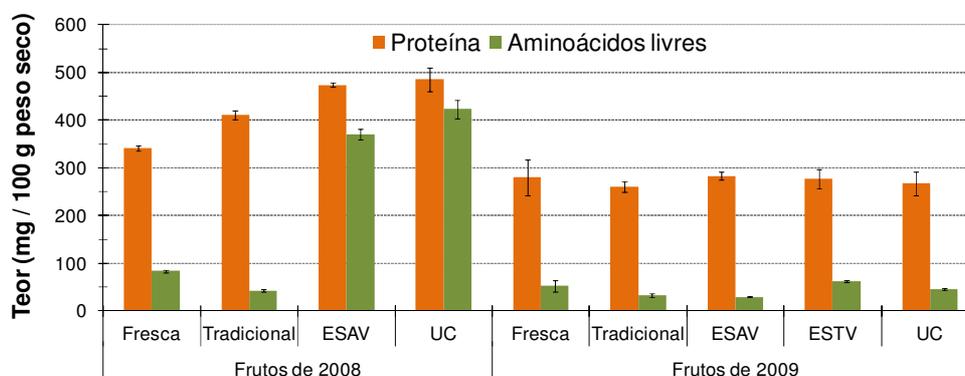


Figura 1. Teor em proteína e em aminoácidos livres de peras frescas e secadas

Em relação aos resultados obtidos para as amostras da secagem de 2009, os resultados são bem mais consistentes e permitem algumas conclusões. Em primeiro lugar, verificou-se que o teor de proteína determinado para o produto fresco foi de 280 ± 11 mg/100 g de peso seco, sendo que este valor está de acordo com o verificado na literatura (Pilipenko, 1999) (231 mg/100 g de peso seco).

Os aminoácidos predominantes no material proteico de todas as amostras de pêra eram: Glx (20%), Leu (18%) e Asx (13%), contrastando com os valores indicados na literatura que apresentam um valor de Asx mais elevado (35%) e valores de Glx (8%) e Leu (5%) mais baixos. Foram detectados ainda os aminoácidos essenciais Ile (10%), Val (7%), Lys (6%), Thr (4%) e Phe (3%) revelando que a pêra de S. Bartolomeu é uma fonte de aminoácidos com valor nutricional. Em relação aos perfis de aminoácidos do material proteico determinados para os produtos secados, os resultados encontram-se representados na Figura 2. Estes perfis encontram-se representados em comparação com o perfil do produto fresco.

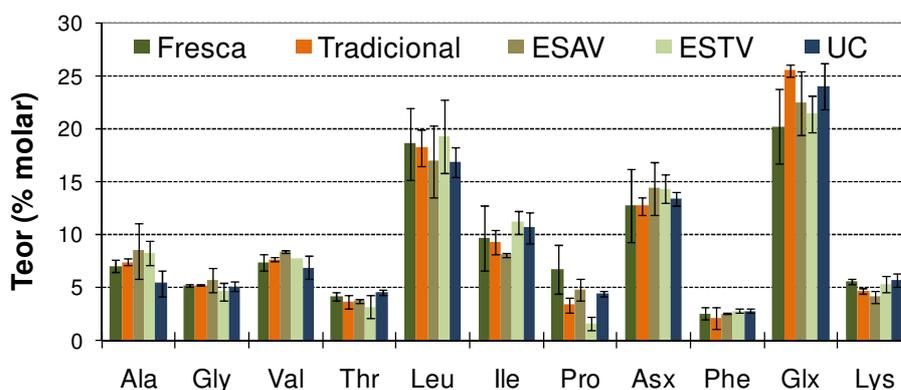


Figura 2. Perfis de aminoácidos das proteínas do produto fresco e dos produtos secados.

Os resultados mostraram que os perfis dos aminoácidos que compunham as proteínas eram muito semelhantes ao do produto fresco, indicando que o processo de secagem não afectou estes parâmetros.

Em relação ao teor em aminoácidos livres verificou-se um valor de 52 ± 11 mg/100g de peso seco para o produto fresco, representando 16% do valor total de aminoácidos. Os aminoácidos predominantemente detectados foram: Glx (45%), Asx (21%) e Ala (13%) tendo sido ainda detectado o aminoácido essencial Val (8%). Estes resultados estão em conformidade com o descrito na literatura para a pêra fresca (Pilipenko, 1999) e para sumos de pêra (Van Gorsel, 1992; Belitz, 2004) onde Asx foi reportado como o aminoácido predominante. Os teores em aminoácidos livres determinados para os produtos secados tradicionalmente (32 ± 3 mg/100 g peso seco) e em estufa na ESAV (29 ± 1 mg/100 g de peso seco) foram menores do que os determinados para o produto fresco, enquanto que para o caso dos produtos secados em túnel e

em estufa na ESTV estes valores foram semelhantes. Verificou-se ainda que todos os processos de secagem promoveram o aumento do teor em Pro (3,6 mg/100 g no produto fresco para 6,2-29,6 mg/100 g de peso seco nos produtos secados). Embora nenhum dado estivesse disponível na literatura em relação ao perfil de aminoácidos das peras secadas nem de frutos secos, o alto teor de Pro livre foi já descrito para sumo de pêra (Belitz, 2004). Na verdade, o alto teor em Pro foi previamente descrito na literatura como uma resposta dos frutos a condições de stress (Huxham, 1999; Josè, 1993; Shirsat, 1996) nomeadamente devido à modulação da expressão de glicoproteínas ricas em prolina (extensinas).

Desta caracterização a nível do perfil de aminoácidos, conclui-se que os processos de secagem não afectam o conteúdo em proteína mas afectam o perfil de aminoácidos livres.

3.2. Detecção dos resíduos de furosina, carboximetil-lisina e frutossil-lisina

Os resultados da detecção dos resíduos de CML, de CEL e de furosina revelou que estes compostos estavam presentes tanto no produto fresco como nos produtos secados. Foi já descrito na literatura (Charissou, 2007; Fenaille, 2006) que estes compostos podem ser formados pela degradação de açúcares e lípidos durante a hidrólise ácida. Como os frutos frescos não sofreram qualquer tipo de processamento, a ocorrência destes compostos será resultado de um artefacto da metodologia usada, nomeadamente durante a hidrólise ácida das amostras. De maneira a reduzir a interferência de açúcares e lípidos nesta determinação, uma prévia extracção do material proteico teria sido necessária. Ainda assim, verificou-se que o teor de furosina e CML+CEL era mais elevado para os produtos secados e usando o produto fresco como controlo foi possível determinar o teor destes compostos resultante dos diferentes processamentos de secagem estudados (Figura 3).

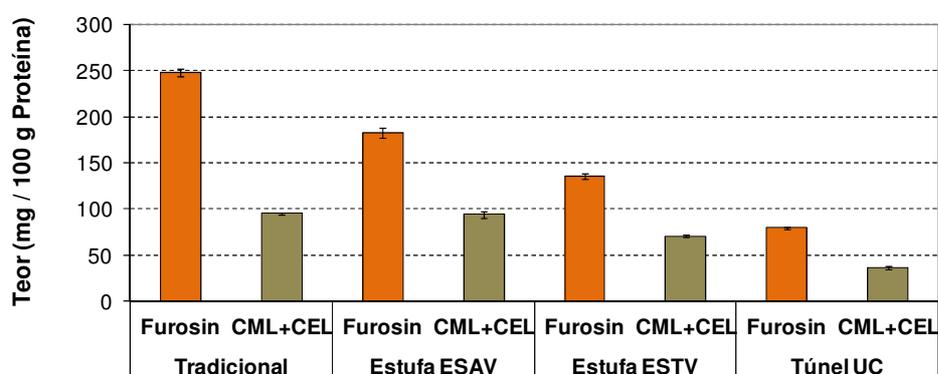


Figura 3. Teor de furosina, CML e CEL nas amostras de peras secadas.

Em relação aos níveis de furosina nos produtos secados, os resultados mostraram que os teores variavam entre 247 e 80 mg por 100 g de proteína, detectados para as peras tradicionais e

para as peras secadas em túnel respectivamente. Para as peras secadas em estufa na ESAV e ESTV, a quantidade de furosina variou entre 182 e 136 mg 100 g⁻¹ proteína, respectivamente. A furosina tem sido usada como indicador de qualidade em produtos lácteos, ovos, cereais para bebés, massas, produtos de tomate, soja, cevada, malte, mel, produtos derivados de carne e leite processados termicamente (Erbersdobler, 2007; Rada-Mendoza, 2002) mas nenhum dado relativo ao teor de furosina em frutos secos foi anteriormente relatado. Ainda assim, os teores de furosina detectados para as peras secadas são semelhantes aos descritos na literatura para produtos que haviam sofrido tratamento térmico de forma moderada, tais como produtos de leite UHT (Vallejo-Cordoba, 2004; Van Renterghem, 1996) (35-269 mg 100 g⁻¹ proteína), compotas e alimentos para crianças à base de frutos (Rada-Mendoza, 2002) (44-448 mg 100g⁻¹ proteína), carne de bovino e salmão cozinhados (Charissou, 2007) (100-200 mg 100g⁻¹ proteína).

Para a quantificação de CML + CEL nas peras secas, os resultados indicaram teores entre 96 e 37 mg por 100 g de proteína, detectados para as peras tradicionais e para as peras secadas em túnel respectivamente. Para as peras secadas em estufa na ESAV e ESTV, a quantidade de furosina variou entre 94 e 71 mg 100 g⁻¹ proteína respectivamente. A CML é descrito na literatura como um indicador útil no estudo da ocorrência dos estados mais avançados das reacções de Maillard em alimentos processados termicamente de forma severa (Charissou, 2007), mas em relação aos teores de CEL não existem dados disponíveis. Assim sendo, os teores determinados para CML+CEL foram, como esperado, superiores aos descritos na literatura para a CML mesmo em alimentos severamente processados termicamente, como o leite em pó esterilizado (Erbersdobler, 2007) (43-52 mg 100 g⁻¹ proteína) e fórmulas infantis hipoalergénicas em pó (Fenaille, 2006) (13-32 mg 100 g⁻¹ proteína). Este facto deveu-se à interferência do teor de CEL na quantificação da CML.

Em ambas as análises realizadas (furosina e CML+CEL), verificou-se uma tendência para a ocorrência de níveis mais elevados para as peras tradicionais e o nível mais baixo para as peras secadas em túnel na UC, enquanto as peras secadas nas estufas possuíam níveis intermédios. Este facto mostrou que a secagem tradicional terá sido o processamento térmico mais severo e que a secagem realizada em túnel terá sido o menos severo. Este facto pode explicar as diferenças observadas entre a cor das peras tradicionais (coloração castanha/avermelhada característica) e das peras secadas em túnel na UC (sem coloração castanha/avermelhada). No caso das peras secadas em estufas na ESAV e na ESTV, verificou-se a ocorrência da coloração característica. Estes resultados permitem afirmar que o processamento de secagem promoveu a ocorrência de reacções de Maillard nas peras de S. Bartolomeu e que no caso da secagem tradicional e das secagens em estufa este facto contribuiu para o desenvolvimento da coloração castanha/avermelhada das peras. Para a secagem em túnel (UC) é possível que o processamento

não foi forte o suficiente para garantir a ocorrência de reacções de Maillard nos estados mais avançados, quando a coloração castanha/avermelhada se desenvolve.

4. CONCLUSÃO

Em relação ao efeito da secagem no perfil de aminoácidos, conclui-se que os processos de secagem em estudo não afectam o conteúdo em proteína nem o seu perfil em aminoácidos, mas afectam o conteúdo em aminoácidos livres e o seu perfil, promovendo o aumento do teor em Pro, facto este que estará relacionado com a modulação da expressão de glicoproteínas ricas em Pro (extensinas). A detecção dos aminoácidos essenciais Ile, Val, Lys, Thr e Phe conferem a este produto valor nutricional.

Em relação ao estudo da influência das reacções de Maillard no processo de desenvolvimento da coloração característica da pêra passa, verificou-se a detecção dos compostos resultantes deste tipo de reacções em todos os tipos de peras secadas, sendo que os níveis mais elevados foram detectados para as peras secadas tradicionalmente, enquanto as peras secadas no túnel de ar quente, que não possuíam cor castanho-avermelhada, apresentaram os valores inferiores. Estes resultados permitem concluir que a secagem da pêra de S. Bartolomeu promove a ocorrência de reacções de Maillard características de produtos processados termicamente que podem contribuir para a coloração característica do produto.

Agradecimentos: Agradecemos à FCT pelo apoio financeiro através do projecto PTDC/AGR-ALI/74587/2006 e à Unidade de Investigação 62/94 QOPNA.

REFERÊNCIAS

- Charissou AL, Ait-Ameur & Birlouez-Aragon I (2007) Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *Journal of Chromatography A*, 1140, 189-194.
- Fenaille F, Parisod V, Visani P, Populaire S, Tabet J & Guy PA (2006) Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *International Dairy Journal*, 16, 728-739.
- Erbersdobler HF & Somoza V (2007) Forty years of furosine - Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 423-430.
- Rada-Mendoza M, Olano A & Villamiel M (2002) Furosine as Indicator of Maillard Reaction in Jams and Fruit-Based Infant Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4141-4145.

- Vallejo-Cordoba B, Mazorra-Manzano MA & González-Córdova AF (2004) New Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Furosine in Dairy Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5787-5790.
- Van Renterghem R & De Block J (1996) Furosine in consumption milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 6, 371-382.
- Pilipenko LN, Kalinkov AY & Spektor AV (1999) Amino acid composition of fruit in the manufacture of sedimentation-stabilized dispersed products. *Chemistry of Natural Compounds*, 35, 208-211.
- Van Gorsel H, Li C, Kerbel EL, Smits M & Kader AA (1992) Compositional characterization of prune juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 784-789.
- Belitz HD & Grosch W (2004) *Fruits and fruit products*. Food Chemistry. (815) Berlin: Springer-Verlag.
- Huxham IM, Jarvis MC, Shakespeare L, Dover CJ, Johnson D, Knox JP & Seymour GB (1999) Electron-energy-loss spectroscopic imaging of calcium and nitrogen in the cell walls of apple fruits. *Planta*, 208, 438-443.
- Josè M & Puigdomènech P (1993) Structure and expression of genes coding for structural proteins of the plant cell wall. *New Phytologist*, 125, 259-282.
- Shirsat AH, Bell A, Spence J & Harris JN (1996) The Brassica napus extA extensin gene is expressed in regions of the plant subject to tensile stresses. *Planta*, 199, 618-624.