KÁTIA NICOLAU MATSUI

**INATIVAÇÃO DAS ENZIMAS PRESENTES NA ÁGUA DE COCO
VERDE (*Cocos nucifera* L.) POR PROCESSO TÉRMICO ATRAVÉS DE
MICROONDAS**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Engenharia

São Paulo
2006

KÁTIA NICOLAU MATSUI

**INATIVAÇÃO DAS ENZIMAS PRESENTES NA ÁGUA DE COCO
VERDE (*Cocos nucifera* L.) POR PROCESSO TÉRMICO ATRAVÉS DE
MICROONDAS**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Engenharia

Área de Concentração:
Engenharia Química

Orientadora: Prof^a. Livre-Docente
Carmen Cecília Tadini

São Paulo
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Matsui, Kátia Nicolau

**Inativação das enzimas presentes na água de coco verde
(Cocos nucifera L.) por processo térmico através de microondas /
K.N. Matsui. -- São Paulo, 2006.**

123 p.

**Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de
São Paulo. Departamento de Engenharia Química.**

**1.Microondas 2.Peroxidase 3.Polifenoloxidase 4.Tratamento
térmico I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica.
Departamento de Engenharia Química II.t.**

“Educar é mostrar a vida a quem ainda não a viu. O educador diz: “Veja!” – e, ao falar, aponta. O aluno olha na direção apontada e vê o que nunca viu. O seu mundo se expande. Ele fica mais rico interiormente. E, ficando mais rico interiormente, ele pode sentir mais alegria e dar mais alegria – que é a razão pela qual vivemos. Vivemos para ter alegria e para dar alegria. O milagre da educação acontece quando vemos um mundo que nunca se havia visto.”

(Rubem Alves)

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial gostaria de agradecer:

À orientadora, Carmen Cecilia Tadini, por acreditar na minha capacidade, valorizar o meu trabalho e contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Eduardo Purgatto, Jorge Gut, Lúcio Angnes e Pedro Vitoriano de Oliveira por todo o auxílio, atenção e amizade.

A todos da Gávea Sensors, em especial Luiz Guedes, pela contribuição mais do que relevante para a execução deste trabalho e, sobretudo, pelo respeito, compreensão e confiança que sempre tiveram comigo.

Ao Rodrigo, Denise, Ivan, Vanessa, Valquíria e Wilson por toda a disposição e atenção dispensados no decorrer desses anos. A Luciane Granado e Mariana Borin pelo trabalho em equipe, dedicação e amizade.

Aos amigos do LEA, que me receberam de braços abertos: Áurea, Bruno, Carol, Cynthia, Fabiana, Lú, Lúcia, Nathy, Pricila, Tati Matuda, Tati Tribess e Vivi, que estiveram sempre presentes me incentivando, vibrando com as minhas conquistas e me apoiando nas horas mais difíceis.

Tati Tribess, obrigada pela presença constante na minha vida, pelo amor e confiança incondicional que normalmente me proporcionam a oportunidade de dar um passo além do que se espera. Aurita, as palavras não expressam verdadeiramente a minha gratidão e alegria por todo o carinho e apoio que você sempre me deu, obrigada minha amiga! Tati Matuda, Dê e Nathy agradeço pela paciência, pelos momentos de descontração e pelo nascimento de uma grande e bela amizade.

Aos meus pais, Regina e Avelino, e ao meu irmão Rodrigo, pelo companheirismo, amor e atenção dispensada a tudo aquilo que faço.

Ao Nando, pelo amor e confiança de me deixar seguir o caminho que desejar estando presente ao meu lado em todos os momentos.

À FAPESP e ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado que permitiu a realização deste estudo.

RESUMO

Neste trabalho, o forno de microondas focalizadas (CEM, Star System 2) e o forno de microondas doméstico adaptado (CCE, MW - 850) foram utilizados para o processo térmico descontínuo e contínuo, respectivamente para reduzir a atividade da POD e PFO presentes na água de coco. No processo descontínuo um sensor de fibra óptica permaneceu em contato direto com as amostras, o que permitiu a obtenção de perfis precisos da temperatura em função do tempo e a determinação dos parâmetros cinéticos D e z para as enzimas, no intervalo de temperatura entre 50 e 100 °C. No processo contínuo, a aquisição dos dados de temperatura foi realizada por termopar tipo T localizado na saída da cavidade do forno e alcançou temperatura máxima entre 66 e 91 °C. Para avaliar a influência dos principais constituintes químicos da água de coco na atividade enzimática soluções simuladas (água; água/açúcares; água/sais; água/sais/açúcares) e água de coco estéril com adição de POD e PFO comerciais foram submetidas ao processo descontínuo por microondas. Os parâmetros cinéticos determinados para as enzimas comerciais nas soluções simuladas obedeceram à cinética de 1ª ordem e os valores D e z foram respectivamente: PFO/água ($D_{93^{\circ}\text{C}} = 16 \text{ s}$, $z = 35,5^{\circ}\text{C}$), PFO/açúcares ($D_{91^{\circ}\text{C}} = 18 \text{ s}$, $z = 33,0^{\circ}\text{C}$), POD/água ($D_{92^{\circ}\text{C}} = 44 \text{ s}$, $z = 24,0^{\circ}\text{C}$), POD/açúcares ($D_{92^{\circ}\text{C}} = 21 \text{ s}$, $z = 19,5^{\circ}\text{C}$), PFO/água de coco estéril ($D_{84,45^{\circ}\text{C}} = 43 \text{ s}$, $z = 39,5^{\circ}\text{C}$) e POD/água de coco estéril ($D_{86,54^{\circ}\text{C}} = 20 \text{ s}$, $z = 19,3^{\circ}\text{C}$). Nas soluções simuladas com sais, as atividades iniciais das enzimas foram significativamente menores. Na água de coco as enzimas apresentaram resistência térmica maior quando comparadas aos resultados das soluções simuladas apresentando $D_{92,20^{\circ}\text{C}} = 52 \text{ s}$ e $z = 17,6^{\circ}\text{C}$ para a PFO e $D_{92,92^{\circ}\text{C}} = 16 \text{ s}$ e $z = 11,5^{\circ}\text{C}$ para a POD. Nos ensaios em processo contínuo a redução da atividade da PFO obedeceu à cinética de 1ª ordem e os resultados corroboraram àqueles determinados para o sistema descontínuo. A POD não apresentou atividade residual detectável para temperaturas de saída acima de 88 °C, mas abaixo de 77 °C a atividade residual foi próxima dos resultados para a POD na água de coco obtidos pelo processo descontínuo. É importante mencionar que para todos os ensaios com água de coco processada, seja no sistema descontínuo ou contínuo, não foi observada a coloração rósea, normalmente atribuída à ação enzimática. Somado a isso, o estudo mostrou que o tratamento térmico por microondas foi mais efetivo na redução da atividade da POD e PFO presentes em água de coco quando comparado com a pasteurização convencional o que torna o uso das microondas uma boa alternativa de processamento para a conservação desse alimento.

Palavras – chave: microondas, água de coco, peroxidase, polifenoloxidase, tratamento térmico.

ABSTRACT

In this work a focused microwave oven (CEM, Star System 2) and an adapted domestic microwave oven (CCE, MW - 850) were employed to reduce POD and PPO activity using batch and continuous processing. In a batch processing an optic fiber sensor was kept in direct contact with the samples, thus precise temperature as a function of time profiles were obtained as well as the kinetic parameters (D and z) in the range between 50 and 100°C. In the continuous processing temperature data were obtained by type T thermocouples in the entrance and exit of the microwave oven cavity in the range between 66 and 90°C. Simulated solutions (water; water/sugars; water/salts; water/sugars/salts) and sterile coconut water were formulated with addition of commercial POD and PPO and were exposed to batch processing by microwaves to evaluate the influence of the main chemical substances present in coconut water on the enzymatic activity. Commercial enzymes in the simulated solutions followed a first order kinetic model. D and z values were: PPO/water ($D_{93^{\circ}\text{C}} = 16$ s, $z = 35.5^{\circ}\text{C}$), PPO/sugars ($D_{91^{\circ}\text{C}} = 18$ s, $z = 33.0^{\circ}\text{C}$), POD/water ($D_{91.5^{\circ}\text{C}} = 44$ s, $z = 24.0^{\circ}\text{C}$), POD/sugars ($D_{92^{\circ}\text{C}} = 21$ s, $z = 19.5^{\circ}\text{C}$), PPO/sterile coconut water ($D_{84.45^{\circ}\text{C}} = 43$ s, $z = 39.5^{\circ}\text{C}$) and POD/sterile coconut water ($D_{86.54^{\circ}\text{C}} = 20$ s, $z = 19.3^{\circ}\text{C}$). Added salts influenced commercial PPO and POD stability and significantly reduced their activity. In coconut water the enzymes were more thermally resistant when compared to the simulated solution presenting $D_{92.9^{\circ}\text{C}} = 52$ s and $z = 17.6^{\circ}\text{C}$ for PPO and $D_{92.9^{\circ}\text{C}} = 16$ s and $z = 11.5^{\circ}\text{C}$ for POD. In continuous processing PPO inactivation followed a first order kinetic model and the results were similar to those obtained in the batch processing. POD didn't present residual activity at exit temperatures above 88 °C. Below 77 °C residual activity was close to that of the POD/coconut water treated by batch processing. An important fact is that for all assays with coconut water, whether batch or continuous process was employed, no pink color (that is attributed to enzyme activity) was observed. Besides this study has shown that thermal treatment by microwaves was more efficient than conventional thermal treatment in reducing PPO and POD activity in coconut water, therefore microwaves are an interesting alternative for conservation of this food.

Keywords: microwaves, coconut water, peroxidase, polyphenol oxidase, heat treatment.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Coqueiro	3
2.2. Água de coco	4
2.3. Métodos de conservação	6
2.4. Microondas	9
2.5. Processamento de alimentos líquidos por microondas	12
2.6. Enzimas	16
2.6.1. Análise do mecanismo da polifenoloxidase (PFO)	16
2.6.2. Análise do mecanismo da peroxidase (POD)	18
2.6.3. Cinética de inativação enzimática	19
2.6.4. Efeito da temperatura e do pH	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Matéria-prima	27
3.2. Metodologia	28
3.2.1. Forno de microondas focalizadas	28
3.2.2. Sensor de fibra óptica	29
3.2.3. Ensaio com as soluções simuladas	30
3.2.4. Ensaio com água de coco	32
3.2.5. Mapeamento da potência dissipada em forno de microondas	32
3.2.6. Processamento contínuo	34
3.3. Análises	37
3.3.1. Atividade da peroxidase (POD)	37
3.3.2. Atividade da polifenoloxidase (PFO)	38
3.3.3. Análises físico-químicas	40
3.3.4. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria	40
3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos no processo descontínuo	41

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Ensaios preliminares	44
4.1.1. Precisão do sensor de temperatura do forno de microondas focalizadas	44
4.1.2 Utilização do termômetro de fibra óptica	46
4.2. Ensaios com as soluções simuladas – parte A	48
4.2.1. Polifenoloxidase/água destilada	48
4.2.2. Polifenoloxidase/açúcares em água destilada	50
4.2.3. Polifenoloxidase/sais em água destilada	53
4.2.4. Peroxidase/água destilada	56
4.2.5. Peroxidase /açúcares em água destilada	59
4.2.6. Peroxidase /sais em água destilada	61
4.3. Ensaios com as soluções simuladas – parte B	63
4.3.1. Estudo da influência dos substratos sobre as enzimas	63
4.3.2. Inativação da PFO nas soluções simuladas (PFO/água, PFO/açúcares, PFO/sais e PFO/açúcares/sais)	66
4.3.3. Inativação da POD nas soluções simuladas (POD/água, POD/açúcares, POD/sais e POD/açúcares/sais)	75
4.3.4. Inativação da PFO e POD em água de coco estéril	83
4.3.5. Peroxidase/sais e Peroxidase/açúcares/sais	81
4.4. Ensaios com a água de coco	90
4.5. Microondas contínuo	99
4.5.1. Mapeamento da potência dissipada no forno de microondas doméstico	99
4.5.2. Ensaios com água destilada no Tubo 1	101
4.5.3. Ensaios com água de coco no Tubo 2	103
5. CONCLUSÕES	109
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	112
Referências Bibliográficas	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Constante dielétrica, fator de perda e fator de dissipação de algumas substâncias (25 °C e 3 GHz).....	11
Tabela 3.1	Sais e açúcares usados na preparação de 100 mL das soluções simuladas.....	30
Tabela 4.1	Valores de tempo e temperatura programados e da temperatura medida com o auxílio de um termômetro tanto para água destilada quanto para água de coco submetidas ao aquecimento no interior do forno de microondas focalizadas.....	44
Tabela 4.2	Atividades residuais da PFO e da POD por microondas e TCB.....	45
Tabela 4.3	Valores médios da atividade residual da PFO, temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente para a solução PFO/água.....	49
Tabela 4.4	Valores médios da atividade residual da PFO, temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente para a solução PFO/açúcares.....	52
Tabela 4.5	Valores médios do pH, acidez titulável, sólidos solúveis e turbidez da solução simulada PFO/açúcares em água destilada.....	52
Tabela 4.6	Valores médios da atividade residual da PFO, temperaturas máximas de cada perfil, tempo equivalente, pH e acidez para a solução PFO/sais.....	54
Tabela 4.7	Valores médios da atividade residual da POD, temperaturas máximas de cada perfil, tempo equivalente, pH e acidez para a solução POD/água determinado a partir da consideração do valor de z igual a 15°C.....	58
Tabela 4.8	Valores médios da atividade residual da POD, temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente para a solução POD/açúcares.....	60
Tabela 4.9	Valores de pH, acidez, teor de sólidos solúveis e turbidez da solução simulada POD/açúcares em água destilada.....	60
Tabela 4.10	Valores de pH e acidez da solução simulada POD/sais submetida às microondas	63
Tabela 4.11	Valores da atividade residual da PFO nas soluções simuladas e a temperatura máxima alcançada em cada condição de processo descontínuo quando submetidas à incidência das microondas.....	66
Tabela 4.12	Temperatura máxima ($T_{m\acute{a}x}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}) e valor de D para as soluções PFO/água e PFO/açúcares.....	68
Tabela 4.13	Temperatura máxima ($T_{m\acute{a}x}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}) e valor de D para as soluções PFO/sais e PFO/açúcares/sais	73
Tabela 4.14	Valores da atividade residual da POD para as soluções simuladas e a temperatura máxima alcançada em cada condição de processo descontínuo quando submetidas à incidência das microondas.....	76

Tabela 4.15	Temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}) e valor de D para as soluções POD/água e POD/açúcares....	77
Tabela 4.16	Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental ($A/A_{0\text{exp}}$) e calculada ($A/A_{0\text{calc}}$) para a PFO em água de coco estéril.....	84
Tabela 4.17	Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental ($A/A_{0\text{exp}}$) e calculada ($A/A_{0\text{calc}}$) para a POD em água de coco estéril.....	87
Tabela 4.18	Valores de D e z, pH, acidez, sólidos solúveis, turbidez para as soluções PFO e POD em água de coco estéril.....	89
Tabela 4.19	Valores de pH, acidez, sólidos solúveis, turbidez e determinação das proteínas totais para os lotes de água de coco utilizados no processo descontínuo por microondas.....	90
Tabela 4.20	Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental ($A/A_{0\text{exp}}$) e calculada ($A/A_{0\text{calc}}$) para a PFO em água de coco.....	91
Tabela 4.21	Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental ($A/A_{0\text{exp}}$) e calculada ($A/A_{0\text{calc}}$) para a POD em água de coco.....	92
Tabela 4.22	Valores de potência dissipada no interior do forno de microondas doméstico adaptado.....	99
Tabela 4.23	Análise de variância (ANOVA) aplicada para os resultados da potência dissipada em função da posição conforme Fig. 3.5.....	100
Tabela 4.24	Vazões volumétricas e tempos de residência para a água destilada conduzida no tubo 1 no interior do forno de microondas.....	101
Tabela 4.25	Valores de pH, acidez, sólidos solúveis, turbidez e determinação das proteínas totais para os lotes de água de coco verde.....	104
Tabela 4.26	Vazão mássica média ($\dot{m}_{\text{média}}$), calor específico da água de coco (C_p), temperaturas de entrada e saída (T_{entrada} e $T_{\text{saída}}$) e energia média absorvida ($\dot{Q}_{\text{média}}$) pelo líquido quando submetido ao forno de microondas adaptado ao sistema contínuo.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	(a) Forno de microondas focalizadas CEM, Star System 2; (b) Frasco de vidro.	28
Figura 3.2	Frasco de vidro com o sensor de fibra óptica localizado no centro da amostra utilizado nos ensaios no forno de microondas focalizadas CEM, Star System 2.	29
Figura 3.3	Diagrama esquemático do processamento térmico descontínuo por microondas	31
Figura 3.4	Forno de microondas doméstico marca CCE, MW – 850, adaptado com um cilindro de metal acoplado na parte superior do forno para os ensaios em processo contínuo.....	32
Figura 3.5	Esquema da distribuição dos pontos para a determinação da potência no interior do forno de microondas doméstico marca CCE, MW- 850.....	34
Figura 3.6	(a) Tubo 1: tubo de vidro para a realização dos ensaios preliminares (diâmetro interno de 0,7 mm e volume de 18,3 mL); (b) tubo de vidro em espiral para os ensaios com água de coco (diâmetro interno de 2,0 mm e volume de 31 mL)...	35
Figura 3.7	Adaptação do forno de microondas doméstico, marca CCE, MW- 850, para o sistema contínuo.....	35
Figura 3.8	Diagrama esquemático para a determinação dos parâmetros cinéticos (D e z)....	42
Figura 4.1	Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) da água destilada obtidos pelo sensor de fibra óptica nas seguintes condições programadas (a) tempo de 5 min para 40, 45 e 50 °C e (b) tempo de 30 s para 40, 45 e 50 °C.....	46
Figura 4.2	(a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução PFO/água destilada, na condição programada de 60 °C sem controle da temperatura antes e depois da incidência das microondas; (b) com controle da temperatura antes e depois da incidência das microondas.....	48
Figura 4.3	Atividade residual x tempo equivalente (s) a 78,91 °C para a solução PFO/água destilada.....	49
Figura 4.4	(a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução PFO/açúcares, na temperatura programada de 60 °C; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s) a 75,56 °C, para a mesma condição.....	50
Figura 4.5	(a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução PFO/açúcares, na temperatura programada de 50 °C; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s) a 70,94 °C, para a mesma condição.....	51
Figura 4.6	(a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução PFO/sais, na temperatura programada de 60 °C; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s) a 92,32 °C e 81,09 °C.....	53

Figura 4.7	(a) Atividades enzimáticas iniciais (A_0) para a solução PFO/sais; (b) para a solução PFO/água.....	55
Figura 4.8	(a) Perfis de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) x tempo (s) para a solução POD/água; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s) a 80,24 e 69,89 $^{\circ}\text{C}$	57
Figura 4.9	(a) Perfis de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) x tempo (s) para a solução POD/açúcares; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s).....	59
Figura 4.10	Perfis de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) x tempo (s) para a solução POD/sais.....	61
Figura 4.11	Absorbância a 460 nm x tempo (s) para a solução POD/sais.....	62
Figura 4.12	Atividade inicial das soluções PFO/água; PFO/açúcares; PFO/sais e a oxidação do catecol.....	63
Figura 4.13	Absorbância a 425 nm x tempo (s) para a solução com maior quantidade de enzima PFO/sais e a oxidação do catecol.....	64
Figura 4.14	Ensaio da atividade inicial da POD com os substratos guaiacol e ABTS.....	65
Figura 4.15	(a) Atividade residual da PFO em solução aquosa x tempo equivalente a diferentes temperaturas submetida ao aquecimento por microondas; (b) Valor de D da PFO em solução aquosa x temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	69
Figura 4.16	(a) Atividade residual da PFO em solução com açúcares x tempo equivalente a diferentes temperaturas quando submetida ao aquecimento por microondas; (b) Valor de D da PFO em solução com açúcares x temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	70
Figura 4.17	Perfis de temperatura x tempo para as soluções com PFO.....	72
Figura 4.18	Atividade residual da PFO em solução com sais (a) e em solução com açúcares/sais (b) em função do tempo equivalente a diferentes temperaturas quando submetida ao aquecimento por microondas.....	74
Figura 4.19	(a) Atividade residual da POD em solução aquosa x tempo equivalente a diferentes temperaturas quando submetida ao aquecimento por microondas; (b) Valor de D da POD em solução aquosa x temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	78
Figura 4.20	(a) Atividade residual da POD em solução com açúcares x tempo equivalente a diferentes temperaturas quando submetida ao aquecimento por microondas; (b) Valor de D da POD em solução com açúcares x temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	79
Figura 4.21	Perfis de temperatura x tempo para as soluções com POD.....	82
Figura 4.22	Figura 4.22 Valores experimentais e calculados da atividade residual da PFO em água de coco estéril (a); atividade residual calculada em função da atividade residual experimental (b).....	86
Figura 4.24	Valores experimentais e calculados da atividade residual da PFO em água de coco (a); atividade residual calculada em função da atividade residual experimental (b).....	93

Figura 4.25	Valores experimentais e calculados da atividade residual da POD em água de coco (a); atividade residual calculada em função da atividade residual experimental (b).....	94
Figura 4.26	Comparação da variação do valor D com a temperatura para as soluções submetidas ao processo térmico por microondas (POD comercial nas soluções simuladas, POD da água de coco, <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. plantarum</i> e POD imobilizada extraída da raiz forte) e ao processo térmico convencional (fração termolábil da POD extraída da raiz forte e da POD do nabo).....	96
Figura 4.27	Comparação da variação do valor D com a temperatura para as soluções submetidas ao processo térmico por microondas (PFO comercial nas soluções simuladas, PFO da água de coco, <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. plantarum</i>) e da PFO em extrato de maçã e de uva determinados no processo térmico convencional.....	97
Figura 4.28	Perfil da temperatura x tempo determinado na saída do tubo 1 para o forno de microondas doméstico adaptado.....	102
Figura 4.29	Perfis de temperatura x tempo para a água de coco no forno de microondas doméstico adaptado foram obtidos na saída do tubo 2 nas seguintes vazões médias: (a) $1,51 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$; (b) $3,10 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ e (c) $3,81 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	103
Figura 4.30	Atividade residual da PFO em função da energia absorvida pela água de coco por processamento térmico por microondas em sistema contínuo.....	105
Figura 4.31	Atividade residual da POD em função da energia absorvida pela água de coco por processamento térmico por microondas em sistema contínuo.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	<i>2,2 azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
HMF	5-hidroximetilfurfural
HTST	<i>High temperature short time</i>
IEC	<i>International electrotechnical commission</i>
PFO	Polifenoloxidase
PME	Pectinesterase
POD	Peroxidase
RADAR	<i>Radio detection and ranging</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TCB	Térmico convencional por batelada
TCP	Trocador de calor a placas
UHT	<i>Ultra high temperature</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

a	razão residual
A_0	atividade enzimática inicial ou no tempo zero (U.mL ⁻¹ .s ⁻¹), (U.mL ⁻¹ . °Brix ⁻¹ .s ⁻¹) e (U. µg de proteínas ⁻¹ . °Brix ⁻¹ . s ⁻¹)
A	atividade enzimática total (U.mL ⁻¹ .s ⁻¹), (U.mL ⁻¹ . °Brix ⁻¹ .s ⁻¹) e (U. µg de proteínas ⁻¹ . °Brix ⁻¹ . s ⁻¹)
B	concentração de sólidos solúveis (°Brix)
C_0	atividade da enzima por unidade de volume no tempo 0
C_i	atividade da enzima por unidade de volume no tempo i
C_p	calor específico a pressão constante (kJ.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
D	tempo de redução decimal (s)
D_{ref}	tempo de redução decimal determinado na temperatura de referência (s)
D	representa a forma inativa da enzima
E_1	forma ativa da enzima
k	constante de velocidade de 1º ordem (s ⁻¹)
L	letalidade integrada
$\dot{m}$	vazão mássica (kg.s ⁻¹)
M_C	massa do recipiente (g)
M_W	massa de água (g)
P	potência de saída do forno de microondas (W)
$\dot{Q}$	energia absorvida (W)
t	tempo (s)
t_{equiv}	tempo equivalente (s)
T	temperatura (°C)
(T)	turbidez (%)
T_0	temperatura ambiente (°C)
T_1 ou T_i	temperatura inicial (°C)
T_2 ou T_f	temperatura final (°C)
$T_{m\acute{a}x}$	temperatura máxima (°C)
Tr	Transmitância
T_{ref}	temperatura de referência (°C)
U	unidade de atividade
z	parâmetro de inativação térmica (°C)

Símbolos Gregos

ϵ_r	permissividade relativa complexa
ϵ'_r	constante dielétrica
ϵ''_r	fator de perda
$\tan \delta$	fator de dissipação

1. INTRODUÇÃO

“Existem mais usos para o coco que dias do ano”, segundo um ditado indonésio. Conhecida como “a árvore da vida” o coqueiro é uma das plantas mais úteis do mundo. Dele retira-se quase tudo de que um homem necessita para viver: alimento para matar a fome e a sede, vestuário e material para erguer e cobrir a casa ou simplesmente abrigar-se do sol (CTENAS; CTENAS; QUAST, 2000).

Em regiões tropicais, notadamente no Pacífico, a cultura do coco (*Cocos nucifera*, L.) se reveste de uma importância econômica e cultural expressiva. Os principais produtos e subprodutos utilizados industrialmente compreendem a casca, a polpa e a água de coco (WOSIACKI; DEMIATE; MELLO, 1996).

O coco foi introduzido no Brasil por meio das embarcações que chegavam de Cabo Verde no período da colonização e desde então se espalhou por toda a costa brasileira (CTENAS; CTENAS; QUAST, 2000).

A água de coco é uma bebida nutritiva, saborosa e pouco calórica, principalmente quando extraída de frutos jovens. Além de ser usada como bebida, a sabedoria popular desenvolveu ao longo dos tempos a tecnologia de transformação deste resíduo agroindustrial em fina iguaria de mesa, servida como ingrediente no preparo de sobremesas, sorvetes e pratos típicos. Suas qualidades terapêuticas também despertam interesse. A comunidade científica tem se dedicado ao desenvolvimento tecnológico com ênfase no aproveitamento alimentar e biotecnológico e o setor industrial tem-se voltado ao aproveitamento integral do fruto (WOSIACKI; DEMIATE; MELLO, 1996).

A água de coco ganhou popularidade e o mercado potencial para a cultura do coco verde é muito grande, uma vez que o consumo de refrigerantes no Brasil é superior a 10 bilhões de litro/ano, enquanto o consumo de água de coco representa apenas 1,4 % desse consumo (BARROSO, 2001).

No interior do fruto a água de coco é estéril, mas quando em contato com o ar atmosférico se torna um produto bastante perecível. Para que possa ser mantida por mais tempo para o consumo e ser comercializada em embalagens práticas, a água de coco deve ser submetida a métodos de conservação adequados (ROSA; ABREU, 2000).

A pasteurização e o processo UHT (do inglês *Ultra High Temperature*), muitas vezes combinados com a adição de substâncias químicas específicas, são métodos usualmente empregados e visam a redução tanto da carga microbiana como enzimática. As enzimas

desempenham uma série de funções específicas e vitais para o fruto *in vivo*, entre as quais, fazer parte do mecanismo de defesa, prevenindo o ataque de insetos e microrganismos. Porém, quando em contato com o ar, as enzimas reagem com outros compostos, promovendo mudanças como alteração no flavor, na coloração e até mesmo perdas nutricionais (ROBINSON, 1991; ROSA; ABREU, 2000; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). Esses métodos podem ser eficientes quanto à redução microbiológica e enzimática, no entanto, alterações sensoriais e nutricionais normalmente são apresentadas, o que compromete a qualidade e a aceitação do produto final (CAMPOS et al., 1996; ROSA; ABREU, 2000).

Segundo a literatura, o tratamento térmico de alimentos líquidos por microondas promove maior inativação enzimática com menores perdas nutricionais e sensoriais em comparação com a pasteurização convencional, produzindo um produto com características próximas ao natural (GERARD; ROBERTS, 2004; HEDDLESON; DOORES, 1994; LOPES-FANDINO et al, 1996; NIKDEL et al, 1993; SIERRA; VIDAL-VALVERDE; OLANO, 1999; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a).

O processamento térmico por microondas em fluxo contínuo pode se tornar uma alternativa interessante para a comercialização da água de coco.

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o comportamento da atividade das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO) presentes na água de coco verde, quando submetidas ao tratamento térmico por microondas em fluxo descontínuo e contínuo.

Estudou-se a influência das diferentes condições de tempo e de temperatura no processamento por microondas sobre as atividades enzimáticas e físico-químicas do produto.

Os parâmetros cinéticos (valores D e z) para a POD e PFO foram determinados e comparados aos resultados reportados em literatura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Coqueiro

O coqueiro cientificamente chamado de *Cocos nucífera L.* é uma planta arbórea com caule ereto, sem ramificações e com folhas terminais. Pertence ao gênero *Cocos* e a família *Palmae* e é originário do Sudeste Asiático (GEOCITIES, 2003).

As exigências climáticas do coqueiro são características de uma planta tropical. Os maiores produtores mundiais são as Filipinas, a Indonésia e a Índia. No Brasil, os coqueiros podem ser encontrados desde o estado do Pará até o litoral norte de São Paulo. Facilmente são vistos na orla marítima, porém, podem ser encontrados em outras regiões do país com altitudes inferiores a 600 metros. A temperatura parece ser o fator preponderante na determinação do valor econômico do coqueiral. Solos arenosos e bem drenados também contribuem para a produtividade da cultura (WOSIACKI; DEMIATE; MELLO, 1996).

O coqueiro é uma planta considerada bastante versátil porque dela tudo pode ser aproveitado. As folhas são utilizadas como material de cobertura na construção civil e matéria-prima para tapetes e redes. Os troncos têm aplicações como combustível, material de construção civil, utensílios e ornamentos. As raízes geralmente são empregadas na produção de corantes e as flores podem ser usadas no preparo de bebidas alcoólicas que posteriormente podem levar à produção de vinagre. Todas essas aplicações estão diretamente relacionadas à cultura local (WOSIACKI; DEMIATE; MELLO, 1996).

A parte mais utilizada do coqueiro é o fruto, composto de casca lisa, mesocarpo, endocarpo e endosperma. Mesocarpo é a camada mais grossa, fibrosa e acastanhada quando seca. Endocarpo é a camada lenhosa, muito dura e de cor escura que possui orifícios, saindo de um deles o embrião. Endosperma ou polpa é formado pelo tegumento (camada fina marrom), albúmem sólido (polpa branca) e o albúmem líquido (água de coco). A polpa branca origina-se a partir de nutrientes provenientes da água de coco e sua consistência aumenta com a idade do fruto (ARAGÃO; CRUZ; HELVÉCIO, 2003; CTENAS; CTENAS; QUAST, 2000).

Os frutos podem ser usados na alimentação humana e animal, como matéria - prima para diversas indústrias alimentícias, automobilísticas, metalúrgicas e de cosméticos. No entanto, os produtos de maior valor comercial são a polpa, o óleo e a água de coco (ARAGÃO, 2000; ARAGÃO; CRUZ; HELVÉCIO, 2003).

No Brasil existem três variedades específicas de coqueiro: anão, gigante e híbrido. A variedade anão tem sido plantada nas diversas regiões do país, principalmente por ser uma variedade precoce, iniciando o florescimento em torno de 3 anos de idade e produzindo em média de 130 a 150 frutos/planta/ano (ROSA; ABREU, 2000). Em função dessa característica, o coqueiro anão é destinado a suprir o mercado de água de coco e o coqueiro gigante abastece principalmente a agroindústria, que utiliza a polpa para a produção de leite de coco, coco ralado e óleo de coco (ARAGÃO, 2000).

No estado de São Paulo a cultura do coco vem se expandindo em função do crescente interesse e valorização do mercado da água de coco. Segundo pesquisas realizadas pela Secretaria da Agricultura de São Paulo, a produção de coco no estado aumentou cerca de 25% durante o ano de 2003, atingindo 10,3 milhões de unidades de coco (NAOZUKA, 2004).

2.2. Água de coco

A água de coco é o líquido do endosperma encontrado dentro da cavidade do coco que começa a se formar 2 meses depois da abertura natural da inflorescência e atinge seu volume máximo nos frutos com idades entre 6 e 7 meses (ARAGÃO, 2000; ARAGÃO; CRUZ; HELVÉCIO, 2003; MACIEL; OLIVEIRA; da SILVA, 1992).

Corresponde a aproximadamente 25 % do peso do fruto e a quantidade de água varia de 300 a 600 mL/coco. É mais palatável cerca de 7 meses após a polinização e o conteúdo de sólidos totais é próximo de 5 % em peso. O flavor é doce e levemente adstringente. Glicose e frutose são os açúcares predominantes nos frutos jovens, enquanto a sacarose é o açúcar mais abundante nos frutos maduros (CTENAS; CTENAS; QUAST, 2000).

Os maiores constituintes químicos da água de coco são os açúcares e minerais que conferem o sabor agradável à água e a tornam uma bebida isotônica natural. Em média, a água de coco apresenta a seguinte composição: sacarose (280 mg/100 mL água de coco); frutose (2400 mg/100 mL); glicose (2378 mg/100 mL); cálcio (17,10 mg/100 g); fósforo (7,40 mg/100 g); sódio (7,05 mg/100 g); magnésio (4,77 mg/100 g) e potássio (156,86 mg/100 g). Os menos presentes são as gorduras e as substâncias nitrogenadas. As concentrações de sais minerais podem variar, principalmente em função da variedade da palmeira, grau de maturação, tipo de solo cultivado e do uso de fertilizantes (ALEIXO et al., 2000; ROSA; ABREU, 2000).

Naozuka (2004) avaliou a concentração total de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn presentes em água de coco de diferentes marcas comercializadas na cidade de São Paulo. Observou que concentrações de Fe, Mg e Mn variaram muito entre as amostras, variações estas que devem estar relacionadas à procedência do fruto. O cobre na água de coco está presente em traços, no entanto para as amostras comerciais a concentração foi relativamente alta, atribuído a possíveis contaminações durante o processo de conservação ou estocagem. Em média a concentração de sódio nas amostras comerciais foi 4 vezes maior quando comparada a água de coco natural. A adição de conservantes como o bissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) para inibir a mudança de cor relacionada à ação enzimática, provavelmente foi o responsável pelo elevado teor de sódio encontrado (ROSA; ABREU, 2000).

A água de coco é amplamente consumida no mundo inteiro não somente por ser uma bebida refrescante e pouco calórica, mas também devido às suas inúmeras qualidades terapêuticas. É empregada na reidratação oral, auxilia no tratamento de distúrbios intestinais, na redução do colesterol e em casos de cólera. Além disso, a água de coco é utilizada como fluido de hidratação intravenoso, devido à presença de aminoácidos essenciais e de sais minerais em concentrações semelhantes a do plasma sanguíneo (ARAGÃO, 2000; MACIEL; OLIVEIRA; da SILVA, 1992; PUMMER et al., 2001).

É um meio adequado para a cultura de bactérias, leveduras e sementes de flores. A utilização da água de coco em novas técnicas de fermentação viabiliza a produção de antibióticos, vitaminas e aminoácidos essenciais, permitindo uma vasta aplicação em vários segmentos da área científica (CAMPOS et al., 1996; WOSIACKI; DEMIATE; MELLO, 1996).

A crescente busca por alimentos naturais que possam trazer benefícios à saúde vem elevando o consumo da água de coco, dando sustentação ao plantio em estados pouco tradicionais como São Paulo e Espírito Santo. O Brasil produz 500 milhões de litros de água de coco por ano e cerca de 7 % desse total são destinados à exportação (RIPARDO, 2000).

Tradicionalmente, a água de coco é comercializada dentro do próprio fruto, prática que envolve problemas relacionados ao transporte e armazenamento, dificultando principalmente a sua exportação. Deve ser consumida como bebida no momento da abertura do fruto porque com o tempo, além de ficar exposta a ação dos microrganismos presentes no ambiente, suas enzimas, a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PFO), provocam alterações indesejáveis afetando a sua coloração, valor nutritivo e sabor (ROSA; ABREU, 2000). Desta forma, justifica-se o desenvolvimento de técnicas de processamento que permitam viabilizar a sua comercialização para locais distantes de sua origem, proporcionando melhor conservação

e menor exigência de espaço para o transporte (ROSA; ABREU, 2000; MAGALHÃES et al., 2005).

Os processos de conservação visam, essencialmente, inibir a ação enzimática e microbiológica da água de coco, após a abertura do fruto (ROSA; ABREU, 2000).

2.3. Métodos de conservação

Diversos processos físicos e químicos vem sendo empregados na conservação da água de coco.

A EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) desenvolveu uma máquina extratora que minimiza o contato da água de coco com o ar atmosférico e, combinada com o resfriamento, resulta em um produto sem conservantes e pronto para o consumo, mantendo-se por um período de aproximadamente três dias (ROSA; ABREU, 2000).

O congelamento é um dos tratamentos térmicos utilizados na conservação da água de coco e pode ser conduzido de forma lenta ou rápida. No congelamento lento os cristais são formados gradativamente enquanto o produto é submetido às temperaturas de -20 a -18 °C por períodos de 8 a 12 horas. Esse congelamento não uniforme faz com que açúcares e sais minerais sejam os últimos componentes a serem congelados. No congelamento rápido, utilizam-se soluções criogênicas ou hidroalcoólicas capazes de atingir temperaturas abaixo de -30 °C por períodos de 15 a 30 minutos, favorecendo a formação de pequenos cristais e a maior uniformidade no congelamento. A água de coco congelada requer cadeia de frio até o momento do consumo, o que acarreta em alto custo de armazenamento e possíveis perdas sensoriais e nutricionais ao produto (ROSA; ABREU, 2000).

Na pasteurização, realizada em trocadores de calor a placas de aço inox, a água de coco deve ser submetida a temperaturas entre 75 e 90 °C por períodos de 20 a 500 s e logo depois ser mantida sob refrigeração. A obtenção do melhor binômio tempo-temperatura é o ponto fundamental para a otimização do método de pasteurização, de forma que garanta segurança microbiológica e redução da atividade enzimática sem alterações sensoriais e nutricionais ao produto (MURASAKI, 2005; ROSA; ABREU, 2000).

Magalhães et al. (2005) estudaram a conservação da água de coco aplicando um método não térmico: a filtração por membranas. Todas as amostras que foram microfiltradas e ultrafiltradas apresentaram-se em condições de esterilidade comercial. A água de coco

ultrafiltrada em membranas com peso molecular de corte (*cut off*) de 20 kDa e 50 kDa e armazenada sob refrigeração manteve a coloração clara característica e apresentou qualidade microbiológica adequada ao consumo durante 28 dias de armazenamento.

Souza et al. (2004) também observaram a redução acentuada da carga microbiana inicial ao aplicar a filtração com membrana monotubo de massa molar 50 kDa. No entanto, o processamento não evitou a coloração rosada da água de coco.

Campos et al. (1996) correlacionaram a composição química, a atividade enzimática e o efeito da inativação térmica sobre o flavor da água de coco. Os experimentos relacionados ao tratamento térmico foram conduzidos submergindo tubos com 10 mL de água de coco em banho termostatzado a temperaturas de 70 a 90 °C. O efeito do tratamento térmico a 90 °C combinado com um ou dois dos aditivos, ácido ascórbico, ácido benzóico, metabissulfito de potássio, EDTA, ácido cítrico, dióxido de carbono e cisteína, também foi estudado. Os autores reportaram que a temperatura e o pH favoráveis à atividade da PFO foram 25 °C a pH 6,0 e para a POD 35 °C a pH 5,5. Estes autores relataram que o tratamento térmico a 90 °C foi o mais eficiente. Entretanto, tempos de retenção da ordem de 550 e 310 s foram necessários para a completa inativação da PFO e POD, respectivamente. Entre os aditivos, o ácido ascórbico promoveu a maior inibição das enzimas sem afetar as características sensoriais do produto. Também observaram que, quanto maior a temperatura e o tempo de retenção empregados, maior foi a perda do flavor da água de coco, percebida por um painel de 15 provadores treinados.

Atualmente, grande parte da água de coco verde disponível no mercado é industrialmente submetida ao processo térmico UHT (*Ultra High Temperature*), combinada à adição de conservantes químicos e posteriormente embalada assepticamente, de modo a reduzir a carga microbiológica para valores seguros ao consumo, evitar a coloração rosada, que ainda é um desafio para pesquisadores e para a indústria, e outras alterações indesejáveis durante a vida de prateleira. Nesse processo, a água de coco atinge temperaturas próximas a 140 °C garantindo a condição de esterilidade comercial, o que permite a sua estocagem à temperatura ambiente. Apesar do tempo de processo ser de apenas poucos segundos, a elevada temperatura e os aditivos promovem alterações significativas nas características sensoriais do produto (ROSA; ABREU, 2000; REDDY; DAS; DAS, 2005).

A influência dos processos de conservação (ultrafiltração, pasteurização e congelamento) na composição química da água de coco foi avaliada por Naozuka (2004) por meio da determinação da concentração total dos elementos de interesse (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn) e das diferentes frações de filtrado e retido, após separação por ultrafiltração

com membranas de 0,025 μm e 0,10 μm . A concentração total dos elementos foi determinada por espectrofotometria de absorção e emissão atômica. Os elementos inorgânicos, presentes na água de coco, desempenham um papel importante na manutenção do bom funcionamento do organismo dos seres vivos, mas apesar de serem essenciais, em quantidades excessivas, podem ser prejudiciais aos mesmos. Os resultados da ultrafiltração mostraram a retenção das enzimas responsáveis pela degradação da água de coco, mas também de elementos essenciais como o Fe e Zn, alterando as propriedades nutricionais do produto final (WATZKE, 1998). O congelamento da água de coco por 0, 30 e 120 dias não alterou a concentração total dos elementos de interesse, no entanto a distribuição de todos os elementos nas diferentes frações da água de coco foi afetada. Essa variação na distribuição provavelmente está relacionada aos processos físicos e químicos como a ruptura de membranas celulares na formação dos cristais de gelo e a desnaturação protéica, devido à baixa temperatura, que pode ocasionar a liberação de sítios ativos que interagem com os elementos (WATZKE, 1998).

O processo de pasteurização realizado a 90 °C com tempos de retenção de 180, 190 e 300 s em trocador de calor a placas não promoveu mudanças significativas nas concentrações totais dos elementos. Na fração de filtrado a distribuição dos elementos apresentou um aumento na concentração de Cu, Fe, Zn e uma diminuição da concentração de Mn. O aumento da temperatura também deve ter permitido a liberação dos sítios ativos modificando a distribuição desses elementos (WATZKE, 1998). Em uma das condições de pasteurização foi observado aumento significativo na concentração de cobre, possivelmente devido à contaminação durante o processamento da água de coco (NAOZUKA, 2004).

A utilização das microondas na pasteurização de alimentos líquidos vem se tornando um processo cada vez mais estudado, devido às suas inúmeras vantagens quando comparado aos processos térmicos convencionais. Além de permitir maiores taxas de inativação enzimática e estabilidade microbiológica, as microondas possibilitam a permanência de constituintes termolábeis, responsáveis pelas características sensoriais do alimento processado (CAÑUMIR et al. 2002; GERARD; ROBERTS, 2004; HEDDLESON; DOORES, 1994; LOPES-FANDINO et al., 1996; NIKDEL et al., 1993; SIERRA; VIDAL-VALVERDE; OLANO, 1999; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a).

2.4. Microondas

Durante a 2ª Guerra Mundial, cientistas britânicos desenvolveram um dispositivo que gerava microondas, chamado magnétron, que era o coração do RADAR (*Radio Detection And Ranging*) usado para detectar aeronaves inimigas (SANSEVERINO, 2002).

Havia uma necessidade urgente na Inglaterra de produzir o magnétron em grande quantidade e os cientistas britânicos entraram em contato com os americanos, de forma que pudessem usar o parque industrial dos Estados Unidos para produzir este dispositivo. Os britânicos que trabalhavam com o magnétron já sabiam que além da emissão das microondas também havia geração de calor, mas foi o engenheiro americano Percy L. Spencer o primeiro a perceber que poderia usar a radiação eletromagnética para aquecer alimentos (BUFFLER, 1993; SANSEVERINO, 2002).

O aquecimento por microondas, ou aquecimento dielétrico, refere-se ao uso de ondas eletromagnéticas de alta frequência que tornam possível a transmissão de energia através do espaço (BUFFLER, 1993).

Existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é denominado **rotação de dipolo** e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido, as moléculas voltam ao estado desordenado e a energia que foi absorvida para esta orientação é dissipada na forma de calor. Como a alternância do campo se dá bilhões de vezes por segundo, os dipolos se alinham e relaxam numa frequência igualmente alta, resultando também na ruptura das pontes de hidrogênio das moléculas de água e na geração de calor por atrito molecular.

O segundo mecanismo é chamado de **condução iônica**. Os compostos ionizados, quando submetidos a um campo eletromagnético, colidem aleatoriamente entre si e com moléculas não ionizadas, gerando calor por fricção (BUFFLER, 1993; HEDDLESON; DOORES, 1994; KINGSTON; JASSIE, 1988; MUDGETT, 1982, 1986).

Heddleson e Doores (1994) atribuem ao aquecimento por microondas o efeito da desnaturação irreversível das enzimas, proteínas, ácidos nucleicos e outros constituintes celulares vitais para o metabolismo e/ou reprodução celular. Metabólitos e cofatores essenciais para a função celular são liberados da membrana pela ação do calor o que acarreta na destruição de microrganismos e na inativação das enzimas presentes em alimentos. Além do efeito do calor, análogo ao que ocorre em aquecimento tradicional, os autores propõem a

ação do efeito não-térmico das microondas na letalidade microbiológica e inativação enzimática. Sabe-se pouco sobre os mecanismos envolvidos, mas muitos autores buscam a comprovação desse efeito (HEDDLESON; DOORES, 1994; PORCELLI et al., 1997; ROY; GUPTA, 2003). Porcelli et al. (1997) estudaram a inativação de duas enzimas extremamente resistentes, a AdoHcy hidrolase e a MTA fosforilase, quando expostas às radiações eletromagnéticas intensas de 10,4 GHz. Segundo os dados de literatura, a AdoHcy hidrolase quando submetida ao tratamento térmico convencional apresenta completa atividade após 90 min de incubação a 70 °C e após 30 min a 90 °C e a MTA fosforilase, quando também submetida ao tratamento térmico convencional, é completamente estável a incubação por 2 h a 100 °C. Os resultados mostraram que a 90 °C a AdoHcy hidrolase manteve somente 18 % de sua atividade inicial após 40 min de incidência das microondas. Nas mesmas condições, a MTA manteve 78 % de sua atividade após 40 min de exposição e 58 % de sua atividade após 90 min.

Segundo os autores, as inativações da AdoHcy hidrolase e da MTA fosforilase sugerem que ambas as enzimas sofreram mudança conformacional relacionada somente à exposição ao campo eletromagnético aplicado, desconsiderando o efeito da temperatura e atribuindo essa alteração ao efeito não térmico das microondas.

Para projetar adequadamente um equipamento de aquecimento por microondas é desejável determinar os fatores que afetam a taxa de aquecimento através do produto. As propriedades dielétricas dos alimentos são os principais parâmetros que determinam o efeito e a distribuição da energia eletromagnética durante o aquecimento dielétrico (MUDGETT, 1982; WANG et al., 2003).

As propriedades dielétricas de interesse básico em processo de alimentos são normalmente descritas em termos de permissividade relativa complexa, ϵ_r (MUDGETT, 1986; WANG et al., 2003):

$$\epsilon_r = \epsilon'_r - j \times \epsilon''_r \quad (1)$$

e definindo $j = \sqrt{-1}$. A parte real da permissividade relativa complexa, ϵ'_r , conhecida como **constante dielétrica**, descreve a habilidade de um material armazenar energia em resposta ao campo eletromagnético aplicado. A parte imaginária da permissividade relativa complexa, ϵ''_r , conhecida como **fator de perda**, descreve a habilidade de um material dissipar energia em resposta ao campo eletromagnético aplicado, que tipicamente resulta em geração de calor. A razão entre o fator de perda e a constante dielétrica é definida como **tangente de perda**, ou

fator de dissipação e está relacionado à habilidade do material converter energia eletromagnética em calor:

$$\tan \delta = \frac{e''}{e'} \quad (2)$$

Na Tabela 2.1 estão apresentados os parâmetros (constante dielétrica, fator de perda e fator de dissipação) de algumas substâncias (KINGSTON; JASSIE, 1988; SANSEVERINO, 2002).

Tabela 2.1- Constante dielétrica, fator de perda e fator de dissipação de algumas substâncias (25 °C e 3 GHz).

Material	e'	e''	$\tan \delta \times 10^4$
Gelo	3,2	0,003	9
Água (25 °C)	76,7	12,04	1570
NaCl aq. 0,1M	75,5	18,12	2400
Etilenoglicol	12,0	12	10000
Heptano	1,90	0,0002	1
CCl ₄	2,20	0,0009	4
PrOH	3,70	2,48	6700

(Fonte: SANSEVERINO, 2002)

Comparando os fatores de dissipação das substâncias, o gelo praticamente não sofreu aquecimento por microondas, o que era esperado, pois é uma substância cristalina e ordenada. Já a água é aquecida pelo mecanismo de rotação de dipolo. Outras substâncias polares como etilenoglicol também são prontamente aquecidas por microondas. Soluções aquosas de cloreto de sódio (NaCl), por exemplo, sofrem os dois mecanismos de aquecimento e atingem temperaturas mais altas quando comparadas à água pura. O tetracloreto de carbono (CCl₄) e o heptano não sofrem aquecimento por microondas por serem apolares.

Não é apenas a polaridade da molécula que deve ser levada em consideração. A constante dielétrica do 1 – propanol (PrOH) é bem menor que da água, mas sofre um aquecimento maior em microondas, como mostrado na Tabela 2.1. A explicação para esse caso se dá pela menor capacidade calorífica dessa substância que é de 2,45 J.g⁻¹.K⁻¹ a 25 °C, enquanto que a capacidade calorífica da água é de 4,18 J.g⁻¹.K⁻¹ (KINGSTON; JASSIE, 1988).

As propriedades dielétricas variam significativamente com a frequência do processo e a temperatura, portanto, devem ser conhecidas em uma ampla faixa de temperatura para

permitir a predição adequada do comportamento do aquecimento por microondas (HEDDLESON; DOORES, 1994; MUDGETT, 1982; SCHIFFMANN, 1986).

Outros parâmetros além do calor específico, frequência do processo e temperatura, interferem significativamente no aquecimento dos alimentos por microondas. A **densidade** apresenta uma relação quase linear com a constante dielétrica. A presença de ar na composição de determinado alimento o torna bom isolante e conseqüentemente diminui a sua constante dielétrica (HEDDLESON; DOORES, 1994; SCHIFFMANN, 1986).

A **geometria** e o **tamanho** também influenciam no aquecimento. Produtos com formas regulares apresentam um aquecimento mais uniforme. Se o tamanho do alimento a ser aquecido for muito maior que o comprimento de onda, a profundidade de penetração das microondas será prejudicada e o aquecimento não será uniforme. Neste caso, o centro do alimento será aquecido por condução de calor e não por microondas, assim a **condutividade térmica** é mais um parâmetro que influencia o processo (HEDDLESON; DOORES, 1994; SCHIFFMANN, 1986).

2.5. Processamento de alimentos líquidos por microondas

Desde a década de 50 o aquecimento por microondas tem sido aplicado em processamento de alimentos (SCHIFFMANN, 1986). Copson (1954 apud NIKDEL et al., 1993) já investigava a utilização das microondas para a inativação da pectinesterase (PME) em suco de laranja, e após esse estudo, muitos outros pesquisadores vêm explorando a aplicação das microondas em alimentos líquidos (NIKDEL et al., 1993).

Nikdel et al. (1993) adaptaram um forno de microondas doméstico (2450 MHz e potência nominal 600W) para um sistema de processamento contínuo para a inativação da pectinesterase (PME), enzima termorresistente que promove a perda de turbidez no suco de laranja. Tubos de teflon foram dispostos no interior do sistema e conectados a um tubo de retenção na saída da cavidade. Submeteram amostras de suco a condições de temperaturas de 75 a 92 °C por tempos de residência de 10 e 15 s. Para esse sistema, conseguiram alcançar uma inativação enzimática de 99 %, a 85 °C por 10 s. Esse mesmo resultado só foi conseguido em trocador de calor a placas (TCP) na temperatura de 90,5 °C por 15 s. Para os ensaios em microondas, a aquisição dos dados de temperatura foi realizada com termopar localizado na saída do tubo de retenção. Este sistema normalmente obtém valores de temperatura que não representam as condições reais de processo, uma vez que o termopar está numa região onde as

microondas não são incididas sobre o fluido.

Tajchakavit e Ramaswamy (1997b) compararam o tempo de redução decimal (valor de D) da inativação da PME em suco de laranja submetido ao sistema contínuo por microondas, proposto por Nikdel et al. (1993) e por TCP. A 60 °C, o valor de D foi 7,37 s para as amostras submetidas às microondas e 152 s para o tratamento térmico convencional. Durante o aquecimento por microondas, perfis de temperatura em função do tempo foram obtidos por meio de um sensor de fibra óptica em contato direto com o suco de laranja.

Tajchakavit, Ramaswamy e Fustier (1998) determinaram os parâmetros cinéticos (valores D e z) para destruir *S. cerevisiae* e *L. plantarum* em suco de maçã durante o aquecimento por microondas contínuo não isotérmico e compararam com os valores obtidos no processo térmico convencional por batelada. O suco foi conduzido para o interior do forno de microondas por um tubo helicoidal de vidro de diâmetro interno 0,001 m e comprimento 3,510 m. Dois sistemas de aquisição de dados foram acoplados, o primeiro com sensores de fibra óptica para a determinação da temperatura do fluido ao longo da cavidade, localizados em três posições distintas, e o segundo para determinar a temperatura do fluido na entrada e logo após a saída da cavidade, com termopares tipo T. Os valores de D e z determinados para a *S. cerevisiae* submetida ao aquecimento por microondas foram 4,8, 2,1 e 1,1 s a 52,5, 55 e 57,5 °C com z correspondente de 7 °C e para *L. plantarum* 14, 3,8 e 0,79 s a 57,5, 60 e 62,5 °C com valor de z correspondente a 4,5 °C. Os parâmetros cinéticos determinados em processamento térmico por microondas foram significativamente menores que aqueles obtidos no tratamento convencional. Para *S. cerevisiae* os valores de D foram 58, 25, 10 e 1,9 s a 50, 55, 60 e 70 °C com valor de z igual a 13,4 °C e para *L. plantarum* 52, 22, 8,4 e 1,2 s a 55, 60, 70 e 80 °C apresentando valor de z igual a 15,9 °C.

Lopes-Fandino et al. (1996) também compararam o efeito do tratamento contínuo por microondas no leite com o efeito de um trocador de calor convencional. Adaptaram um tubo helicoidal de teflon de 0,50 cm de diâmetro interno e 1,25 m de comprimento no interior do sistema de aquecimento por microondas (marca CEM, modelo MDS-2000) que operava na máxima potência e na frequência de 2450 MHz. Posicionaram termopares somente na entrada e saída da cavidade e submeteram o leite às temperaturas de 72, 80 e 85 °C. Para o tratamento térmico convencional foram utilizadas as mesmas condições de temperatura. Em ambos os processos houve um aumento na desnaturação do leite quando aquecido a 80 e 85 °C, no entanto foi observado uma menor desnaturação térmica para o leite processado por microondas, sendo esse resultado atribuído à melhor distribuição do calor e à ausência de

superfícies quentes em contato direto com o produto, evitando o superaquecimento do mesmo.

Sierra, Vidal-Valverde e Olano (1999) avaliaram a influência dos tratamentos térmicos convencional e por microondas na retenção da vitamina B₁ do leite. Utilizaram um trocador de calor a placas de escala laboratorial com 4 seções: pré-aquecimento, aquecimento, retenção e resfriamento. A vazão volumétrica foi ajustada para 112,5 mL/min, possibilitando um tempo de retenção de 40 s e temperatura de pasteurização de 80 °C. Para o sistema de microondas, os termopares também permaneceram posicionados na parte externa da cavidade e o leite foi conduzido por um tubo ao interior do forno com vazão de 91 mL/min, atingindo a temperatura de 85 °C no termopar de saída. Comparando os processos, observaram que a retenção da vitamina foi maior quando o leite foi submetido às microondas (85 °C). O curto intervalo de tempo para alcançar a temperatura máxima e o aquecimento mais uniforme foram considerados os responsáveis por esse resultado.

Entre os estudos reportados em literatura para o processamento de alimentos líquidos por microondas, deve-se destacar o sistema desenvolvido por Gentry e Roberts (2004) caracterizado por controlar as diversas variáveis envolvidas no processo. Tubos helicoidais de teflon, ligados em série, foram dispostos no interior da cavidade (0,88 x 0,88 x 0,88 m), operando a 2450 MHz com controle de potência variável entre 0 e 2,5 kW. Na saída, o produto foi conduzido para um tubo de retenção onde posteriormente foi resfriado. Termopares do tipo T foram posicionados na entrada e saída da cavidade e em três posições (início, meio e fim) do tubo de retenção. Ao longo da tubulação, quatro sensores de fibra óptica foram conectados para a obtenção dos perfis de temperatura no interior da cavidade. Os autores ressaltaram que o monitoramento da temperatura no interior do sistema de microondas deve ser realizado com a utilização de sensores de fibra óptica que são extremamente frágeis e de custo elevado. Neste estudo, a cinética de formação do 5-hidroximetilfurfural (HMF), produto da reação entre hexoses e aminoácidos durante o tratamento térmico, foi determinada para validar a letalidade do sistema de pasteurização por microondas em solução modelo de suco de maçã.

Sabendo que a maçã é rica em flavonóides e compostos fenólicos que podem contribuir para a redução de doenças do coração e câncer, Gerard e Roberts (2004) avaliaram o efeito do tratamento térmico por microondas da polpa de maçã para a produção do suco. O tratamento térmico convencional aumentou a concentração desses compostos, mas conferiu ao suco características sensoriais indesejáveis. O sistema de pasteurização por microondas utilizado foi o mesmo desenvolvido por Gentry e Roberts (2004) com pequenas modificações.

No interior da cavidade foi inserido um recipiente retangular, de polipropileno, com homogeneizadores operando a 30 e 35 rpm e sensores de fibra óptica em contato com o alimento. Estudos prévios mostraram que 3,0 kg de polpa de maçã aquecida nesse sistema a 1500 W por 4, 7,1, 10,9 e 16,2 min atingiram temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C, respectivamente. Tanto as amostras aquecidas como o controle (temperatura ambiente) foram conduzidos separadamente para a prensagem e o suco obtido foi pasteurizado na temperatura de 71 °C por 6 s assegurando a destruição da *Escherichia coli* 0157:H7. Os resultados mostraram que o aquecimento por microondas aumentou a extração de fenólicos e flavonóides da polpa de maçã para todas as condições de processo analisadas, produzindo sucos de alta qualidade e sensorialmente sem diferenças significativas do controle. O aquecimento a 60 °C foi a condição de processo que conferiu a melhor qualidade e rendimento ao suco.

Soysal e Soylemez (2005) consideraram o aquecimento por microondas mais efetivo na inativação da peroxidase em cenoura quando comparado ao tratamento convencional e a retenção da vitamina C no produto final também foi maior para as amostras submetidas às microondas. A redução da atividade da POD por microondas seguiu a cinética de primeira ordem quando aplicadas as potências de 350 e 700 W e apresentou um comportamento bifásico para os ensaios de menor potência entre 70 e 210 W. O controle da temperatura não foi realizado para este sistema, assim, a inativação da POD em cenoura pode ter sido influenciada tanto pela temperatura quanto pelo efeito das microondas.

Dengh, Singh e Lee (2003) indicaram o sistema por microondas para o branqueamento de vegetais por reduzir efetivamente a atividade enzimática, mantendo as características originais do produto. Utilizaram como indicador de processo térmico partículas cilíndricas de amido de batata e de alginato com POD (origem raiz forte) imobilizada. A potência nominal aplicada foi 258 W e as partículas foram aquecidas por períodos de 15 a 85 s. O aquecimento por microondas não se manteve constante, mas para cada intervalo de 5 s foi assumido processo isotérmico. Após o aquecimento, as partículas foram rapidamente imersas em nitrogênio líquido para evitar alterações pós-processo. A concentração da forma ativa da enzima foi determinada em relação à intensidade da coloração avermelhada, proveniente da reação enzima/partícula, por um sistema de visualização da intensidade de cor. O aquecimento não uniforme foi observado por esse sistema e perfis de temperatura foram obtidos com sensores de fibra óptica posicionados em diferentes regiões da partícula. A partir dos perfis de temperatura foram determinados os parâmetros cinéticos $D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 1,62 \text{ s}$ e $z = 34,5^{\circ}\text{C}$.

2.6. Enzimas

Enzimas são, em sua grande maioria, proteínas que catalisam com grande eficiência as reações metabólicas sob diversas condições de pH, temperatura, meio iônico, entre outros (WHITAKER, 1972).

As enzimas peroxidase e polifenoloxidase possuem centros ativos onde se processam mais de uma reação e agem sobre um grande número de substratos. Estes centros ativos são geralmente constituídos de resíduos de aminoácidos da cadeia protéica e de um grupo não protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima (LUPETTI; RAMOS; FATIBELLO-FILHO, 2003; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; WHITAKER, 1972).

Algumas enzimas dependem somente de sua estrutura protéica para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não protéicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas coenzimas (WHITAKER, 1972).

A POD e PFO podem participar de um grande número de reações oxidativas e especialmente em frutas e vegetais são responsáveis pela mudança de cor, degradação da clorofila, oxidação dos fenóis, do ácido indol acético, sendo que muitos desses fatores estão associados com o flavor, cor, textura e qualidades nutricionais dos alimentos (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Pesquisas confirmam que essas enzimas são normalmente mais termorresistentes que as bactérias deterioradoras podendo ser consideradas indicadores biológicos da efetividade de um processo de pasteurização (GÜNES; BAYINDIRLI, 1993; MACHADO; SARAIVA, 2002; ROBINSON, 1991; WENG et al., 1991a).

2.6.1. *Análise do mecanismo da polifenoloxidase (PFO)*

A polifenoloxidase presente em muitas frutas e hortaliças tem recebido atenção especial dos pesquisadores por ser uma das enzimas responsáveis pelo escurecimento desses alimentos durante o manuseio pós-colheita e a industrialização (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991; WHITAKER, 1972).

Diferentes nomes tem sido associados a esta enzima como tirosinase, creolase, catecolase, difenolase e fenolase, que reflete a sua habilidade em utilizar muitos compostos fenólicos diferentes como substrato. A PFO pertence ao grupo das enzimas oxidoredutases,

possui no seu centro ativo íons cobre que agem como cofatores capazes de catalisar duas reações distintas: a hidroxilação de monofenóis a o-difenóis e a oxidação de o-difenóis a orto-quinonas. A reação de escurecimento prossegue através de oxidações não enzimáticas ocorrendo, finalmente, a polimerização das quinonas a pigmentos de coloração escura. Quimicamente são polímeros amorfos, insolúveis e altamente estáveis que podem interagir com outros constituintes do meio, particularmente as proteínas, formando complexos coloridos (RAMÍREZ; WHITAKER; VIRADOR, 2003; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; WEEMAES et al., 1997; ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

Apesar das investigações sugerirem que o papel da PFO está relacionado com o mecanismo da respiração, ainda não há um consenso sobre o verdadeiro envolvimento que a mesma exerce sobre os tecidos vegetais. A localização da PFO em tecido celular vegetal depende da espécie, idade e estágio de maturação (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A determinação precisa da PFO continua sendo um desafio devido as quinonas formadas durante o curso da reação enzimática, substratos não reagentes, oxigênio e outros constituintes da enzima. Estas reações levam a formação de moléculas poliméricas complexas interferindo na análise. A existência de outras enzimas com propriedades moleculares similares como a peroxidase podem causar erro na medida da atividade da PFO. Considerando que o escurecimento oxidativo catalisado pela PFO é na maioria dos casos indesejável em frutas e hortaliças, métodos químicos e físicos foram desenvolvidos visando a sua inibição, tendo por base a eliminação ou complexação de um ou mais componentes essenciais à reação, ou seja, oxigênio, enzima, cobre e substrato (GUERRERO-BELTRÁN; SWANSON; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; RAMÍREZ; WHITAKER; VIRADOR, 2003; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

O tratamento térmico apresenta-se como um método eficiente para o controle do escurecimento devido à inativação da PFO, entretanto, o aquecimento dos tecidos vegetais normalmente resulta em perdas sensoriais e nutricionais ao alimento prejudicando significativamente aqueles produtos onde a PFO apresenta elevada termoestabilidade (MENDONÇA; GUERRA, 2003; RAPEANU et al., 2005).

Diferentes métodos têm sido investigados destacando-se o uso de inibidores enzimáticos e antioxidantes como o ácido ascórbico, cisteína e 4-hexilresorcinol utilizados em purê de manga (GUERRERO-BÉLTRAN; SWANSON; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005), metabissulfito de sódio, cloreto de sódio e EDTA em batatas (DUANGMAL; APENTEN, 1999), altas pressões para a inativação da PFO em uvas e cogumelos (RAPEANU et al., 2005; WEEMAES et al., 1997), tratamento térmico convencional para a prevenção do

escurecimento em polpa de abacaxi, banana, uva, ameixa, pêra (CHUTINTRASRI; NOOMHORM, 2006; DITCHFIELD; TADINI, 2006; WEEMAES et al., 1998) e o uso da energia de microondas diminuindo a ação enzimática em abacate, água de coco e soluções de PFO extraída de cogumelo (JIMÉNEZ-VIEYRA; ZAMBRANO-ZARAGOZA; AGUILLAR-RODRÍGUEZ, 2004; MATSUI; de OLIVEIRA; TADINI, 2004; MATSUI; de OLIVEIRA; TADINI, 2006).

2.6.2. *Análise do mecanismo da peroxidase (POD)*

A enzima peroxidase está largamente presente nos reinos animal e vegetal, na forma de hemoproteína e utiliza o peróxido de hidrogênio como substrato oxidante, apesar de já ter sido revelada a presença de peroxidase contendo íons metálicos, tais como ferro, selênio e vanádio ou o grupo protético flavina, atuando como cofatores (ROBINSON, 1991; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Durante o amadurecimento dos frutos e particularmente no climatério a atividade da POD aumenta de acordo com a atividade das outras enzimas, como a poligalacturonase e a celulase, que são normalmente associadas ao processo de amadurecimento. Promove um grande número de reações e tem uma versatilidade insuperável em relação às outras enzimas. Por não se apresentar como uma única enzima em frutas e vegetais, sua atividade é medida como de um número de isoenzimas, as isoperoxidasas, que são codificadas por genes estruturais separados, localizados sobre diferentes cromossomos. Existem muitos compostos fenólicos naturais nos tecidos vegetais, cada qual podendo ser oxidado pela POD na presença de pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio (LING; LUND, 1978; ROBINSON, 1991; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Robinson (1991) apresenta uma revisão bastante completa dos estudos de degradação de alimentos vegetais provocada pela presença de isoperoxidasas. No entanto, afirma que a correlação da atividade da POD com o *off-flavor* e a perda de cor de vegetais crus é ainda bastante empírica. De acordo com o autor quanto maior a estabilidade das isoperoxidasas frente à temperatura menos linear é a sua curva de inativação térmica.

Correlações entre o desenvolvimento do *off-flavor* em vegetais congelados durante o armazenamento e a atividade residual da POD tornam as peroxidases úteis como índice de eficiência do tratamento térmico (BURNETTE, 1977; GÜNES; BAYINDIRLI, 1993; MACHADO; SARAIVA, 2002; SCHMIDT; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1985; WENG et al., 1991a).

O comportamento da POD tem sido investigada por diversos autores em diferentes alimentos. Gibriel et al. (1978) estudaram a cinética de inativação e reativação térmica da POD em cenoura, espinafre e damasco. Lu e Whitaker (1974), Ling e Lund (1978), Chang, Park e Lund (1988), Lemos, Oliveira e Saraiva (2000) e Matsui, de Oliveira e Tadini (2006), determinaram os parâmetros cinéticos para a POD extraída da raiz forte. Lourenço, Neves e Silva (1995) e Robinson (1991) avaliaram o comportamento da POD em mamão, manga, pêra e uva. Schweiggert, Schieber e Carle (2005) estudaram a POD em pasta de páprica e pimenta e Soysal e Soylemez (2005) em cenouras. Campos et al. (1996) iniciaram o estudo em água de coco seguido por Duarte, Coelho e Leite (2002), Magalhães et al. (2005), Matsui, de Oliveira e Tadini (2004), Murasaki, da Silva e Tadini (2004) e Murasaki (2005).

2.6.3. Cinética de inativação enzimática

Dados de cinética de inativação enzimática por aquecimento por microondas ainda são escassos na literatura (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b).

As reações enzimáticas nos alimentos normalmente ocorrem a uma taxa que é limitada pela concentração das enzimas presentes. Na literatura, estudos sugerem mais de sete fenômenos envolvidos na inativação enzimática, incluindo agregação, dissociação em subunidades e mudanças conformacionais (MOZHAEV; MARTINEK, 1982; VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Muitos autores consideram que a inativação térmica das enzimas segue a cinética de primeira ordem, portanto, o logaritmo da atividade residual da enzima a uma dada temperatura em função do tempo de aquecimento é linear (ROBINSON, 1991; TOLEDO, 1999; YAMAMOTO; STEINBERG; NELSON, 1962):

$$\frac{dA}{dt} = -k \times A \quad (3a)$$

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k \times t \quad (3b)$$

onde: A_0 é a atividade enzimática no tempo zero; A é a atividade enzimática a qualquer tempo; k é a constante de velocidade de 1º ordem

O tempo necessário para reduzir a atividade enzimática a um décimo do valor inicial, a uma dada temperatura, é definido como tempo de redução decimal ou valor D. Como o tempo de redução decimal é fortemente dependente da temperatura, o valor z foi definido como o número de graus necessários para o decaimento de 1 ciclo logarítmico de D (TOLEDO, 1999).

Desvios da cinética de 1ª ordem tem sido descritos por vários pesquisadores (FUJIKAWA; ITOH, 1996; ROBINSON, 1991; YAMAMOTO; STEINBERG; NELSON, 1962) e modelos tem sido propostos para explicar essas inativações não lineares. Polakovic e Vrabel (1996) selecionaram dados de literatura apresentando os tipos mais comuns de desvios de 1ª ordem: inativação bifásica, inativação com período de ativação e inativação com período de atividade constante. A inativação bifásica é controlada por uma reação diferente em cada fase com a taxa de inativação na segunda fase menor que a primeira. Considera-se a existência de duas frações de isoenzimas (termolábeis e termorresistentes) cada uma sendo inativada segundo um modelo de cinética de 1ª ordem.

Entre os modelos, um multicomponente (ou multifração) de 1ª ordem é expresso como a soma da cinética de seus componentes. Este modelo tem sido estudado principalmente para a inativação térmica de enzimas consistindo de isoenzimas com estabilidades térmicas diferentes (BOBROVNIK, 2000; FUJIKAWA; ITOH, 1996; POLAKOVIC; VRÁBEL, 1996).

Considere uma amostra de enzimas consistindo de m componentes que são inativadas termicamente independentemente seguindo a cinética de 1º ordem sob certas condições:

Por definição temos:

$$C_i = C_{0_i} \exp(-k_i \times t) \quad (4)$$

sendo C_{0_i} e C_i as atividades da enzima por unidade de volume no tempo 0 e t , respectivamente, sendo $k_1 > k_2 > \dots > k_m > 0$. Então:

$$C = \sum_{i=1}^m C_i \quad (5)$$

$$C_0 = \sum_{i=1}^m C_{0_i} \quad (6)$$

Se a é definido como a razão residual de C/C_0 no tempo t , a razão é expressa usando as equações 4 a 6, como segue:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^m C_{0_i} \exp(-k_i \times t)}{\sum_{i=1}^m C_{0_i}} \quad (7)$$

Para o modelo multicomponente de 1ª ordem, quando o número de componentes $i > 2$, é muito difícil avaliar os parâmetros C_{0_i} e k_i dos componentes a partir de dados experimentais. Mas, quando $i = 2$, os parâmetros do modelo, incluindo k_1 , k_2 , C_{0_1} e C_{0_2} , podem ser estimados dos dados experimentais. Neste caso a equação 7 fica:

$$a = \frac{\{C_{0_1} \exp(-k_1 \times t) + C_{0_2} \exp(-k_2 \times t)\}}{(C_{0_1} + C_{0_2})} \quad (8)$$

De acordo com os autores, a informação principal para elucidar a cinética da inativação enzimática é através da medida da atividade. Conseqüentemente, a atividade da enzima fornece a melhor informação quantitativa sobre o fenômeno da sua perda, mas é difícil relacioná-lo às mudanças que ocorrem na estrutura da enzima. A medida da atividade fornece uma informação ambígua se a enzima ativa é representada por uma única forma. A atividade total da enzima, A , é geralmente igual à soma das atividades das formas ativas das enzimas, A_i :

$$A = \sum_{i=1}^m A_i = \sum_{i=1}^m g_i C_i \quad (9)$$

onde g_i são as atividades específicas molares das isoenzimas e são função da concentração do substrato S , temperatura T , pH e de outras variáveis:

$$g_i = f(T, S, pH, \dots) \quad (10)$$

A atividade é usualmente dada como um valor relativo à atividade inicial A_{0_i} , definida pela equação 7 e reescrita como:

$$a = \frac{A}{A_0} = \frac{\sum_{i=1}^m g_i \times C_i}{\sum_{i=1}^m g_i \times C_{0_i}} \quad (11)$$

As equações 9 a 11 refletem os problemas metodológicos encontrados na análise da cinética de inativação enzimática. Como a inativação é representada por um conjunto de reações entre diferentes isoenzimas, para a avaliação da cinética seria muito útil conhecer o conteúdo de cada isoforma, além disso, não se conhece a atividade molar das isoformas.

Segundo Polakovic e Vrábel (1996) é difícil decidir a partir da curva de inativação se uma reação é reversível ou irreversível, se reações paralelas tomam lugar sobre uma mesma isoforma ou não, ou se intermediários são ativos ou inativos. Tem sido demonstrado como equações de cinética simples (principalmente cinética de 1ª ordem) que podem distinguir um comportamento cinético mais complexo.

Como exemplo considere o mecanismo reversível simples:

onde E_1 é a forma ativa e D representa a forma inativa da enzima. Se somente E_1 está presente inicialmente, a seguinte relação da atividade a , no tempo t , é obtida:

$$a = \frac{k_2}{k_1 + k_2} + \left(1 - \frac{k_2}{k_1 + k_2} \right) \times \exp(-(k_1 + k_2) \times t) \quad (13)$$

A equação 14 representa matematicamente uma função uniexponencial na forma de:

$$a = (1 - b_1) + b_1 \times \exp(-d_1 \times t) \quad (14)$$

onde $b_1 = \frac{k_1}{k_1 + k_2}$ e $d_1 = (k_1 + k_2)$, que tem um valor de 1 para $t=0$ e assintoticamente se aproxima de um valor diferente de zero para tempo infinito.

Outros mecanismos podem ser propostos para demonstrar o caráter diversificado da atividade enzimática, através de modelos de interação de 3 ou 4 parâmetros. Murasaki e Tadini (2002) empregaram um modelo multicomponente de primeira ordem de 3 parâmetros do tipo: $a = b_1 \cdot \exp(-d_1 \times t) + (1 - b_1) \cdot \exp(-d_2 \times t)$ para explicar a inativação térmica da enzima PFO em processo descontínuo da água de coco verde. Os autores relataram que dados de inativação térmica da POD presente na água de coco só foram ajustados adequadamente a um modelo multicomponente de 1ª ordem de 4 parâmetros do tipo:

$$a = (1 - b_1 - b_2) + b_1 \cdot \exp(-d_1 \times t) + b_2 \cdot \exp(-d_2 \times t) \quad (15)$$

2.6.4. Efeito da temperatura e do pH

Investigações dos efeitos da temperatura sobre a inativação enzimática são comumente conduzidas para obter as condições ótimas de processo. Para uma melhor análise do mecanismo e cinética de inativação algumas considerações devem ser seguidas: 1. o mecanismo de inativação deve ser validado a cada temperatura; 2. a equação de cinética deve conter parâmetros que não mudam com a temperatura; 3. os parâmetros dependentes da temperatura devem apresentar uma correlação consistente, como por exemplo, espera-se que as constantes de velocidade obedeçam a equação de Arrhenius.

Segundo Vámos-Vigyázó (1981) o pH ótimo para a atividade da POD e da PFO depende da origem das enzimas, do substrato e normalmente concentra-se entre pH 4 e 7. A atividade enzimática apresenta um decréscimo para pH ácido atribuído às modificações das proteínas do estado nativo para o estado de desnaturação reversível (BURNETTE, 1977).

Campos et al. (1996) estudaram o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática da PFO e POD de água de coco verde. Os resultados mostraram que o pH ótimo, ou seja, de maior atividade para PFO e POD foi 6,0 e 5,5, respectivamente. Constataram que a água de coco verde possui o pH favorável para a atividade de ambas as enzimas. As temperaturas de 25 °C e 35 °C foram aquelas que apresentaram uma maior atividade para PFO e POD, respectivamente. Também observaram que a temperatura de refrigeração de 5 °C não foi suficiente para a completa inativação dessas enzimas, a atividade enzimática foi de 46 % para a PFO e de 39 % para a POD, não sendo mencionado o período de exposição para essa condição de temperatura.

Gibriel et al. (1978) já haviam observado taxas de reativação maiores para a POD presente em cenouras quando mantida a -5 °C, comparada com outras condições de armazenamento como 4 ou 18 °C. Também concluíram que o pH 7 foi o melhor para a atividade inicial da POD em extrato de espinafre e após o branqueamento a 70 °C por 1 min o pH 8 foi o que forneceu as melhores condições de reativação tanto para a POD de extrato de espinafre como de extrato de damasco.

Lemos, Oliveira e Saraiva (2000) avaliaram a influência do pH e do tratamento térmico convencional sobre a inativação térmica da POD extraída da raiz forte em meio aquoso. A máxima estabilidade da POD ocorreu em condições de pH próximo do neutro, apresentando um decréscimo na atividade para os valores extremos de pH. O valor de z de aproximadamente 10 °C foi determinado para a fração termolábil no intervalo de pH entre

11,5 e 12,5 para as condições de temperatura de 40 a 65 °C, e da fração termorresistente nas condições de pH entre 3,0 e 4,0 para temperaturas entre 65 e 85 °C.

Ditchfield e Tadini (2006) estudaram a cinética de inativação da POD e da PFO em purê de banana, utilizando trocador de calor tubular com tempo de retenção variando de 2,5 a 5,5 s nas temperaturas de 69,8 a 100,1 °C. Os resultados foram ajustados ao modelo multicomponente de primeira ordem por se tratar de uma inativação bifásica, indicando uma taxa de inativação na segunda fase menor que na primeira, devido à presença de duas isoenzimas.

Collet et al. (2005) avaliaram a cinética de inativação da pectinesterase (PME) em pasteurização contínua de suco de laranja utilizando um trocador de calor a placas. Os experimentos foram realizados a 82,5, 85 e 87,5 °C e em tempos de retenção variando de 8,5 a 11,1 s. Observaram a influência do pH sobre a inativação da PME do suco processado e ajustaram os dados referentes ao intervalo de pH entre 3,8 e 3,9 a um modelo multicomponente de 1ª ordem com três parâmetros, proposto por Fujikawa e Itoh (1996). Comparando os modelos para as três temperaturas, o processo a 82,5 °C apresentou maior inativação da POD, fato esse explicado pela diferença na proporção das duas isoenzimas presentes no suco de laranja e o comportamento diferenciado frente ao pH.

Tribess e Tadini (2006) deram continuidade a esse estudo correlacionando os parâmetros do modelo não linear com o pH na inativação térmica da pectinesterase (PME) em suco de laranja minimamente processado. Duas variedades de laranja, *Citrus aurantium L.* e *Citrus aurantifolia*, foram utilizadas para obter misturas com pH ajustado nos valores 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0 e 4,1. Os sucos foram submetidos às mesmas temperaturas estudadas por Collet et al. (2005) em seis tempos de retenção distintos. A utilização do modelo de cinética de primeira ordem com três parâmetros mostrou que o parâmetro a (atividade da fração da isoenzima 1 em relação a inativação enzimática total) para cada pH estudado, foi influenciado pela temperatura de processo, com um aumento da termolabilidade da fração da isoenzima com o aumento da temperatura. A constante de velocidade k_1 variou de maneira similar em relação ao pH e temperatura, tendo seus pontos mínimos entre pH 3,8 e 3,9 na temperatura de 85 °C. Os maiores valores de k_1 foram encontrados nos valores extremos de pH e temperatura. A maior inativação da PME foi para pH de 3,6 a 85 °C e pH 3,7 para as temperaturas de 85 e 87,5 °C. Com os dados de cinética determinados, os autores observaram um ponto de inflexão na inativação da PME para pH 3,8 com mínima inativação.

O tratamento térmico para a prevenção do escurecimento da polpa de abacaxi, promovido pela ação da PFO, foi estudado por Chutintrasri e Noomhorm (2006) em banho

termostatzado nas condições de temperatura entre 40 e 90 °C por períodos de exposição que variaram de 0 a 30 min. Os valores D e z foram determinados tanto para as temperaturas mais brandas (40-70 °C) como para as temperaturas elevadas (75-90 °C). A atividade inicial da PFO foi reduzida para aproximadamente 60 % após a exposição por 30 min entre 40 e 60 °C. A desnaturação evoluiu rapidamente para temperaturas acima de 75 °C e 7 % da atividade residual foi determinada após 5 min a 85 °C e apenas 1,2 % após 5 min a 90 °C. Para a faixa de temperatura estudada (40 - 90 °C) a redução da atividade da PFO obedeceu à cinética de 1ª ordem ratificando o comportamento evidenciado em outros estudos com frutas e vegetais. Os autores salientaram que variações na cinética de inativação da PFO podem ocorrer devido ao grau de maturação, condições de cultivo e da composição de cada fruta ou vegetal.

Valderrama, Marangoni e Clemente (2001) estudaram a inativação da POD e da PFO extraídas da casca e da polpa das maçãs tipo Gala e Fuji. O extrato enzimático foi submetido ao processamento térmico a 60, 65, 70 e 75 °C, por períodos de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 min. O teor total de proteínas e a eletroforese dos extratos enzimáticos para a detecção da POD também foram determinados. A polpa da maçã Fuji apresentou o maior teor de proteínas, mas a maior atividade da POD foi determinada na casca, tanto da maçã tipo Gala (219,3 U/100g) quanto da Fuji (229,3 U/100g). A atividade da PFO foi muito baixa para todas as amostras analisadas. Pela eletroforese observou-se que a POD tanto do extrato da polpa quanto da casca da maçã Fuji apresentou uma isoenzima catiônica e duas isoenzimas aniônicas. No gel da eletroforese dos extratos concentrados da maçã Gala detectaram uma isoenzima aniônica da POD na polpa, duas isoenzimas aniônicas e duas isoenzimas catiônicas da POD na casca. A máxima inativação para a isoenzima aniônica isolada da casca e da polpa das maçãs tipo Gala e Fuji foi de 70 %, entretanto, o mesmo tratamento aplicado a isoenzima catiônica apresentou uma inativação máxima de 20 %. A redução da atividade da POD foi não linear em relação ao tempo e temperatura, mostrando que as isoenzimas possuem diferentes resistências térmicas.

Duarte, Coelho e Leite (2002) determinaram a atividade da POD e da PFO presentes na água de coco verde e caracterizaram essas enzimas por cromatografia e eletroforese. Para a POD foi encontrada a atividade de 0,3 U/mL e para a PFO 5U/mL, valores menores que aqueles encontrados por Campos et al. (1996) (114,3 U/mL para a POD e 32,1 U/mL para a PFO). Essa diferença foi atribuída à variedade da planta, diversidade no cultivo e desenvolvimento do fruto. Os autores também utilizaram técnicas de FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) e SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) para a caracterização enzimática. Por filtração a gel, o peso molecular determinado para a POD foi 44,63 kDa e 73,8 kDa para a PFO. O peso molecular da POD de

44,63 kDa também foi determinado por SDS-PAGE, mas não foi possível detectar o peso molecular da PFO por esse método, talvez pela baixa concentração dessa enzima nas amostras analisadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos objetivos propostos, o estudo foi dividido em duas etapas que compreenderam os processamentos térmicos descontínuo e contínuo por energia das microondas.

A 1ª etapa foi conduzida no forno de microondas focalizadas, marca CEM, Star System 2 com ensaios preliminares para conhecer o funcionamento do equipamento e a adaptação do mesmo às condições de processo desejadas. Nesta etapa o sensor de fibra óptica, marca GAVEA SENSORS, TRB, foi acoplado ao forno de microondas para a obtenção dos perfis de temperatura.

Além de estudar o comportamento das enzimas presentes na água de coco frente à ação da energia das microondas e determinar os parâmetros cinéticos das mesmas, teve-se o interesse em avaliar a influência dos principais constituintes químicos da água de coco no comportamento da POD e da PFO. A realização deste estudo foi conduzida com a adição de enzimas comerciais em soluções que simulavam a água de coco e que posteriormente foram submetidas às microondas em diversas condições de temperatura e de tempo para a determinação dos parâmetros cinéticos.

A 2ª etapa foi realizada em um forno de microondas doméstico adaptado para um sistema contínuo, marca CCE, MW-850. O mapeamento da potência e a construção de serpentinas de vidro para a circulação da água de coco no interior do forno de microondas fizeram parte desta adaptação. Análises da atividade enzimática da POD e da PFO, a determinação das proteínas e as análises de: pH, acidez, turbidez e sólidos solúveis foram realizadas para todas as amostras de água de coco.

3.1. Matéria-prima

Polifenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) tipo Tyrosinase e Peroxidase (E.C. 1.11.1.7) tipo X, origem raiz forte, de procedência SIGMA CHEMICAL (SIGMA-T3824 e SIGMA-P6140) foram utilizadas nas soluções simuladas.

A água de coco foi extraída de lotes de cocos verdes (*Cocos nucifera L.*) comercializados na cidade de São Paulo.

3.2. Metodologia

3.2.1. Forno de microondas focalizadas

Todo o processo descontínuo foi conduzido em um forno de microondas focalizadas da marca CEM, Star System 2, do Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica (LEEAA) do Instituto de Química da USP. O forno de microondas contém duas cavidades onde são introduzidos frascos de vidro (comprimento: 310 mm, diâmetro: 41 mm). As amostras foram inseridas, individualmente, nos frascos de vidro a volume constante (20 mL) e submetidas à incidência das microondas em diversas condições de temperatura e de tempo de exposição.

O forno de microondas focalizadas caracteriza-se por incidir uniformemente, mas não de maneira contínua as microondas e por possuir um dispositivo que mede a temperatura no interior do mesmo. Pelo painel de controle, localizado na parte externa do forno, foi possível programar e monitorar a temperatura e o tempo desejados para o processo. A partir desses parâmetros a incidência das microondas foi controlada pelo dispositivo do equipamento sobre o material em estudo. Na Figura 3.1 (a) apresentam-se o forno de microondas focalizadas CEM, Star System 2 e (b) o tubo de vidro onde a amostra foi inserida e submetida à incidência das microondas.

Figura 3.1. (a) Forno de microondas focalizadas CEM, Star System 2; (b) Frasco de vidro.

Como parte inicial dos experimentos, foram realizados alguns ensaios com água destilada e água de coco, a fim de verificar a precisão do sensor de temperatura no interior do forno de microondas, já que a temperatura é um dos parâmetros de controle mais relevantes

no processo em estudo. Decorrido o tempo programado para a incidência das microondas, o frasco de vidro contendo a amostra foi rapidamente retirado da cavidade do forno e um termômetro de precisão 0,1 °C, marca INCOTERM, foi utilizado para medir a temperatura da amostra.

Foram programadas temperaturas entre 40 e 60 °C com o objetivo de reduzir a atividade enzimática e ao mesmo tempo permitir mínimas perdas nutricionais e sensoriais ao produto.

3.2.2. Sensor de fibra óptica

O termômetro de fibra óptica da marca GAVEA SENSORS, TRB, de precisão 0,1 °C foi inserido no interior do frasco de vidro, no centro da amostra como apresentado na Figura 3.2. O sensor foi conectado a um sistema de aquisição de dados o que permitiu a obtenção dos perfis de temperatura na frequência de 1 registro por segundo. Sendo de fibra óptica, as microondas não interferiram no funcionamento deste sensor, permitindo o seu contato direto com a amostra em estudo. Os ensaios sempre foram realizados com repetições.

Figura 3.2. Frasco de vidro com o sensor de fibra óptica localizado no centro da amostra utilizado nos ensaios no forno de microondas focalizadas CEM, Star System 2.

3.2.3. Ensaios com as soluções simuladas

Polifenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) tipo Tyrosinase, origem cogumelo (PFO) e a Peroxidase (E.C. 1.11.1.7) tipo X, origem raiz forte (POD) foram utilizadas para preparar as soluções estoque: $1,7 \times 10^{-4}$ g PFO/mL água destilada e $7,4 \times 10^{-4}$ g POD/mL água destilada na formulação das diferentes soluções simuladas:

- (1) água destilada e enzimas;
- (2) água destilada, enzimas e minerais;
- (3) água destilada, enzimas e açúcares;
- (4) água destilada, enzimas, açúcares e minerais;
- (5) água de coco esterilizada e enzimas;

As soluções simuladas foram preparadas de modo a conter açúcares e minerais próximos aos conteúdos médios da água de coco obtidos em literatura (ALEIXO et al., 2000). Na Tabela 3.1 estão apresentados os sais e açúcares usados para a preparação das soluções.

Tabela 3.1 - Sais e açúcares usados na preparação de 100 mL das soluções simuladas.

Sais (p.a.)	Massa (mg) para 100 mL de solução
Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4)	44
Sulfato de potássio (K_2SO_4)	336
Sulfato de sódio (Na_2SO_4)	31
Cloreto de cálcio (CaCl_2)	47
Cloreto de magnésio (MgCl_2)	20
Açúcares	Massa (mg) para 100 mL de solução
Sacarose	280
Glicose	2378
Frutose	2400

As soluções de (1) a (5) foram preparadas separadamente para cada enzima e foram submetidas ao processamento descontínuo, conduzido no forno de microondas focalizadas, nas temperaturas programadas entre 45 e 60 °C como apresentado no diagrama esquemático da Figura 3.3.

A água de coco foi esterilizada em autoclave vertical da marca FABBE-PRIMAR, 103, na condição de pressão de 0,12 MPa por um intervalo de tempo de 20 min. Após o resfriamento, as enzimas foram adicionadas à água de coco esterilizada para serem submetidas à incidência das microondas nas temperaturas programadas de 45 a 60 °C.

As enzimas comerciais foram submetidas ao processamento térmico descontínuo por microondas em diferentes concentrações e estão apresentadas no capítulo *Resultados* como parte A e B. Na parte A, 1 mL da solução estoque de PFO e POD foi diluído em 300 e 200 mL de solução, respectivamente e na parte B, 1 mL da solução estoque de PFO e POD foi diluído em 100 e 80 mL de solução, respectivamente.

Após sofrer a incidência das microondas, o frasco de vidro contendo a amostra foi retirado do forno e inserido em um béquer com gelo e água para acelerar a diminuição da temperatura. O sensor de fibra óptica permaneceu em contato com a amostra permitindo a aquisição dos valores de temperatura em função do tempo até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi distribuída em frascos de 2 mL com tampa e estes foram rapidamente imersos em nitrogênio líquido e mantidos em freezer, marca SANYO, MDF-U3086S a - 80 °C para posterior medição da atividade residual das enzimas, realizadas no mínimo em duplicata.

Figura 3.3. Diagrama esquemático do processamento térmico descontínuo por microondas.

3.2.4. Ensaios com água de coco

Para cada ensaio realizado nos processos descontínuo e contínuo foram utilizados 10 e 25 cocos respectivamente, com o objetivo de ter uma amostragem representativa e um volume de líquido suficiente para submeter ao tratamento térmico por microondas. Análises da atividade enzimática, físico – químicas e de determinação de proteínas foram realizadas para cada lote de água de coco.

3.2.5. Mapeamento da potência dissipada em forno de microondas

O forno de microondas doméstico marca CCE, MW-850, potência nominal 1150 W, frequência de 2450 MHz e cavidade interna (L x A x P) 32,0 x 20,0 x 30,6 cm foi adaptado para o sistema contínuo. Este forno de microondas foi cedido pelo Laboratório de Sensores Químicos (LSQ) do Instituto de Química da USP, que já o utilizara com uma abertura na parte superior de diâmetro externo igual a 3,4 cm onde foi acoplado um cilindro de metal, como apresentado na Figura 3.4.

Figura 3.4. Forno de microondas doméstico marca CCE, MW – 850, adaptado com um cilindro de metal acoplado na parte superior do forno para os ensaios em processo contínuo.

A incidência das microondas no interior da cavidade não é homogênea, por isso foi realizado o mapeamento da potência, seguindo a norma IEC (2004) que determina a variação da temperatura de uma quantidade de massa de água por um intervalo de tempo. Um recipiente cilíndrico de borossilicato, com espessura de 0,3 cm, diâmetro externo de 15 cm e altura de 10,1 cm foi usado para acondicionar a água destilada que inicialmente deve estar

com temperatura inferior à do ambiente. Devido à incidência das microondas, ocorre o aquecimento da água e a sua temperatura se eleva até a temperatura ambiente. Este procedimento assegura que a perda de calor e a capacidade de aquecimento do recipiente tenham um efeito mínimo pelo qual um fator de correção é introduzido.

Antes de iniciar os ensaios assegurou-se que tanto o forno como o recipiente vazio estavam na temperatura ambiente. Uma quantidade de 1000 g de água foi colocada no recipiente na temperatura inicial de 10 °C e sua massa foi determinada em balança CHYO, de precisão 0,1 g. O recipiente foi imediatamente colocado no interior do forno e mantido por 70 s à incidência das microondas, que em ensaios preliminares foi considerado o tempo adequado de processo para elevar a temperatura de 10 °C até a ambiente. No término desse período, o líquido foi homogeneizado e sua temperatura foi determinada não ultrapassando o tempo de 1 min como descrito na norma. Todas as medidas de temperatura foram realizadas com termômetro calibrado (INCOTERM na faixa de temperatura de - 8 a 32 °C, com precisão de 0,1 °C).

A potência de saída do forno de microondas foi determinada usando a equação (16):

$$P = \frac{4,187 \times M_w \times (T_2 - T_1) + 0,55 \times M_c \times (T_2 - T_0)}{t} \quad (16)$$

onde:

P é a potência de saída do forno de microondas (W)

M_w é a massa de água (g)

M_c é a massa do recipiente (g)

T_0 é a temperatura ambiente (°C)

T_1 é a temperatura inicial da água (°C)

T_2 é a temperatura final da água (°C)

t é o tempo de aquecimento (s)

Para verificar a distribuição da potência dissipada na cavidade do forno foram analisados 27 pontos distintos, sendo 9 pontos localizados no plano com variação na altura em três níveis, como mostra o esquema na Figura 3.5. Para cada ponto foram realizadas medidas em triplicata. O programa *Statgraphics plus* versão 4.0 foi utilizado para o tratamento dos dados.

Figura 3.5. Esquema da distribuição dos pontos para a determinação da potência no interior do forno de microondas doméstico marca CCE, MW- 850.

3.2.6. Processamento contínuo

A adaptação do forno doméstico de microondas para um sistema contínuo de aquecimento foi realizada com a construção de tubos de vidro levando em consideração os dados determinados no mapeamento da potência dissipada.

A água destilada foi escolhida como líquido de estudo para a realização dos ensaios preliminares que foram realizados com um tubo de vidro (Tubo 1) como mostra a Figura 3.6 (a). O tubo foi posicionado na região de maior incidência das microondas e permitiu a passagem e o aquecimento da água destilada por processo contínuo. Na Figura 3.6 (b) está apresentado o Tubo 2, que foi utilizado para o processamento da água de coco verde e obedeceu ao posicionamento do tubo anterior.

Uma das extremidades dos tubos foi conectada a bomba peristáltica da marca COLE-PARMER, 7553-77, que permitiu variações na vazão e com o volume do tubo conhecido foi possível determinar o tempo de residência do líquido em estudo. Essa bomba foi alimentada por um tanque de 5 L. A outra extremidade foi conectada ao tubo de saída, conforme mostra a Figura 3.7. Termopares do tipo T previamente calibrados foram conectados na parte externa do forno de microondas, nas extremidades de entrada e de saída do sistema. A interface usada para a aquisição dos dados de temperatura foi a do sistema ARMFELD, pasteurizador de escala laboratorial, FT43A-IFD3FT.

Figura 3.6. (a) Tubo 1: tubo de vidro para a realização dos ensaios preliminares (diâmetro interno de 0,7 mm e volume de 18,3 mL); (b) tubo de vidro em espiral para os ensaios com água de coco (diâmetro interno de 2,0 mm e volume de 31 mL).

Figura 3.7. Adaptação do forno de microondas doméstico, marca CCE, MW- 850, para o sistema contínuo.

Nesse sistema adaptado, os dados de atividade residual foram expressos tanto em função da temperatura máxima quanto em função da energia absorvida pela água de coco durante o aquecimento por microondas usando a equação 17:

$$\dot{Q} = \dot{m} \cdot C_p \cdot (T_f - T_i) \quad (17)$$

onde:

$\dot{Q}$ é a energia absorvida (W)

$\dot{m}$ é a vazão mássica ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$)

C_p é o calor específico ($\text{kJ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T_f é a temperatura final (obtida pelo termopar localizado na saída da cavidade) ($^{\circ}\text{C}$)

T_i é a temperatura inicial (obtida pelo termopar localizado na entrada da cavidade) ($^{\circ}\text{C}$)

O calor específico da água de coco foi calculado de acordo com a equação 18 (PEACOCK, 1995):

$$C_p = 4,1253 - 0,024804B + 6,7 \times 10^{-5}BT + 1,8691 \times 10^{-3}T - 9,271 \times 10^{-6}T^2 \quad (18)$$

sendo:

B a concentração de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$)

T a temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

3.3. Análises

3.3.1. Atividade da peroxidase (POD)

As medidas das atividades enzimáticas foram realizadas em espectrofotômetro UV – VIS, marca FEMTO, 700 PLUS, com precisão de 0,003 absorbância/h. Este equipamento é provido de cubetas de vidro ótico de 40 mm marca HELIMA e jaqueta acoplada em banho de água termostaticado, marca MLW, U2C, para manter a temperatura constante.

A análise da atividade da peroxidase (POD) foi realizada por dois métodos. O primeiro foi proposto por Ferhmann e Diamond (1967 apud Campos et al., 1996) que utiliza solução tampão fosfato 0,2 M, pH 5,5, solução de peróxido de hidrogênio 0,1 % e solução de guaiacol, 0,05 % (G5502, SIGMA).

A solução tampão fosfato 0,2 M de pH 5,5 foi preparada em um balão volumétrico de 1 L, adicionando-se 20 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M e 500 mL de solução de potássio fosfato monobásico (KH_2PO_4) 0,2 M e completando o volume com água destilada.

A solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de 0,1 % foi preparada em um balão volumétrico de 100 mL adicionando 0,33 mL de H_2O_2 (30 %) e completando o volume com água destilada.

A solução de guaiacol 0,05 % foi preparada dissolvendo-se 0,05 g de guaiacol em 100 mL de água destilada. Como a solução fenólica degrada com o tempo, sempre foi utilizada recém preparada.

Em um tubo de ensaio foram adicionados 7,0 mL da solução tampão, 1,5 mL da solução de guaiacol, 0,5 mL da solução de peróxido de hidrogênio e 1,0 mL da amostra em estudo. O tubo foi agitado e colocado em banho termostaticado, ajustado à temperatura de 35 °C. Após atingir a estabilização térmica, a mistura foi transferida para a cubeta de vidro ótico e esta foi inserida no espectrofotômetro ajustado ao comprimento de onda de 470 nm. O valor de referência (0,000 de absorbância) foi definido pela leitura do branco que consistiu de 7,0 mL de solução tampão pH 5,5; 1,5 mL de guaiacol e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio.

O segundo método foi descrito por Pütter e Becker (1983). Em um tubo de ensaio foram adicionados 7,0 mL da solução tampão ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$), pH 6,0; 0,8 mL da solução de ABTS (2,2 azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (2×10^{-2} mol/L); 0,8 mL da solução de peróxido de hidrogênio (0,1 % v/v) e 1,0 mL da amostra. O tubo foi

agitado e colocado em banho termostatzado, ajustado à temperatura de 25 °C. Após atingir a estabilização térmica, a mistura foi transferida para a cubeta de vidro ótico e esta foi inserida no espectrofotômetro ajustado ao comprimento de onda de 405 nm. O valor de referência (0,000 de absorbância) foi definido pela leitura do branco que consistiu de 7,0 mL de solução tampão pH 6,0; 0,8 mL de ABTS e 0,8 mL de peróxido de hidrogênio.

A solução tampão ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$) foi preparada em um balão volumétrico de 1 L adicionando-se 0,14 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 7,98 g de KH_2PO_4 e completando o volume com água destilada.

A solução de ABTS foi preparada dissolvendo-se 0,55 g de ABTS em 50 mL de solução tampão ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$).

A solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,1 % foi preparada em um balão volumétrico de 100 mL adicionando 0,33 mL de H_2O_2 (30 %) e completando o volume com água destilada.

A atividade da POD foi medida pela leitura da absorbância no espectrofotômetro a cada 10 s durante aproximadamente 30 min. A velocidade de reação foi expressa em unidades de atividade (U) sendo que 1 U foi definida como a quantidade necessária para produzir um aumento na absorbância de 0,001 por mL de amostra por segundo.

A atividade da POD corresponde ao trecho linear da curva e foi definida como Unidades de atividade por μg de proteínas por sólidos solúveis da amostra por segundo ($\text{U}/\mu\text{g}$ de proteínas. °Brix. s) para a solução (5) e a água de coco; Unidades de atividade por mL por sólidos solúveis da amostra por segundo (U/mL amostra °Brix. s) para as soluções (3) e (4) e Unidades de atividade por mL de amostra por segundo (U/mL amostra. s) para as soluções (1) e (2).

A atividade residual (A/A_0) foi determinada sendo A_0 a atividade da enzima antes do aquecimento e A atividade da enzima após o aquecimento por microondas.

3.3.2. Atividade da polifenoloxidase (PFO)

A análise da atividade da polifenoloxidase (PFO) foi realizada conforme método proposto por Ponting e Joslyn (1948 apud Campos et al., 1996). Este método utiliza solução tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0 e como substrato uma solução de pyrocatecol (15890, FLUKA), 0,2 M.

PONTING, J. D.; JOSLYN, M. A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Archives of Biochemistry, v. 19, p. 47-63, 1948.

A solução tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0 foi preparada em um balão volumétrico de 1 L, adicionando-se 57 mL da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M, 500 mL da solução de potássio fosfato monobásico (KH_2PO_4) 0,2 M e completando o volume com água destilada.

A solução de catecol 0,2 M foi preparada em um balão volumétrico de 25 mL dissolvendo-se 0,5555 g de pyrocatecol em 25 mL de água destilada. Como a solução fenólica degrada com o tempo, sempre foi utilizada recém preparada.

Em um tubo de ensaio foram adicionados 5,5 mL da solução tampão, 1,5 mL da solução de pyrocatecol e 1,0 mL da amostra em estudo. O tubo foi agitado e colocado em banho termostatzado, ajustado à temperatura de 25 °C. Após atingir a estabilização térmica, a mistura foi transferida para a cubeta de vidro ótico e esta foi inserida no espectrofotômetro ajustado ao comprimento de onda de 425 nm.

O valor de referência (0,000 de absorbância) foi definido pela leitura do branco que consistiu de 5,5 mL de solução tampão pH 6,0 e 1,5 mL da solução de pyrocatecol 0,2 M.

A atividade da PFO foi medida pela leitura da absorbância no espectrofotômetro a cada 10 s durante aproximadamente 30 min. A velocidade de reação foi expressa em unidades de atividade (U) sendo que 1 U foi definida como a quantidade necessária para produzir um aumento na absorbância de 0,001 por mL de amostra por segundo.

A atividade da PFO corresponde ao trecho linear da curva e foi definida como Unidades de atividade por μg de proteínas por sólidos solúveis da amostra por segundo ($\text{U}/\mu\text{g}$ de proteínas. °Brix. s) para a solução (5) e a água de coco; Unidades de atividade por mL por sólidos solúveis da amostra por segundo (U/mL amostra°Brix. s) para as soluções (3) e (4) e Unidades de atividade por mL de amostra por segundo (U/mL amostra. s) para as soluções (1) e (2).

A atividade residual (A/A_0) foi determinada sendo A_0 a atividade da enzima antes do aquecimento e A atividade da enzima após o aquecimento por microondas.

3.3.3. Análises físico – químicas

- pH, medido diretamente no pH-Stat RADIOMETER, PHM-290, precisão 0,001 pH, sendo necessária a calibração do mesmo com soluções tampão de pH 4, 7 e 10.
- Sólidos solúveis, expressos como ° Brix, medidos em refratômetro, marca CARLZEISSJENA, I, precisão 0,1 corrigidos pela acidez e temperatura (AOAC, 1995).
- Acidez total expressa como percentagem de ácido málico. A titulação foi conduzida no pH-Stat, com auto bureta ABU 901 até atingir pH 8,2 (referente ao pH de mudança de coloração do indicador fenolftaleína) (AOAC, 1995).
- Turbidez determinada por espectrometria a 610 nm (relativa à água destilada). A leitura foi feita em absorbância (A). Os valores de Transmittância (Tr) foram calculados de acordo com a relação: $Tr = (10^{-A}) * 100$. A turbidez (T) foi determinada a partir de: $T = 100 - Tr$.

3.3.4. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria

O teor de proteína foi interpretado como uma medida indireta da concentração enzimática e foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). “Este método é baseado na interação entre o corante *Coomassie brilliant blue* BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm” (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

As proteínas foram determinadas para todos os ensaios com água de coco estéril e água de coco.

3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos no processo descontínuo

Em muitos processos industriais, os alimentos estão sujeitos a condições de aquecimento não isotérmico. A letalidade integrada (L), representa a contribuição tanto da temperatura como do tempo de processo sobre a inativação das enzimas e é geralmente obtida a partir da integração dos efeitos letais do perfil de temperatura durante os períodos de aquecimento, retenção e resfriamento, de acordo com a relação:

$$L = \int_0^t 10^{\left(\frac{T - T_{ref}}{z}\right)} dt \quad (19)$$

onde

L é a letalidade integrada

T é a temperatura (°C)

T_{ref} é a temperatura de referência (°C)

t tempo (s)

z intervalo de temperatura necessário para o decaimento de um ciclo logarítmico do tempo de redução decimal (°C).

Para a determinação da letalidade integrada requer-se o valor de z que pode ser obtido a partir da regressão de $\log$ de D *versus* temperatura (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a; TOLEDO, 1999).

No processamento por microondas não há período isotérmico. Assim, os primeiros valores de D foram baseados no tempo total de permanência do produto no interior do forno de microondas e a partir dos valores de D , os valores de z foram determinados. Correções para o tempo de aquecimento foram realizadas permitindo a obtenção de novos valores para D e z . Essa iteração se repetiu até a obtenção da convergência do valor de z . Um diagrama esquemático do procedimento de cálculo para a letalidade integrada (L) que também pode ser expressa como tempo de processo equivalente a uma determinada temperatura de referência (t_{equiv}) e a determinação dos parâmetros cinéticos (D e z) estão apresentados na Figura 3.8. (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY; FUSTIER, 1998; TOLEDO, 1999).

Figura 3.8. Diagrama esquemático para a determinação dos parâmetros cinéticos (D e z).

De acordo com Tajchakavit e Ramaswamy (1997a), não havendo um período isotérmico na etapa de aquecimento, qualquer temperatura dentro da faixa estudada poderá ser utilizada como temperatura de referência.

Os resultados foram agrupados de acordo com a temperatura alcançada ($T_{máx}$). Dentro de cada grupo a temperatura mais elevada foi considerada a temperatura de referência (T_{ref}). Com essas considerações foi possível estimar o tempo equivalente de aquecimento (t_{equiv}) e os parâmetros cinéticos (D e z). Esse procedimento foi aplicado para ambas às enzimas (PFO e POD) nas soluções simuladas de (1) a (4). Para a determinação do tempo equivalente inicial foi considerado o valor hipotético de z igual a 15 °C.

Para os ensaios com a solução simulada (5) e com água de coco, os resultados foram organizados em um só grupo. A temperatura máxima desse grupo foi considerada a temperatura de referência (T_{ref}) e usando a ferramenta *Solver* do programa Excel (Microsoft Office) foi possível minimizar a soma do desvio quadrático entre o modelo (equação 20) e os dados de atividade residual experimental, estimando os parâmetros (D_{ref} e z) para as enzimas.

$$\left(\frac{A}{A_0} \right)_{calculada} = 10^{-t_{equiv}/D_{ref}} \quad (20)$$

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Ensaios preliminares

4.1.1. Precisão do sensor de temperatura do forno de microondas focalizadas

Na Tabela 4.1 estão apresentados os valores de temperatura e de tempo programados e os valores de temperatura determinados para água destilada e água de coco com o auxílio de um termômetro de precisão de 0,1 °C, logo após a retirada da amostra do interior do forno de microondas focalizadas.

Tabela 4.1 - Valores de tempo e temperatura programados e da temperatura medida com o auxílio de um termômetro tanto para água destilada quanto para água de coco submetidas ao aquecimento no interior do forno de microondas focalizadas.

Amostras	Tempo programado	Temperatura programada	Temperatura medida com o termômetro
Água destilada			
A	45 segundos	60 °C	80 °C
B	1 minuto	60 °C	70 °C
C	2 minutos	60 °C	69 °C
D	5 minutos	60 °C	65 °C
Água de Coco			
E	26 segundos	50 °C	81 °C
F	1 minuto	40 °C	62 °C
G	8 minutos	65 °C	70 °C

Tanto para a água destilada como para a água de coco, as temperaturas medidas pelo termômetro foram superiores às aquelas programadas pelo sensor de temperatura do forno de microondas. Sabe-se que o sensor não está localizado na parte interna do frasco de vidro, assim, este instrumento não detecta as rápidas elevações da temperatura na amostra decorrentes do aquecimento dielétrico originado da incidência das microondas.

Estes resultados demonstram a necessidade descrita por outros pesquisadores (DENG; SINGH; LEE, 2003; GENTRY; ROBERTS, 2004; HEDDLESON; DOORES, 1994; SOYSAL; SOYLEMEZ, 2005) de utilizar um sensor de temperatura de fibra óptica, pois este

é inerte à incidência das microondas e por permanecer em contato direto com a amostra é possível obter os perfis de temperatura (°C) x tempo (s) mais precisos.

Para as amostras de água de coco (E) e (F) foram realizadas análises físico – químicas e medida da atividade residual das enzimas POD e PFO.

A água de coco *in natura* apresentou pH de $5,16 \pm 0,00$, acidez $0,084 \pm 0,009$ % expressa como ácido málico e sólidos solúveis $5,48 \pm 0,14$ °Brix.

Os resultados da atividade residual das enzimas submetidas às microondas estão apresentados na Tabela 4.2 assim como os valores para a água de coco pasteurizada em processo térmico convencional por batelada, TCB, determinados por Murasaki e Tadini (2002).

Tabela 4.2 - Atividades residuais da PFO e da POD por microondas e TCB.

Processo	T_{máx} (°C)	t_{experimento} * (s)	t_{residência} ** (s)	Atividade Residual**** (PFO/PFO₀)	Atividade Residual**** (POD/POD₀)
Microondas	62	60	-	79,5 %	81,9 %
Microondas	62	60	-	88,3 %	107,9 %
Microondas	81	30	-	35,1 %	8,1 %
Microondas	81	30	-	34,9 %	6,0%
TCB	80	-	25,6	71,1 %	114,3 %
TCB	80	-	196,6	54,6 %	66,7 %
TCB	85	-	22,6	49,0 %	97,3 %
TCB	85	-	349,3	20,0%	33,3%
TCB	90	-	19,4	76,0%	75,0%
TCB	90	-	58,2	66,0 %	25,0 %

* Tempo requerido para atingir a temperatura máxima (T_{máx}) no processo por microondas

** Tempo de residência a temperatura máxima (T_{máx}) constante no processo por TCB

*** Atividade da enzima corrigida pela acidez e teor de sólidos solúveis (°Brix) da amostra

No processo por microondas, as amostras com temperaturas iniciais de 10° C atingiram 81 °C no intervalo de 30 s e apresentaram atividade residual para a POD inferior a 10 % e de aproximadamente 35 % para a PFO. Mesmo quando comparada às condições de temperatura e de tempo mais severas, aplicadas no processo TCB, essa condição se mostrou eficiente na inativação dessas enzimas. Uma das amostras que atingiu 62 °C em 1 min apresentou sobreativação da POD, fato também evidenciado por Murasaki e Tadini (2002) em processo por TCB.

4.1.2. Utilização do termômetro de fibra óptica

Sabendo da grande variação da temperatura que ocorre no interior do forno de microondas focalizadas foram realizados diversos testes com o sensor de fibra óptica, a fim de obter perfis reais de *temperatura x tempo* de processo. Foram programados tempos de 30 segundos, 1, 3 e 5 minutos e temperaturas de 40, 45 e 50 °C. Na Figura 4.1 estão apresentados os perfis obtidos para as seguintes condições programadas: (a) tempo de 5 minutos; temperaturas de 40, 45 e 50 °C e (b) tempo de 30 segundos; temperaturas de 40, 45 e 50 °C.

Figura 4.1. Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) da água destilada obtidos pelo sensor de fibra óptica nas seguintes condições programadas (a) tempo de 5 min para 40, 45 e 50 °C e (b) tempo de 30 s para 40, 45 e 50 °C.

Como já era esperado, os dados de temperatura determinados pelo sensor de fibra óptica, para todos os tempos pré-definidos, foram superiores aos valores programados e mostrados pelo painel de controle do equipamento. O tempo programado de 1 minuto apresentou perfis semelhantes aos obtidos com 30 segundos e o tempo de 3 minutos apresentou perfis próximos aos obtidos com 5 minutos, por isso não foram mostrados na figura.

Na Figura 4.1 (a) observa-se que além das temperaturas reais serem superiores às aquelas programadas, manteve-se uma coerência e reprodutibilidade dos perfis: para a condição programada a 50 °C a temperatura real foi de 70 °C e para a condição programada a 45 °C a temperatura real foi de aproximadamente 60 °C.

Na Figura 4.1 (b) a coerência e reprodutibilidade não foram observadas. As condições programadas de 50 e 45 °C apresentaram perfis semelhantes, atingindo temperaturas próximas a 90 °C. Esse resultado pode ser esclarecido considerando que o tempo programado para elevar a temperatura de aproximadamente 20 °C (ambiente) até a temperatura de 45 ou 50 °C foi muito curto, tornando intensa a incidência das microondas, controlada pelo próprio equipamento, e atingindo temperaturas bem superiores como foi observado.

A condição programada de 40 °C, para todos os tempos estudados, apresentou perfis muito distintos impossibilitando a reprodução dos mesmos. A causa da obtenção desses perfis não uniformes pode ser atribuída à baixa temperatura programada, já que o forno de microondas focalizadas foi construído para alcançar temperaturas elevadas.

Analisando principalmente os perfis das condições 45 e 50 °C da Figura 4.1 (a) notou-se que as microondas foram incididas sobre as amostras durante os primeiros 100 s (1,5 min), alcançando a temperatura máxima. Após esse período, não foi observada a incidência das microondas no interior da cavidade do forno e a temperatura monitorada pelo sensor de fibra óptica começou a decrescer. Ao final dos 300 s o frasco foi retirado do forno e imerso em um béquer com gelo e água, acelerando o decréscimo da temperatura. Diante desse resultado, tomou-se a iniciativa de retirar o frasco da cavidade do forno de microondas logo após o alcance da máxima temperatura e posteriormente conduzi-lo rapidamente ao banho de gelo e água.

A partir desses perfis foram escolhidos o tempo de 5 minutos e as temperaturas programadas acima de 45 °C como condições iniciais para os experimentos em processo descontínuo, realizados com as soluções simuladas e a água de coco.

4.2. Ensaios com as soluções simuladas – parte A

Para esses ensaios 1 mL da solução estoque de PFO e POD foi diluído em 300 e 200 mL de solução, respectivamente e submetidas à incidência das microondas focalizadas. Para cada perfil de *temperatura x tempo* obtido para as soluções simuladas foram coletadas amostras para as análises da atividade residual das enzimas.

4.2.1. Polifenoloxidase/água destilada

Os primeiros ensaios foram realizados para a solução PFO/água destilada na temperatura programada de 60 °C. Na Figura 4.2 estão mostrados os perfis obtidos para essa condição.

Figura 4.2. (a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução PFO/água destilada, na condição programada de 60 °C sem controle da temperatura antes e depois da incidência das microondas; (b) com controle da temperatura antes e depois da incidência das microondas.

Na Figura 4.2 (a) apresenta-se um exemplo do que ocorreu com as primeiras soluções submetidas às microondas. As temperaturas iniciais e a do béquer com gelo e água não foram controladas e os perfis mostraram-se heterogêneos. Monitorando a temperatura inicial e mantendo sempre constante a temperatura no interior do béquer, conseguiu-se obter perfis semelhantes para a mesma condição, como se observa na Figura 4.2 (b).

Na Tabela 4.3 estão apresentados os valores médios encontrados para a atividade residual da enzima (A/A_0), as temperaturas máximas de cada perfil ($T_{\text{máx}}$) e o tempo equivalente (t_{equiv}) determinado a partir da consideração do valor de z igual a 15 °C. Os valores da atividade residual da PFO em solução aquosa estão apresentados em função do tempo equivalente (s) na Figura 4.3.

Tabela 4.3 - Valores médios da atividade residual da PFO, temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente para a solução PFO/água.

Amostras	(A/A_0) (%)	$T_{\text{máx}}$ (°C)	t_{equiv} (s) a 78,91 °C
1	$9,2 \pm 2,1$	69,19	8,66
2	$8,2 \pm 0,7$	71,35	19,24
3	$7,5 \pm 0,7$	73,20	14,09
4	$9,6 \pm 0,2$	75,62	24,21
5	$7,4 \pm 1,3$	77,31	23,28
6	$6,4 \pm 0,4$	78,91	25,74

Figura 4.3. Atividade residual x tempo equivalente (s) a 78,91 °C para a solução PFO/água destilada.

Observa-se na Tabela 4.3 que os valores encontrados para a atividade residual estiveram entre 6 e 11 % para a PFO em água submetida a essas condições de processo. Todas as amostras submetidas às microondas nessa condição apresentaram 90 % de redução da atividade inicial da enzima, como mostrado na Figura 4.3.

4.2.2. Polifenoloxidase /açúcares em água destilada

Três ensaios foram realizados para a solução PFO/açúcares, na condição programada de 60 °C apresentando os perfis que estão na Figura 4.4 (a). Na Figura 4.4 (b) estão os valores da atividade residual em função do tempo equivalente (s).

Figura 4.4. (a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução PFO/açúcares, na temperatura programada de 60 °C; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s) a 75,56 °C, para a mesma condição.

As amostras da PFO em solução com açúcares também apresentaram reduções de 90 % da atividade inicial da enzima, quando submetidas às microondas. Na Figura 4.5 (a) estão os perfis de *temperatura (°C) x tempo (s)* para a solução PFO/açúcares na condição programada de 50 °C e na (b) a atividade residual em função do tempo equivalente a 70,94 °C.

Figura 4.5. (a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução PFO/açúcares, na temperatura programada de 50 °C; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s) a 70,94 °C, para a mesma condição.

Na Tabela 4.4 apresentam-se os valores médios encontrados para a atividade residual da enzima nas duas condições de temperatura programadas (50 e 60 °C), as temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente determinado a partir da consideração do valor de *z* igual a 15°C.

Tabela 4.4 - Valores médios da atividade residual da PFO, temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente para a solução PFO/açúcares.

Temperatura programada de 60 °C			
Amostras	(A/A₀) (%)	T_{máx} (°C)	t_{equiv} (s) a 75,56 °C
1	4,9 ± 0,5	74,57	32,64
2	10,6 ± 0,8	75,56	24,82
3	9,6 ± 1,6	74,43	27,17
Temperatura programada de 50 °C			
Amostras	(A/A₀) (%)	T_{máx} (°C)	t_{equiv} (s) a 70,94 °C
4	13,1 ± 2,4	70,54	28,21
5	16,5 ± 4,3	70,94	28,44
6	19,1 ± 0,5	65,90	19,44

As soluções de PFO/açúcares submetidas às temperaturas entre 74,5 e 75,5 °C apresentaram atividades residuais entre 5 % e 11 % enquanto as amostras que permaneceram nas temperaturas mais baixas mostraram atividades residuais superiores. A amostra 1 é um exemplo de que não só a temperatura, mas também o tempo de processo influenciam significativamente na redução da atividade enzimática

Comparando a atividade das soluções PFO/água e PFO/açúcares, apresentadas nas Tabelas 4.3 e 4.4, observa-se que para o intervalo de temperatura de 69 °C a 79 °C houve redução de 90 % da atividade da enzima quando em contato com a água, enquanto que em solução com os açúcares a redução foi semelhante somente para temperaturas superiores a 74°C. Os açúcares podem estar atuando a favor da enzima protegendo-a contra a ação da energia eletromagnética. Na Tabela 4.5 estão apresentados os valores médios do pH, acidez titulável, sólidos solúveis e turbidez da solução simulada PFO/açúcares.

Tabela 4.5 - Valores médios do pH, acidez titulável, sólidos solúveis e turbidez da solução simulada PFO/açúcares em água destilada.

Solução PFO/açúcares	
pH	6,27 ± 0,02
Acidez ¹ (%)	0,022 ± 0,002
Sólidos Solúveis ² (° Brix)	4,88 ± 0,00
Turbidez (%)	3,37 ± 0,17

¹ Acidez titulável expressa em percentagem de ácido málico

² Teor de sólidos solúveis expresso em ° Brix corrigido pela temperatura e acidez

4.2.3. Polifenoloxidase/sais em água destilada

Na Figura 4.6 (a) estão apresentados perfis de *temperatura x tempo* obtidos para a solução PFO/sais para a temperatura programada de 60 °C e na 4.6 (b) a atividade residual da PFO nessa solução.

Figura 4.6. (a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução PFO/sais, na temperatura programada de 60 °C; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s) a 92,32 °C e 81,09 °C.

Os perfis de *temperatura x tempo* para a solução PFO/Sais, mostrados na Figura 4.6(a) quando comparados aos perfis das outras soluções simuladas apresentaram temperaturas máximas próximas a 90 °C, ou seja, um aumento de aproximadamente 15 °C nas mesmas condições de temperatura e de tempo programadas para as outras soluções. A

explicação para esse aumento da temperatura se dá pela presença dos sais dispersos na solução que intensificam a condução iônica, sendo esta considerada um dos principais mecanismos de transformação de energia eletromagnética em calor, resultando em um aumento na geração de calor.

Na Tabela 4.6 apresentam-se os valores médios encontrados para a atividade residual da enzima, as temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente, determinado a partir da consideração do valor de z igual a 15°C . Valores de pH e acidez encontrados para essa solução simulada estão na mesma tabela. Turbidez e sólidos solúveis foram determinados e os resultados foram nulos para ambas as análises.

Tabela 4.6 - Valores médios da atividade residual da PFO, temperaturas máximas de cada perfil, tempo equivalente, pH e acidez para a solução PFO/sais.

Amostras	(A/A₀) (%)	T_{máx} (°C)	t_{equiv} (s) a 92,32 °C
1	36,4 ± 3,1	89,27	23,68
2	38,6 ± 3,6	91,64	28,44
3	35,4 ± 0,2	92,32	34,40
Amostras	(A/A₀) (%)	T_{máx} (°C)	t_{equiv} (s) a 81,09 °C
4	86,8 ± 4,2	77,22	17,63
5	67,2 ± 8,1	81,09	30,72
pH	5,03 ± 0,01		
¹ Acidez (%)	0,044 ± 0,005		

¹Acidez titulável expressa em percentagem de ácido málico

As amostras da solução PFO/sais mesmo atingindo temperaturas próximas a 90°C apresentaram reduções mais brandas na atividade da enzima, resultando em atividades residuais em torno de 35 % a 40 %. Condições de processo que atingiram temperaturas máximas abaixo de 82°C apresentaram atividades residuais acima de 60 %. Esse resultado foi contrário do que se esperava, principalmente quando se faz uma comparação com os resultados encontrados por Campos et al. (1996), Duangmal e Apentem (1999), Mendonça e Guerra (2003) e Zawistowsky, Biliaderis e Eskin (1991) que reportaram aos sais o efeito de inibidores enzimáticos.

Sendo a atividade residual (A/A₀) a razão da atividade enzimática a qualquer tempo (A) pela atividade enzimática no tempo zero (A₀), (e sendo A₀ a amostra coletada antes de ser submetida às microondas), observou-se uma concentração enzimática menor de A₀ para todas

as soluções de PFO/sais. A hipótese de erro na formulação da solução foi desconsiderada uma vez que vários testes foram realizados, inclusive retirando da mesma solução estoque de PFO concentrada, uma alíquota para a solução PFO/água e outra para a solução PFO/sais. Novamente a solução PFO/sais apresentou valores de atividade menores como apresentado nas Figuras 4.7 (a) e (b). Na Figura 4.7 (a) estão apresentadas às curvas das atividades enzimáticas iniciais (A_0) obtidas para a solução PFO/sais e na (b) as curvas das atividades enzimáticas para a solução PFO/água. A atividade da PFO foi determinada pelo aumento da absorbância a 425 nm com o tempo.

Figura 4.7. (a) Atividades enzimáticas iniciais (A_0) para a solução PFO/sais; (b) para a solução PFO/água.

Na Figura 4.7 (a) o valor médio encontrado para a atividade enzimática inicial da solução PFO/sais foi de aproximadamente $2,42 \times 10^{-5} \text{ U.mL}^{-1}.\text{s}^{-1}$, enquanto para a solução

PFO/água, Figura 4.7 (b), o valor médio foi de $2,23 \times 10^{-4} \text{ U.mL}^{-1}.\text{s}^{-1}$. A comparação dos valores médios obtidos para as duas soluções mostra uma atividade 10 vezes menor para a PFO quando em contato com os sais.

Os resultados da atividade residual da PFO, apresentados na Figura 4.7 (a) ou na Tabela 4.6, sugerem uma interpretação equivocada. Neste caso, não houve somente a ação das microondas, mas também dos sais presentes na solução. Como o contato dos sais com a enzima já promoveu uma diminuição da atividade da PFO, o efeito das microondas tornou-se secundário e mínimas diferenças na leitura da absorbância foram apresentadas pelas amostras submetidas à ação das microondas quando comparadas às amostras não submetidas.

Os sais que constituem a solução simulada podem estar exercendo o papel de inibidores, como já relatado por vários autores. Segundo Duangmal e Apenten (1999) o cloreto de sódio (NaCl) interage com o cobre localizado no centro ativo da enzima promovendo a sua inibição. Os agentes sulfitantes, como o dióxido de enxofre, bissulfito e metabissulfito de potássio e de sódio, são os mais efetivos na inibição da PFO, atuam na formação de um complexo quinona-sulfito prevenindo a polimerização das quinonas e também diretamente sobre a enzima, resultando em um complexo enzimaticamente inativo (MENDONÇA; GUERRA, 2003; ZAWISTOWSKY; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

4.2.4. Peroxidase /água destilada

Nove perfis foram obtidos para a solução POD/água e alguns estão apresentados na Figura 4.8 (a) para ilustrar a diferença de temperatura entre eles. Valores da *Atividade residual x tempo equivalente* também podem ser observados na Figura 4.8 (b). Na Tabela 4.7 apresentam-se os valores médios encontrados para a atividade residual da enzima, as temperaturas máximas de cada perfil, o tempo equivalente e os valores de pH e de acidez titulável para essa solução.

Figura 4.8. (a) Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução POD/água; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s) a 80,24 e 69,89 °C.

Tabela 4.7 - Valores médios da atividade residual da POD, temperaturas máximas de cada perfil, tempo equivalente, pH e acidez para a solução POD/água determinado a partir da consideração do valor de z igual a 15°C.

Amostras	(A/A₀) (%)	T_{máx} (°C)	t_{equiv} (s) a 80,24 °C
1	14,5	75,06	8,35
2	10,2	80,24	15,87
3	14,8	75,70	8,56
Amostras	(A/A₀) (%)	T_{máx} (°C)	t_{equiv} (s) a 69,89 °C
4	41,0 ± 0,1	68,68	43,25
5	56,7 ± 0,1	69,89	32,53
6	68,9 ± 0,1	65,36	16,93
7	64,8 ± 0,1	64,27	15,84
8	69,8 ± 0,1	51,19	2,69
9	107,7 ± 0,0	45,83	1,79
pH	6,32 ± 0,12		
Acidez ¹ (%)	0,028 ± 0,008		

¹ Acidez titulável expressa em percentagem de ácido málico

Comparando aos resultados da PFO/água, a POD se mostrou mais resistente à ação das microondas em condições de temperatura similares. Para as amostras submetidas à temperatura de aproximadamente 46 °C ocorreu a sobreativação da enzima, fato esse evidenciado nos ensaios preliminares apresentados na Tabela 4.2 e também por Campos et al. (1996) na temperatura de processo de 35 °C com amostras de água de coco acondicionadas em tubos de vidro e inseridas em banho de água termostatizado. Esse resultado não foi inesperado, pois, a metodologia que utiliza o guaiacol como substrato para reagir com a POD define a temperatura de 35 °C como a temperatura ótima para a máxima atividade da enzima.

Outros autores relataram a reativação da POD após o tratamento térmico. Lu e Whitaker (1974) submeteram amostras de POD extraída de raiz forte a diferentes condições de tempo e temperatura em banho termostatizado e observaram a influência do tratamento térmico combinado com outros parâmetros como pH e força iônica sobre a inativação e reativação enzimática. A inativação parcial da POD ocorreu a 76 °C, pH 7,0, com uma rápida regeneração da enzima a medida que houve o decréscimo da temperatura para 20-35 °C. Os estudos de Gibriel et al. (1978) mostraram a reativação da POD em cenouras após ser processada a 70 °C por diferentes períodos de tempo. A reativação foi maior quanto menor o

período de exposição ao tratamento térmico e a recuperação máxima da atividade ocorreu depois de 1 a 2 horas de armazenamento. Extratos armazenados a -5°C mostraram maior reativação enzimática quando comparados com as amostras armazenadas a 4 ou 18°C . Para todos os casos, após 4 horas de armazenamento a atividade da POD foi igual ou superior a atividade inicial, antes do aquecimento.

4.2.5. Peroxidase /açúcares em água destilada

Na Figura 4.9 estão apresentados os perfis obtidos para a solução POD/açúcares e a atividade residual da POD em função do tempo equivalente.

Figura 4.9. (a) Perfis de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) x tempo (s) para a solução POD/açúcares; (b) Atividade residual x tempo equivalente (s).

Na Figura 4.9 (b) observa-se que nas condições de temperatura e de tempo estudadas a redução da atividade da POD foi menor que 90 %. Na Tabela 4.8 apresentam-se os valores médios encontrados para a atividade residual da enzima, as temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente determinado a partir da consideração do valor de z igual a 15 °C.

Tabela 4.8 - Valores médios da atividade residual da POD, temperaturas máximas de cada perfil e o tempo equivalente para a solução POD/açúcares.

Amostras	(A/A ₀) (%)	T _{máx} (°C)	t _{equiv} (s) a 76,60 °C
1	15,2 ± 1,6	76,60	29,84
2	23,7 ± 0,3	76,10	29,18
3	22,0 ± 4,4	69,75	34,53

Campos et al. (1996) e Murasaki e Tadini (2002) mostraram que a POD presente na água de coco apresenta atividade residual inferior a PFO, nas mesmas condições de processo. Sabe-se que as enzimas utilizadas nas soluções simuladas não foram extraídas da água de coco e, em especial, a POD foi extraída da raiz forte que tem sido extensivamente estudada por apresentar alta estabilidade térmica (CHANG; PARK; LUND, 1988; LEMOS; OLIVEIRA; SARAIVA, 2000; LU; WHITAKER, 1974; ROBINSON, 1991). Neste estudo a POD se mostrou mais resistente às microondas do que a PFO. Na Tabela 4.9 estão apresentados os valores médios obtidos para as análises de pH, acidez titulável, sólidos solúveis e turbidez da solução simulada POD/açúcares.

Tabela 4.9 – Valores de pH, acidez, teor de sólidos solúveis e turbidez da solução simulada POD/açúcares em água destilada.

Solução POD/Açúcares	
pH	5,96 ± 0,08
Acidez ¹ (%)	0,023 ± 0,003
Sólidos Solúveis ² (° Brix)	4,02 ± 0,00
Turbidez (%)	1,26 ± 0,06

¹ Acidez titulável expressa em percentagem de ácido málico

² Teor de sólidos solúveis expresso em ° Brix corrigido pela temperatura e acidez

4.2.6. Peroxidase /sais em água destilada

Na Figura 4.10 são apresentados os perfis de *temperatura (°C) x tempo (s)* da solução POD/sais.

Figura 4.10. Perfis de temperatura (°C) x tempo (s) para a solução POD/sais.

Entre todas as soluções com POD, os perfis da solução POD/sais foram aqueles que alcançaram as temperaturas mais elevadas, em torno de 90 °C. Esse resultado foi análogo ao observado para a solução PFO/Sais, comentado anteriormente.

Na Figura 4.11 estão apresentadas as leituras de absorbância a 460 nm com o tempo para a solução POD/sais. A leitura da absorbância permaneceu constante ao longo do tempo, mostrando a completa inativação da POD. Os valores da atividade inicial (A_0) ficaram em torno de $1,00 \times 10^{-5} \text{ U.mL}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

Figura 4.11. Absorbância a 460 nm x tempo (s) para a solução POD/sais.

Lu e Whitaker (1974) observaram uma diminuição considerável na termoestabilidade da POD, extraída da raiz forte, na presença de cloreto de sódio (NaCl). Esse decréscimo foi atribuído a uma mudança conformacional da enzima o que ocasionou, possivelmente, a dissociação das moléculas termoestáveis. Gibriel et al. (1978) também observaram que concentrações de cloreto de sódio (NaCl) acima de 0,6 M em contato com a POD proveniente de extratos de cenoura, espinafre e damasco reduziram significativamente a atividade da enzima.

Os sais utilizados neste trabalho podem estar exercendo o mesmo papel do NaCl ou dos agentes sulfítantes, como mencionado anteriormente, e modificando a conformação da POD fazendo com que esta sofra uma diminuição significativa na sua atividade.

O efeito combinado das microondas com os sais permitiram a inativação completa da POD. Os valores de absorbância foram muito baixos, na ordem da precisão do espectrofotômetro que é de 0,003. As pequenas oscilações, também evidenciadas nas leituras, muito provavelmente estão relacionadas à precisão do equipamento.

Na Tabela 4.10 apresentam-se os valores médios de pH e acidez para a solução POD/sais submetida às microondas.

Tabela 4.10- Valores de pH e acidez da solução simulada POD/sais submetida às microondas.

Solução POD/sais	
pH	$5,00 \pm 0,00$
Acidez ¹ (%)	$0,076 \pm 0,007$

¹ Acidez titulável expressa em percentagem de ácido málico

4.3 Ensaios com as soluções simuladas – parte B

4.3.1. Estudo da influência dos substratos sobre as enzimas

No decorrer das análises realizadas para a enzima PFO, verificou-se que o substrato catecol poderia interferir na leitura da absorbância com o tempo. Ensaios utilizando somente o catecol e a solução tampão foram realizados e os resultados da atividade foram comparados com as soluções simuladas como mostra a Figura 4.12.

Figura 4.12. Atividade inicial das soluções PFO/água; PFO/açúcares; PFO/sais e a oxidação do catecol.

Mesmo sem a presença da enzima, um aumento da absorbância em função do tempo foi observado e atribuído exclusivamente à oxidação do catecol. As soluções simuladas PFO/água e PFO/açúcares apresentaram atividades iniciais na ordem de $1,4 \times 10^{-4} \text{ U.mL}^{-1}.\text{s}^{-1}$, enquanto que a solução PFO/sais apresentou atividade inicial mais baixa, na ordem de $3,2 \times 10^{-5} \text{ U.mL}^{-1}.\text{s}^{-1}$, próxima da oxidação do catecol, podendo acarretar erros na

interpretação dos resultados, ou seja, superestimando os valores da atividade residual da solução PFO/Sais.

Para minimizar a influência da oxidação do catecol novos experimentos foram realizados com concentração maior de PFO (1 mL da solução estoque foi diluída em 100 mL de água destilada) nas soluções simuladas. Ensaio com soluções de POD também foram repetidos com maior concentração de enzima (1 mL da solução estoque foi diluída em 80 mL de água destilada), para posteriormente comparar a eficiência do tratamento térmico por microondas frente à atividade de ambas as enzimas.

Figura 4.13. Absorvância a 425 nm x tempo (s) para a solução com maior quantidade de enzima PFO/sais e a oxidação do catecol.

A solução PFO/sais apresentou atividade inicial na ordem de $9,1 \times 10^{-4} \text{ U.mL}^{-1}.\text{s}^{-1}$, tornando desprezível a influência da oxidação do catecol sobre os resultados, como mostrado na Figura 4.13.

Na Figura 4.14 estão apresentadas as curvas da atividade enzimática de ensaios realizados com os substratos guaiacol e ABTS utilizados para a medida da atividade da peroxidase. Os ensaios foram feitos com a solução mais concentrada de POD/Água, sendo a enzima comercial retirada da mesma solução estoque para minimizar possíveis alterações externas.

Figura 4.14. Ensaio da medida da atividade inicial da POD com os substratos guaiacol e ABTS.

A metodologia descrita por Ferhmann e Diamond (1967) e adaptada por Campos et al. (1996), determina a relação 1,0 mL de amostra para 1,5 mL de solução de guaiacol e segundo Pütter e Becker (1983), deve-se adicionar 1 mL da amostra para cada 0,8 mL da solução de ABTS.

A atividade da POD normalmente é determinada pela diminuição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou pela formação de compostos oxidados. Na Figura 4.14 foram encontrados valores da atividade inicial média da POD com o ABTS de $2,285 \cdot 10^{-3} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ e de $7,058 \cdot 10^{-4} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ com o substrato guaiacol. A atividade da enzima com o substrato ABTS foi três vezes maior quando comparada à reação com o guaiacol. Pütter e Becker (1983) já haviam estudado a utilização de vários substratos para a determinação da POD, entre eles o guaiacol e o ABTS, e descreveram este último como aquele que fornece um produto final mais estável, resultando em dados mais precisos e coerentes. Já na oxidação do guaiacol, constataram a formação de mais de um produto o que gera dificuldades e incertezas nos resultados obtidos.

Considerando os resultados mostrados na Figura 4.14 foram realizados novos ensaios com as soluções simuladas sendo o substrato ABTS o escolhido para a determinação da atividade da POD.

4.3.2. Inativação da PFO nas soluções simuladas (PFO/água, PFO/açúcares, PFO/sais e PFO/açúcares/sais)

As soluções PFO/água, PFO/açúcares, PFO/sais e PFO/açúcares/sais foram submetidas ao tratamento térmico por microondas em diversas condições de temperatura. Na Tabela 4.11 estão apresentados os valores da atividade residual da PFO para as soluções simuladas contendo concentração mais alta dessa enzima ($1,7 \times 10^{-6}$ g PFO/mL de solução) e a temperatura máxima alcançada em cada processo.

Tabela 4.11 – Valores da atividade residual da PFO nas soluções simuladas e a temperatura máxima alcançada em cada condição de processo descontínuo quando submetidas à incidência das microondas.

Solução Simulada PFO/água ¹			Solução Simulada PFO/açúcares ²		
Amostras	Atividade residual (%)	Temperatura máxima (°C)	Amostras	Atividade residual (%)	Temperatura máxima (°C)
1	2,16 ± 0,46	74,12	1	2,49 ± 0,09	74,35
2	3,14 ± 0,17	76,53	2	3,24 ± 0,12	75,60
3	0,80 ± 0,05	81,97	3	1,33 ± 0,20	78,29
4	0,22 ± 0,03	82,10	4	1,12 ± 0,01	79,85
5	0,34 ± 0,06	80,97	5	0,28 ± 0,01	82,65
6	0,21 ± 0,01	86,84	6	0,32 ± 0,05	83,04
7	0,21 ± 0,03	84,64	7	0,18 ± 0,03	83,14
8	0,29	85,33	8	0,20 ± 0,01	84,34
9	0,20 ± 0,07	90,90	9	0,16 ± 0,02	89,99
10	0,17 ± 0,04	91,73	10	0,29 ± 0,04	91,11
11	0,20 ± 0,04	92,92			

Tabela 4.11 – (Continuação) Valores da atividade residual da PFO nas soluções simuladas e a temperatura máxima alcançada em cada condição de processo descontínuo quando submetidas à incidência das microondas.

Solução Simulada PFO/sais ³			Solução Simulada PFO/açúcares/sais ⁴		
Amostras	Atividade residual (%)	Temperatura máxima (°C)	Amostras	Atividade residual (%)	Temperatura máxima (°C)
1	15,28 ± 0,86	64,26	1	13,76 ± 1,49	70,11
2	4,30 ± 0,28	69,11	2	3,59 ± 0,66	72,93
3	3,08 ± 0,52	71,74	3	3,19 ± 0,37	75,67
4	2,98 ± 0,72	73,42	4	1,77 ± 0,08	81,92
5	1,37 ± 0,14	80,81	5	0,80 ± 0,04	83,41
6	1,21 ± 0,11	84,07	6	0,69 ± 0,18	85,66
7	0,86 ± 0,01	87,11	7	ND	96,12
8	1,64 ± 0,04	89,65	8	ND	96,24
9	ND	97,43	9	ND	96,47
10	ND	97,49	10	ND	97,18
11	ND	98,52	11	ND	98,68
12	ND	99,22			

¹ pH 6,7 ± 0,1; acidez (0,026 ± 0,005) expressa em percentagem de ácido málico

² pH 6,5 ± 0,2; acidez (0,027 ± 0,007) expressa em percentagem de ácido málico e (4,53 ± 0,15) °Brix

³ pH 5,0 ± 0,0; acidez (0,065 ± 0,004) expressa em percentagem de ácido málico

⁴ pH 5,0 ± 0,1; acidez (0,068 ± 0,005) expressa em percentagem de ácido málico e (4,86 ± 0,38) °Brix

ND Atividade não detectada

A partir dos perfis de *temperatura x tempo* das soluções simuladas (PFO/água e PFO/açúcares) e da atividade residual das enzimas foi possível determinar os parâmetros tempo de redução decimal (D) e o valor de z. Na Tabela 4.12 são apresentados os valores da temperatura máxima de cada ensaio ($T_{\text{máx}}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}), determinado a partir da letalidade acumulada (eq. 19), e valores de D determinados para cada solução.

Tabela 4.12- Temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}) e valor de D para as soluções PFO/água e PFO/açúcares.

PFO/água				PFO/açúcares			
$T_{\text{máx}}$ (°C)	T_{ref} (°C)	t_{equiv} (s)	D* (s)	$T_{\text{máx}}$ (°C)	T_{ref} (°C)	t_{equiv} (s)	D* (s)
74,1	76,5	78,7	48	74,4	75,6	68,3	51
76,5		74,4		75,6		86,1	
81,0	82,1	70,0	33	78,3	79,8	76,1	41
82,0		81,7		79,8		83,0	
82,1		85,4					
	86,8		27	82,6	84,3	63,5	26
84,6		66,6		83,0		75,1	
85,3		71,0		83,1		67,5	
86,8		72,6		84,3		70,4	
90,9	92,9	44,6	16	90,0	91,1	50,4	18
91,7		44,9		91,1		46,6	
92,9		45,8					

(*) determinado de acordo com a Fig. 3.8

Nas Figuras 4.15 (a) e 4.16 (a) estão apresentados os resultados da atividade residual da PFO quando em contato com solução aquosa ou em solução com açúcares em função do tempo equivalente para várias condições de temperatura. Através da regressão linear valores de D para diferentes temperaturas foram obtidos e através do cálculo iterativo esquematizado na Figura 3.8 obteve-se o valor de z (Figuras 4.15 (b) e 4.16 (b)).

Figura 4.15. (a) Atividade residual da PFO em solução aquosa x tempo equivalente a diferentes temperaturas submetida ao aquecimento por microondas; (b) Valor de D da PFO em solução aquosa x temperatura (°C).

Figura 4.16. (a) Atividade residual da PFO em solução com açúcares x tempo equivalente a diferentes temperaturas quando submetida ao aquecimento por microondas; (b) Valor de D da PFO em solução com açúcares x temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

O decréscimo da atividade residual da PFO em função do tempo equivalente apresentado nas Figuras 4.15 (a) e 4.16 (a) mostrou que para temperaturas próximas a 80°C ocorreu redução de 2 décadas logarítmicas, enquanto que para temperaturas superiores houve redução de até 3 décadas. Obedecendo a inativação térmica de 1ª ordem, os valores de z encontrados para as soluções PFO/água e PFO/açúcares foram muito próximos $D_{3^{\circ}\text{C}} = 16\text{ s}$ ($z = 35,5^{\circ}\text{C}$) e $D_{91^{\circ}\text{C}} = 18\text{ s}$ ($z = 33,0^{\circ}\text{C}$), respectivamente, como apresentados nas Figuras 4.15 (b) e 4.16 (b).

Weemaes et al. (1997) determinaram os parâmetros cinéticos (D e z) para a PFO extraída de cogumelo, quando submetida ao tratamento térmico convencional. Os resultados mostraram inativação irreversível e de 1ª ordem. Os ensaios realizados em processo descontínuo (banho de água termostatizado) com quantidade de enzima (3900 unidades de enzima/mg) similar a que foi utilizada neste trabalho, apresentaram valores de $D_{53^{\circ}\text{C}} = 55 \text{ min}$ ($z = 6,52^{\circ}\text{C}$).

Weemaes et al. (1998) também determinaram os parâmetros cinéticos para a PFO extraída de maçã, abacate, ameixa, uva e pêra. Para todos os casos a máxima atividade detectada foi entre pH 6 e 7 e a inativação da PFO seguiu a cinética de 1ª ordem quando submetida ao banho termostatizado, exceto para os extratos de maçã e pêra que apresentaram comportamentos não lineares para a faixa de temperatura estudada. Para a PFO em maçã foi encontrado $z = 20,08 \pm 0,75^{\circ}\text{C}$ para temperaturas inferiores a $72,5^{\circ}\text{C}$ e para temperaturas superiores z foi igual a $5,44 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$. Temperaturas menores que 75°C apresentaram valor de $z = 18,90 \pm 1,38^{\circ}\text{C}$ para PFO de extrato de pêra e para temperaturas acima de 75°C , o valor de z foi igual a $8,07 \pm 0,36^{\circ}\text{C}$.

Duangmal e Apentem (1999) adicionaram soluções de PFO presente em batatas e inhame em tubos de *epENDORF* e submeteram essas soluções a diferentes temperaturas em banho de água termostatizado, resultando em uma inativação parcial (70 %) da PFO quando submetida a 60°C por 10 min e a 70°C pelo mesmo período constataram a inativação completa e irreversível.

Chutintrasri e Noomhorm (2006) avaliaram o efeito da temperatura e do tempo de exposição sobre a atividade da PFO em polpa de abacaxi. O tratamento térmico foi conduzido em banho de água termostatizado nas temperaturas entre 40 e 90°C , por períodos de 0 a 30 min. A atividade inicial da PFO foi reduzida para aproximadamente 60 % após a exposição por 30 min nas temperaturas entre 40 e 60°C . A desnaturação evoluiu rapidamente para temperaturas acima de 75°C e constataram 7 % de atividade residual após 5 min a 85°C e apenas 1,2 % após 5 min a 90°C .

Os resultados do processamento térmico por microondas quando comparados aos reportados em literatura (tratamento térmico convencional) mostraram que mesmo em condições não isotérmicas e com menor tempo de exposição houve uma redução similar ou maior da atividade residual da enzima, o que confere ao processamento térmico por microondas uma ação efetiva sobre a inativação da PFO.

Na Figura 4.17 são apresentados os perfis de temperatura para as soluções simuladas da PFO submetidas à incidência das microondas nas mesmas condições de processo.

Figura 4.17. Perfis de temperatura x tempo para as soluções com PFO.

As soluções contendo somente água e açúcares atingiram temperaturas próximas a 75 °C enquanto que as soluções contendo sais apresentaram temperaturas mais altas, na faixa de 80 a 90 °C. Esses perfis confirmam os resultados obtidos nos ensaios anteriores mostrando que os sais quando submetidos a um campo eletromagnético colidem com outros íons e moléculas não ionizadas causando geração de calor por fricção, exercendo assim grande influência na elevação da temperatura (HEDDLESSON et al., 1994; MUDGETT, 1986).

Na Tabela 4.13 são apresentados os valores da temperatura máxima de cada ensaio ($T_{\text{máx}}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}), determinado a partir da letalidade acumulada (eq. 19), e valores D determinados para as soluções PFO/sais e PFO/açúcares/sais.

Tabela 4.13 - Temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}) e valor de D para as soluções PFO/sais e PFO/açúcares/sais.

PFO/sais				PFO/açúcares/sais			
$T_{\text{máx}}$ (°C)	T_{ref} (°C)	t_{equiv} (s)	D_I^* (s)	$T_{\text{máx}}$ (°C)	T_{ref} (°C)	t_{equiv} (s)	D_I^* (s)
64,3	73,4	11,3	10	70,1	75,7	16,9	18
69,1		19,0		72,9		30,3	
71,7		33,2		75,7		42,9	
73,4		44,4					
80,8	89,6	14,2	14	81,9	85,7	26,7	20
84,1		22,6		83,4		41,8	
87,1		32,7		85,7		50,8	
89,6		38,3					
97,4	99,2	46,0	-	96,2	98,7	36,2	-
97,5		55,7		96,5		39,1	
98,5		22,8		97,2		19,7	
99,2		29,9		98,7		26,1	

D_I^* valor de D da fração termolábil, determinado a partir da Fig. 3.8.

Na Figura 4.18 (a) e (b) estão apresentados os resultados da atividade residual da PFO quando em contato com sais e em solução com açúcares e sais em função do tempo equivalente para várias condições de temperatura. Da regressão linear da atividade residual *versus* tempo equivalente, foram obtidos os valores de D através do cálculo iterativo esquematizado na Figura 3.8.

Figura 4.18. Atividade residual da PFO em solução com sais (a) e em solução com açúcares/sais (b) em função do tempo equivalente a diferentes temperaturas quando submetida ao aquecimento por microondas.

Para as duas soluções apresentadas na Figura 4.18 foi observado um comportamento diferenciado da PFO quando comparada com as soluções aquosa e com açúcares. A redução da atividade enzimática não obedeceu à cinética de primeira ordem, sugerindo a existência de uma fração mais sensível (termolábil) e outra mais resistente à temperatura. Soluções de PFO com sais a 99,2 °C e com sais/açúcares a 98,7 °C não apresentaram atividade residual

detectável, por essa razão não foi possível obter os parâmetros cinéticos da fração mais sensível para essas soluções simuladas.

Ditchfield e Tadini (2006) estudaram a cinética de inativação da POD e PFO durante o processamento contínuo em trocador tubular para purê de banana nas condições de tempo de retenção de 2,5 a 5,3 s e temperaturas de 69,8 a 100,1 °C e constataram inativação bifásica, provavelmente devido à presença das duas frações de isoenzimas que obedecem à cinética de primeira ordem.

Valderrama, Marangoni e Clemente (2001) prepararam extratos de PFO e de POD a partir da polpa e da casca da maçã Fuji e Gala e submeteram ao tratamento térmico convencional nas temperaturas de 60, 65, 70 e 75 °C por períodos que variaram de 1 a 10 min. Durante o tratamento térmico dos extratos enzimáticos concentrados, observou-se um decréscimo quase contínuo da atividade da PFO em todas as temperaturas, tanto para os extratos da polpa quanto para os extratos da casca de ambos os cultivares. A análise da atividade da PFO frente ao tratamento térmico apresentou um comportamento não linear e a isoenzima foi totalmente inativada após 10 min de tratamento a 75 °C.

4.3.3. Inativação da POD nas soluções simuladas (POD/água, POD/açúcares, POD/sais e POD/açúcares/sais)

As soluções simuladas POD/água, POD/açúcares, POD/sais e POD/açúcares/sais foram submetidas ao tratamento térmico por microondas em diversas condições de temperatura. Na Tabela 4.14 estão apresentados os valores da atividade residual da POD para as soluções simuladas contendo concentrações mais altas dessa enzima ($9,7 \times 10^{-6}$ g POD/mL de solução) e a temperatura máxima alcançada em cada processo.

Tabela 4.14 – Valores da atividade residual da POD para as soluções simuladas e a temperatura máxima alcançada em cada condição de processo descontínuo quando submetidas à incidência das microondas.

Solução Simulada POD/água ¹			Solução Simulada POD/açúcares ²		
Amostras	Atividade residual (%)	Temperatura máxima (°C)	Amostras	Atividade residual (%)	Temperatura máxima (°C)
1	45,66 ± 3,66	76,4	1	85,74 ± 0,47	67,0
2	42,17 ± 1,43	77,4	2	82,26 ± 3,17	68,0
3	27,30 ± 1,20	81,5	3	40,17 ± 0,18	75,4
4	29,15 ± 2,05	83,9	4	45,14 ± 2,18	75,8
5	16,51 ± 0,43	88,5	5	12,70 ± 0,50	81,0
6	26,53 ± 3,25	91,5	6	8,76 ± 0,48	82,3
			7	5,82 ± 0,12	90,6
			8	3,33 ± 0,01	91,9
Solução Simulada POD/sais ³			Solução Simulada POD/sais/açúcares ⁴		
Amostras	Atividade residual (%)	Temperatura máxima (°C)	Amostras	Atividade residual (%)	Temperatura máxima (°C)
1	75,05 ± 20,58	57,1	1	45,30 ± 8,77	61,9
2	50,85 ± 2,62	62,7	2	26,46 ± 0,41	69,4
3	32,00 ± 4,38	72,2	3	26,20 ± 3,54	75,1
4	44,15 ± 0,64	77,1	4	22,20 ± 0,28	80,9
5	45,70 ± 0,71	80,3	5	2,66 ± 0,51	83,5
6	21,35 ± 0,07	85,9	6	6,07 ± 1,50	84,0
7	ND	95,2	7	3,55 ± 1,20	90,7
8	ND	95,4	8	ND	95,1
			9	ND	96,4

¹ pH 6,2 ± 0,1; acidez (0,024 ± 0,003) expressa em percentagem de ácido málico

² pH 6,3 ± 0,1; acidez (0,021 ± 0,004) expressa em percentagem de ácido málico e (4,53 ± 0,22) °Brix

³ pH 5,0 ± 0,0; acidez (0,048 ± 0,002) expressa em percentagem de ácido málico

⁴ pH 5,2 ± 0,1; acidez (0,068 ± 0,005) expressa em percentagem de ácido málico e (4,93 ± 0,14) °Brix

ND Atividade não detectada

Na Tabela 4.15 são apresentados os valores da temperatura máxima de cada ensaio ($T_{\text{máx}}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}), determinado a partir da letalidade acumulada (eq.19), e o valor de D determinado para as soluções POD/água e POD/açúcares.

Tabela 4.15 - Temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), temperatura de referência (T_{ref}), tempo equivalente (t_{equiv}) e valor de D para as soluções POD/água e POD/açúcares.

POD/água				POD/açúcares			
$T_{\text{máx}}$ (°C)	T_{ref} (°C)	t_{equiv} (s)	D^* (s)	$T_{\text{máx}}$ (°C)	T_{ref} (°C)	t_{equiv} (s)	D^* (s)
76,4	77,4	57,9	167	67,0	75,8	15,6	144
77,4		61,6		68,0		17,9	
				75,4		54,4	
				75,8		48,9	
81,5	83,9	41,4	93	81,0	82,3	50,8	54
83,9		57,7		82,3		50,9	
88,5	91,5	27,9	44	90,6	91,9	31,4	21
91,5		31,1		91,9		24,2	

(*) determinado de acordo com a Fig. 3.8

Nas Figuras 4.19 (a) e 4.20 (a) estão apresentados os valores de atividade residual da POD quando em contato com água e em solução com açúcares em função do tempo equivalente para várias condições de temperatura. Os valores de z, apresentados nas Figuras 4.19 (b) e 4.20 (b), foram determinados para a POD a partir de D *versus* temperatura.

Figura 4.19. (a) Atividade residual da POD em solução aquosa x tempo equivalente a diferentes temperaturas quando submetida ao aquecimento por microondas; (b) Valor de D da POD em solução aquosa x temperatura (°C).

Figura 4.20. (a) Atividade residual da POD em solução com açúcares x tempo equivalente a diferentes temperaturas quando submetida ao aquecimento por microondas; (b) Valor de D da POD em solução com açúcares x temperatura (°C).

A solução POD/Água apresentou pequeno decréscimo na atividade quando submetida ao aquecimento por microondas nas temperaturas estudadas, como mostra a Figura 4.19 (a). Nas mesmas condições de processo, a solução POD/Açúcares teve um decréscimo maior da atividade enzimática sugerindo a contribuição dos açúcares para a diminuição da atividade enzimática.

Chang, Park e Lund (1988) mostraram pela medida da atividade residual e por calorimetria diferencial de varredura (DSC) que dependendo do tipo de açúcar presente no meio e da concentração do mesmo pode haver maior ou menor desnaturação enzimática. Foram observados dois efeitos opostos da ação da sacarose sobre a POD (raiz forte). Para as curvas de inativação a 60 °C quanto maior a concentração de sacarose na solução maior foi a temperatura de desnaturação da proteína, demonstrando a ação protetora deste açúcar. Em compensação para a faixa de temperatura de 70 a 94 °C, soluções com baixa concentração de sacarose conferiram maior inativação térmica, resultado também relatado por Gibriel et al. (1978) no estudo com a POD presente em damasco.

Açúcares redutores como frutose e glicose também foram estudados e os resultados apontaram para uma perda da termoestabilidade da POD. A interação desses açúcares com aminoácidos residuais pode influenciar a conformação do sítio ativo da enzima durante o tratamento térmico e esse efeito não se restringe somente a POD (CHANG; PARK; LUND, 1988).

Os valores de D e z encontrados para as soluções POD/Água e POD/Açúcares seguiram a cinética de 1ª ordem e foram respectivamente $D_{91,5^{\circ}\text{C}} = 44 \text{ s}$ ($z = 24,0^{\circ}\text{C}$) e $D_{92^{\circ}\text{C}} = 20,5 \text{ s}$ ($z = 19,5^{\circ}\text{C}$). Apresentaram comportamentos similares entre si, monofásicos e quando comparados aos dados de literatura, os valores de z foram da mesma ordem de grandeza.

Joffe e Ball (1962) obtiveram z de 9,9 °C para a POD (raiz forte) em um intervalo de temperatura de 85 a 150 °C e mostraram que a inativação da enzima nessas condições de processo obedeceu à cinética de primeira ordem.

Yamamoto, Steinberg e Nelson (1962) consideraram o tratamento térmico em altas temperaturas por curtos períodos de tempo (HTST) ineficiente para a inativação da POD em milho, devido à existência de isoenzimas da peroxidase com diferentes resistências térmicas.

Ling e Lund (1978) utilizaram um recipiente de vidro encamisado para submeter soluções contendo POD extraída de raiz forte a 76,7, 82,2 e 87,2 °C. Reportaram um comportamento não linear para a inativação da enzima e propuseram um método simples para analisar a cinética de inativação que consistiu em subdividir as enzimas em dois grupos com diferentes termoestabilidades. Apresentaram valores de $D_{82^{\circ}\text{C}} = 1,2 \text{ min}$ ($z = 17^{\circ}\text{C}$) para a fração mais sensível e $D_{82^{\circ}\text{C}} = 42 \text{ min}$ ($z = 27,3^{\circ}\text{C}$) para a fração mais estável à temperatura .

Weng et al. (1991b) também encontraram um comportamento bifásico para a inativação térmica da POD da raiz forte, em solução aquosa e reportaram valores de $z = 10,38 \pm 2,16^{\circ}\text{C}$ para a fração termolábil e $z = 26,3 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ para a fração termoestável, quando submetida ao tratamento térmico convencional entre 65 e 98 °C.

Schmidt e Vámos-Vigyázó (1985) mostraram para temperaturas acima de 90 °C curvas monofásicas que representavam a inativação térmica da fração termoestável da POD extraída de nabo (*Kohlrabi*). Curvas entre 70 e 80 °C não obedeceram à cinética de 1ª ordem, apresentando mais de uma fase na inativação enzimática. Os valores de D determinados para a fração termoestável foram de 60, 43, 24, 18,4 e 5,7 min para as respectivas temperaturas de 70, 75, 80, 90 e 95 °C. O valor de z foi da ordem de 25 °C.

Dengh, Singh e Lee (2003) salientaram a dificuldade em obter perfis de temperatura para o sistema de aquecimento térmico por microondas e propuseram a utilização da POD (raiz forte) imobilizada em partículas de amido de batata e de alginato como indicador de tempo e temperatura do processamento. Um sistema de cores visíveis para detectar a concentração da enzima foi desenvolvido neste estudo e os parâmetros cinéticos encontrados foram $D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 1,62 \text{ s}$ e $z = 34,5^{\circ}\text{C}$.

A atividade da POD em cenouras foi determinada por Soysal e Söylemez (2005) com a imersão em banho térmico de tubos contendo extrato de cenoura nas temperaturas de 35 a 75 °C pelo período de 0,5 a 180 min e por microondas nas potências de 70, 210, 350 e 700 W. Para temperaturas abaixo de 75 °C os resultados comprovaram a existência de duas frações enzimáticas. O modelo utilizado foi baseado na presença de dois grupos de isoenzimas com termoestabilidades distintas, sendo a fração termolábil inativada em períodos curtos de tempo enquanto a fração termoresistente se manteve totalmente estável. A 75 °C a redução da atividade foi monofásica indicando que só houve a inativação da fração termoresistente, com valor de $D_{75^{\circ}\text{C}} = 4,87 \text{ min}$. No tratamento térmico por microondas a inativação enzimática seguiu a cinética de primeira ordem e apresentou comportamento bifásico para os ensaios com potência baixa e monofásico para as potências altas, com valores de $D_{350\text{W}} = 1,24 \text{ min}$ e $D_{700\text{W}} = 0,89 \text{ min}$. Como o controle de temperatura não foi aplicado ao sistema, os autores sugeriram que a inativação da POD ocorreu pelo efeito combinado temperatura-energia das microondas, ou seja, a inativação da fração enzimática mais resistente foi obtida quando aplicada a potência alta e nas temperaturas mais elevadas, conferindo o comportamento monofásico para a POD. Foi constatada uma ação mais efetiva das microondas tanto na redução da atividade da POD como na retenção de vitamina C.

Os parâmetros cinéticos determinados para as soluções POD/água e POD/açúcares, submetidas à incidência das microondas, provavelmente estão relacionados a uma única fração da enzima. As condições de processo no sistema descontínuo por microondas impossibilitaram a obtenção de tempos de exposição variados para a mesma temperatura, o que permitiria a construção de curvas de inativação enzimática que poderiam mostrar a

existência ou não de frações com termoestabilidades diferenciadas e a determinação dos parâmetros cinéticos para cada uma delas.

Na Figura 4.21 são apresentados os perfis de temperatura para as soluções simuladas da POD submetidas à incidência das microondas na mesma condição de processo.

Figura 4.21. Perfis de temperatura x tempo para as soluções com POD.

Os perfis foram idênticos aos encontrados para as soluções com a PFO. Para as soluções contendo somente água e açúcares os perfis atingiram temperaturas máximas próximas a 75 °C enquanto que para as soluções contendo sais apresentaram temperaturas mais altas, na faixa de 80 a 90 °C.

Na Tabela 4.14 a solução POD/sais não apresentou uma redução significativa da atividade da POD para temperaturas abaixo de 86 °C, já para temperaturas acima de 95 °C não foi detectada sua atividade residual. A POD em solução com sais e açúcares também não apresentou reduções significativas na medida da atividade enzimática para temperaturas inferiores a 81 °C, enquanto que para temperaturas entre 83 °C e 91 °C foi observada a redução de 1 ciclo logarítmico e para temperaturas acima de 95 °C não foi detectada atividade residual.

Para todas as soluções estudadas, a POD se mostrou mais resistente a temperaturas abaixo de 90 °C quando comparada à PFO. Esse resultado também foi evidenciado por Ditchfield e Tadini (2006) em purê de banana submetido ao tratamento térmico contínuo em

trocador tubular com tempos de retenção variando de 2,5 a 5,3 s e temperaturas de 69,8 a 100,1 °C. Todas as condições de processo reduziram significativamente a atividade de ambas as enzimas, no entanto, o tempo requerido para diminuir a atividade residual da POD foi maior, demonstrando uma resistência térmica superior da POD comparada a PFO.

Valderrama, Marangoni e Clemente (2001) submeteram amostras de polpa e de casca de maçã do tipo Gala e Fuji ao tratamento térmico realizado nas temperaturas de 60, 65, 70 e 75 °C por períodos que variaram de 1 a 10 minutos, e observaram diminuição da atividade da POD com o aumento da temperatura e tempo. No entanto a POD não chegou a ser inativada em nenhum dos tratamentos realizados.

As soluções somente com sais e com sais e açúcares apresentaram atividade enzimática inicial menor tanto para a PFO como para a POD quando comparadas às outras soluções, confirmando a influência exercida pelos sais sobre a atividade enzimática.

4.3.4. Inativação da PFO e POD em água de coco estéril

As soluções concentradas de PFO e de POD foram adicionadas separadamente à água de coco previamente esterilizada e resfriada para posteriormente serem submetidas ao processamento descontínuo por microondas.

Nas Tabelas 4.16 e 4.17 estão apresentados os valores da atividade residual experimental e calculada (através da eq. 20) da PFO e da POD em água de coco estéril, a temperatura máxima alcançada em cada processo e o tempo equivalente determinado. Os resultados da atividade residual obtidos para ambas as enzimas foram agrupados e a temperatura mais alta para cada enzima foi considerada a temperatura de referência (T_{ref}).

Nas Figuras 4.22 (a) e 4.23 (a) apresentam-se os resultados experimentais da atividade residual da PFO e POD em água de coco estéril e os calculados através da eq. 20. Para analisar melhor os ajustes estão apresentados nas Figuras 4.22 (b) e 4.23 (b) gráficos de paridade da atividade residual calculada ($A/A_{0\text{ calc}}$) em função da atividade residual experimental ($A/A_{0\text{ exp}}$).

Tabela 4.16 – Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental ($A/A_{0 \text{ exp}}$) e calculada ($A/A_{0 \text{ calc}}$) para a PFO em água de coco estéril.

$t_{\text{equiv}} \text{ (s)}^*$	$T_{\text{máx}} \text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$A/A_{0 \text{ experimental}}$	$A/A_{0 \text{ calculada}}$
13,45	47,09	0,6824	0,4894
13,45	47,09	0,7073	0,4894
18,25	55,86	0,5188	0,3792
18,25	55,86	0,5578	0,3792
15,36	56,17	0,5497	0,4421
15,36	56,17	0,5632	0,4421
22,04	57,07	0,3179	0,3101
22,04	57,07	0,4594	0,3101
24,81	60,30	0,3504	0,2677
24,81	60,30	0,3388	0,2677
28,69	61,26	0,2588	0,2177
28,69	61,26	0,3264	0,2177
39,21	70,63	0,1112	0,1245
39,21	70,63	0,1252	0,1245
39,21	70,63	0,0910	0,1245
47,22	71,42	0,0407	0,0813
47,22	71,42	0,0358	0,0813
53,57	72,83	0,0443	0,0581
53,57	72,83	0,0487	0,0581
54,13	76,00	0,0334	0,0564
54,13	76,00	0,0357	0,0564
54,13	76,00	0,0306	0,0564
71,26	77,06	0,0300	0,0227
71,26	77,06	0,0269	0,0227
73,95	80,56	0,0210	0,0197
73,95	80,56	0,0310	0,0197
88,69	80,81	0,0099	0,0090

Tabela 4.16 – (Continuação) Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental (A/A_0_{exp}) e calculada (A/A_0_{calc}) para a PFO em água de coco estéril.

t_{equiv} (s) *	$T_{\text{máx}}$ (°C)	$A/A_0_{\text{experimental}}$	$A/A_0_{\text{calculada}}$
88,69	80,81	0,0063	0,0090
95,98	82,50	0,0101	0,0061
95,98	82,50	0,01	0,0061
93,54	82,81	0,0042	0,0069
93,54	82,81	0,005	0,0069
93,54	82,81	0,0055	0,0069
100,27	84,45	0,0081	0,0049
100,27	84,45	0,009	0,0049

* $T_{\text{ref}} = 84,45 \text{ °C}$

Figura 4.22. Valores experimentais e calculados da atividade residual da PFO em água de coco estéril (a); atividade residual calculada em função da atividade residual experimental (b).

Tabela 4.17 – Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental ($A/A_{0 \text{ exp}}$) e calculada ($A/A_{0 \text{ calc}}$) para a POD em água de coco estéril.

$t_{\text{equiv}} \text{ (s)}^*$	$T_{\text{máx}} \text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$A/A_{0 \text{ experimental}}$	$A/A_{0 \text{ calculada}}$
0,62	41,65	0,7489	0,9310
0,62	41,65	0,8227	0,9310
0,54	45,22	0,8285	0,9340
0,54	45,22	0,8010	0,9340
2,26	59,96	0,5618	0,7706
2,26	59,96	0,6044	0,7706
9,65	71,39	0,5346	0,3280
9,65	71,39	0,4464	0,3280
9,65	71,39	0,3729	0,3280
13,89	72,04	0,3154	0,2010
13,89	72,04	0,2303	0,2010
12,03	74,07	0,2074	0,2493
12,03	74,07	0,2463	0,2493
12,03	74,07	0,2885	0,2493
13,61	75,00	0,1684	0,2078
13,61	75,00	0,2517	0,2078
28,45	81,14	0,0080	0,0374
28,45	81,14	0,0071	0,0374
32,33	82,52	0,0403	0,0239
32,33	82,52	0,0534	0,0239
47,45	83,49	0,0151	0,0042
56,61	86,20	0,0004	0,0014
56,61	86,20	0,0005	0,0014
53,94	86,54	0,0056	0,0020
53,94	86,54	0,0052	0,0020

* $T_{\text{ref}} = 86,54 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Figura 4.23. Valores experimentais e calculados da atividade residual da POD em água de coco estéril (a); atividade residual calculada em função da atividade residual experimental (b).

Na Tabela 4.18 estão apresentados os valores de D e z, pH, acidez, sólidos solúveis, turbidez e determinação de proteínas para ambas as soluções.

Tabela 4.18 – Valores de D e z, pH, acidez, sólidos solúveis, turbidez para as soluções PFO e POD em água de coco estéril.

Solução	T_{ref} (°C)	D_{ref} (s)	z (°C)	R²
PFO/Água de coco estéril	84,45	43	39,5	0,9739
POD/Água de coco estéril	86,54	20	19,3	0,9334
Análises Físico - químicas				
pH			5,04 ± 0,01	
Acidez ¹ (%)			0,063 ± 0,004	
Sólidos Solúveis ² (° Brix)			3,29 ± 0,06	
Turbidez (%)			29,10 ± 0,34	
Determinação das Proteínas Totais				
PFO/Água de coco estéril			17,727 µg/mL	
POD/Água de coco estéril			18,360 µg/mL	

¹ Acidez titulável expressa em percentagem de ácido málico

² Teor de sólidos solúveis expresso em ° Brix corrigido pela temperatura e acidez

Ambas as enzimas apresentaram comportamento linear e obedeceram à cinética de primeira ordem com correlações de 0,97 e 0,93 para a PFO e POD, respectivamente.

Para a PFO foram encontrados os parâmetros cinéticos $D_{84,45^{\circ}\text{C}} = 43$ s e $z = 39,5^{\circ}\text{C}$, e para a POD foi determinado $D_{86,54^{\circ}\text{C}} = 20$ s e $z = 19,3^{\circ}\text{C}$, valor esse de z muito próximo àquele obtido para a mesma enzima em solução com açúcares ($z = 19,5^{\circ}\text{C}$).

Weemaes et al. (1998) compararam os parâmetros cinéticos determinados para a inativação da PFO extraída de maçã, abacate, ameixa, pêra e uva e observaram que a PFO do extrato de uva apresentou a menor resistência térmica $D_{70^{\circ}\text{C}} = 5,62$ min e $z = 13,02 \pm 2,26^{\circ}\text{C}$. Para temperaturas abaixo de $72,5^{\circ}\text{C}$ a resistência térmica da PFO em maçã, pêra e ameixa foi praticamente a mesma $D_{72,5^{\circ}\text{C}} = 35,48$ min e z entre $17,6$ e $20,8^{\circ}\text{C}$. Para temperaturas mais altas a PFO do extrato de ameixa ($D_{75^{\circ}\text{C}} = 35,48$ min e $z = 17,60 \pm 1,24^{\circ}\text{C}$) foi a mais resistente seguida da PFO do extrato de pêra ($D_{75^{\circ}\text{C}} = 25,12$ min e $z = 18,90 \pm 1,38^{\circ}\text{C}$) e de maçã ($D_{75^{\circ}\text{C}} = 17,78$ min e $z = 5,44 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$).

Chutintrasri e Noomhorm (2006) submeteram polpa de abacaxi em banho termostaticado sob condições isotérmicas e avaliaram o efeito da temperatura e do tempo de exposição sobre a atividade da mesma. O tratamento térmico foi conduzido nas temperaturas

entre 40 e 90 °C, por períodos de 0 a 30 min. A taxa de inativação variou com a temperatura e também seguiu a cinética de primeira ordem. No intervalo de temperatura de 40 a 70 °C o z determinado foi de $104,2 \pm 0,7$ °C para $D_{40^\circ\text{C}} = 190,3 \pm 3,6$ min e $D_{70^\circ\text{C}} = 93,7 \pm 2,1$ min. Para temperaturas elevadas entre 70 e 90°C o z foi $21,5 \pm 0,0$ °C para $D_{5^\circ\text{C}} = 91,3 \pm 1,9$ min e $D_{90^\circ\text{C}} = 11,4 \pm 0,2$ min. Salientaram que variações na cinética de inativação da PFO podem ocorrer devido ao grau de maturação, condições de cultivo e da composição de cada fruta ou vegetal.

4.4. Ensaio com a água de coco

Foram utilizados três lotes de água de coco para a realização dos ensaios em sistema descontínuo por microondas e a caracterização de cada lote está apresentada na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 – Valores de pH, acidez, sólidos solúveis, turbidez e determinação das proteínas totais para os lotes de água de coco utilizados no processo descontínuo por microondas.

Lote	pH	Acidez ¹ (%)	Sólidos Solúveis ² (°Brix)	Turbidez (%)	Proteínas totais (mg.mL ⁻¹)
1	5,2 ± 0,01	0,032 ± 0,002	2,93 ± 0,02	35,39 ± 0,32	21,209
2	5,1 ± 0,00	0,056 ± 0,002	3,77 ± 0,28	31,98 ± 0,19	32,330
3	4,9 ± 0,01	0,040 ± 0,003	4,02 ± 0,00	15,19 ± 0,22	51,724

¹ Acidez titulável expressa em percentagem de ácido málico

² Teor de sólidos solúveis expresso em °Brix corrigido pela temperatura e acidez

Apesar dos lotes serem adquiridos do mesmo fornecedor e em períodos muito próximos, pela Tabela 4.19 foram observadas variações significativas nas análises realizadas, principalmente na determinação das proteínas. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas com o local de plantio e o tempo de colheita do fruto. Segundo Rosa e Abreu (2000) o período que compreende entre o 5º e o 7º mês de idade do fruto é aquele em que a atividade enzimática ocorre com plenitude e a água de coco apresenta o máximo teor de açúcares.

Duarte, Coelho e Leite (2002) quando compararam os resultados da atividade da PFO e da POD em água de coco com aqueles obtidos por Campos et al. (1996) encontraram valores muito distintos, explicado também pela variedade da planta, cultivo e desenvolvimento do fruto.

Os resultados obtidos nos ensaios para todos os lotes foram agrupados e normalizados de acordo com o teor de sólidos solúveis e proteínas totais. O tratamento dos dados foi o mesmo aplicado para as enzimas em água de coco estéril. Nas Tabelas 4.20 e 4.21 estão apresentados os valores da atividade residual experimental e calculada da PFO e da POD para a solução de água de coco, a temperatura máxima alcançada em cada processo e o tempo equivalente determinado. Nas Figuras 4.24 (a) e 4.25 (a) estão apresentados os dados experimentais da atividade residual para a PFO e POD, respectivamente, em água de coco e nas Figuras 4.24 (b) e 4.25 (b) gráficos de paridade da atividade residual calculada ($A/A_{0\text{ calc}}$) em função da atividade residual experimental ($A/A_{0\text{ exp}}$) para as duas enzimas.

Tabela 4.20 – Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental ($A/A_{0\text{ exp}}$) e calculada ($A/A_{0\text{ calc}}$) para a PFO em água de coco.

$t_{\text{equiv}} \text{ (s)}^*$	$T_{\text{máx}} \text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$A/A_{0\text{ experimental}}$	$A/A_{0\text{ calculada}}$
0,30	52,50	0,9633	0,9869
0,30	52,50	0,9884	0,9869
0,40	54,90	0,9419	0,9826
0,40	54,90	1,009	0,9826
0,51	60,70	0,9391	0,9779
0,51	60,70	0,9808	0,9779
1,17	64,82	0,8746	0,9498
1,17	64,82	1,0905	0,9498
3,16	72,06	0,9196	0,8701
3,16	72,06	0,6484	0,8701
5,42	76,23	0,8497	0,7873
5,42	76,23	0,9020	0,7873
23,34	87,36	0,4641	0,3573
23,34	87,36	0,6698	0,3573
26,41	87,55	0,3245	0,3121
26,41	87,55	0,2445	0,3121
31,78	90,14	0,2608	0,2463
31,78	90,14	0,1734	0,2463
46,70	92,20	0,1550	0,1275
46,70	92,20	0,1227	0,1275

* $T_{\text{ref}} = 92,20^{\circ}\text{C}$

Tabela 4.21 – Valores de tempo equivalente (s), temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$), atividade residual experimental ($A/A_{0 \text{ exp}}$) e calculada ($A/A_{0 \text{ calc}}$) para a POD em água de coco.

$t_{\text{equiv}} \text{ (s)}^*$	$T_{\text{máx}} \text{ (}^\circ\text{C)}$	$A/A_{0 \text{ experimental}}$	$A/A_{0 \text{ calculada}}$
0,10	63,86	0,8500	0,9862
0,10	63,86	0,8891	0,9862
0,52	72,05	0,6587	0,9288
0,52	72,05	0,6341	0,9288
0,92	74,74	0,7684	0,8783
0,92	74,74	0,4567	0,8783
11,67	87,36	0,2282	0,1935
11,67	87,36	0,1635	0,1935
13,37	88,09	0,1332	0,1522
13,37	88,09	0,0879	0,1522
18,45	90,14	0,1084	0,0745
18,45	90,14	0,1216	0,0745
33,25	92,92	0,0069	0,0093
33,25	92,92	0,0102	0,0093

* $T_{\text{ref}} = 92,92^\circ\text{C}$

Figura 4.24. Valores experimentais e calculados da atividade residual da PFO em água de coco (a); atividade residual calculada em função da atividade residual experimental (b).

Figura 4.25. Valores experimentais e calculados da atividade residual da POD em água de coco (a); atividade residual calculada em função da atividade residual experimental (b).

A inativação térmica da PFO e POD presentes em água de coco apresentou comportamento linear em função do tempo equivalente quando submetidas à incidência das microondas, seguindo a cinética de 1ª ordem com ajuste de 0,97 e 0,98, respectivamente. Os parâmetros cinéticos determinados para a PFO foram $D_{2,20^{\circ}\text{C}} = 52$ s, $z = 17,6^{\circ}\text{C}$ e para a POD $D_{2,92^{\circ}\text{C}} = 16$ s e $z = 11,5^{\circ}\text{C}$ indicando uma resistência térmica maior da PFO quando comparada a POD, confirmando os resultados relatados por outros autores. A redução da atividade da PFO e POD presentes na água de coco, quando submetidas ao processamento térmico por microondas foi significativamente maior quando comparada aos resultados reportados na literatura empregando o tratamento térmico convencional.

Campos et al. (1996) determinaram a atividade residual das enzimas quando submetidas ao tratamento térmico em banho termostaticado e obtiveram 90 % da redução da atividade somente para temperaturas superiores a 90°C e por um período de tempo maior que 90 s. A completa inativação só foi alcançada com tempos de retenção de 310 s para a POD e 550 s para a PFO.

Murasaki (2005) também evidenciou maior resistência térmica da PFO em água de coco submetida ao processamento térmico contínuo com trocador de calor a placas. Tempos superiores a 200 s por 90°C foram necessários para obter uma redução da atividade da PFO em torno de 80 %, enquanto que para a POD, nas mesmas condições, foram alcançados 97 % de redução da sua atividade.

Em relação a maior estabilidade da PFO, a observação de Vámos-Vigyázó (1981) também pode ser levada em consideração, uma vez que foi relatada maior estabilidade térmica da PFO em frutas quando comparada a POD, em compensação nos vegetais a POD apresentou maior resistência térmica.

Os parâmetros cinéticos, determinados no processamento térmico por microondas em sistema descontínuo, da inativação da POD comercial (extraída da raiz forte) adicionada nas soluções simuladas e da POD presente na água de coco foram comparados aos parâmetros cinéticos da POD reportados na literatura tanto para o tratamento térmico convencional (fração termolábil da POD extraída da raiz forte determinado por Ling e Lund, 1978 e da POD do nabo determinado por Schmidt e Vámos-Vigyázó, 1985) quanto por microondas (parâmetros cinéticos da destruição da *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum* determinados por Tajchakavit, Ramaswamy e Fustier, 1998 e da inativação da POD imobilizada extraída da raiz forte determinado por Dengh, Singh e Lee, 2003), como mostra a Figura 4.26. As temperaturas utilizadas como referência foram $65,5$, 70 e $82,2^{\circ}\text{C}$.

Figura 4.26. Comparação da variação do valor D com a temperatura para as soluções submetidas ao processo térmico por microondas (POD comercial nas soluções simuladas, POD da água de coco, *S. cerevisiae*, *L. plantarum* e POD imobilizada extraída da raiz forte) e ao processo térmico convencional (fração termolábil da POD extraída da raiz forte e da POD do nabo).

A POD presente no nabo apresentou maior resistência térmica seguida da água de coco e a menor estabilidade térmica foi encontrada para a POD imobilizada submetida às microondas. Sabe-se que no processamento térmico por microondas não há período isotérmico e a integração dos efeitos letais do perfil de temperatura foi realizada para a determinação dos parâmetros cinéticos pelo método iterativo (eq. 19). Ling e Lund (1978) submeteram amostras da POD da raiz forte em banho termostatzado, a temperatura constante, e encontraram duas frações enzimáticas com termoestabilidades distintas. Fazendo uma comparação dos valores de D da fração termosensível ($D=1,2$ min e $z = 17$ °C) com a POD da raiz forte submetida ao aquecimento por microondas foram observados comportamentos similares na variação de D com a temperatura, o que valida o método iterativo e mostra que é

adequado para a determinação dos parâmetros cinéticos no processamento térmico por microondas.

Para a PFO comercial (extraída do cogumelo) adicionada nas soluções simuladas e a PFO presente na água de coco, os parâmetros cinéticos determinados no processamento térmico por microondas em sistema descontínuo também foram comparados aos parâmetros cinéticos da *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum* determinados por Tajchakavit, Ramaswamy e Fustier, (1998) por processo térmico através das microondas e aos parâmetros cinéticos da PFO em extrato de maçã e de uva determinados por tratamento térmico convencional por Weemaes et al., (1998), como mostra a Figura 4.27. As temperaturas utilizadas como referência também foram 65,5, 70 e 82,2 °C.

Figura 4.27. Comparação da variação do valor D com a temperatura para as soluções submetidas ao processo térmico por microondas (PFO comercial nas soluções simuladas, PFO da água de coco, *S. cerevisiae* e *L. plantarum*) e da PFO em extrato de maçã e de uva determinados no processo térmico convencional.

A PFO comercial (extraída do cogumelo) adicionada nas soluções simuladas apresentou a menor estabilidade térmica comparada a PFO da maçã, uva e água de coco. A variação de D com a temperatura apresentou o mesmo comportamento para as soluções PFO/água e PFO/açúcares e a solução PFO/água de coco estéril mostrou discreta resistência térmica quando comparada às outras soluções simuladas.

Nas Figuras 4.26 e 4.27 a variação do tempo de redução decimal com a temperatura mostrou que as enzimas (POD e PFO) são termicamente mais resistente que a *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum*, por isso são utilizadas como indicadores de eficiência dos processos térmicos como já reportaram Burnette (1977), Günes e Bayindirli (1993), Machado e Saraiva (2002), Robinson (1991) e Weng et al. (1991b).

Todas as soluções simuladas contendo POD e PFO apresentaram comportamentos muito similares em relação à variação de D com a temperatura. Já para a água de coco as enzimas mostraram maior estabilidade térmica quando comparadas às soluções simuladas. Esse resultado pode ser atribuído à influência do pH e da composição do meio que pode favorecer a estabilidade da POD e da PFO presentes na água de coco.

4.5. Microondas contínuo

4.5.1. Mapeamento da potência dissipada no forno de microondas doméstico

A análise de variância (ANOVA) e teste de média (Tukey) foram aplicados aos dados de potência dissipada realizada no programa *Statgraphics plus* versão 4.0 para determinar diferenças significativas da incidência das microondas nas diferentes posições em cada altura estudada. Este resultado auxiliou no posicionamento adequado da serpentina de vidro no interior do forno doméstico adaptado, por onde o líquido em estudo foi conduzido e submetido ao processo contínuo por microondas.

Na Tabela 4.22 estão apresentados os valores da potência dissipada calculada pela eq. 16 no interior do forno de microondas doméstico adaptado para o sistema contínuo para cada um dos nove pontos e para as três alturas, como esquematizado na Figura 3.5. Na Tabela 4.23 apresenta-se a análise de variância aplicada nos resultados.

Tabela 4.22 - Valores de potência dissipada no interior do forno de microondas doméstico adaptado.

Posições	Potência média (W)		
	h = 0 cm	h = 5 cm	h = 9 cm
1	558,152 ^a	557,044 ^a	554,343 ^a
2	562,720 ^{ab}	561,208 ^a	559,660 ^a
3	562,969 ^{ab}	564,577 ^{ab}	559,964 ^a
4	584,106 ^c	575,537 ^b	562,163 ^a
5	570,965 ^{ab}	566,298 ^{ab}	563,960 ^a
6	573,559 ^{bc}	567,075 ^{ab}	565,109 ^a
7	564,562 ^{ab}	565,262 ^{ab}	565,114 ^a
8	566,399 ^{ab}	566,129 ^{ab}	567,641 ^a
9	570,956 ^{abc}	566,948 ^{ab}	569,655 ^a
DMS ^{**}	13,753	13,597	15,548

^{*} Médias com a mesma letra, na mesma coluna, não são significativamente diferentes no intervalo de 95 % de confiança.

^{**} Diferença mínima significativa

Tabela 4.23 – Análise de variância (ANOVA) aplicada para os resultados da potência dissipada em função da posição conforme Fig. 3.5.

Altura = 0 cm					
Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Razão F	Valor p
Entre posições	1390,91	8	173,86	7,56	0,0002
Entre réplicas	413,97	18	23,00		
Total (corrigido)	1804,87	26			
Altura = 5 cm					
Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Razão F	Valor p
Entre posições	591,43	8	73,93	3,29	0,0171
Entre réplicas	404,62	18	22,48		
Total (corrigido)	996,06				
Altura = 9 cm					
Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Razão F	Valor p
Entre posições	514,92	8	64,36	2,19	0,0798
Entre réplicas	529,02	18	29,39		
Total (corrigido)	1043,94				

A análise estatística para cada uma das três alturas estudadas indicou que para a altura $h = 9$ cm, o valor de p foi igual a 0,08, ou seja, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) da potência em relação à posição. Para as demais alturas, 0 e 5 cm, os valores de p foram 0,00 e 0,02 respectivamente, indicando diferença significativa nos valores da potência em relação ao posicionamento. Para $h = 0$ cm a posição 4 foi a que apresentou o maior valor para a potência, seguido das posições 6 e 9. Para $h = 5$ cm a posição 4 também obteve o maior valor para a potência.

4.5.2. Ensaios com água destilada no Tubo 1

Foram realizadas medidas das vazões de água destilada, em triplicata, que atingiram as mais elevadas temperaturas de processo utilizando o tubo 1. Na Tabela 4.24 estão apresentados os valores das vazões, o valor médio das mesmas e o tempo de residência.

Tabela 4.24 - Vazões volumétricas e tempos de residência para a água destilada conduzida no tubo 1 no interior do forno de microondas.

Ensaio	Vazão (cm ³ .s ⁻¹)	Vazão média (cm ³ .s ⁻¹)	tempo residência (s)
1	2,34	2,36	7,76
	2,38		
	2,36		
2	3,86	3,86	4,74
	3,86		
	3,87		
3	4,82	4,75	3,85
	4,70		
	4,72		
4	6,98	6,97	2,62
	6,98		
	6,96		

Na Figura 4.28 está apresentado o perfil da temperatura x tempo obtido para água destilada por aquisição dos dados do termopar localizado na saída do tubo 1.

Figura 4.28. Perfil da temperatura x tempo determinado para água destilada na saída do tubo 1 para o forno de microondas doméstico adaptado.

Observa-se na Figura 4.28 que o equipamento automaticamente interrompe a incidência das microondas por um determinado período, fazendo com que a temperatura de processo não seja uniforme. Esse perfil corresponde a menor vazão aplicada de $2,36 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ alcançando a temperatura mais elevada para todas as condições estudadas. Mesmo assim a temperatura máxima não ultrapassou 55°C e se manteve por um curto intervalo de tempo de aproximadamente 5 s.

Com base nos resultados encontrados para as soluções simuladas e para a água de coco no forno de microondas focalizadas, pode-se afirmar que esta condição não é a mais adequada para se realizar um tratamento térmico. O volume do tubo 1 ($18,3 \text{ cm}^3$) não foi suficiente para atingir temperaturas acima de 56°C , normalmente necessárias para processos que envolvam o tratamento térmico de alimentos.

A partir desses resultados foi projetado o tubo 2 de maior volume (31 cm^3) e conseqüentemente maior tempo de residência, proporcionando um aumento na temperatura de processo.

4.5.3. Ensaios com água de coco no Tubo 2

Utilizando o mesmo procedimento descrito para o tubo 1 foram determinados perfis de temperatura x tempo para a água de coco para diferentes vazões volumétricas como mostra a Figura 4.29 (a), (b) e (c).

Figura 4.29. Perfis de temperatura x tempo para a água de coco no forno de microondas doméstico adaptado foram obtidos na saída do tubo 2 nas seguintes vazões médias: (a) $1,51 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$; (b) $3,10 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ e (c) $3,81 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

O equipamento não mantém a incidência das microondas continuamente, mas os perfis com o tubo 2 apresentaram temperaturas máximas entre 53 e 90 °C e o intervalo de tempo foi mais prolongado (mantendo-se praticamente constante por até 8 minutos), permitindo submeter à água de coco a diferentes condições de processo.

Para os ensaios com água de coco em sistema contínuo por microondas foram utilizados dois lotes de água de coco. A caracterização de cada lote está apresentada na Tabela 4.25.

Tabela 4.25 – Valores de pH, acidez, sólidos solúveis, turbidez e determinação das proteínas totais para os lotes de água de coco verde.

Lote	pH	Acidez ¹ (%)	Sólidos Solúveis ² (°Brix)	Turbidez (%)	Proteínas totais (mg.mL⁻¹)
1	4,83 ± 0,01	0,128 ± 0,014	5,17 ± 0,17	46,10 ± 1,01	79,298
2	4,82 ± 0,01	0,111 ± 0,003	5,06 ± 0,35	50,11 ± 0,52	95,556

¹ Acidez titulável expressa em percentagem de ácido málico

² Teor de sólidos solúveis expresso em °Brix corrigido pela temperatura e acidez

Na Tabela 4.26 estão apresentados os dados obtidos experimentalmente para a determinação da energia absorvida pela água de coco ($\dot{Q}$) calculada pela eq. 17 quando submetida à incidência das microondas em sistema contínuo.

Tabela 4.26 - Vazão mássica média ($\dot{m}_{\text{média}}$), calor específico da água de coco (C_p), temperaturas de entrada e saída (T_{entrada} e $T_{\text{saída}}$) e energia média absorvida ($\dot{Q}_{\text{média}}$) pelo líquido quando submetido ao forno de microondas adaptado ao sistema contínuo.

Ensaio	$\dot{m}_{\text{média}}$ (kg.s^{-1}) $\times 10^{-3}$	C_p ($\text{kJ.kg}^{-1}.\text{K}$)	T_{entrada} ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{\text{saída}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$\dot{Q}_{\text{média}}$ (kW)	$\left(\frac{POD}{POD_0}\right)_{\text{médio}}$ (%)	$\left(\frac{PFO}{PFO_0}\right)_{\text{médio}}$ (%)
1	$2,14 \pm 0,06$	5,435	22,05	66,78	$0,520 \pm 0,014$	$75,23 \pm 1,58$	$25,01 \pm 0,48$
2	$2,14 \pm 0,06$	5,440	21,84	67,01	$0,526 \pm 0,014$	$69,13 \pm 3,81$	$23,13 \pm 1,11$
3	$2,15 \pm 0,13$	5,577	22,79	73,58	$0,610 \pm 0,040$	$56,60 \pm 8,25$	$21,66 \pm 1,97$
4	$2,15 \pm 0,13$	5,651	22,79	77,14	$0,661 \pm 0,041$	$51,29 \pm 1,23$	$4,84 \pm 0,87$
5	$1,71 \pm 0,03$	5,878	22,90	88,17	$0,654 \pm 0,023$	ND	$3,34 \pm 0,45$
6	$1,71 \pm 0,03$	5,931	23,16	90,72	$0,683 \pm 0,024$	ND	$3,37 \pm 0,51$
7	$1,35 \pm 0,03$	5,932	22,57	90,78	$0,544 \pm 0,013$	ND	ND

ND atividade não detectável

Nas Figuras 4.30 e 4.31 estão mostrados os valores da atividade residual da PFO e da POD, respectivamente, em função da energia absorvida pela água de coco quando submetida ao processamento térmico por microondas em sistema contínuo.

Figura 4.30. Atividade residual da PFO em função da energia absorvida pela água de coco por processamento térmico por microondas em sistema contínuo.

Figura 4.31. Atividade residual da POD em função da energia absorvida pela água de coco processamento térmico por microondas em sistema contínuo.

Os resultados apresentados na Figura 4.30 confirmam aqueles determinados para a água de coco e soluções simuladas em sistema descontínuo por microondas: a diminuição da atividade da PFO quando submetida ao sistema contínuo por microondas obedeceu à cinética de 1ª ordem com índice de correlação de 0,987.

A redução da atividade da POD foi bem inferior quando comparada com a redução da PFO. Amostras submetidas às microondas com temperatura de saída acima de 88 °C não apresentaram atividade residual detectável, no entanto para temperaturas abaixo de 77 °C a atividade residual da enzima foi próxima dos resultados obtidos no sistema descontínuo por microondas para a POD da água de coco.

Além da obtenção da atividade enzimática por espectrofotometria e da determinação de proteínas totais da água de coco, a combinação de métodos como eletroforese e cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC do inglês *Fast protein liquid chromatography*) podem fornecer um conjunto de dados mais precisos para a determinação da atividade residual enzimática.

A utilização de um equipamento que disponha de sensores de fibra óptica localizados ao longo da tubulação, no interior da cavidade, torna possível a obtenção de perfis de temperatura ao longo do processo. A partir desses perfis a integração dos efeitos da

temperatura sobre a redução da atividade enzimática pode ser obtida e, pelo método iterativo (aplicado ao sistema descontínuo por microondas) os parâmetros cinéticos (D e z) podem ser determinados.

É importante ressaltar que para todos os ensaios com água de coco submetida ao sistema descontínuo e contínuo por microondas não foi observada a coloração rósea, normalmente relatada em literatura e atribuída à ação enzimática (ROSA; ABREU, 2001; MAGALHÃES et al. 2005).

Para tentar compreender esse efeito, deve ser levado em consideração os estudos que atribuem ao aquecimento por microondas a potencialização da desnaturação irreversível das enzimas, proteínas, ácidos nucleicos e outros constituintes celulares vitais para o metabolismo ou reprodução celular (HEDDLESON; DOORES, 1994; PORCELLI et al., 1997).

A influência dos processos de conservação na concentração e distribuição das espécies elementares na água de coco pode ser relevante para a compreensão da possível relação entre esses elementos e a alteração da cor. Naozuka (2004) avaliou a influência do congelamento, ultrafiltração e pasteurização e observou que o congelamento afetou a distribuição de todos os elementos de interesse nas diferentes frações da água de coco. A ultrafiltração reteve as enzimas, mas também elementos como o Fe e o Zn, e para as amostras pasteurizadas a 90 °C, não houve mudanças significativas nas concentrações totais dos elementos analisados, entretanto a distribuição desses elementos na fração de filtrado da água de coco apresentou um aumento na concentração de Cu, Fe, Zn e diminuição da concentração de Mn.

Elevada concentração de cobre foi observada em amostras de água de coco de marcas comercializadas na cidade de São Paulo (submetida aos processos convencionais como UHT, pasteurização ou congelamento), o que sugere a contaminação durante esses processos de conservação ou na etapa de armazenamento (NAOZUKA, 2004). Tanto o cobre como o ferro estão presentes nos sítios ativos da PFO e da POD, respectivamente e na presença de oxigênio atuam como cofatores nas reações de oxidação (ROBINSON, 1991; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

Murasaki (2005) relatou que a água de coco pasteurizada a 90°C por períodos de 120 a 200 s apresentou coloração rosada após o armazenamento sob refrigeração, no entanto para as mesmas amostras acondicionadas em garrafas PET, preenchidas totalmente com água de coco, não foi observada a mudança de cor, o que sugere a relação entre a alteração na cor e reações oxidativas.

Magalhães et al. (2005) estudaram a conservação da água de coco por filtração por membranas e todas as amostras microfiltradas e ultrafiltradas apresentaram-se em condições de esterilidade comercial. As amostras ultrafiltradas, armazenadas sob refrigeração, mantiveram a coloração clara característica da água de coco. Souza et al. (2004) conseguiu a redução acentuada da carga microbiana, mas não evitou a coloração rosada da água de coco ao aplicar a filtração com membrana monotubo de massa molar 50 kDa.

A escassez de dados que mostrem a influência do tratamento térmico por microondas na composição elementar da água de coco não permite a comparação com os demais processos de conservação. Sabe-se que durante o processamento térmico por microondas, em sistema descontínuo e contínuo, os riscos de contaminação por elementos provenientes de materiais metálicos que possam ter contato com a água de coco foram praticamente nulos, já que todas as amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro e/ou propileno e o sistema de aquisição de temperatura foi o de fibra óptica, com exceção dos termopares posicionados na parte externa do forno doméstico adaptado ao sistema contínuo.

Essas observações são somente qualitativas, estudos mais detalhados devem ser realizados a fim de esclarecer quais são os fatores que realmente afetam as características sensoriais e nutricionais da água de coco para otimizar o processo de conservação.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo apontam o tratamento térmico por microondas como um processo que promove maiores reduções na atividade das enzimas presentes na água de coco, comparado a pasteurização convencional e que pode se tornar uma boa alternativa de processo na conservação de alimentos líquidos.

Com relação aos ensaios descontínuos conduzidos no forno de microondas focalizadas, o sensor de fibra óptica permitiu a obtenção de perfis precisos de temperatura em função do tempo e mostrou como a incidência das microondas promove variações muito rápidas na temperatura das soluções acondicionadas no interior da cavidade. A aquisição dos dados de temperatura a partir dos termopares convencionais, posicionados na parte externa do equipamento, pode resultar erros significativos, já que o aquecimento das soluções ocorre bruscamente.

O uso de pequenos volumes de amostra para serem submetidos ao forno de microondas focalizadas permitiu um aquecimento mais uniforme e se apresentou como uma boa alternativa para o estudo inicial da inativação enzimática.

No forno de microondas focalizadas foi possível estimar os parâmetros cinéticos (D e z) tanto para a PFO e POD comerciais como para ambas as enzimas presentes naturalmente na água de coco. As soluções PFO/Água ($D_{93^{\circ}\text{C}} = 17\text{s}$; $z = 35,5^{\circ}\text{C}$) e PFO/Açúcares ($D_{91,1^{\circ}\text{C}} = 18\text{s}$; $z = 33,0^{\circ}\text{C}$) apresentaram o mesmo comportamento em relação a variação de D com a temperatura, já a solução simulada PFO/água de coco estéril apresentou maior resistência térmica com $D_{84,45^{\circ}\text{C}} = 43,34\text{s}$ e $z = 39,5^{\circ}\text{C}$.

A solução simulada POD/Água de coco estéril apresentou a menor termoestabilidade ($D_{86,54^{\circ}\text{C}} = 19,6\text{s}$, $z = 19,3^{\circ}\text{C}$), seguida da solução POD/Açúcares ($D_{92^{\circ}\text{C}} = 21\text{s}$; $z = 19,5^{\circ}\text{C}$) e POD/Água ($D_{91,5^{\circ}\text{C}} = 44\text{s}$; $z = 24,0^{\circ}\text{C}$).

A variação de D com a temperatura para as soluções simuladas de POD extraída da raiz forte (submetidas ao sistema descontínuo por microondas) mostrou comportamento semelhante aos resultados reportados em literatura para a mesma enzima (submetida ao

tratamento térmico convencional), o que valida o método iterativo empregado para a determinação dos parâmetros cinéticos no processamento não isotérmico por microondas.

Na água de coco as enzimas mostraram maior resistência térmica quando comparadas aos resultados das soluções simuladas apresentando $D_{92,20^{\circ}\text{C}} = 52$ s e $z = 17,6$ °C para a PFO e $D_{92,92^{\circ}\text{C}} = 16$ s e $z = 11,5$ °C para a POD.

A presença de açúcares redutores e não redutores tanto na água de coco como nas soluções simuladas pode ter proporcionado efeitos opostos nos resultados analisados, ora mantendo a estabilidade, ora desnaturando as enzimas. A POD se mostrou mais suscetível à ação dos açúcares embora, de uma maneira geral, tenha demonstrado ser mais resistente ao aquecimento por microondas.

Os sais influenciaram significativamente a estabilidade da PFO e POD comerciais. Para temperaturas acima de 90 °C, os sais e a energia eletromagnética das microondas reduziram a atividade de ambas as enzimas para níveis não detectáveis. Na água de coco o efeito dos sais não foi tão pronunciado, sendo realizadas medidas das atividades residuais para temperaturas superiores a 90°C.

No processamento térmico contínuo conduzido no forno de microondas doméstico adaptado, o mapeamento da potência apresentou uma região no interior da cavidade com maior potência incidida, o que auxiliou na construção e no posicionamento dos tubos de vidro no interior do forno. O tubo de maior volume (31 cm³) permitiu conduzir ensaios com diferentes vazões alcançando temperaturas entre 50 e 93°C.

A redução da atividade da PFO quando submetida ao sistema contínuo por microondas obedeceu à cinética de 1ª ordem com correlação de 0,987 e os resultados corroboraram aqueles determinados para a água de coco e soluções simuladas em sistema descontínuo por microondas.

A POD não apresentou atividade residual detectável nas condições de processo em que a temperatura de saída foi acima de 88 °C, mas para temperaturas abaixo de 77 °C a atividade residual foi próxima dos resultados obtidos no sistema descontínuo por microondas para a POD da água de coco.

O estudo dos substratos catecol, guaiacol e ABTS na determinação da atividade das enzimas foi importante para minimizar erros e otimizar o tempo de análise.

Pode-se afirmar que para todos os ensaios com água de coco processada em microondas no sistema descontínuo e contínuo não foi verificada a coloração rósea, normalmente atribuída à ação enzimática. Algumas hipóteses foram levantadas para esse efeito, mas deve-se ressaltar que a coloração natural apresentada nas amostras de água de coco foi uma observação somente qualitativa e estudos quantitativos devem ser realizados para confirmar e elucidar esse problema. Análises mais específicas como composição elementar, eletroforese e cromatografia de troca iônica podem fornecer dados mais precisos relacionados à atividade enzimática e auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na mudança de cor, atributo tão relevante para a aceitação da água de coco pelos consumidores.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudos que avaliem a influência das propriedades físico-químicas da água de coco sobre a cinética de inativação térmica da POD e PFO submetidas ao aquecimento por meio das microondas poderão contribuir para a otimização do processo.

A combinação do tratamento térmico por microondas e a adição de ácido cítrico ou ácido ascórbico na água de coco poderá ser estudada, a fim de garantir segurança microbiológica e inativação enzimática da água de coco.

Análises sensoriais para determinar a vida de prateleira e aceitabilidade do produto também devem ser conduzidas e comparadas com resultados referentes aos processos de conservação usualmente utilizados.

A utilização de um sistema de controle adaptado ao processamento contínuo por microondas permitiria o estudo de diversos tempos de exposição da amostra para uma dada temperatura o que forneceria dados suficientes para descrever o comportamento da PFO e POD frente à ação das microondas e avaliaria a existência de isoformas com estabilidades térmicas distintas para ambas as enzimas. Os parâmetros cinéticos de processo também seriam determinados e comparados com os resultados deste estudo.

Referências Bibliográficas*

ALEIXO, P. C.; NÓBREGA, J. A.; SANTOS JÚNIOR, D.; MULLER, R. C. S. Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química Nova**, v.23, n.3, p.310-312, mai./jun., 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 2, 16ed., Washington D. C., 1995.

ARAGÃO, W. M. A importância do coqueiro anão, 2000. Disponível em: <<http://www21.sede.embrapa.br/noticias/artigos/2000/artigo>>. Acesso em: jul. 2004.

ARAGÃO, W. M.; CRUZ, E. M. de O.; HELVÉCIO, J. S. Caracterização Morfológica da noz e química da água de coco em cultivares de coqueiro anão (*Cocos nucífera* L.), 2003, Disponível em: <<http://www.sbmp.org.br/cbmp2001area3/03Resumo252.htm>>. Acesso em 20 jul. 2003.

BARROSO, N. Coco será tema de curso e simpósio em Sergipe, 2001. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 15 out. 2003.

BOBROVNIK, S. A. Determination the rate constants of some biexponential reactions, **Biochemical and Biophysical Methods**, v. 42, n. 1-2, p. 49-63, jan., 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUFFLER, C. R. Introduction to microwaves. In: BUFFLER, C. R. **Microwave cooking and processing: engineering fundamentals for the food scientist**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. Cap. 1. p. 1 – 13.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BURNETTE, F. S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 1-6, 1977.

CAMPOS, C. F.; SOUZA, P. E. A.; COELHO, J. V.; GLÓRIA, M. B. A. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, p. 487-500, ago., 1996.

CAÑUMIR, J. A.; CELIS, J. E.; DE BRUIJN, J.; VIDAL, L. V. Pasteurization of apple juice by using microwaves. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 35, n. 5, p. 389-392, ago., 2002.

CHANG, B. S.; PARK, K. H.; LUND, D. B. Thermal Inactivation kinetics of horseradish peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 3, p. 920-923, 1988.

CHUTINTRASRI, B.; NOOMHORM, A. Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 492-495, jun., 2006.

COLLET, L. S. F. C. A.; SHIGEOKA, D. S.; BADOLATO, G. G.; TADINI, C. C. A kinetic study on pectinesterase inactivation during continuous pasteurization of orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 1, p. 125-129, jul., 2005.

CTENAS, M. L .B.; CTENAS, A. C.; QUAST, D. Coco. In: CTENAS, M. L .B.; CTENAS, A. C.; QUAST, D. **Frutas das Terras Brasileiras**. São Paulo: C2, 2000, p. 99-103.

DENG, Y.; SINGH, R. K.; LEE, J. H. Estimation of temperature profiles in microwaved particulates using enzyme and vision system. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 331-338, mai., 2003.

DITCHFIELD, C.; MACHOSHVILI, I. A.; PENNA, T. C. V.; TADINI, C. C. Polyphenol oxidase and peroxidase thermal inactivation kinetics used as indicators for pasteurization of acidify banana puree (*Musa cavendishi*, Lamb.). **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, n.1, no prelo 2006.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romana*). **Food Chemistry**, v. 64, N. 3, p. 351-359, fev., 1999.

DUARTE, A. C. P.; COELHO, M. A. Z; LEITE, S. G. F. Identification of peroxidase and tyrosinase in green coconut water. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 3, n. 5, p. 266 – 270, 2002.

FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 263-271, ago., 1996.

GENTRY, T. S.; ROBERTS, J. S. Formation kinetics and application of 5-hydroxymethylfurfural as a time-temperature indicator of lethality for continuous pasteurization of apple cider. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, n. 3, p. 327-333, set., 2004.

GEOCITIES. A Cultura do coqueiro, origem da cultura. Disponível em: <<http://www.geocities.com/coqueiroanaoindex.html>>. Acesso em: 06 fev. 2003.

GERARD, K. A.; ROBERTS, J. S. Microwave heating of apple mash to improve juice yield and quality. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 37, n. 5, p. 551-557, ago., 2004.

GIBRIEL, A. Y.; EL-SHRIGI, A. F.; KANDIL, S. H.; EL-MANSY, H. A. Effect of pH, sodium chloride and sucrose on heat-inactivation and reactivation of peroxidases in certain foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 261-266, 1978.

GUERRERO-BELTRÁN, J. A., SWANSON, B. G., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 625-630, set., 2005.

GÜNES, B.; BAYINDIRLI, A. Peroxidase and lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots, **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 406-410, out., 1993.

HEDDLESON, R. A.; DOORES, S. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens – a review. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 11, p. 1025-1037, 1994.

INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION. IEC – 60705. **Household microwave ovens –Methods for measuring performance**. 3.1 ed., Geneva, 2004.

JIMÉNEZ-VIEYRA.; ZAMBRANO-ZARAGOZA; AGUILLAR-RODRÍGUEZ. Effect of treatment with microwave energy on polyphenoloxidase and peroxidase activity in fruits. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 9, 2004. Montpellier. **Anais International Congress on Engineering and Food**, Montpellier, mar., 2004.

JOFFE, F. M.; BALL, C. O. Kinetics and energetics of thermal inactivation and the regeneration rates of a peroxidase system. **Journal of Food Science**, v. 27, p. 587-592, 1962.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. Introduction to microwave acid decomposition. In: **Introduction to microwave sample preparation**. Washington: ACS Professional Reference Book, 1988, p. 1-6.

LEMOS, M. A.; OLIVEIRA, J. C.; SARAIVA, J. A. Influence of pH on the thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase in aqueous solution. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 33, n. 5, p. 362-368, ago., 2000.

LING, A. C.; LUND, D. B. Determining kinetic parameters for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isoenzymes from thermal destruction curves. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1307-1310, 1978.

LOPEZ-FANDINO, R.; VILLAMIEL, M.; CORZO, N.; OLANO, A. Assessment of the thermal treatment of milk during continuous microwave and conventional heating. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 8, p.889-892, 1996.

LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A.; SILVA, M. A. da. Heat inactivation of soluble and bound peroxidase from papaya fruit. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 155-158, jul./dez., 1995.

LU, A. T.; WHITAKER, J. R. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 1173-1177, 1974.

LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 197-201, 2003.

MACHADO, M. F.; SARAIVA, J. Inactivation and reactivation kinetics of horseradish peroxidase in phosphate buffer and buffer-dimethylformamide solutions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 451-457, dez., 2002.

MACIEL, M. I.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, I. P. da Effects of different storage conditions on preservation of coconut (*Cocos nucifera*) water. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 16, p 13-22, 1992.

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C. D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 72-77, jan./mar., 2005.

MATSUI, K. N.; de OLIVEIRA, P. V.; TADINI, C. C. Inativação das enzimas presentes na água de coco verde por energia de microondas em processo descontínuo. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19, 2004. Recife/PE. **Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

MATSUI, K. N.; de OLIVEIRA, P. V.; TADINI, C. C. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, no prelo, 2006.

MENDONÇA, S. C. de; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, n. 2, p. 113-118, jul./dez., 2003.

MOZHAEV, V. V.; MARTINEK, K. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). **Enzyme Microbial Technology**, v. 4, n. 5, p. 299-309, set., 1982.

MUDGETT, R. E. Electrical properties of foods in microwave processing. **Food Technology**, p. 109-115, fev., 1982.

MUDGETT, R. E. Microwave properties and heating characteristics of food. **Food Technology**, v. 40, n. 6, p. 84-93, 1986.

MURASAKI, N. C.; TADINI, C. C. Inativação da peroxidase e da polifenoloxidase no processo térmico descontínuo da água de coco verde (*Cocos nucifera* L). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 10, 2002, São Carlos. **Anais do Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**. São Paulo: Universidade de São Paulo, v.1, p. 2438, 2002.

MURASAKI, N. C.; da SILVA, R. M. S., TADINI, C. C. Inativação térmica por processo descontínuo e contínuo da peroxidase e polifenoloxidase presentes na água de coco verde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife/PE. **Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2004.

MURASAKI, N. C. **Cinética de inativação térmica da peroxidase e da polifenoloxidase presentes na água de coco verde por processo térmico contínuo**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

NAOZUKA, J. **Estudo da influência de processos de conservação na distribuição de espécies elementares em água de coco por espectrometria de absorção e emissão atômica**. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

NIKDEL, S.; CHEN, C. S.; PARISH, M. E.; MACKELLAR, D. G.; FRIEDRICH, L. M. Pasteurization of citrus juice with microwave energy in continuous flow unit. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 41, p. 2116-9, 1993.

PEACOCK, S. Predicting physical properties of factory juices and syrups. **Journal International Sugar**, v. 97, n. 1162, p. 571-577, 1995.

POLAKOVIC, M.; VRÁBEL, P. Analysis of the mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Critical assessment of inactivation experiments. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 8, p. 787-800, 1996.

PORCELLI, M.; CACCIAPUOTI, S. F.; MASSA, R.; d'AMBROSIO, G.; BERTOLDO, C.; DE ROSA, M.; ZAPPIA, V. Non-Thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. **FEBS Letters - Federation of European Biochemical Societies**, v. 402, n. 2-3, p. 102-106, FEV., 1997.

PUMMER, S.; HEIL, P.; MALECK, W.; PETROIANU, G. Influence of coconut water on hemostasis. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 19, n. 4, p. 287 – 289, jul., 2001.

PÜTTER, J.; BECKER, R. Peroxidases. In Bergmeyer, H. U.; Bergmeyer, J.; Grassl, M. **Methods of enzymatic analysis**. 3a edição. Weinheim: Verlag Chemie, 1983, p. 286-293.

RAMÍREZ, E. C.; WHITAKER, J. R.; VIRADOR, V. M. Polyphenol oxidase. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of Food Enzymology**. New York : Marcel Dekker, 2003. Cap. 39, p. 509-523.

RAPEANU, G., LOEY, A. V., SMOUT, C., HENDRICKX, M. Effect of pH on thermal and/or pressure inactivation of victoria grape (*Vitis vinifera sativa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 5, p. 301-307, out., 2005.

REDDY, K. V.; DAS, M.; DAS, S. K. Filtration resistances in non-thermal sterilization of green coconut water. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 3, p. 381-385, 2005.

RIPARDO, S. Coco muda a paisagem do interior paulista. **Folha de São Paulo**, 18 jan. 2000. Agrofolha, p. 6.3.

ROBINSON, D. S. Peroxidases and catalases in foods. In ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative enzymes in foods**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. p. 1-45.

ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. **Água de coco - Métodos de Conservação**. Fortaleza: SEBRAE/CE, EMBRAPA, 2000. 42 p.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification. **Tetrahedron**, v. 59, p. 5431-5436, 2003.

SANSEVERINO A. M. Microondas em Síntese Orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p.660-667, jul., 2002.

SCHIFFMANN, R. F. Food Product Development for Microwave Processing. **Food Technology**, p. 94-98, jun. 1986.

SCHMIDT, K.; VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Heat inactivation of a soluble peroxidase extract from acetone powder of kohlrabi and its reactivation after heat treatment. **Food Chemistry**, v. 16, p. 103-113, 1985.

SCHWEIGGERT, U.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Inactivation of peroxidase, polyphenoloxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 403-411, dez., 2005.

SIERRA, I.; VIDAL-VALVERDE, C.; OLANO, A. The effects of continuous flow microwave treatment and conventional heating on the nutritional value of milk as shown by influence on vitamin B₁ retention. **European Food Research Technology**, v. 209, p. 352-354, 1999.

SOUZA, C. R.; SOUZA, M. P. FARIA, J. A. F.; VIOTTO, L. A. Avaliação de processo de ultrafiltração de água de coco (*Cocos Nucífera*). In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19, 2004, Recife/PE. **Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2004.

SOYSAL, Ç.; SÖYLEMEZ, Z. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 68, n. 3, p. 349-356, jun., 2005.

TAJCHAKAVIT, S; RAMASWAMY, H. S. Continuous-Flow Microwave Inactivation Kinetics of Pectin Methyl Esterase in Orange Juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 21, p 365-378, 1997a.

TAJCHAKAVIT, S; RAMASWAMY, H. S. Thermal vs. Microwave Inactivation Kinetics of Pectin Methylesterase in Orange Juice under Batch Mode Heating Conditions. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p 85-93, fev., 1997b.

TAJCHAKAVIT, S.; RAMASWAMY, H. S, FUSTIER, P. Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. **Food Research International**, v.31, n.10, p.713-722, dez., 1998.

TOLEDO, R. T. Thermal process calculations. In: TOLEDO, R. T. **Fundamentals of food process engineering**, 2^a ed. New York: Chapman & Hall, 1999, p. 315-397.

TRIBESS, T. B.; TADINI, C. C. Inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1328-1335, 2006.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 321-325, set./dez., 2001.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, set. 1981.

WANG, Y.; WIG, T. D.; TANG, J.; HALLBERG, L. M. Dielectric Properties of Foods Relevant to RF and Microwave Pasteurization and Sterilization. **Journal of Food Engineering**, v. 57, n. 3, p. 257-268, mai., 2003.

WATZKE, H. J. Impact processing on bioavailability examples of minerals in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 8-9, p. 320-327, ago., 1998.

WEEMAES, C.; RUBENS, P.; de CORDT, S.; LUDI KHUYSE, L.; VAN den BROECK, I.; HENDRICKX, M.; HEREMANS, K.; TOBBACK, P. Temperature sensitivity and pressure resistance of mushroom polyphenoloxidase. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p. 261-266, 1997.

WEEMAES, C. A.; LUDI KHUYSE, L. R.; VAN den BROECK, I.; HENDRICKX, M. E.; TOBBACK, P. P. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. **Lebensmittel - Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 44-49, jan., 1998.

WENG, Z.; HENDRICKX, M.; MAESMANS, G.; TOBBACK, P. Immobilized peroxidase: a potential bioindicator for evaluation of thermal processes. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 2, p. 567-570, 1991a.

WENG, Z.; HENDRICKX, M.; MAESMANS, G.; GEBRUERS, K.; TOBBACK, P. Thermostability of soluble and immobilized horseradish peroxidase. **Journal of Food Science** v. 56, n. 2, p. 574-578, 1991b.

WHITAKER, J. R.; **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker, 1972, 636p.

WOSIACKI, G.; DEMIATE, I. M.; MELLO, F. Nata de coco – o estado da arte. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 142-155, jun./dez., 1996.

YAMAMOTO, H. Y.; STEIBERG, M. P.; NELSON, A. I. Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. **Journal of Food Science**, v. 27, p. 113-119, 1962.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZAWISTOWSKY, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M.; Polyphenoloxidase. In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative enzymes in foods**. New York: Elsevier Applied Science, 1991, p. 217-271.