NATHALIA DA CUNHA MURASAKI

**CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PEROXIDASE E DA
POLIFENOLOXIDASE PRESENTES NA ÁGUA DE COCO VERDE POR
PROCESSO TÉRMICO CONTÍNUO**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Engenharia

São Paulo
2005

NATHALIA DA CUNHA MURASAKI

**CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PEROXIDASE E DA
POLIFENOLOXIDASE PRESENTES NA ÁGUA DE COCO VERDE POR
PROCESSO TÉRMICO CONTÍNUO**

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Engenharia

Área de Concentração:
Engenharia Química

Orientadora: Prof. Livre-Docente
Carmen Cecília Tadini

São Paulo
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Murasaki, Nathalia da Cunha

Cinética de inativação térmica da peroxidase e da polifenoloxidase presentes na água de coco verde por processo térmico contínuo / N.C. Murasaki. -- São Paulo, 2005.

78p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

**1.Processos contínuos 2.Enzimas 3.Inativação térmica
4.Água de coco I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica.
Departamento de Engenharia Química II.t.**

Aos meus pais Sônia e Jacir,
às minhas irmãs Adriana e Gabriela e
ao André com carinho

AGRADECIMENTOS

Ao bondoso Deus.

À Prof. Dra. Carmen C. Tadini pela orientação e dedicação com seus orientados.

Ao Prof. Dr. Pedro Oliveira Vitoriano e Dr. Amauri Rosenthal pela importante contribuição durante a elaboração desse trabalho.

Aos professores Dra. Beatriz Kilikian e Dr. Aldo Tonso pela orientação no PAE.

Aos meus tios José Roberto Cardoso, Marisa Ortegos da Cunha e José Nilson Machado pelo incentivo e exemplo.

Aos colegas: Carolina Singer, Cynthia Ditchfield, Denise Tavares, Fabiana Hilsenrath, Gisele Miyashira, Ivan Nunes, Kátia Matsui, Laura Carr, Patrícia Hamano, Sandra Orosco, Tatiana Matuda, Tatiana Tribess, Vanessa Duarte e Prof. Dr. Jorge Gut, pelas grandes amizades, pelo incentivo, colaboração e horas de descontração. Aos amigos Aurea Sugai e Bruno Esteves, que também foram os abridores oficiais de coco e à Lucia Collet pela importante colaboração e ajuda na parte experimental.

Ao Rodrigo Martins pela sua valiosa ajuda no início da minha parte experimental.

Aos meus pais Sônia e Jacir e irmãs Adriana e Gabriela pelo incentivo e apoio.

Ao querido André pela dedicação, incentivo e companhia.

Aos amigos Mariana, Gustavo, Márcia, Fernando, Priscila e Fábio pelos momentos de descontração.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na execução deste trabalho.

À Capes pela bolsa concedida.

RESUMO

Considerando a necessidade da pasteurização da água de coco verde, após a abertura do fruto, devido à ação de microrganismos e das enzimas presentes, peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFD), o presente trabalho tem como objetivo estudar o comportamento da atividade dessas enzimas, através de processo térmico contínuo. Na primeira parte foi estudada a cinética de inativação térmica das enzimas em processo de pasteurização da água de coco, realizado em trocador de calor a placas (TCP) de laboratório, ARMFIELD FT 43–A, a temperatura de 90°C em diferentes tempos de retenção. Amostras da água de coco não processada e processada foram congeladas a – 30 °C para as análises enzimáticas. Na segunda parte, com base nos resultados obtidos de cinética, foram realizados processos a 90 °C com tempos de retenção de 120, 180 e 200 s para o estudo do comportamento dessas enzimas durante o armazenamento. Análises de pH, acidez, turbidez e atividade enzimática também foram realizadas durante o tempo de armazenamento de amostras da água de coco processada e não processada em temperatura ambiente, refrigerada (10 °C) e congelada (- 20 °C). Cada lote de água de coco foi caracterizado pela densidade, teores de sólidos totais e solúveis, cinzas, pH, acidez e turbidez. Nos processos térmicos contínuos realizados a 90 °C a POD e PFD presentes na água de coco apresentaram pelo menos duas isoenzimas com estabilidades diferentes e a PFD mostrou-se mais termorresistente que a POD. A POD presente na água de coco processada, durante o armazenamento a – 30 °C, apresentou-se mais estável que a PFD. A água de coco processada que apresentou maior estabilidade físico-química e enzimática foi a armazenada congelada.

ABSTRACT

Considering the need for green coconut water pasteurization after opening the fruit due to microbial and enzymatic (peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PFD)) action, the objective of this work is to study the behavior of the activity of these enzymes during continuous thermal processing. The first stage of the work was the study of the enzymes thermal inactivation kinetics during continuous pasteurization of coconut water, performed in a laboratory plate heat exchanger, Armfield 43 – A, at a temperature of 90 °C with different holding times. Samples of unprocessed and processed coconut water were frozen at - 30 °C for enzymatic analyses. In the second stage, based on the results obtained, processing was performed at 90 °C with holding times of 80, 120, 180 and 200 s for studying the behavior of these enzymes during storage. Analyses of the pH, titratable acidity, turbidity and enzymatic activity were conducted during storage in processed and unprocessed samples kept at ambient temperature, refrigerated (10 °C) and frozen (- 20°C). Each coconut water batch was characterized by density, total and soluble solids, ashes, pH, titratable acidity and turbidity. For the continuous thermal processes carried out at 90 °C both POD and PFD presented at least two isozymes with different thermal stability, and PFD was more thermally resistant than POD. During storage at - 30°C POD in processed coconut water was more stable than PFD. The highest physicochemical and enzymatic stability was achieved for processed coconut water under frozen storage.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 MATÉRIA PRIMA.....	23
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	23
3.3 REAGENTES.....	26
3.4 PARTE EXPERIMENTAL.....	26
3.4.1 <i>Processamento contínuo</i>	26
3.4.2 <i>Amostragem</i>	28
3.4.3 <i>Análises</i>	30
3.4.3.1 Análises físico-químicas.....	30
3.4.3.2 Análise da atividade enzimática.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES DE ÁGUA DE COCO.....	33
4.2 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA.....	35
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POD E PFD E ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS DA ÁGUA DE COCO VERDE DURANTE TEMPO DE ARMAZENAMENTO.....	40
5. CONCLUSÕES.....	71
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	73
7. LISTA DE REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Parâmetros de cinética e as constantes de velocidade para mecanismos de uma reação de acordo com a equação: $a = (1 - b_1) + b_1 \times \exp(-d_1 \times t)$. k_1 e k_2 são as constantes de velocidade e g_2/g_1 é a razão das atividades molares das formas E_1 e E_2	17
Tabela 2.2	Mecanismo árvore demonstrando o caráter diversificado da atividade enzimática. Os mecanismos no mesmo nível na árvore dão perfis de atividade – tempo idênticos, correspondentes a: <i>a.</i> para o 1º nível: $a = \exp(-d_1 \times t)$; <i>b.</i> para o 2º nível: $a = (1 - b_1) + b_1 \times \exp(-d_1 \times t)$; <i>c.</i> para o 3º nível $a = b_1 \times \exp(-d_1 \times t) + (1 - b_1) \times \exp(-d_2 \times t)$; <i>d.</i> para o 4º nível: $a = (1 - b_1 - b_2) + b_1 \times \exp(-d_1 \times t) + b_2 \times \exp(-d_2 \times t)$	18
Tabela 3.4.1.1	Conjuntos de tubos de retenção utilizados no trocador de calor a placas para obtenção dos tempos de retenção de 20, 40, 80, 120, 160, 180 e 300 s, de acordo com a vazão do produto.....	27
Tabela 4.1.1	Correspondência entre os lotes de água de coco e as condições de processo.....	33
Tabela 4.1.2	Valores médios obtidos nas análises de acidez, pH, cinzas, sólidos totais, sólidos solúveis, densidade e turbidez da água extraída dos cocos.....	34
Tabela 4.2.1	Tempos reais dos processos realizados no trocador de calor a placas, de acordo com o volume dos tubos de retenção.....	35
Tabela 4.2.2	Valores da atividade residual da POD e PFD na água de coco processada a 90 °C em tempos de retenção variando entre 21,5 e 379,8 s.....	36
Tabela 4.2.3	Parâmetros do modelo multicomponente de primeira ordem com 2 e 3 parâmetros para a POD e PFD, respectivamente....	38
Tabela 4.3.1	Valores médios das atividades iniciais da POD e PFD na água de coco processada e não processada.....	40

Tabela 4.3.2	Valores da atividade residual da POD na água de coco não processada, armazenada congelada.....	43
Tabela 4.3.3	Valores da atividade residual da PFD na água de coco não processada, armazenada congelada.....	45
Tabela 4.3.4	Valores da atividade residual da POD presente na água de coco processada, durante tempo de armazenamento sob refrigeração.....	48
Tabela 4.3.5	Valores da atividade residual da POD presente na água de coco processada, durante o armazenamento congelado.....	49
Tabela 4.3.6	Valores da atividade residual da PFD presente na água de coco processada, durante o armazenamento sob refrigeração.....	53
Tabela 4.3.7	Valores da atividade residual da PFD presente na água de coco processada, durante o armazenamento congelado.....	54
Tabela 4.3.8	Valores de pH, acidez e turbidez da água de coco não processada de acordo com a condição de armazenamento.....	57
Tabela 4.3.9	Valores de pH, acidez e turbidez da água de coco processada ao longo do tempo de acordo com a condição de armazenamento.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Esquema cíclico para a formação do composto e subsequente oxidação de substratos doadores de elétrons.....	8
Figura 2.2	Reações catalisadas pela PFD. (a) hidroxilação de monofenol em O-difenol; (b) dehidrogenação de O-difenol em O-quinonas.....	12
Figura 2.3	Mecanismo de formação da melanina da tirosina.....	12
Figura 3.2.1	Espectrofotômetro UV-VIS, marca FEMTO, modelo 700 plus.....	24
Figura 3.2.2	pH-STAT, marca RADIOMETER, modelo PHM-290.....	24
Figura 3.4.1.1	Trocador de calor ARMFIELD modelo FT-43, com tubo de retenção forma de “S”.....	27
Figura 3.4.2.1	Fluxograma de amostragem da água de coco não processada e processada armazenada em três condições de armazenamento (ambiente, refrigerada e congelada).....	29
Figura 4.2.1	Isoterma de inativação térmica a 90 °C da POD e PFD, presente na água de coco.....	39
Figura 4.3.1	Dados da atividade enzimática residual da PFD da água de coco logo após o processo comparados com os dados experimentais que geraram o modelo de cinética multicomponente de 1 ^a ordem com 3 parâmetros.....	41
Figura 4.3.2	Dados da atividade enzimática residual da POD da água de coco logo após o processo, comparados com os dados experimentais que geram o modelo de cinética multicomponente de 1 ^a ordem com 2 parâmetros.....	42
Figura 4.3.3	Variação da atividade da POD presente na água de coco não processada congelada, durante o tempo de armazenamento....	47
Figura 4.3.4	Variação da atividade da PFD presente na água de coco não processada congelada, durante o tempo de armazenamento.....	47

Figura 4.3.5	Atividade da POD presente na água de coco processada, armazenada refrigerada.....	51
Figura 4.3.6	Atividade da POD presente na água de coco processada, armazenada congelada.....	51
Figura 4.3.7	Atividade da PFD presente na água de coco processada, armazenada refrigerada.....	55
Figura 4.3.8	Atividade da PFD presente na água de coco processada, armazenada congelada.....	55
Figura 4.3.9	Valores da acidez medida na água de coco não processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.....	60
Figura 4.3.10	Valores do pH medido na água de coco não processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.....	60
Figura 4.3.11	Valores da turbidez medida na água de coco não processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.....	60
Figura 4.3.12	Variação da acidez da água de coco não processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).	61
Figura 4.3.13	Variação do pH da água de coco não processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).....	61
Figura 4.3.14	Variação da turbidez da água de coco não processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).....	62
Figura 4.3.15	Valores da acidez medida na água de coco processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.....	66
Figura 4.3.16	Valores do pH medidos na água de coco processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.....	66

Figura 4.3.17	Valores da turbidez medida na água de coco processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.....	67
Figura 4.3.18	Variação da acidez da água de coco processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).....	67
Figura 4.3.19	Variação do pH da água de coco processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).....	68
Figura 4.3.20	Variação da turbidez da água de coco processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).....	68

LISTA DE SIGLAS

ABIA	Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação
FPLC	Cromatografia líquida de proteína rápida
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFD	Polifenoloxidase
POD	Peroxidase
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Atividade da fração da isoenzima menos resistente em relação a atividade enzimática total
A_0	Atividade enzimática no tempo zero
A	Atividade enzimática a qualquer tempo
C_{oi}	Atividade da enzima por unidade de volume no tempo zero
C_i	Atividade da enzima por unidade de volume no tempo t
D	Forma inativa da enzima
E_1	Forma ativa nativa da enzima
k	Constante de reação (s^{-1})
PFD_0	Atividade da PFD presente na água de coco não processada
PFD_i	Atividade inicial da PFD
POD_0	Atividade da POD presente na água de coco não processada
POD_i	Atividade inicial da POD
r	Taxa de reação
S	Substrato
γ_i	Atividade específica molar da isoenzima

1. INTRODUÇÃO

A água de coco verde, pela sua rica composição nutricional, atua como estimulante de vários processos do trato digestivo, auxilia as funções cardíacas e na reposição de sais minerais e água perdidos por atletas, além de ser recomendada para diabéticos. Tais benefícios à saúde fazem da água de coco um concorrente potencial a refrigerantes e bebidas isotônicas e segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA), em 2002 o consumo de água de coco representou cerca de 1,4 % desse mercado, estimado em 10 bilhões de litros/ano. Essa pequena participação no mercado dá a dimensão das possibilidades de crescimento do consumo da água de coco (PESSOA; SILVA; CAMARGO, 2002).

O processo de pasteurização, um dos mais empregados em alimentos líquidos, tem o objetivo de destruir os microrganismos patogênicos e deterioradores e inativar enzimas presentes nesses alimentos que tenham uma ação indesejada e possam alterar as suas características. A obtenção do melhor binômio tempo-temperatura é importante para minimizar alterações nas propriedades nutricionais e sensoriais do produto.

Couto *et al.* (2004) realizaram um estudo de aceitação de água de coco “in natura”, refrigerada e de duas marcas industrializadas (Ind. A e Ind. B), disponíveis no mercado varejista. As amostras foram analisadas por 40 provadores, através do método de escala hedônica de nove pontos. Tanto a amostra Ind. B, quanto a amostra “in natura” diferiram significativamente das demais, sendo a média obtida para a Ind. B 5,8, inferior a “in natura” (média 7,5). A água de coco “in natura” foi a que obteve melhor aceitação pelos provadores, seguida pela Ind. B, no entanto a água de coco Ind. A e refrigerada apresentaram tendência para a rejeição. A justificativa para a maior aceitação da amostra “in natura” pode ser atribuída às características sensoriais (aparência límpida, aroma, sabor e textura homogênea) descritas pelos provadores como sendo atributos característicos de água de coco.

A aplicação de tecnologias de processamento e conservação da água de coco é necessária, pois após a abertura da fruta, além de ficar exposta à ação dos microrganismos presentes no ambiente, reações químicas acontecem devido à ação de enzimas como a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PFD) que provocam o

seu escurecimento, modificando as suas características sensoriais e seu valor nutricional.

1.1. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo o estudo da cinética de inativação térmica das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFD) presentes na água de coco verde, por processo térmico contínuo em diferentes tempos de retenção.

Objetivos específicos:

- Obter dados de atividade residual da POD e PFD da água de coco processada a temperatura de processo a 90 °C, em 7 tempos de retenção (0; 20; 40; 80; 160; 180 e 300 s);
- Ajustar os resultados obtidos da atividade residual das enzimas a modelos cinéticos multicomponentes de 1^a. ordem, existentes na literatura;
- Verificar a influência da condição de armazenamento (refrigeração e congelamento) sobre a atividade residual das enzimas presentes na água de coco processada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A água de coco verde possui muitas aplicações, além de ser uma bebida refrescante utilizada na alimentação humana. Na biotecnologia, a água de coco pode ser empregada como meio de cultura bacteriológica e como meio de crescimento para fermentação de levedo e vinagre. Suas aplicações medicinais também são importantes como no auxílio do tratamento de distúrbios intestinais, na recuperação de problemas do estômago, na redução do colesterol, no tratamento da artrite, no controle da pressão arterial, na redução da febre e também pode ser usado como calmante natural. Durante a segunda guerra mundial, a água de coco era empregada na rehidratação oral e na perfusão intravenosa, substituindo o soro fisiológico, para os soldados japoneses (ANZALDO *et al.*, 1982); (DUPAIGNE, 1971); (JARMAN; GRIMWOOD, 1975); (SISON, 1977); (JASPER, 1979 apud MACIEL; OLIVEIRA; da SILVA, 1992); (PINTO, 1983 apud MACIEL; OLIVEIRA; da SILVA, 1992).

O coco verde, com 6 a 7 meses de desenvolvimento, contém cerca de 400 mL/fruto de uma deliciosa bebida, refrescante e nutritiva. A água de coco é uma mistura relativamente diluída, contendo 5% de sólidos totais, apresentando um conteúdo de sais minerais e açúcares que a torna uma bebida isotônica. A água do coco anão verde, com 7 meses, apresenta, em média: sacarose 280 mg/100mL; glicose 2378 mg/100mL; frutose 2400 mg/100mL; P 7,40 mg/100g; Ca 17,10 mg/100g; Na 7,05 mg/100g ; Mg 4,77 mg/100g; Mn 0,52 mg/100g; Fe 0,04 mg/100g; K 156,86 mg/100g; acidez 1,23 mEq/100g; pH 4,91; sólidos solúveis 5°Brix, vitamina C 1,2 mg/100mL; proteína 370 mg/100g e valor calórico de 27,51 Kcal/100g (PIERIS, 1971); (GONZALEZ, 1990 apud CAMPOS *et al.*, 1996); (ROSA; ABREU, 2000).

A composição eletrolítica da água de coco apresenta-se mais próxima do fluido intracelular do que do plasma extracelular. Os cátions predominantes são o potássio, cálcio e o magnésio. É uma solução hipotônica mais ácida, porém com densidade comparável com o plasma sanguíneo (CAMPBELL-FALCK *et al.*, 2000).

Apesar da alta concentração de açúcares e potássio presentes na água de coco, existe uma controvérsia sobre o seu uso para rehidratação oral. Inúmeros estudos defendem seu uso, porém outros defendem o uso exclusivo do soro oral lançado pela

OMS (Organização Mundial de Saúde) e UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância). Sua acidez, hipotonicidade e alto teor de potássio não fazem a água de coco um soro ideal para ser utilizada por um longo tempo, mas uma alternativa em situações de emergência. Quando utilizada em pequenos volumes e por curto período de tempo, a água de coco se apresenta eficaz na hidratação intravenosa, principalmente em regiões onde falta soro e a água de coco é abundante e barata. Por ser boa fonte de potássio, cloreto e cálcio, pode ser a melhor indicação em situações específicas em que o teor desses eletrólitos deva ser aumentado (CAMPBELL-FALCK *et al.*, 2000).

Os maiores constituintes da água de coco são os açúcares e os minerais, que conferem o sabor agradável à água e os menos presentes são as gorduras e as substâncias nitrogenadas (ANZALDO *et al.*, 1982); (JAYALEKSHMY *et al.*, 1986 apud MACIEL; OLIVEIRA; da SILVA, 1992); (JASPER, 1979 apud MACIEL; OLIVEIRA; da SILVA, 1992).

De acordo com Anzaldo (1985); Jayalekshmy *et al.* (1986) apud Campos *et al.* (1996), a composição da água de coco muda de acordo com o estágio de maturação do fruto. O nível de açúcares totais, sólidos totais e acidez total aumenta até o sexto mês de desenvolvimento e depois diminui enquanto que a concentração de lipídios e proteínas aumenta até o estágio final de desenvolvimento. Portanto, as diferenças encontradas na composição da água de coco podem ser devido à variedade do coco, o seu estágio de desenvolvimento, práticas de cultivo, bem como condições de transporte e armazenamento.

Atualmente, o Brasil possui 90 mil hectares de área plantada, três vezes mais do que há cinco anos, dos quais menos de 50 % estão em produção efetiva, com isso o mercado nacional de água de coco gira em torno de 600 milhões de litros ao ano (PAGEL, 2005).

A água de coco comercializada dentro do próprio fruto, apresenta problemas relacionados ao transporte, armazenamento e perecibilidade do produto. A água de coco verde envasada insere-se na linha dos produtos de conveniência, apresentando praticidade no manuseio, transporte, estocagem, uma vida de prateleira prolongada, além de permitir o seu consumo em locais fora das regiões produtoras. Com o

desenvolvimento de máquinas para extrair a água e tecnologia de envase, a venda da água de coco em embalagem longa vida dobrou nos últimos cinco anos, aumentando de 60 milhões para 120 milhões de unidades (ROSA; ABREU, 2000);(PAGEL, 2005).

De acordo com Manoel Cuenca, economista da Embrapa, o consumo da água de coco na Europa e nos Estados Unidos ainda é pequeno porque não há uma cultura de consumo do produto nesses países. Ele também ressaltou que o maior problema enfrentado pelas empresas que exportam água de coco para a Europa é a conservação do produto (MAZENOTTI, 2004).

A industrialização da água de coco é fundamental para evitar a deterioração provocada pelos microrganismos presentes no ambiente e a alteração de suas características originais provocada pelas enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFD). Presentes naturalmente na água de coco, essas enzimas possuem finalidades específicas e vitais para o fruto *in vivo*, porém, em contato com o ar atmosférico, desencadeiam reações indesejáveis, principalmente no que diz respeito à alteração de cor. O escurecimento enzimático em frutas e vegetais é normalmente devido a oxidação de compostos fenólicos em quinonas, que são polimerizadas em pigmentos marrom, vermelho e preto (GALEAZZI, 1984 apud CAMPOS *et al.*, 1996); (ROSA; ABREU, 2000); (VALDERRAMA; CLEMENTE, 2004).

Com o objetivo de aumentar a vida de prateleira da água de coco, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas. Como a esterilização causa uma forte alteração no sabor, vários tratamentos como: filtração, pasteurização, ajuste do teor de açúcares, pH, sólidos totais, concentração por osmose reversa e adição de conservantes estão sendo estudados para a preservação da água de coco (REDDY; DAS; DAS, 2004).

A ultrafiltração representa uma alternativa aos processos convencionais de tratamento térmico, pois pode operar à temperatura ambiente, não prejudicando as qualidades sensoriais e nutricionais do produto final (ARAGÃO, 2002 apud SOUZA *et al.*, 2004).

Souza *et al.* (2004) realizaram o processo de ultrafiltração com uma membrana monotubo, com massa molar de 50 kDa, pressão de transmembrana de 2,0

bar e velocidade tangencial de 5 m/s. A água de coco desenvolveu uma cor rosada após 24 horas, devido à ação enzimática. A ultrafiltração apresentou uma redução acentuada da carga microbiana inicial, porém não evitou a alteração de cor causada pela ação enzimática (SOUZA *et al.*, 2004).

A aplicação de tratamentos auxiliares e a adição de aditivos específicos (conservantes, antioxidantes, acidulantes, etc.) permitem estender a vida de prateleira do produto para até seis meses. O pH também deve ser corrigido com acidulantes orgânicos adequados e mantido em valores inferiores a 4,5 (ROSA; ABREU, 2000).

A pasteurização deve ser conduzida de forma a reduzir os níveis de contaminação microbiológica, numa faixa de temperatura de processo de 75 a 90 °C e o binômio, tempo-temperatura, deve ser otimizado considerando os atributos sensoriais e o tipo de equipamento disponível. Esta etapa é executada em equipamentos do tipo trocadores de calor a placas, dotados de sistema de aquecimento e resfriamento (ROSA; ABREU, 2000).

Campos *et al.* (1996) determinaram a composição química e físico-química da água de coco verde e estudaram a aplicação de alguns aditivos sobre a atividade enzimática, sem afetar as propriedades sensoriais da água de coco. Esses autores determinaram o efeito do tratamento térmico na atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase. Os testes foram realizados submergindo tubos contendo 10 mL de água de coco em banho de água termostatizado entre as temperaturas de 70 e 90 °C. Assim que os tubos alcançavam a temperatura desejada, eram coletados no intervalo específico de tempo e imediatamente refrigerados. Os aditivos estudados foram: ácido ascórbico, ácido sórbico e benzóico, metabissulfito de potássio, EDTA, ácido cítrico, dióxido de carbono e cisteína.

Os referidos autores relataram o pH 6,0 como o de maior atividade da PFD e pH 5,5 como o de maior atividade da POD em água de coco verde. De acordo com esses valores, a água de coco apresenta um pH favorável para a atividade de ambas enzimas. Estes mesmos autores constataram que o tratamento térmico a 90 °C foi o mais eficiente, no entanto, tempos de retenção de 550 e 310 segundos foram necessários para a completa inativação da polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente, portanto a polifenoloxidase apresentou maior resistência térmica que a peroxidase. Os experimentos realizados com os aditivos indicaram o ácido

ascórbico como o inibidor mais eficiente para ambas enzimas. Os resultados obtidos na análise sensorial indicaram que o melhor binômio tempo-temperatura, que não apresentou alteração nas propriedades sensoriais da água de coco, foi 100 s a 90 °C (CAMPOS *et al.*, 1996).

Duarte; Coelho; Leite (2002) estudaram a determinação da atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase presentes na água de coco verde fresca e caracterizaram essas enzimas por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) e eletroforese. Os autores obtiveram uma atividade de 0,3 U/mL para a POD e 5,0 U/mL para a PFD, valores menores do que os encontrados por Campos *et al.* (1996), 114,3 U/mL e 32,1 U/mL, respectivamente. Essa diferença pode ser explicada pela diferença na variedade, cultivares e desenvolvimento do fruto e procedimento de determinação da atividade enzimática. Pela cromatografia, os tempos de retenção de 0,30 min e 1,30 min foram obtidos para a peroxidase e polifenoloxidase, respectivamente. O método de eletroforese apresentou um peso molecular para a peroxidase de 44,63 KDa e não foi possível detectar o peso molecular da polifenoloxidase, esse fato pode ser explicado por uma baixa concentração dessa enzima nas amostras analisadas.

Tadini; Murasaki (2002) estudaram a inativação térmica das enzimas, POD e PFD, presentes na água de coco verde em processo descontínuo nas temperaturas 80 °C, 85 °C e 90 °C, durante tempos de inativação de 0 a 500 segundos. Isotermas de inativação térmica dessas enzimas apresentaram um desvio da cinética de primeira ordem, indicando a presença de isoenzimas, com frações mais termorresistentes e frações menos termorresistentes.

De acordo com Robinson (1991), quanto maior for a estabilidade das isoperoxidasas frente à temperatura, mais não linear é a curva de inativação térmica. Tadini; Murasaki (2003) observaram que para a POD presente na água de coco, quanto maior a temperatura de inativação térmica em processo descontínuo, maior foi desvio da cinética de primeira ordem.

Peroxidasas e catalases são largamente distribuídas nos reinos vegetal e animal, ambas na forma de hemoproteínas, utilizando o peróxido de hidrogênio como

substrato oxidante, porém a presença de íons metálicos, como selênio e vanádio ou um grupo prostético flavina já foi encontrada (ROBINSON, 1991).

A peroxidase faz parte de um grande grupo de enzimas chamadas de oxidoreduções. As peroxidases são encontradas nos tecidos vegetais em grupos de isoenzimas que podem ser separadas e detectadas em géis após eletroforese. Em plantas consumidas como alimentos, as peroxidases podem ser responsáveis pela perda de cor, sabor e textura, assim como atributos nutricionais. A atividade enzimática da peroxidase vem sendo considerada importante na qualidade do processamento de alimentos, pela sua conhecida termostabilidade (ROBINSON, 1991).

Durante o amadurecimento das frutas e particularmente durante o climatério, a atividade da peroxidase aumenta de acordo com a atividade de outras enzimas, como a poligalacturonase e a celulase, que estão normalmente associadas ao processo de amadurecimento. A peroxidase promove um grande número de reações e conseqüentemente possui uma versatilidade que não é excedida por nenhuma outra enzima. A peroxidase não existe sozinha nas frutas e vegetais, como as outras enzimas nas plantas. Existem naturalmente vários compostos fenólicos nos tecidos vegetais, que podem ser oxidados pela peroxidase na presença de uma pequena quantidade de hidroperóxido. Devido à diversidade dos compostos suscetíveis à oxidação causada pela peroxidase, a variedade de produtos formados é muito extensa. As peroxidases utilizam tanto um substrato oxidante quanto um redutor. O oxidante usualmente é um peróxido ou um ácido peróxido, ROOH (ROBINSON, 1991).

Geralmente, as peroxidases são definidas como as enzimas que catalisam a seguinte reação peroxidativa global:

A primeira etapa da oxidação inicial do substrato doador (AH₂) produz um radical (A[·]) livre. O peróxido de hidrogênio é geralmente o substrato oxidante (ROOH).

O composto I é produzido pela adição de 2 elétrons à forma nativa da peroxidase.

A Figura 2.1 apresenta a redução do composto II resultando na reformação da peroxidase nativa no estado de oxidação III.

As taxas de inativação e reativação da atividade da peroxidase dependem de vários fatores, como temperatura, tempo de aquecimento, pH, concentração salina e concentração de sacarose (GIBRIEL *et al.*, 1978) (ROBINSON, 1991).

GIBRIEL *et al.* (1978) estudaram a cinética de inativação e reativação térmica da peroxidase em cenoura, damasco e espinafre. Nas cenouras processadas a 70 °C por diferentes períodos de tempo, o ganho da atividade enzimática foi maior quando tempos menores foram utilizados. O ganho máximo da atividade foi obtido após 1-2 horas de armazenamento após aquecimento. Extratos armazenados a – 5 °C mostraram maior reativação enzimática do que as amostras armazenadas a 4 ou 18°C. É interessante notar que, em todos os casos, a atividade da peroxidase após 4 horas de armazenamento foi igual ou superior ao nível original antes do aquecimento.

Resultados obtidos no espinafre apresentaram um modelo semelhante aos obtidos no extrato de cenoura. No extrato de damasco, uma significativa redução da atividade da peroxidase foi observada durante o armazenamento.

Fig. 2.1 Esquema cíclico para a formação do composto I e subsequente oxidação de substratos doadores de elétrons (ROBINSON, 1987 apud ROBINSON, 1991).

A polifenoloxidase (PFD) tem recebido atenção contínua de pesquisadores, por estar envolvida no escurecimento enzimático de frutas e vegetais, bem como em crustáceos. Diferentes nomes têm sido associados a esta enzima como a tirosinase, creolase, catecolase, difenolase e fenolase, fato que reflete a habilidade desta enzima de utilizar diferentes compostos fenólicos como substrato (ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

A estabilidade térmica e as propriedades térmicas da PFD têm sido citadas em diversos trabalhos, o problema é que, em alguns são realizadas análises em condições experimentais diferentes, para estudar as características das enzimas, em outros, o estudo é sobre diferentes procedimentos de extração e purificação e, portanto torna-se difícil uma comparação direta entre os resultados obtidos (WEEMAES *et al.*, 1998).

Apesar de investigações sugerirem que o papel da PFD está relacionado com o mecanismo da respiração, ainda não há um consenso sobre o verdadeiro envolvimento que a PFD exerce sobre os tecidos vegetais, particularmente na biossíntese de fenólicos de plantas (VAUGHN; DUKE, 1984a, apud ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991).

A determinação precisa da PFD continua sendo um desafio, o que pode ser constatado nos numerosos métodos descritos na literatura. Isto devido as quinonas formadas durante o curso da reação enzimática, proveniente de reações secundárias, substratos não reagentes, oxigênio e outros constituintes da enzima. Estas reações levam à formação de moléculas poliméricas complexas interferindo na análise. A existência de outras enzimas com propriedades moleculares similares, tais como lacase e peroxidase, pode causar erro na medida da atividade da PFD.

A PFD é uma enzima contendo cobre capaz de catalisar dois diferentes tipos de reação: a hidroxilação de monofenóis a O- difenóis e a de hidrogenação de O- difenóis a O-quinonas, conforme a Figura 2.2. Os últimos produtos conduzem subsequentemente a uma série de reações não enzimáticas que produzem pigmentos e melanina de cor marrom escura, conforme Figura 2.3.

Fig. 2.2 Reações catalisadas pela PFD. (a) hidroxilação de monofenol em O-difenol; (b) dehidrogenação de O-difenol em O-quinonas (ZAWISTOWSKI; BILIADERIS; ESKIN, 1991)

Fig 2.3 Mecanismo de formação da melanina da tirosina (MASON, 1984 *apud* ZAWISTOWSKI, BILIADERIS; ESKIN, 1991).

Ainda segundo Vámos-Vigyázó (1981), apud Zawistowski, Biliaderis; Eskin (1991), a PFD é geralmente considerada uma enzima de baixa termoestabilidade. Tratamentos térmicos de duração relativamente curta a 70-90 °C são suficientes para reduzir substancialmente ou eliminar completamente a atividade da PFD, em produtos de origem vegetal. No entanto, a enzima é relativamente estável sob armazenamento a temperatura abaixo de zero.

De acordo com diversos autores, a inativação da polifenoloxidase por tratamento térmico é o método mais eficaz para controlar o escurecimento enzimático (WEEMAES *et al.*, 1998). Tate *et al.* (1964) apud Weemaes *et al.* (1998), ressaltaram a importância de um rápido tratamento térmico, pois o processo lento resulta na ativação da PFD presente nos tecidos vegetais. Entretanto, o tratamento térmico pode ser responsável por mudanças indesejáveis na textura e sabor. Além disso, o tratamento térmico para inativação da PFD em produtos com antocianinas não pode ser aplicado devido à sua degradação.

Weemaes *et al.* (1998) estudaram a estabilidade térmica da PFD em extrato de maçã, abacate, uva, pêra e ameixa. A inativação térmica das enzimas estudadas foi descrita como cinética de primeira ordem. No entanto, no caso da ameixa, uma queda na atividade enzimática foi observada nos primeiros 30 segundos. Como a PFD presente na ameixa é formada por pelo menos duas isoenzimas, é possível que o decaimento inicial rápido causado pelo aquecimento seja devido a isoenzima com menor termoestabilidade. O decréscimo mais lento foi decorrente da isoenzima mais termoestável.

Cano; Marin; Fúster (1990) constataram que o efeito do congelamento de fatias de banana, sem um tratamento prévio, sobre a atividade da PFD e da POD, difere dependendo da maturidade da fruta e do sistema enzimático. A peroxidase é uma enzima ligada à membrana celular e sua solubilidade é afetada com a condição de congelamento do tecido vegetal. Quanto menor a umidade, maior o número de cristais de gelo no protoplasma e maior o dano causado, assim a disponibilidade da peroxidase pode aumentar tanto quanto sua atividade residual. Os autores também constataram que o valor da atividade residual da PFD não diminuiu em consequência do congelamento de fatias de banana nos primeiros dias de armazenamento, no entanto, foi observada após 20 dias, uma atividade residual de 34%, sugerindo que o

processo de congelamento afeta diferentemente a atividade dessas duas enzimas (POD e PFD) presentes na banana.

Cinética de inativação enzimática:

As reações enzimáticas nos alimentos normalmente ocorrem a uma taxa que é limitada pela concentração das enzimas presentes.

Geralmente é considerado que a inativação térmica de enzimas segue a cinética de primeira ordem, eq. (2.1a) e (2.1b) (TOLEDO, 1991):

$$r = -\frac{dA}{dt} = k \times A \quad (2.1a)$$

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k \times t \quad (2.1b)$$

em que:

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

r é a taxa de reação

Desvios dessa cinética têm sido descritos por vários pesquisadores. Modelos têm sido propostos para explicar as inativações não lineares. Entre os modelos, um multicomponente de 1º ordem é expresso como a soma da cinética de seus componentes, supondo que cada componente segue a inativação da 1º ordem durante o aquecimento. Este modelo tem sido estudado principalmente para a inativação térmica de enzimas consistindo de isoenzimas com estabilidades térmicas diferentes (CERF, 1977; BAILEY; OLLER, 1986 apud FUJIKAWA; ITOH, 1996).

Teoria

(TOLEDO, 1991); (HELDMAN; LUND, 1992); (FUJIKAWA; ITOH, 1996); (POLAKOVIC; VRÁBEL, 1996); (BOBROVNIK, 2000)

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

Por definição temos, eq. (2.2):

$$C_i = C_{0_i} \exp(-k_i \times t) \quad (2.2)$$

C_{0_i} e C_i são as atividades da enzima por unidade de volume no tempo 0 e t , respectivamente, sendo $k_1 > k_2 > \dots > k_m > 0$. Então, eq. (2.3):

$$C = \int_{i=1}^m C_i, C_0 = \int_{i=1}^m C_{0_i} \quad (2.3)$$

Se a é definido como a razão residual de C/C_0 no tempo t , a razão é expressa usando as eq. 2.2 e 2.3, como segue:

$$a = \frac{\int_{i=1}^m C_{0_i} \exp(-k_i \times t)}{\int_{i=1}^m C_{0_i}} \quad (2.4)$$

Polakovic; Vrábel (1996) apresentam uma revisão sobre avaliação isotérmica de cinética de inativação de enzimas utilizando dados de literatura exibindo desvios da cinética de 1ª ordem.

Segundo os autores, a informação principal para elucidar a cinética da inativação enzimática é pela medida da atividade. A medida da atividade dá 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 da enzima, A_i , eq (2.5):

$$A = \sum_{i=1}^m A_i = \sum_{i=1}^m g_i C_i \quad (2.5)$$

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

$$g_i = f(T, S, pH, \dots) \quad (2.6)$$

A atividade é usualmente dada como um valor relativo a atividade inicial A_{0_i} , definida pela eq.(2.4) e reescrita como:

$$a = \frac{A}{A_0} = \frac{\sum_{i=1}^m g_i \times C_i}{\sum_{i=1}^m g_i \times C_{0_i}} \quad (2.7)$$

As eq. (2.5) a (2.7) 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 altamente útil conhecer o conteúdo de cada isoforma. Além disso, não se conhece a atividade molar das isoformas. Então, segundo Polakovic; Vrábel (1996), é difícil decidir pela curva de inativação se uma reação é reversível ou irreversível, se reações paralelas tomam lugar sobre uma mesma isoforma ou não, ou se compostos intermediários são ativos ou inativos.

Tem sido demonstrado como equações de cinética simples (principalmente cinética de 1ª ordem) podem distinguir um comportamento cinético mais complexo. Considerando como exemplo o mecanismo reversível simples:

onde E_1 é a forma ativa nativa 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:

$$a = \frac{k_2}{k_1 + k_2} + \left(1 - \frac{k_2}{k_1 + k_2}\right) \times \exp(-(k_1 + k_2) \times t) \quad (2.9)$$

A eq. (2.9) representa matematicamente uma função uniexponencial na forma de:

$$a = (1 - b_1) + b_1 \times \exp(-d_1 \times t) \quad (2.10)$$

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 aproxima um valor diferente de zero para tempo infinito.

A Tabela 2.1 mostra que existem outros dois mecanismos cuja relação entre a atividade enzimática e o tempo pode ser expressa na forma da eq. (2.10).

O número de mecanismos equivalentes aumenta consideravelmente se o mecanismo de inativação torna-se mais complexo. A Tabela 2.2 mostra que seis mecanismos, consistindo de duas reações, correspondem à eq. (2.11) escrita da seguinte forma (para duas isoformas):

$$a = b_1 \times \exp(-d_1 \times t) + (1 - b_1) \times \exp(-d_2 \times t) \quad (2.11)$$

que é a equação integral mais comum aplicada às inativações que apresentam desvios significativos da 1ª ordem.

Tabela 2.1 Parâmetros de cinética e as constantes de velocidade para mecanismos de uma reação de acordo com a equação: $a = (1 - b_1) + b_1 \times \exp(-d_1 \times t)$. k_1 e k_2 são as constantes de velocidade e g_2/g_1 é a razão das atividades molares das formas E_1 e E_2 .

Mecanismo	b_1	d_1
$E_1 \xrightleftharpoons[k_1]{k_2} D$	$\frac{k_1}{k_1 + k_2}$	$k_1 + k_2$
$E_1 \xrightleftharpoons[k_1]{k_2} E_2$	$\frac{k_1}{k_1 + k_2} \times \left(1 - \frac{g_2}{g_1}\right)$	$k_1 + k_2$
$E_1 \xrightarrow[k_1]{} E_2$	$1 - \frac{g_2}{g_1}$	k_1

Fonte: POLAKOVIC; VRÁBEL, 1996

Tabela 2.2 Mecanismo árvore demonstrando o caráter diversificado da atividade enzimática. Os mecanismos no mesmo nível na árvore dão perfis de atividade – tempo idênticos, correspondentes a: *a.* para o 1º nível: $a = \exp(-d_1 \times t)$; *b.* para o 2º nível: $a = (1 - b_1) + b_1 \times \exp(-d_1 \times t)$; *c.* para o 3º nível: $a = b_1 \times \exp(-d_1 \times t) + (1 - b_1) \times \exp(-d_2 \times t)$; *d.* para o 4º nível: $a = (1 - b_1 - b_2) + b_1 \times \exp(-d_1 \times t) + b_2 \times \exp(-d_2 \times t)$.

Fonte: POLAKOVIC; VRÁBEL, 1996

Efeito da temperatura:

Investigações dos efeitos da temperatura sobre a inativação enzimática são comumente conduzidas para obter as condições ótimas de processo. Se os parâmetros de cinética são avaliados a cada temperatura, isto providencia uma oportunidade para melhorar a análise do mecanismo e cinética de inativação. Isto consiste de: 1. o mecanismo de inativação deve ser validado a cada temperatura; 2. a equação de cinética deve conter parâmetros que não devem mudar com a temperatura; 3. os parâmetros dependentes da temperatura devem apresentar uma correlação consistente, como por exemplo, é esperado que as constantes de velocidade obedeçam a equação de Arrhenius.

Exemplos de parâmetros cinéticos não dependentes da temperatura são a razão das atividades iniciais nos modelos das isoenzimas ou a razão das atividades molares nos modelos seqüenciais.

Murasaki; da Silva; Tadini (2004) estudaram a inativação térmica da POD e PFD presentes na água de coco verde por processo térmico descontínuo. Os autores sugeriram que, no mínimo, duas isoenzimas da POD e da PFD, estão presentes com diferentes termoestabilidades. Um modelo multicomponente de primeira ordem de 3 parâmetros foi proposto para explicar a inativação térmica em processo descontínuo para a PFD e um modelo multicomponente de primeira ordem de 4 parâmetros para explicar a inativação térmica em processo descontínuo para a POD. Os modelos indicaram que tempos de inativação superior a 400 s a 90 °C não trouxeram benefícios em relação à inativação da POD e PFD, no entanto, a água de coco seria sobre-processada, diminuindo a sua qualidade nutricional e sensorial.

A cinética de inativação da polifenoloxidase e peroxidase também foi estudada por Ditchfield; Tadini (2004). Os autores estudaram essas duas enzimas presentes no purê de banana, em trocador tubular com tempo de retenção variando de 5,5 a 5,3 s e temperaturas de 69,8 a 100,1 °C. As bananas foram despolpadas e acrescidas de ácido ascórbico (0,2 %) e ácido cítrico para reduzir o pH a valor inferior a 4,5. Após o tratamento térmico do purê, as enzimas foram extraídas segundo Cano; Marin; Fúster (1990).

Os autores ajustaram os dados ao modelo multicomponente de primeira ordem, pois as enzimas apresentaram inativação bifásica indicando uma taxa de inativação na segunda fase menor que na primeira, devido à presença de duas isoenzimas. A melhor condição de processo foi de 2,87 s na temperatura de referência de 96,4 °C, pois a partir dessa condição houve alteração da qualidade do purê e a redução da atividade enzimática não foi significativa.

Soysal; Söylemez (2005) estudaram o tratamento térmico descontínuo da POD em cenoura. Foram imersos tubos contendo 2 mL do extrato cru da cenoura em banho de água com temperatura variando de 35-75 °C. As amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e rapidamente resfriadas em banho de gelo.

O gráfico mono-log da porcentagem da atividade residual pelo intervalo de tempo apresentou dois trechos lineares para temperaturas abaixo de 75 °C, indicando a existência de frações mais e menos resistentes. Este resultado pode ser descrito por um modelo bifásico de primeira ordem. Esse modelo é baseado na presença de 2 grupos de isoenzimas com estabilidades térmicas distintas, uma fração menos resistente, que sofre uma rápida inativação e uma fração mais resistente que não foi inativada num curto período de tempo. A inativação térmica a 75 °C apresentou-se monofásica, indicando a inativação da fração mais resistente (SOYSAL; SÖYLEMEZ, 2005).

Esses autores também estudaram a inativação enzimática por microondas. Um recipiente contendo aproximadamente 350 mL de água e um suporte para os tubos foram colocados no centro do microondas e os tubos contendo 5 mL de extrato de enzima foram posicionados acima da superfície da água. A água foi utilizada para dissipar o calor e impedir que a temperatura se elevasse muito. O aquecimento por microondas foi realizado a 70, 210, 350 e 700 W de potência em tempos variando de 15 s a 12 min. O extrato enzimático foi imediatamente resfriado imergindo os tubos em banho de gelo.

A inativação da POD pelo aquecimento por microondas seguiu a cinética de primeira ordem para todos níveis de microondas utilizados. O comportamento bifásico da inativação enzimática foi observado no tratamento com microondas a 70 e 210 W, sendo que a 350 e 700 W, a inativação foi monofásica. Como o controle de temperatura não foi aplicado ao sistema, a inativação da POD em cenouras pode ter

sido causada pela combinação da temperatura com o efeito das microondas. A fase monofásica para os altos valores de potência pode ser explicada pela elevação da temperatura que inativou a fração mais resistente da enzima (SOYSAL; SÖYLEMEZ, 2005).

Valderrama; Clemente (2004) estudaram a inativação da POD presente no extrato enzimático da casca e polpa de maçãs tipo Gala e Fuji. Em ambos os tipos, a atividade da peroxidase foi maior na casca. O concentrado enzimático extraído da casca e da polpa foi submetido a tratamento térmico a 65, 70, 75 e 80 °C e a máxima inativação obtida foi de 70 % para a isoenzima aniônica isolada da casca e da polpa em maçãs dos tipos Gala e Fuji. Entretanto, o mesmo tratamento aplicado a isoenzima catiônica apresentou uma inativação máxima de 20 %. A inativação térmica da peroxidase mostrou-se não linear em relação aos fatores de tempo e temperatura, concluindo que as isoenzimas possuem diferentes resistências térmicas.

Collet *et al.* (2005) estudaram a cinética de inativação da pectinesterase (PE) em pasteurização contínua de suco de laranja utilizando um trocador de calor a placas. Os experimentos foram realizados em três temperaturas (82,5 °C, 85,0 °C e 87,5 °C) e tempos de retenção variando entre 11,1 e 8,5 s.

Os autores observaram a influência do pH do suco de laranja não processado na inativação da atividade enzimática. Dessa maneira, os resultados obtidos foram classificados de acordo com o pH. Os autores ajustaram os dados referentes ao intervalo do pH do suco natural entre 3,8 – 3,9, a um modelo multicomponente de primeira ordem com três parâmetros, proposto por Fujikawa e Itoh (1996), que considera a presença de dois grupos de isoenzimas com termoresistências diferentes. Comparando os modelos obtidos para as três temperaturas, o processo a 82,5 °C apresentou uma maior inativação enzimática do que a 85,0 °C, fato que pode ser explicado pela diferença na proporção das duas isoenzimas presentes no suco de laranja e seu diferente comportamento frente ao pH.

Tadini; Tribess; Silva (2004) estudaram a correlação dos parâmetros do modelo não-linear com o pH na inativação térmica da pectinesterase (PE) em suco de laranja minimamente pasteurizado, em trocador de calor a placas. Duas variedades de laranja, *Citrus aurantium* L. e *Citrus aurantifolia*, foram utilizadas para obter misturas de pH ajustado nos valores 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0 e 4,1. Os sucos foram

processados em três temperaturas diferentes (82,5 °C, 85,0 °C e 87,5 °C) em 6 tempos de retenção, para cada condição.

Com os resultados de cinética obtidos, os autores propuseram um modelo de primeira ordem com três parâmetros, indicando a presença de duas isoenzimas com diferentes termoresistências. 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 pontos mínimos em pH 3,8 e 3,9 em temperatura de 85,0 °C. Os maiores valores da constante de velocidade foram encontrados nos valores extremos de pH e temperatura. Esses mesmos autores encontraram uma maior inativação no pH 3,6 e 85,0 °C e pH 3,7 a 85,0 °C e 87,5 °C. Nesses casos 99,9% de inativação foi obtida em tempos de retenção menores que 15 segundos. Com os dados de cinética obtidos, os autores observaram um ponto de inflexão na inativação da pectinesterase no pH 3,8, com mínima inativação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental foi constituída de duas etapas. Na primeira etapa, a água extraída de cocos verdes foi submetida a processo térmico contínuo em trocador de calor a placas. Foram realizados ensaios de pasteurização contínua da água de coco verde em trocador de calor a placas, a temperatura de 90°C em tempos de retenção de 0; 20; 40; 80; 160; 180 e 300 s. Análises físico-químicas e de atividade residual das enzimas na água de coco não processada e processada foram conduzidas para cada ensaio.

Na segunda etapa, medidas da atividade residual das enzimas presentes na água de coco processada foram realizadas em amostras armazenadas refrigeradas (10 °C) e congeladas (- 30 °C). Também foram realizadas análises físico-químicas (pH, acidez e turbidez) da água de coco processada armazenada em três condições diferentes (no ambiente, refrigerada a 10 °C e congelada a - 20 °C). Foram realizados 4 processamentos a 90 °C com tempos de retenção de 80 s, 120 s, 180 s e 200 s. Amostras de água de coco não processada também foram analisadas para comparação dos resultados.

3.1. Matéria prima

- ✓ Coco verde adquirido no comércio da cidade de São Paulo

3.2. Material e Equipamentos

- ✓ Balança digital, marca CHYO, modelo JK-200, precisão 0,0001 g, 220V;
- ✓ Balança eletrônica de precisão, marca METTLER, modelo PE 11, precisão 0,1g, 110V;
- ✓ Banho de água termostatizado, marca MLW, modelo U2C, 110V, 0,95kW.
- ✓ Banho de água termostatizado, marca QUIMIS, modelo Q-215 D2, 220V, 1600W;
- ✓ Cronômetro analógico com precisão de 0,1s;
- ✓ Densímetro, precisão 0,001g/L;

- ✓ Espectrofotômetro UV-VIS, marca FEMTO, modelo 700 PLUS, apresentado na Figura 3.2.1, provido de jaqueta acoplada em banho de água termostaticado para manter a temperatura constante e cubetas de vidro ótico 40 mm, marca HELLMMA;

Fig. 3.2.1 Espectrofotômetro UV-VIS, marca FEMTO, modelo 700 plus.

- ✓ “Freezer” horizontal, marca METALFRIO, modelo double action, 110 V, -20 °C
- ✓ “Freezer” Plasma vertical, marca FANEM, modelo 349 FV, 220 V, -30 °C, com indicador digital com precisão de 0,5 °C;
- ✓ Máquina de cubos de gelo, marca DROPSGELO – PROSDÓCIMO, 110 V;
- ✓ pH - STAT, marca RADIOMETER, modelo PHM-290, com auto bureta ABU 901, precisão 0,001 pH, apresentado na Figura 3.2.2;

Fig. 3.2.2 pH-STAT, marca RADIOMETER, modelo PHM-290.

- ✓ Refratômetro, marca CARLZEISSJENA, modelo I, precisão 0,1 ° Brix.
- ✓ Refrigerador, marca PROSDÓCIMO, modelo C41, 110V, mantido a 10 °C;
- ✓ Termômetro de alta precisão, marca INCOTERM, modelo 1056;
- ✓ Termômetro de alta precisão, marca INCOTERM, modelo 2079;
- ✓ Trocador de calor ARMIFIELD modelo FT-43 A, tipo placas, de laboratório, com acessórios e componentes: unidade processadora de pasteurização, console de controle, unidade de refrigeração modelo FT61-B, interface de aquisição de dados ARMIFIELD, modelo FT43 A-90 IFD, transformador de voltagem (10A) de 110V para 220 V. A unidade processadora do trocador de calor a placas tem as seguintes especificações:
 - Bomba de alimentação: peristáltica, construção sanitária e velocidade variável, capacidade máxima 30 L/h;
 - Controlador de temperatura: microprocessador com ação PID para o aquecedor de água, faixa de 0 a 100 °C;
 - Placas lisas de aço inox AISI 316, com gaxetas em Teflon® sanitário;
 - Sensores de temperatura: seis sensores semicondutores, providos de poço de aço inoxidável para uso em nove possíveis pontos de medição;
 - Sistema de aquecimento: bomba centrífuga de circulação de água quente aquecida por uma resistência elétrica de capacidade 1,5 kW. A vazão de água quente é variável através da válvula de agulha do rotâmetro até 1,5 L/min;
 - Tanque de alimentação com capacidade de 4 litros;
 - Tubos de retenção: “S” 75,8 cm³, Cilíndrico 240,0 cm³, Kitassatos de 500 e 1000 cm³;
 - Válvula de desvio de aço inoxidável, do tipo de três vias;
- ✓ Vidraria comum de laboratório

3.3. Reagentes

- ✓ Soluções de hidróxido de sódio 0,001 M; 0,01 M; 0,1 M;
- ✓ Solução tampão citrato 0,2M/fosfato 0,4M pH 6,5;
- ✓ Solução tampão fosfato (0,2M) monobásico/dibásico pH 6,0;
- ✓ Solução tampão ácido cítrico/hidróxido de sódio/ácido clorídrico pH 4,0;
- ✓ Solução tampão di-sódio hirogenofosfato/potássio di-hidrogenofosfato pH 7,0;
- ✓ Solução tampão ácido bórico/cloreto de potássio/hidróxido de sódio pH 10,0;
- ✓ Solução peróxido de hidrogênio 15 mL/L
- ✓ Substrato fenólico catecol, procedência MERCK 1596140005;
- ✓ Substrato fenólico p-fenilenediamina 10 g/L, MERCK 8072460005

3.4. Parte experimental

3.4.1. Processamento contínuo

Para o processamento contínuo foi utilizado o trocador de calor a placas da marca ARMFIELD modelo FT-43, Figura 3.4.1.1, provido de placas lisas com uma seção de regeneração com arranjo de dez passes de uma passagem, uma seção de aquecimento com arranjo de seis passes de uma passagem e uma seção de resfriamento com arranjo de quatro passes de uma passagem.

Para cada tempo de retenção dos processos da água de coco a 90 °C foram utilizados diferentes tubos de retenção, como apresentado na Tabela 3.4.1.1. Os kitassatos foram imersos em banho de água termostatizado, marca QUIMIS, para que não houvesse queda da temperatura durante a passagem do produto pelos tubos de retenção.

Após a montagem dos tubos de retenção no trocador de calor a placas, as mangueiras com os tubos foram soltos e cheios de água. Os volumes dos tubos de retenção foram medidos em proveta.

Fig. 3.4.1.1 Trocador de calor ARMFIELD modelo FT-43, com tubo de retenção forma de “S”.

Tabela 3.4.1.1 Conjuntos de tubos de retenção utilizados no trocador de calor a placas para obtenção dos tempos de retenção de 20, 40, 80, 120, 160, 180 e 300 s, de acordo com a vazão do produto.

V (cm ³)	Conjuntos
84,80	tubo S + mangueiras
306,67	tuboS+ tubo cilíndrico+ mangueiras
612,50	kitassato 500 + mangueiras
780,00	tubo cilíndrico+ kitassato 500 + mangueiras
1220,00	Tubo cilíndrico+ kitassato 1000 + mangueira

Para o estudo de cinética de inativação da POD e PFD foram utilizados 5 lotes diferentes de água de coco verde, sendo que os processos a 90°C por 40 e 80 s foram realizados com o mesmo lote de água de coco. Foi utilizado um lote diferente de água de coco para cada processo realizado para o estudo da atividade enzimática na água de coco, durante o período de armazenamento.

Os cocos de cada lote foram lavados e pesados antes e após a abertura da fruta. A água extraída foi recolhida num recipiente de aço-inoxidável imerso em banho de gelo, para manter a atividade inicial das enzimas peroxidase e polifenoloxidase na alimentação do trocador durante todo o processo.

3.4.2. Amostragem

Para o estudo de cinética de inativação enzimática, para cada processamento, amostras de 2,5 mL de água de coco não processada foram recolhidas em 6 tubinhos imersos em banho de gelo e imediatamente congelados para posterior análise da atividade inicial da POD e PFD.

Amostras de 2,5 mL da água de coco processada foram recolhidas em tubinhos imersos em banho de gelo e imediatamente congelados para posterior análise da atividade enzimática da POD e PFD.

Para a caracterização de cada lote, água de coco foi extraída de 40 cocos e análises de densidade, sólidos solúveis, sólidos totais, cinzas, pH, acidez e turbidez, foram conduzidas.

O fluxograma, mostrado na Figura 3.4.2.1, apresenta a amostragem realizada para o estudo do comportamento da atividade das enzimas presentes na água de coco, durante o tempo de armazenamento.

Amostras de água de coco processada e não processada foram recolhidas em garrafas de 250 mL para análises físico-químicas (pH, acidez e turbidez) durante o tempo de armazenamento em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.

Amostras de 2,5 mL da água de coco não processada foram recolhidas em tubinhos imersos em banho de gelo, para medida da atividade da POD e PFD. As amostras foram armazenadas congeladas a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amostras de 2,5 mL da água de coco processada foram recolhidas em tubinhos imersos em banho de gelo, para medida da atividade enzimática da POD e PFD. Metade dos tubinhos foi armazenada em geladeira ($10\text{ }^{\circ}\text{C}$) e outra metade armazenada em freezer ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Em intervalos regulares (diariamente para as amostras no ambiente, 3 dias para as amostras armazenadas refrigeradas e 7 dias para as amostras congeladas) as análises físico-químicas e/ou da atividade enzimática foram conduzidas.

Figura 3.4.2.1 Fluxograma de amostragem da água de coco não processada e processada armazenada em três condições de armazenamento (ambiente, refrigerada e congelada).

3.4.3. Análises

3.4.3.1. Análises físico-químicas

- ✓ Sólidos solúveis (°Brix): Medido em refratômetro da marca Carlzeissjena, com correções de acidez e temperatura (KIMBALL, 1991).
- ✓ Sólidos totais: obtidos segundo o método da AOAC e Instituto Adolfo Lutz, secando 10g da amostra de água de coco a 70°C, sob baixa pressão (≤ 100 mmHg), com pesagens consecutivas em intervalos de duas horas, até peso constante (ESTADOS UNIDOS, 1995); (BRASIL, 1976).
- ✓ Cinzas: As análises de cinzas foram realizadas logo após o processo de sólidos totais, segundo o Instituto Adolfo Lutz , em cápsulas de porcelana em mufla a 550°C (BRASIL, 1976).
- ✓ Densidade: Medido com o densímetro com precisão 0,001g/L (BRASIL, 1976).
- ✓ pH: As medidas de pH foram obtidas diretamente no pH-stat Radiometer, modelo PHM-29.
- ✓ Acidez titulável: Realizado no pH-Stat até atingir pH de 8,2, referente a pH de mudança de coloração do indicador fenolftaleína (ESTADOS UNIDOS, 1995).
- ✓ Turbidez: Determinada por espectrofotometria a 610 nm (relativa à água destilada). No comprimento de onda, para cada amostra foi lida a Absorbância (A). Os valores de Transmitância foram calculados de acordo com a relação:

$$Tr = (10^{-A}) * 100$$

A turbidez foi calculada a partir de: $T = 100 - Tr$

3.4.3.2. Análise da atividade enzimática

Atividade da enzima peroxidase (POD)

Preparação das soluções utilizadas:

A solução tampão citrato 0,2M/fosfato 0,4M (pH 6,5) foi preparada a partir das soluções de Na_2HPO_4 e ácido cítrico. Essas duas soluções foram misturadas na proporção de 2,45 mL Na_2HPO_4 : 1 mL ácido cítrico. O acerto para pH 6,5 foi feito pela adição da solução de Na_2HPO_4 para aumentar o pH e ácido cítrico para diminuir.

A solução de Na_2HPO_4 foi preparada adicionando-se 35,814 g de Na_2HPO_4 com 250 mL de água destilada em um balão volumétrico. A solução de ácido cítrico foi preparada adicionando-se 4,2016 g de ácido cítrico com água destilada em um balão volumétrico de 100 mL.

A solução de p-fenilenediamina foi preparada adicionando-se 0,25 g de p-fenilenediamina com água destilada em um balão volumétrico de 25 mL. Como a solução fenólica degrada com o tempo, foi preparada no dia da análise.

A solução de peróxido de hidrogênio foi preparada adicionando-se 1,5 mL de peróxido de hidrogênio com água destilada em um balão volumétrico de 100 mL.

Procedimento:

A metodologia utilizada para a análise da POD foi adaptada da metodologia sugerida por Cano; Marin; Fúster (1990), para análise dessa enzima em banana.

Em um tubo de ensaio, foram adicionados e homogeneizados: 10,8 mL de solução tampão citrato 0,2 M/fosfato 0,4 M pH 6,5; 0,8mL de p-fenilenediamina 10 g/L e 0,4 mL de peróxido de hidrogênio 15 mL/L. A mistura foi transferida para a cubeta de vidro ótico e esta foi inserida na câmara de leitura provida de jaqueta acoplada a um banho de água termostatizado ajustado à temperatura de 25 °C. Após a obtenção do valor de referência (0,000 de absorbância), 1mL de água de coco foi adicionado na própria cubeta e agitado com uma bagueta de vidro.

A absorbância foi lida no espectrofotômetro ajustado ao comprimento de onda de 485 nm em intervalos de tempo de 10 segundos, pois a absorbância variou muito rapidamente .

Todas as análises da atividade enzimática foram realizadas em duplicata. A unidade da atividade da POD medida foi definida como: (U/s.mL.°Brix) e a atividade residual como: (POD/POD_i).

Atividade da enzima polifenoloxidase (PFD)

Preparação das soluções utilizadas:

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

A solução de catecol 0,2 M foi preparada adicionando-se 0,5555 g de catecol com 25 mL de água destilada em um balão volumétrico. Como a solução fenólica degrada com o tempo, foi preparada no dia da análise.

Procedimento:

Em um tubo de ensaio, foram adicionados e homogeneizados: 5,5 mL de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 6,0) e 1,5 mL de solução de catecol 0,2 M. A mistura foi transferida para a cubeta de vidro ótico e esta inserida na câmera de leitura provida de jaqueta acoplada a um banho de água termostatizado ajustado à temperatura de 25 °C. Após a obtenção do valor referência (0,000 de absorbância), 1 mL de água de coco foi adicionado na própria cubeta e agitado com uma bagueta de vidro.

A absorbância foi lida no espectrofotômetro ajustado ao comprimento de onda de 425 nm em intervalos de tempo de 30 segundos (PONTING; JOSLYN,1948 apud CAMPOS *et al.*,1996).

Todas as análises da atividade enzimática foram realizadas em duplicata. A unidade da atividade da PFD medida foi definida como: (U/s.mL.°Brix) e a atividade residual como: (PFD/PFD_i).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos lotes de água de coco

A Tabela 4.1.1 apresenta a correspondência entre os lotes de água de coco e as condições de processo. Os lotes A, B, C, D e E foram utilizados nos processos para o estudo de cinética de inativação das enzimas POD e PFD, enquanto que os lotes F, G e I foram utilizados nos processos para o estudo do comportamento da atividade enzimática da POD e PFD e análises físico-químicas, da água de coco não processada e processada durante o tempo de armazenamento em temperatura ambiente, refrigerada e congelada. A água de coco do lote H é a mesma utilizada no estudo de cinética, que corresponde ao processo a 90 °C por 180 s e foram utilizadas duas nomenclaturas para o mesmo lote, para facilitar a identificação nos resultados que serão apresentados.

Tabela 4.1.1 Correspondência entre os lotes de água de coco e as condições de processo.

Lote	Condição de processo
A	90 °C, 20 s
B	90 °C, 40 s
B	90 °C, 80 s
C	90 °C, 160 s
D, H	90 °C, 180 s
E	90 °C, 300 s
F	90 °C, 80 s
G	90 °C, 120 s
I	90 °C, 200 s

Os cocos de todos os lotes foram pesados antes e após a extração da água de coco e o rendimento médio foi de 27,8 %. Também foram medidos os volumes de água extraída dos cocos e constatou-se uma variação de 270 a 960 mL de água entre os cocos. Essa variação não foi apenas entre os lotes, mas também entre os cocos do mesmo lote.

A Tabela 4.1.2 apresenta os valores médios obtidos nas análises de acidez, pH, cinzas, sólidos totais, sólidos solúveis, densidade e turbidez, realizadas para a caracterização dos lotes de água de coco.

Tabela 4.1.2 Valores médios obtidos nas análises de acidez, pH, cinzas, sólidos totais, sólidos solúveis, densidade e turbidez da água extraída dos cocos.

Lote	Acidez ¹ (%)	pH	Cinzas (%)	ST (%)	SS ² (°Brix)	Densidade (g/mL)	Turbidez (%)
A	0,01±0,01	5,220±0,000	0,3615±0,0097	5,1976±0,0080	5,1±0,0	1,022±0,000	83,887
B	0,13±0,00	4,993±0,007	0,4196±0,0056	3,1112±0,3692	5,1±0,0	1,021±0,001	54,003
C	0,02±0,00	5,271±0,004	0,3699±0,0216	4,0370±0,0158	5,1±0,0	1,022±0,000	61,293
D,H	0,12±0,03	4,925±0,002	0,3297±0,0454	5,1832±0,3848	5,0±0,0	1,021±0,000	37,037
E	0,08±0,01	5,067±0,020	0,3542±0,0112	4,9229±0,0145	5,1±0,0	1,022±0,000	64,069
F	0,09±0,00	4,989±0,004	0,3559±0,0056	5,8322±0,2464	5,4±0,0	1,023±0,000	
G	0,09±0,01	5,192±0,000	0,3721±0,0034	5,6365±0,0161	5,2±0,0	1,022±0,000	62,436
I	0,05±0,01	5,320±0,002	0,3733±0,0020	6,0704±0,0103	5,6±0,0	1,022±0,000	51,600

¹ Acidez expressa em porcentagem de ácido málico

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

A ANOVA foi aplicada a esses dados com intervalo de confiança de 95 %. A análise indicou diferença significativa na acidez, pH, sólidos totais e densidade entre os lotes. Não houve diferença significativa para os dados de cinzas. Pelo fato de a análise de turbidez não ter sido realizada em duplicata, seus dados foram analisados pelo teste pareado que indicou diferença significativa entre os lotes. Os valores de sólidos solúveis foram analisados pelo teste pareado, pois apesar de terem sido realizadas medidas em duplicata os resultados foram iguais. Os lotes A, B, C e E apresentaram o mesmo teor de sólidos solúveis e diferiram dos demais.

4.2 Cinética de inativação enzimática

Para o estudo da cinética de inativação enzimática, foram processados os lotes A, B, C, D e E de água de coco no trocador de calor a placas, conforme descrito no item 3.4.1. O tempo real de processo foi calculado de acordo com o volume dos tubos de retenção e a vazão do produto, como apresentado na Tabela 4.2.1. A temperatura média real de todos os processos realizados para o estudo de cinética de inativação da POD e PFD foi de $88,0 \pm 1,3$ °C.

Tabela 4.2.1 Tempos reais dos processos realizados no trocador de calor a placas, de acordo com o volume dos tubos de retenção.

Lotes	Volume do arranjo (mL)	Vazão (g/min)	Tempo real (s)
A	84,8	241,8	21,5
B	306,7	497,2	37,8
B	306,7	262,9	71,5
C	612,5	233,4	160,9
D,H	780,0	281,8	169,6
E	1220,0	248,6	301,0
F	306,7	231,3	81,3
G	612,5	339,4	110,7
I	780,0	218,2	218,9

A Tabela 4.2.2 apresenta os valores de atividade residual das enzimas presentes na água de coco processada a 90 °C por tempos de retenção variando entre 21,5 s e 379,8 s. A modelagem de cinética foi baseada nos dados desse trabalho, juntamente com os dados obtidos por Murasaki; da Silva; Tadini (2004). O valor de atividade residual é a razão entre a atividade enzimática após o processo e da água de coco não processada. A atividade enzimática inicial na água de coco variou de $4,6170 \times 10^{-6}$ a $2,3033 \times 10^{-3}$ (U/s.mL.°Brix) para a POD e de $1,8695 \times 10^{-5}$ a $5,7601 \times 10^{-5}$ (U/s.mL.°Brix) para a PFD.

Tabela 4.2.2 Valores da atividade residual da POD e PFD na água de coco processada a 90 °C em tempos de retenção variando entre 21,5 e 379,8 s.

Condição de processo	POD/POD₀	PFD/PFD₀
Não processada	1,0000	1,0000
90 °C; 21,5 s	0,0353	
	0,0343	0,3257
90 °C; 26,6 s	0,0303	0,5023
	0,0303	0,4027
90 °C; 37,8 s	0,1380	0,4191
	0,1287	0,4443
90 °C; 45,5 s	0,0175	0,2136
	0,0117	0,2136
90 °C; 71,5 s	0,0226	0,2592
	0,0210	0,2474
90 °C; 76,9 s	0,0126	0,3194
	0,0063	0,4161
90 °C; 138,9 s	0,0144	0,2087
	0,0096	0,2239
90 °C; 160,9 s	0,0328	0,3747
	0,0317	0,2715
90 °C; 169,9 s	0,0472	0,2238
	0,0184	0,2177
90 °C; 200,6 s	0,0150	0,1310
	0,0150	0,1416
90 °C; 287,5 s	0,0230	0,1376
	0,0230	0,1340
90 °C; 301 s	0,0377	0,2048
	0,0373	0,2065
90 °C; 379,8 s	0,0221	0,0924
	0,0221	0,1597

Esses valores de atividade residual foram ajustados segundo os modelos multicomponentes de primeira ordem propostos por Polakovic; Vrabel (1996). Segundo os autores, para a obtenção da curva de cinética de inativação são necessários pelo menos 6 pontos, excluindo o valor inicial .

Os valores de atividade residual da POD foram ajustados ao modelo multicomponente de 1ª ordem com 2 parâmetros, apresentado na eq.(**4.2.1**):

$$A/A_0 = (1-a) + a e^{-k_1 t} \quad (4.2.1)$$

Onde: a é a atividade da fração da isoenzima menos termorresistente em relação a atividade enzimática total;

k_1 é a constante de reação (s^{-1}) da isoenzima.

Os valores de atividade residual da PFD foram ajustados ao modelo multicomponente de 1ª ordem com 3 parâmetros, eq. (**4.2.2**):

$$A/A_0 = a e^{-k_1 t} + (1-a) e^{-k_2 t} \quad (4.2.2)$$

Onde: a é a atividade da fração da isoenzima 1 menos termorresistente em relação a atividade enzimática total;

k_1 é a constante de reação (s^{-1}) da isoenzima 1;

k_2 é a constante de reação (s^{-1}) da isoenzima 2, na mesma temperatura.

A Tabela 4.2.3 apresenta os resultados da regressão não linear utilizando o método de Marquardt, do programa estatístico Statgraphics V. 4.0, para o modelo da POD e PFD.

Tabela 4.2.3 Parâmetros do modelo multicomponente de primeira ordem com 2 e 3 parâmetros para a POD e PFD, respectivamente.

Parâmetros do modelo				
	a	k_1 (s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	R ²
POD	0,9688	0,2028		97,16
PFD	0,6367	0,0920	0,0028	83,28

O modelo multicomponente de 1^a ordem com 3 parâmetros foi o que melhor elucidou a cinética de inativação da PFD a 90 °C, assim como o modelo proposto por Murasaki; da Silva; Tadini (2004).

Murasaki; da Silva; Tadini (2004) propuseram um modelo multicomponente de 1^a. ordem com 3 parâmetros para explicar a cinética de inativação da POD a 90 °C. Segundo Polakovic; Vrabel (1996) o modelo a ser escolhido deve ser o mais simples que apresenta uma boa correlação dos dados, por isso o modelo de 1^a. ordem com 2 parâmetros foi proposto, pois o coeficiente de determinação obtido ($R^2 = 97,16\%$) indicou um bom ajuste dos dados experimentais.

A Figura 4.2.1 apresenta a isoterma de inativação térmica a 90 °C da POD e PFD, com os dados obtidos experimentalmente e os modelos propostos.

Fig. 4.2.1 Isoterma de inativação térmica a 90 °C da POD e PFD, presente na água de coco.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a presença de duas isoenzimas POD e PFD presentes na água de coco, apresentando termoestabilidade diferente. A PFD mostrou-se mais termorresistente do que a POD, quando a água de coco foi submetida a processo contínuo a 90 °C. Murasaki; da Silva; Tadini (2004) também observaram que a polifenoloxidase foi mais termorresistente do que a peroxidase em processo descontínuo da água de coco verde.

Pela Figura 4.2.1, observa-se que tempos superiores a 200 s a 90 °C não causaram um acréscimo significativo na inativação da PFD, entretanto se tempos superiores a 200 s a 90 °C forem empregados, poderá causar maiores perdas sensoriais na água de coco. Observa-se também que nessa condição (90 °C, 200 s) uma inativação máxima de 80 % da PFD foi obtida, enquanto que para a POD a inativação foi da ordem de 97 %.

Em função desses resultados, foi proposta uma segunda etapa neste trabalho, para verificar a estabilidade enzimática e físico-química da água de coco verde não processada e processada (90 °C, 120 s; 90 °C, 180 s; 90 °C, 200 s) sob três diferentes condições de armazenamento (no ambiente, refrigerada e congelada).

4.3 Atividade enzimática da POD e PFD e análises físico-químicas da água de coco verde durante o armazenamento

Para o estudo da atividade enzimática e análises físico-químicas da água de coco verde durante o armazenamento, a água de coco dos lotes F, G, H e I foram processadas conforme descrito no item 3.4.1. A amostragem foi feita de acordo com a Figura 3.4.2.1. Essas condições de processo foram escolhidas com base no modelo de cinética obtido. A temperatura real média dos processos dos lotes G, H e I foi $89,2 \pm 1,7$ °C, enquanto que a temperatura real média do processo do lote F foi $85,5 \pm 3,2$ °C.

A Tabela 4.3.1 apresenta os valores médios das atividades iniciais da POD e PFD presentes na água de coco processada e não processada.

Os dados da atividade da POD presente na água de coco do lote F, processada a 90 °C por 80 s, não foram apresentados, pois as análises foram prejudicadas por causa de problemas com o substrato.

Tabela 4.3.1 Valores médios das atividades iniciais da POD e PFD na água de coco processada e não processada.

Condição de processo (s)	POD ¹ (U/s.mL.°Brix)	POD/POD ₀	PFD ² (U/s.mL.°Brix)	PFD/PFD ₀
Não processada		1,00	8,3209E-05	1,00
Não processada	1,8600E-03	1,00	5,0568E-05	1,00
Não processada	2,1346E-03	1,00	2,9852E-05	1,00
Não processada	2,1607E-03	1,00	1,8696E-05	1,00
85,5 °C, 80 s			5,9837E-5 $\pm$ 1,83325E-8	0,72 $\pm$ 0,00
90 °C, 120 s	1,0354E-4 $\pm$ 9,1285E-6	0,05 $\pm$ 0,00	8,8763E-6 $\pm$ 1,0365E-6	0,30 $\pm$ 0,04
90 °C, 180 s	5,0005E-5 $\pm$ 2,2405E-5	0,03 $\pm$ 0,01	1,2817E-5 $\pm$ 2,5555E-6	0,25 $\pm$ 0,05
90 °C, 200 s	7,0421E-5 $\pm$ 7,1734E-6	0,03 $\pm$ 0,00	5,9431E-6 $\pm$ 1,5770E-7	0,32 $\pm$ 0,01

¹Atividade da enzima POD presente na água de coco, expressa como Unidades de atividade por segundo por mL de água de coco por graus Brix

²Atividade da enzima PFD presente na água de coco, expressa como Unidades de atividade por segundo por mL de água de coco por graus Brix

As Figuras 4.3.1 e 4.3.2 apresentam os dados de atividade residual da PFD e POD obtidos da água de coco processada nas condições de processo indicadas na Tabela 4.3.1. Observa-se que exceção à condição 85,5 °C por 80 s (lote F), os dados obtidos da atividade enzimática residual tanto para a PFD quanto para POD validaram os modelos de cinética propostos.

O valor obtido da atividade residual da PFD referente ao lote F difere muito dos demais valores, pois a temperatura real de processo foi de 85,5 °C e não 90 °C, resultando em uma inativação enzimática menor. Os valores obtidos da atividade residual referentes aos outros lotes (G, H e I) validaram o modelo proposto.

Os valores da atividade residual da POD para os lotes G, H e I também validaram o modelo proposto de cinética de inativação. Não foi possível verificar a atividade residual da POD presente no lote F, pois as análises dessa enzima foram prejudicadas por problemas no substrato.

Fig. 4.3.1 Dados da atividade enzimática residual da PFD da água de coco logo após o processo comparados com os dados experimentais que geraram o modelo de cinética multicomponente de 1ª ordem com 3 parâmetros.

Fig. 4.3.2 Dados da atividade enzimática residual da POD da água de coco logo após o processo, comparados com os dados experimentais que geram o modelo de cinética multicomponente de 1ª ordem com 2 parâmetros.

As Tabelas 4.3.2 e 4.3.3 apresentam os valores da atividade residual da POD e da PFD presentes na água de coco não processada dos lotes F, G, H e I, armazenadas congeladas até 55 dias. A atividade residual da POD e PFD presentes na água de coco não processada é a razão da atividade da enzima determinada nos diferentes tempos de armazenamento pela atividade inicial da enzima nos dias de processo da água de coco não processada extraída dos cocos.

As Figuras 4.3.3 e 4.3.4 apresentam a atividade da POD e PFD presentes na água de coco congelada, durante o tempo de armazenamento. Houve uma pequena variação da atividade da POD entre os dias de armazenamento e entre os lotes, comparado com a variação da PFD entre os dias e entre os lotes. A menor variação da atividade da PFD durante o tempo de armazenamento foi no lote I, lote que também apresentou a menor atividade enzimática inicial, 4,5 vezes menor que do lote F. A variação na atividade enzimática durante o tempo de armazenamento mostra que o congelamento em “freezer” a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ não manteve a atividade dessas enzimas estáveis.

Cano; Marin; Fúster (1990) também observaram uma variação da atividade da POD e PFD presentes em fatias de banana durante o armazenamento. Segundo os

autores, o aumento da atividade enzimática pode ter sido explicada por causa de danos mecânicos causados na membrana celular devido a formação de cristais de gelo, com esses danos, as enzimas ligadas a membrana ficam expostas. A atividade da PFD presente nas bananas permaneceu estável nos primeiros dias, apresentou um aumento de 160 % após 6 dias e uma atividade residual de 34%, após 20 dias.

Tabela 4.3.2 Valores da atividade residual da POD na água de coco não processada, armazenada congelada.

Lote	Tempo de armazenamento (U/s.mL.°Brix) (dia)	POD	POD/POD_i
G	0	2,1346E-03	1,00
	3	1,6951E-03	0,79
	6	1,6843E-03	0,79
	7	2,1175E-03	0,99
	9	1,6441E-03	0,77
	13	1,6413E-03	0,77
	14	1,8360E-03	0,86
	16	1,6819E-03	0,79
	20	2,1569E-03	1,01
	28	2,3800E-03	1,11
	34	2,1146E-03	0,99
	51	2,3077E-03	1,08
H	0	1,8600E-03	1,00
	3	1,6200E-03	0,87
	8	1,4800E-03	0,80
	16	1,4400E-03	0,77
	20	1,6600E-03	0,89
	21	2,0800E-03	1,12
	55	2,0800E-03	1,12
I	0	2,1607E-03	1,00

Lote	Tempo de armazenamento (U/s.mL.ºBrix) (dia)	POD	POD/POD_i
I	3	2,2143E-03	1,02
	6	2,0536E-03	0,95
	7	2,6377E-03	1,22
	9	2,2143E-03	1,02
	13	2,3214E-03	1,07
	14	2,4643E-03	1,14
	16	2,2500E-03	1,04
	22	1,9821E-03	0,92
	22	2,3952E-03	1,11
	27	1,8214E-03	0,84
	29	1,9921E-03	0,92

POD: atividade da enzima medida em diferentes tempos de armazenamento

POD_i: atividade da enzima medida da água de coco extraída no dia do processo.

Tabela 4.3.3 Valores da atividade residual da PFD na água de coco não processada, armazenada congelada.

Lote	Tempo de armazenamento (U/s.mL.ºBrix) (dia)	PFD	PFD/PFD_i
F	1	8.32E-05	1,00
	4	7.86E-05	0,95
	7	7.10E-05	0,85
	21	7.66E-05	0,92
	33	8.24E-05	0,99
	50	4.76E-05	0,57
	71	9.85E-05	1,18
G	1	2.99E-05	1,00
	3	3.68E-05	1,23
	6	8.01E-05	2,68
	7	1.22E-04	4,07
	9	5.45E-05	1,83
	13	4.93E-05	1,65
	14	9.75E-05	3,27
	20	2.95E-05	0,99
	28	3.16E-05	1,06
	36	3.02E-05	1,01
H	1	5.06E-05	1,00
	2	8.35E-05	1,65
	7	5.48E-05	1,08
	15	4.84E-05	0,96
	21	4.93E-05	0,98
	22	5.90E-05	1,17
	44	4.35E-05	0,86
I	1	1.87E-05	1,00

Lote	Tempo de armazenamento (U/s.mL.ºBrix) (dia)	PFD	PFD/PFD_i
I	3	9.68E-06	0,52
	6	9.40E-06	0,50
	7	1.57E-05	0,84
	9	1.09E-05	0,58
	13	9.50E-06	0,51
	14	1.24E-05	0,67
	23	9.29E-06	0,50
	29	9.59E-06	0,51

PFD: atividade da enzima medida em diferentes tempos de armazenamento

PFD_i: atividade inicial da enzima medida da água de coco extraída no dia do processo.

Fig. 4.3.3 Variação da atividade da POD presente na água de coco não processada congelada, durante o tempo de armazenamento.

Fig. 4.3.4 Variação da atividade da PFD presente na água de coco não processada congelada, durante o tempo de armazenamento.

As Tabelas 4.3.4 e 4.3.5 apresentam os valores da atividade residual da POD presentes na água de coco processada durante o armazenamento sob refrigeração e congelamento. A atividade residual da POD presente na água de coco processada é a razão da atividade da enzima durante o tempo de armazenamento pela atividade inicial da enzima logo após o processo, apresentada na Tabela 4.3.1, de acordo com o lote.

Tabela 4.3.4 Valores da atividade residual da POD presente na água de coco processada, durante o armazenamento sob refrigeração.

Processo	Tempo de armazenamento (dia)	POD (U/s.mL.°Brix)	POD/POD _i
90 °C, 120s	0	1,0999E-04	1,00
	0	9,7083E-05	1,00
	3	1,4106E-04	1,36
	3	1,3630E-04	1,32
	6	7,2621E-05	0,70
	6	5,8042E-05	0,56
	9	1,1138E-04	1,08
	9	6,6671E-05	0,64
	13	8,1694E-05	0,79
	13	7,9710E-05	0,77
	16	8,6996E-05	0,84
	16	7,7004E-05	0,74
90 °C, 180s	0	6,5848E-05	1,00
	0	3,4162E-05	1,00
	8	1,1282E-04	2,26
	8	8,8458E-05	1,77
	16	3,3162E-05	0,66
	16	3,6982E-05	0,74
	20	3,6702E-05	0,73
	20	3,7010E-05	0,74
90 °C, 200s	0	7,5493E-05	1,00
	0	6,5348E-05	1,00
	3	7,0829E-05	1,01
	3	5,9964E-05	0,85
	6	8,8575E-05	1,26
	6	7,8759E-05	1,12

Processo	Tempo de armazenamento (dia)	POD (U/s.mL.°Brix)	POD/POD _i
90 °C, 200s	9	9,8214E-05	1,39
	9	8,0357E-05	1,14
	13	5,1030E-05	0,72
	13	5,9495E-05	0,84
	16	6,7121E-05	0,95
	16	6,3134E-05	0,90
	22	2,4020E-04	3,41
	22	1,9671E-04	2,79
	27	3,0243E-05	0,43
	27	2,4852E-05	0,35

POD: atividade da enzima medida em diferentes tempos de armazenamento

POD_i: atividade da enzima medida da água de coco extraída no dia do processo.

Tabela 4.3.5 Valores da atividade residual da POD presente na água de coco processada durante o armazenamento congelado.

Lote	Tempo de armazenamento (dia)	POD (U/s.mL.°Brix)	POD/POD _i
90 °C, 120 s	0	1,0999E-04	1,00
	0	9,7083E-05	1,00
	7	1,0464E-04	1,01
	7	1,0149E-04	0,98
	14	9,7127E-05	0,94
	14	9,4850E-05	0,92
	20	1,0877E-04	1,05
	20	1,1016E-04	1,06
	28	1,0194E-04	0,98
	28	9,3302E-05	0,90
	34	1,5593E-04	1,51
	34	1,2500E-04	1,21
	51	9,7479E-05	0,94
	51	1,0044E-04	0,97
90 °C, 180 s	0	6,5848E-05	1,00
	0	3,4162E-05	1,00
	3	7,9890E-05	1,60

Lote	Tempo de armazenamento (dia)	POD (U/s.mL.°Brix)	POD/POD_i
90 °C, 180 s	3	5,5432E-05	1,11
	21	4,0760E-05	0,82
	21	3,6998E-05	0,74
	55	3,6114E-05	0,72
	55	3,7364E-05	0,75
90 °C, 200 s	0	7,5493E-05	1,00
	0	6,5348E-05	1,00
	7	8,4986E-05	1,21
	7	8,0900E-05	1,15
	14	5,9954E-05	0,85
	14	7,0179E-05	1,00
	22	6,4855E-05	0,92
	22	6,0302E-05	0,86
	29	9,3623E-05	1,33
	29	7,7993E-05	1,11

POD: atividade da enzima medida em diferentes tempos de armazenamento

POD_i: atividade da enzima medida da água de coco extraída no dia do processo.

As Figuras 4.3.5 e 4.3.6 apresentam os valores de atividade da POD presente na água de coco processada armazenada refrigerada e congelada.

Observa-se que os resultados apresentados indicam que a atividade da enzima peroxidase manteve-se constante no início do período de armazenamento refrigerado, seguido de um ligeiro declínio após 15 dias. Entretanto no armazenamento congelado os resultados apresentados na Figura 4.3.6 indicam uma maior estabilidade dessa enzima até 30 dias.

Fig. 4.3.5 Atividade da POD presente na água de coco processada, armazenada refrigerada.

Fig. 4.3.6 Atividade da POD presente na água de coco processada, armazenada congelada.

ANOVA foi aplicada nos resultados apresentados nas Tabelas 4.3.4 e 4.3.5, no intervalo de confiança de 95 %. A atividade da POD presente na água de coco processada a 90 °C, 120 s armazenada refrigerada apresentou diferença significativa entre os dias 3 e 6 e entre os dias 3 e 13, os demais dias não apresentaram diferença significativa entre si. A atividade da POD presente na água de coco processada a 90 °C, 180 s apresentou um aumento significativo no 8º dia e uma queda no 16º dia, permanecendo estável até o 20º dia. A atividade enzimática da POD presente na água de coco processada a 90 °C, 200 s permaneceu estável até o 16º dia, apresentou um aumento significativo no 22º e uma redução no 27º dia. A atividade obtida nesse dia foi significativamente menor que a atividade dos dias 6 e 9.

ANOVA aplicada aos resultados da atividade da POD presente na água de coco processada a 90 °C, 120 s, armazenada congelada permaneceu constante até o 28º dia, no 34º dia apresentou um aumento significativo e no 51º dia a atividade diminuiu, sendo igual às atividades obtidas até o 28º dia. As atividades da POD da água de coco processada a 90 °C, 180 s e 200 s, não apresentaram diferença significativa durante todo o tempo de armazenamento. Com esses resultados, observa-se que até 29 dias da água de coco congelada, a atividade da POD permaneceu estável independente das condições de processo.

As Tabelas 4.3.6 e 4.3.7 apresentam os valores da atividade residual da PFD presentes na água de coco processada durante o armazenamento sob refrigeração e congelamento. A atividade residual da PFD presente na água de coco processada é a razão da atividade da enzima durante o tempo de armazenamento pela atividade inicial da enzima logo após o processo, apresentada na Tabela 4.3.1, de acordo com o lote.

Tabela 4.3.6 Valores da atividade residual da PFD presente na água de coco processada, durante o armazenamento sob refrigeração.

Lote	Tempo de armazenamento (dia)	PFD (U/s.mL.°Brix)	PFD/PFD_i
90 °C, 120 s	1	9,6092E-06	1,00
	1	8,1435E-06	1,00
	3	6,6208E-06	0,75
	3	6,5242E-06	0,74
	6	6,2208E-06	0,70
	6	7,4319E-06	0,84
	9	9,1750E-06	1,03
	9	8,0869E-06	0,91
	13	6,6665E-06	0,75
	13	7,1885E-06	0,81
90 °C, 180 s	1	1,4624E-05	1,00
	1	1,1010E-05	1,00
	7	1,0733E-05	0,84
	7	1,4086E-05	1,10
	15	8,1432E-06	0,64
	15	1,0827E-05	0,84
	22	3,0626E-06	0,24
	22	3,3460E-06	0,26
90 °C, 200 s	1	6,0546E-06	1,00
	1	5,8316E-06	1,00
	3	3,6214E-06	0,61
	3	3,6468E-06	0,61
	6	2,5773E-06	0,43
	6	2,5384E-06	0,43
	9	2,7709E-06	0,47
	9	2,4025E-06	0,40
	13	1,6359E-06	0,28
	13	1,2446E-06	0,21

PFD: atividade da enzima medida em diferentes tempos de armazenamento

PFD_i: atividade da enzima medida da água de coco extraída no dia do processo.

Tabela 4.3.7 Valores da atividade residual da PFD presente na água de coco processada durante o armazenamento congelado.

Lote	Tempo de armazenamento (dia)	PFD (U/s.mL.°Brix)	PFD/PFD _i
90 °C, 120 s	1	9,6092E-06	1,00
	1	8,1435E-06	1,00
	7	4,1400E-05	4,66
	7	3,7260E-05	4,20
	14	3,1729E-05	3,57
	14	3,2219E-05	3,63
	20	1,1542E-05	1,30
	20	1,2556E-05	1,41
	28	1,0646E-05	1,20
	28	9,4121E-06	1,06
	36	1,1822E-05	1,33
	36	1,2414E-05	1,40
90 °C, 180 s	1	1,4624E-05	1,00
	1	1,1010E-05	1,00
	2	3,2766E-05	2,56
	2	3,1778E-05	2,48
	21	9,1338E-06	0,71
	21	6,9120E-06	0,54
	44	3,5638E-06	0,28
	44	3,4904E-06	0,27
90 °C, 200 s	1	6,0546E-06	1,00
	1	5,8316E-06	1,00
	7	2,8504E-06	0,48
	7	3,0529E-06	0,51
	14	2,9634E-06	0,50
	14	3,2057E-06	0,54
	23	3,3109E-06	0,56
	23	3,0036E-06	0,51
	29	2,8629E-06	0,48
	29	2,6950E-06	0,45

PFD: atividade da enzima medida em diferentes tempos de armazenamento

PFD_i: atividade da enzima medida da água de coco extraída no dia do processo.

As Figuras 4.3.7 e 4.3.8 apresentam os valores de atividade da PFD presente na água de coco processada, armazenada refrigerada e congelada.

Fig. 4.3.7 Atividade da PFD presente na água de coco processada, armazenada refrigerada.

Fig. 4.3.8 Atividade da PFD presente na água de coco processada, armazenada congelada.

ANOVA foi aplicada nos resultados apresentados nas Tabelas 4.3.6 e 4.3.7, no intervalo de confiança de 95 %. A atividade da PFD presente na água de coco processada a 90 °C, 120 s, armazenada refrigerada, não apresentou diferença

significativa durante o tempo de armazenamento, enquanto que a atividade da PFD presente na água de coco processada a 90 °C, 180 s não apresentou diferença significativa até o 15º dia. No entanto, houve uma redução significativa no 22º dia. A atividade da PFD presente na água de coco processada a 90 °C, 200 s apresentou uma redução significativa ao longo do armazenamento.

A atividade da PFD presente na água de coco processada a 90 °C, 120 s, armazenada congelada, apresentou um aumento significativo do 1º para o 7º e posteriormente uma redução até o 20º dia, ficando estável até o 36º dia. A atividade da PFD presente na água de coco processada a 90 °C, 180 s, apresentou um aumento significativo no 2º dia, seguido de uma redução após 21 dias. A atividade da PFD presente na água de coco processada a 90 °C, 200 s apresentou uma redução significativa no 7º dia e permaneceu estável até o 29º dia.

O congelamento da água de coco processada a 90 °C por tempos 120 s, 180 s e 200 s em “freezer” a – 30 ° C, não manteve a atividade enzimática da PFD estável como a atividade da POD.

A Tabela 4.3.8 apresenta os valores das análises físico-químicas realizadas na água de coco não processada, dos lotes F, G, H e I, armazenada em três condições diferentes, ambiente, refrigerada e congelada.

Tabela 4.3.8 Valores de pH, acidez e turbidez da água de coco não processada de acordo com a condição de armazenamento.

Lote	Condição de Armazenamento	Tempo de Armazenamento (dias)	pH	Acidez %	Turbidez %
F	Ambiente	0	4,987	0,085	
		1	5,211	0,272	98,690
		4	3,946	0,594	99,731
		5	3,831	0,784	99,856
		7	3,789	0,842	99,675
		14	3,845	0,892	99,621
G		0	5,145	0,345	
		1	5,067	0,339	95,554
		3	3,748	0,251	98,766
H		0	4,925	0,110	37,037
		1	5,011	0,083	
		3	4,828	0,235	
		7			99,709
		14			99,328
		15	3,473	0,755	
		16	3,470	0,743	
		22	3,535	0,786	
		23	3,107	0,779	99,627
		36			95,924
		37			98,369
I		29	2,882	0,855	
		0	5,320	0,050	51,600
		1	5,297	0,115	86,132
F	Refrigerada	3	4,088	0,419	99,633
		1	5,017	0,089	
		4	4,960	0,104	66,966
		5	4,946	0,097	88,351
		7	4,949	0,091	92,693
		18	4,700	0,238	83,212
G		1	5,172	0,088	66,912
		3	5,203	0,087	77,639
		6	5,291	0,105	98,049
		9	5,257	0,162	99,164
		13	5,030	0,198	98,752

Lote	Condição de Armazenamento	Tempo de Armazenamento (dias)	pH	Acidez %	Turbidez %
G	Refrigerada	16	4,745	0,222	74,441
H		1	5,048	0,074	
		3	5,091	0,070	
		14			83,305
		15	4,952	0,174	
		16	5,026	0,172	
		22	4,928	0,134	
		23	4,194	0,165	98,406
		29	4,190	0,204	
		36	3,666	0,216	99,890
		37	4,207	0,246	99,244
		43	3,949	0,283	99,803
		44	3,952	0,294	
		45	3,346	0,274	
		55	3,412	0,237	
		57	3,700	0,246	
I		1	5,325	0,054	62,609
		3	5,313	0,070	56,774
		6	5,199	0,117	94,822
		9	5,217	0,206	99,317
		13	5,143	0,275	97,621
		16	5,087	0,295	99,232
		22	3,915	0,429	99,613
F	Congelada	4	4,856	0,176	
		5	4,903	0,115	
		7	5,002	0,088	58,235
		18	4,962	0,076	65,138
		46	5,055	0,069	
		71	4,060	0,087	
		81	5,175	0,054	
G		1	5,154	0,104	80,045
		7	5,174	0,092	43,729
		14	5,162	0,112	49,058
		20	5,136	0,094	44,835
		28			43,298
		34	5,153	0,069	52,315
		36			48,160

Lote	Condição de Armazenamento	Tempo de Armazenamento (dias)	pH	Acidez %	Turbidez %
G	Congelada	51	5,155	0,074	41,190
H		22	4,998	0,148	
		23	5,028	0,128	82,519
		29	4,565	0,128	
		36	4,606	0,110	57,145
		37	5,225	0,076	41,046
		44	5,231	0,117	
		45	5,233	0,061	
		55	4,377	0,066	
		57	5,222	0,053	
		62			33,333
I		1	5,310	0,075	50,129
		7	5,336	0,058	54,431
		13	5,358	0,071	69,321
		22	5,338	0,072	55,074
		29	5,339	0,071	53,664

ANOVA foi aplicada nos resultados físico-químicos da água de coco não processada dos lotes F, G, H e I, indicando que as condições e tempo de armazenamento influenciaram significativamente a acidez, pH e turbidez. A ANOVA foi aplicada no intervalo de confiança de 95 %.

As Figuras 4.3.9, 4.3.10 e 4.3.11 ilustram como essas respostas variaram em função da condição de armazenamento.

Fig. 4.3.9 Valores da acidez medida na água de coco não processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.

Fig. 4.3.10 Valores do pH medido na água de coco não processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.

Fig. 4.3.11 Valores da turbidez medida na água de coco não processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.

As Figuras 4.3.12, 4.3.13 e 4.3.14 ilustram a variação da acidez, pH e turbidez da água de coco não processada ao longo do armazenamento no ambiente, refrigerada e congelada.

Fig. 4.3.12 Variação da acidez da água de coco não processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).

Fig. 4.3.13 Variação do pH da água de coco não processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).

Fig. 4.3.14 Variação da turbidez da água de coco não processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).

A ANOVA foi aplicada nos resultados físico-químicos da água de coco não processada para cada condição de armazenamento (ambiente, refrigerada e congelada), no intervalo de confiança de 95 %.

Para a condição ambiente, o tempo de armazenamento influenciou significativamente a acidez, pH e turbidez, no entanto, não houve influência dos diferentes lotes sobre a estabilidade físico-química da água de coco não processada.

Na condição refrigerada, o tempo de armazenamento influenciou apenas o pH. Nessa condição, o pH também não foi influenciado pelos diferentes lotes. A acidez e a turbidez não apresentaram diferença significativa em relação ao tempo de armazenamento e aos lotes.

Na condição congelada, o tempo de armazenamento e os diferentes lotes influenciaram significativamente a acidez da água de coco não processada. Tanto o pH, quanto a turbidez não sofreram influência dos lotes e do tempo de armazenamento.

A Tabela 4.3.9 apresenta os valores das análises físico-químicas realizadas na água de coco processada, dos lotes G, H e I, armazenada em três condições diferentes, ambiente, refrigerada e congelada.

Tabela 4.3.9 Valores de pH, acidez e turbidez da água de coco processada ao longo do tempo de acordo com a condição de armazenamento.

Processo	Condição de Armazenamento	Tempo de Armazenamento (dias)	pH	Acidez %	Turbidez %
90 °C, 120 s	Ambiente	0	5,192	0,348	
		1	4,311	0,289	93,084
		3	3,595	0,241	95,526
90 °C, 180 s		0	5,032	0,072	77,335
		1	5,017	0,079	
		3	4,993	0,172	
		7			99,658
		14			99,751
		15	3,515	0,693	
		16	3,451	0,724	
		22	3,460	0,899	
		23	3,451	0,762	99,810
		36			99,025
		37			99,752
		29	3,383	1,031	
90 °C, 200 s		0	5,296	0,054	75,845
		1	5,108	0,073	59,678
		3	4,230	0,339	99,386
90 °C, 120 s	Refrigerada	1	5,231	0,085	60,400
		3	5,239	0,096	47,078
		6	5,280	0,087	69,103
		9	5,452	0,085	97,421
		13	5,889	0,072	88,457
		16	5,795	0,097	93,436
90 °C, 180 s		1	5,003	0,081	
		3	5,051	0,076	
		14			70,691
		15	5,138	0,100	
		16	5,172	0,065	

Processo	Condição de Armazenamento	Tempo de Armazenamento (dias)	pH	Acidez %	Turbidez %
90 °C, 180 s	Refrigerada	22	5,169	0,089	
		23	4,809	0,091	92,501
		29	5,173	0,102	
		36	5,119	0,101	98,059
		37	5,133	0,129	94,505
		43	5,044	0,177	95,802
		44	5,066	0,126	
		45	5,087	0,114	
		62			99,840
		55	4,846	0,183	
		57	4,757	0,202	
90 °C, 200 s		1	5,240	0,064	48,596
		3	5,290	0,070	54,960
		6	5,261	0,075	83,962
		9	5,268	0,067	90,310
		13	5,324	0,119	98,179
		16	5,344	0,089	90,656
		22	5,586	0,105	99,288
90 °C, 120 s	Congelada	1	5,207	0,101	54,735
		7	5,191	0,082	42,915
		14	5,199	0,099	48,077
		20	5,154	0,089	46,453
		28			42,794
		34	5,193	0,068	47,870
		36	5,188	0,081	58,283
		51	5,183	0,074	51,694
90 °C, 180 s		22	4,963	0,163	
		23	4,964	0,161	90,680
		29	4,964	0,157	
		36	5,100	0,128	77,210
		37	5,205	0,061	69,380
		44	5,160	0,100	
		45	5,275	0,047	
		55	5,167	0,056	
		57	4,395	0,082	
		62			15,360
		64			15,450

Processo	Condição de Armazenamento	Tempo de Armazenamento (dias)	pH	Acidez %	Turbidez %
90 °C, 200 s	Congelada	1	5,236	0,075	51,437
		7	5,234	0,075	69,574
		13	5,231	0,064	47,277
		22	5,248	0,069	53,226
		29	5,237	0,070	50,672

A água de coco não processada armazenada no ambiente e refrigerada, apresentou fermentação a partir do 1º e 6º dia, respectivamente. A água de coco processada armazenada no ambiente também apresentou cheiro desagradável após 1 dia de armazenamento.

A água de coco processada a 90 °C por 120 s, armazenada refrigerada, apresentou uma coloração rosada no 3º dia e fermentação no 6º dia. A turbidez dos 7º e 9º dias não foi medida, pois a leitura atingiu o fundo de escala do equipamento, no entanto no 13º dia foi novamente possível sua leitura. A água de coco processada a 90 °C por 200 s, armazenada refrigerada, apresentou coloração rosada a partir do 6º dia.

De todos os lotes analisados, apenas a água de coco processada armazenada sob refrigeração apresentou coloração rosada. No processo a 90 °C por 200 s, algumas garrafas foram totalmente cheias com água de coco processada e armazenadas refrigeradas ao longo do tempo de armazenamento. Até 22 dias a coloração rosada não foi observada, o que pode indicar que o aparecimento da cor rosa está relacionado à reação de oxidação.

ANOVA foi aplicada nos resultados físico-químicos da água de coco processada, no intervalo de confiança de 95 %, indicando que as condições de armazenamento influenciaram significativamente a acidez, pH e turbidez.

As Figuras 4.3.15, 4.3.16, 4.3.17 ilustram como essas respostas variaram em função da condição de armazenamento.

Fig. 4.3.15 Valores da acidez medida na água de coco processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.

Fig. 4.3.16 Valores do pH medidos na água de coco processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.

Fig. 4.3.17 Valores da turbidez medida na água de coco processada armazenada em temperatura ambiente, refrigerada e congelada.

As Figuras 4.3.18, 4.3.19, 4.3.20 apresentam a variação da acidez, pH e turbidez para cada condição nos diferentes tempos de armazenamento.

Fig. 4.3.18 Variação da acidez da água de coco processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).

Fig. 3.4.19 Variação do pH da água de coco processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).

Fig. 3.4.20 Variação da turbidez da água de coco processada em relação ao tempo de armazenamento para cada condição (ambiente, refrigerada e congelada).

ANOVA foi aplicada nos resultados físico-químicos da água de coco processada para cada condição de armazenamento (ambiente, refrigerada e congelada).

Para a condição ambiente, apenas o tempo de armazenamento influenciou significativamente a acidez. Entretanto o pH e a turbidez não foram influenciados pelo tempo de armazenamento e nem pelo processo.

Na condição refrigerada, o tempo de armazenamento influenciou significativamente a acidez e a turbidez, no entanto apenas o processo influenciou o pH da água de coco.

Na condição congelada, o tempo de armazenamento e o processo aplicado influenciaram o pH e a acidez da água de coco. Apesar da ANOVA indicar diferença significativa entre os processos, a variação da acidez da água de coco processada acompanhou a variação da acidez da não processada, ou seja, do lote da água de coco não processada.

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que a água de coco processada a 90 °C apresentou maior estabilidade físico-química e enzimática quando armazenada congelada por até 44 dias.

A enzima polifenoloxidase apresentou maior termorresistência ao processo térmico do que a peroxidase. Além disso, durante o armazenamento congelado da água de coco processada, a mesma apresentou menor estabilidade. Esses resultados confirmam que a PFD deve ser considerada como indicador de processo da água de coco.

GIBRIEL, *et al.* (1978) estudaram a cinética de inativação e reativação da peroxidase em extratos de cenoura, espinafre e damasco, processados a 70 °C em diferentes períodos de tempo e armazenados a – 5 °C, 4 °C e 18 °C, por até 4 horas. Os resultados obtidos mostraram que a reativação da peroxidase foi maior quando tempos menores de tratamento foram utilizados e que os extratos armazenados a – 5 °C apresentaram maior reativação que os extratos armazenados a 4 °C e 18 °C. Esse trabalho confirma a variação na atividade enzimática provocada pelas diferentes temperaturas de armazenamento.

Com relação à estabilidade físico-química, a acidez e o pH medido na água de

coco processada armazenada refrigerada ou congelada por até 57 dias foram estáveis, indicando que não deve ter havido processo fermentativo, com exceção ao observado na água de coco processada a 90 °C por 120 s (condição mais branda) a partir do 6º dia, sob refrigeração.

5. CONCLUSÕES

No estudo de cinética de inativação enzimática em processo térmico contínuo de água de coco verde, os dados de atividade residual da POD (peroxidase) e PFD (polifenoloxidase) foram ajustados aos modelos multicomponentes de primeira ordem descritos na literatura. O modelo proposto para explicar a cinética de inativação térmica da POD foi um multicomponente de primeira ordem com 2 parâmetros, enquanto que o modelo proposto para a PFD foi um multicomponente de primeira ordem com 3 parâmetros. Esses resultados confirmam a presença de duas isoenzimas da POD e PFD presentes na água de coco, com termoestabilidades diferentes.

A PFD presente na água de coco processada a 90 °C apresentou maior termoestabilidade que a POD, no entanto um processo a 90 °C por 200 s foi suficiente para obtenção da máxima inativação enzimática, uma vez que nesta temperatura de processo com tempos superiores a 200 s não foi observado um aumento significativo de inativação da PFD.

As atividades residuais da POD e PFD presentes na água de coco processada a 90 °C por 120 s, 180 s e 200 s validaram os modelos propostos de cinética de inativação térmica.

O armazenamento da água de coco processada a 90 °C sob refrigeração indicou que a atividade da POD se manteve estável até o 15º dia, no entanto a atividade da PFD, apresentou uma redução significativa ao longo do tempo de armazenamento.

O armazenamento da água de coco processada a 90 °C e congelada à - 30 °C indicou que a atividade da POD permaneceu estável, não ocorrendo o mesmo com a atividade da PFD.

Somente amostras da água de coco processada a 90 °C armazenada sob refrigeração apresentaram coloração rosa. No entanto, em garrafas totalmente cheias com água de coco processada e mantidas sob refrigeração não apresentaram a cor rosa, indicando que o aparecimento da cor pode estar associado a uma reação oxidativa.

A água de coco processada a 90 °C e refrigerada ou congelada manteve-se estável com relação ao pH e a acidez por até 57 dias, indicando que neste período não ocorreu processo fermentativo.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Um estudo sobre o agente causador da coloração rosada na água de coco processada será muito importante para garantir um produto próprio para consumo por um tempo maior de armazenamento.

Um estudo sobre a utilização de outro substrato ou outra metodologia para quantificação da PFD em água de coco, de modo a acelerar o tempo das análises.

Estudo do comportamento enzimático e físico-químico da água de coco submetida a outros processos de conservação térmicos, como microondas e não térmicos, como o uso da alta pressão.

Estudo do efeito combinado do uso de envase à vácuo com tratamento térmico ou não térmico para promover a estabilidade enzimática da água de coco.

7. LISTA DE REFERÊNCIAS¹

- ANZALDO, F. E. *et al.* Modified coconut water: a suitable fluid for oral rehydration **Philippine Journal of Science**, 109, 9-14, 1982.
- BOBROVNIK, S. A. Determination the rate constants of some biexponential reactions. **Biochemical and Biophysical Methods**, v.42, p. 49-63, 2000.
- BRASIL. Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e físicos para Análise de Alimentos**, São Paulo, v. 1, p.371, 1976.
- CAMPBELL-FALCK, D. *et al.* The intravenous use of coconut water, **American Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 1, p.108–111, 2000.
- CAMPOS, C. F. *et al.* 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, 1996.
- CANO, P.; MARIN, M. A.; FÚSTER, C. Effects of some thermal treatments on polyphenoloxidase and peroxidase activities of banana (*Musa cavendishii*, var *enana*). **Journal Sci Food Agric**, v. 51 p. 223-231, 1990
- COLLET, L. S. F. C. A. *et al.* Kinetic study on pectinesterase inactivation during continuous pasteurization of orange juice, **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 125-129, 2005.
- COUTO, S. M. *et al.* Estudo comparativo da aceitação de água de coco “in natura”, refrigerada e industrializada. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2004, Recife. **Anais do XIX CBCTA**, 2004.

¹ De acordo com as normas da ABNT NBR-6023, com adaptações EPUSP – Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses, 41p., 2001. Disponível em www.poli.usp.br.

- DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. Cinética da inativação enzimática da polifenoloxidase e da peroxidase durante o processamento contínuo de purê de banana (*Musa cavendishii*, Lamb.). In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2004, Recife. **Anais do XIX CBCTA**, 2004.
- DUPAIGNE, P. Un jus de fruit peu ordinaire: l'eau de coco. **Fruits**, 26, (9), 625-627, 1971.
- DUARTE, A. C. P., COELHO, M. A. Z., LEITE, S. G. F., Identification of peroxidase and tyrosinase in green coconut water, **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.3, n. 5, p. 266-270, 2002
- ESTADOS UNIDOS. Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official Methods Of Analysis**, v. 2, 16 ed., Washington D. C., 1995.
- FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, 31, 263-271, 1996.
- 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, **J. Sci. Fd. Agric.**, v. 29, p. 261-266, 1978.
- HELDMAN, D. R.; LUND D. B., ed. **Handbook of Food Engineering**. Dekker, New York, 1992.
- JARMAN, C.C.; GRIMWOOD, B. E. **Utilization of coconut water**. In: GRIMWOOD, B. E. Coconut palm products. FAO – Agricultural Development Paper, 99, 159-169, 1975.
- KIMBALL, D.A. **Citrus processing quality control and technology**. New York. Chapman & Hall-IPT, 1991.

- MACIEL, M. I.; OLIVEIRA, S. L.; da SILVA, I. P. Effects of different storage conditions on preservation of coconut (Cocos nucifera) water. **Journal of Food Processing and Preservation**, 16 (13-22), 1992.
- MAZENOTTI, P. Água de coco do Brasil começa a ganhar o mundo. **Agência Brasil** Brasília, DF. Disponível em: < <http://www.radiobras.gov.br/>>. Acesso em: 18 de março 2004.
- 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: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2004, Recife. **Anais** do XIX CBCTA, 2004.
- PAGEL, G. Após dobrar vendas no Brasil, produtores de água de coco partem para o mercado externo. Disponível em: < <http://www.anba.com.br>> . Acesso em: 25 de out. 2004.
- PESSOA, M. C. P. Y; SILVA, A. de S.; CAMARGO, C. P. **Qualidade e certificação de produtos agropecuários**. Embrapa informações tecnológicas. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://embrapa.br>>. Acesso em: 25 jul. 2004.
- PIERIS, W. V. D. Coconut Water, the liquid component of the coconut endosperm. Note on terminology. **Oleagineux**, n. 26, p. 383-390, jun. 1971.
- POLAKOVIC, M.; VRÁBEL, P. Analysis of the mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Critical assessment of inactivation experiments. **Process Biochemistry**, 31, (8), 787-800, 1996.
- REDDY, K. V.; DAS, M; DAS, S. K., Filtration resistances in non-thermal sterilization of green coconut water, **Journal of Food Engineering**, in press, 2004
- ROBINSON, D. S. Peroxidases and catalases in foods. In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. Ed. **Oxidative enzymes in foods**, Elsevier Applied Science, 1-45, 1991.

- ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. **Água de coco - Métodos de Conservação**, Documento nº. 37, Junho, 2000. Disponível em: <<http://www.sites.uol.com.br>>. Acesso em: 05 Fevereiro 2003.
- SISON Jr., B. C. Disposal coconut Waste. **Philippine Journal of Coconut Studies**, 2, 39-41, 1977.
- SOYSAL, Ç. SÖYLEMEZ, Z., Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment, **Journal of Food Engineering**, v. 68, p. 249-356, 2005.
- SOUZA, C. R.; SOUZA, M. P.; FARIA, J. A. F.; VIOTTO, L. A.. Avaliação do processo de ultrafiltração de água de coco (*Cocus Nucifera*). In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2004, Recife. **Anais do XIX CBCTA**, 2004.
- TADINI, C. C.; MURASAKI, N. C. Inativação da peroxidase e da polifenoloxidase no processo térmico descontínuo da água de coco verde (*Cocos nucifera L.*). In: 10º SIICUSP, 2002, São Carlos. **Anais do 10º SIICUSP**, 1, 2438-2438, 2002.
- TADINI, C. C.; MURASAKI, N. C. Peroxidase and Polyphenoloxidase Inactivation by Batch Thermal Processing of Coconut Water (*Cocos nucifera L.*). In: IV Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos, CIBIA. **Anais do IV CIBIA**, 1, 107-107, 2003.
- TADINI, C. C.; TRIBESS, T. B.; SILVA JUNIOR, P. A. da. Correlation of non-linear model parameters and pH on pectinesterase thermal inactivation in minimally pasteurized orange juice. In: International Congress on Engineering and Food ICEF 9, 2004, Montpellier. **Proceedings of International Congress on Engineering and Food ICEF 9**. Montpellier: International Association for Engineering and Food, 2004. p. 595-600.
- TOLEDO, R. T. **Fundamentals of Food Process Engineering**. Chapman & Hall . New York/ London, 1991.

VALDERRAMA, P.; CLEMENTE, E., Isolation and thermostability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji, **Food Chemistry**, v. 87, p. 601-606, 2004.

WEEMAES, C. A. *et al.* Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums, **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.31, n.1, p. 44-49, 1998.

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