

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

JUCELIO KULMANN DE MEDEIROS

**TERMOSSONICAÇÃO PARA INATIVAÇÃO DE ENZIMAS PRESENTES EM
CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)**

Porto Alegre

2020

JUCELIO KULMANN DE MEDEIROS

**TERMOSSONICAÇÃO PARA INATIVAÇÃO DE ENZIMAS PRESENTES EM
CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Domeneghini Mercali
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Julia Ribeiro Sarkis

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Medeiros, Jucelio Kulmann de
TERMOSSONICAÇÃO PARA INATIVAÇÃO DE ENZIMAS
PRESENTES EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum
officinarum* L.) / Jucelio Kulmann de Medeiros. --
2020.

106 f.

Orientadora: Giovana Domeneghini Mercali.

Coorientadora: Julia Ribeiro Sarkis.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Inativação enzimática. 2. Ultrassom. 3. Caldo de
cana. 4. Peroxidase. I. Mercali, Giovana Domeneghini,
orient. II. Sarkis, Julia Ribeiro, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

A Comissão avaliadora, abaixo assinada, aprova a defesa de Dissertação de Mestrado, intitulada “Termossonicação para inativação de enzimas presentes em caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)”, elaborada por Jucelio Kulmann de Medeiros, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Prof^a. Dr^a. Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Prof^a. Dr^a. Bethania Brochier

“Caminante, no hay camino, se hace el camino al andar.”

Antonio Machado

Ao meu pai, que não chegou a ver os filhos formados, e que talvez nunca tenha sabido do quão inspirador foi nessa tarefa.

À minha Vó Lila, a quem muito devi atenção por estar nessa etapa, pelo eterno carinho, zelo, sabedoria, mate, bebida e comida gorda que muito fazem falta.

À minha mãe, estrela da minha vida, pela paciência de sempre.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A minhas orientadoras, Prof^ª. Giovana Domeneghini Mercali e Prof^ª. Julia Ribeiro Sarkis, por acreditarem até mais do que eu na possibilidade que ora se concretiza, e pela generosidade de terem-me acolhido.

Aos colegas de LATEPA, grandes pesquisadores e companheiros de celebrações, que muito me ensinaram, estando sempre dispostos a ajudar.

À Rita Ferreira, pelo inspirador “bom dia” na porta do Anexo II da Saúde, que, por vezes, era a calma nas tantas idas e vindas interestaduais.

À Mel, hoje professora da UFCSPA, que antes de qualquer um de nós, já tinha o mapa desse caminho.

Aos meus professores do então CEFET-BG, minha verdadeira *alma mater*, por terem semeado todas as possibilidades que abraço hoje. Tonia, Angheben, Ethel, André, Aneti, Claudia, Giovannini, Giselle, Larissa, lembrarei sempre de vocês e de todos que, de alguma forma, são parte do que sou hoje.

Aos professores do DCTA da UFPel, com os quais infelizmente não pude ter a honra de dividir momento como esse, não apenas por terem ensinado-me muito do que preciso para completar essa etapa, mas pelas figuras humanas generosas e inspiradoras. Rombaldi, Angela, Álvaro, Moacir, Fábio, ainda nos veremos na lida acadêmica.

Aos amigos daquela terra nova, que há 9 anos me acolheram e renovam constantemente a paciência, por fazerem-me mais alegre, humano e completo. Fabi, Paulo Henrique, Paulo Camargo, Elenira, Débora, Jana, Tanes, João Sol, vocês também são parte disso.

Aos meus alunos, razão de ser do meu trabalho, pela compreensão.

A tudo e ao todo que me faz insistir, inquietar e acordar todo dia com a missão de ser feliz e ser melhor.

RESUMO

O ultrassom (US) é uma tecnologia emergente não térmica que desperta interesse no processamento de alimentos. US de alta potência é utilizado para processos de modificação da matéria e inativação de micro-organismos e enzimas. O caldo de cana-de-açúcar é uma bebida popular em vários países tropicais, e apesar disso, sua comercialização é restrita devido à alta perecibilidade, sobretudo em função da ação de enzimas oxidativas, como polifenoloxidase e peroxidase. O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de US para a inativação de enzimas oxidativas endógenas do caldo de cana, além de sua influência no conteúdo de compostos fenólicos totais e nas mudanças de cor. Foram testadas temperaturas de 50 a 80 °C, com variação de amplitude de US, tempo de tratamento ultrassônico e regime de pulsos. Além disso, verificou-se a qualidade do produto e a regeneração das enzimas durante 32 dias de armazenamento do caldo sob refrigeração. Os resultados indicam um efeito positivo do US na redução da atividade enzimática, quando aplicado com amplitude de 75 %, regime de pulsos durando 20 s, em intervalos de 10 s e com sonicação ao longo do processo térmico. Em geral, os resultados indicam que o US é uma alternativa para reduzir a severidade do processamento térmico, diminuindo o tempo ou a temperatura de processamento, com maior manutenção dos atributos de cor e concentração de compostos fenólicos iguais ao do caldo *in natura* ao longo do armazenamento. Esse estudo colabora com a consolidação de tecnologias emergentes como alternativas aos tratamentos convencionais, na busca por um melhor aproveitamento energético e por alimentos mais seguros e saudáveis.

Palavras-chave: inativação enzimática, ultrassom, caldo de cana, peroxidase.

ABSTRACT

Ultrasound (US) is a non-thermal emerging technology that has gained interest in food processing field. High-power US can be used for modification of food structure, as well as for micro-organisms and enzymes inactivation. Sugarcane juice is a popular beverage in some tropical countries. However, its commercialization is restricted due to its high perishability, mainly caused by oxidative enzymes, such as polyphenol oxidase and peroxidase. The aim of this work was to evaluate the use of US for inactivation of endogenous oxidative enzymes in sugarcane juice and its influence on the total phenolic content and color changes. Temperatures from 50 to 80 °C were tested, varying US amplitude, ultrasonic treatment time and pulse regime. In addition, the quality of the product and the regeneration of the enzymes were verified during 32 days of storage under refrigeration. The results indicated a positive effect of US on reducing enzyme residual activity, when applied with a sonication amplitude of 75%, pulse regime of 20 s on / 10 s off and with sonication throughout the entire thermal process. Overall, results showed that ultrasound is an alternative to reduce the thermal processing severity, decreasing the processing time or temperature, with color attributes maintenance and concentration of phenolic compounds similar to those of the product *in natura*. This study collaborates with the consolidation of emerging technologies as alternatives to conventional treatments, seeking efficient energy use and safe and healthier foods.

Keywords: enzymatic inactivation, ultrasound, sugarcane juice, peroxidase.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo Geral.....	4
2.2	Objetivos Específicos.....	4
3	FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1	Cana-de-açúcar.....	5
3.1.1	<u>A cana-de-açúcar no Brasil</u>	7
3.1.2	<u>A cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul</u>	9
3.2	O caldo de cana-de-açúcar.....	10
3.3	Processamento do caldo de cana.....	12
3.4	Enzimas de interesse presentes em caldo de cana.....	13
3.4.1	<u>Polifenoloxidase (PFO)</u>	14
3.4.2	<u>Peroxidase (POD)</u>	17
3.4.3	<u>Isoenzimas</u>	19
3.4.4	<u>Inativação enzimática</u>	20
3.4.5	<u>Cinética de inativação enzimática</u>	22
3.5	Tecnologias emergentes para processamento de alimentos.....	25
3.5.1	<u>Ultrassom</u>	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Caldo de cana-de-açúcar.....	33
4.2	Caracterização do caldo de cana.....	33
4.2.1	<u>Análise da cor</u>	34
4.2.2	<u>Análise de compostos fenólicos totais</u>	35
4.2.3	<u>Análise de compostos flavonoides totais</u>	35
4.2.4	<u>Atividade enzimática de PFO</u>	35
4.2.5	<u>Atividade enzimática de POD</u>	36
4.3	Tratamentos Controle.....	337
4.4	Tratamento ultrassônico.....	338

4.5	Cinética de inativação em diferentes temperaturas – Etapa I.....	339
4.6	Avaliação da influência dos parâmetros de processamento – Etapa II	40
4.7	Avaliação da regeneração enzimática durante armazenamento refrigerado – Etapa III	42
4.8	Modelagem matemática e análise estatística.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Caracterização físico-química do caldo de cana-de-açúcar.....	45
5.2	Cinética de inativação enzimática em diferentes temperaturas – Etapa I ..	49
5.2.1	<u>Atividade enzimática da PFO.....</u>	50
5.2.2	<u>Atividade enzimática de POD.....</u>	55
5.2.3	<u>Avaliação da cor.....</u>	58
5.3	Avaliação da influência dos parâmetros de processamento – Etapa II ...	62
5.3.1	<u>Avaliação da influência do regime de pulsos do ultrassom na inativação enzimática de POD</u>	63
5.3.2	<u>Avaliação da influência do tempo de sonicação na inativação enzimática de POD</u>	65
5.3.3	<u>Avaliação da influência da potência do ultrassom na inativação enzimática de POD</u>	67
5.4	Avaliação da regeneração da atividade enzimática de POD durante armazenamento refrigerado – Etapa III.....	69
5.4.1	<u>Atividade residual de POD durante o armazenamento refrigerado.....</u>	69
5.4.2	<u>Variação dos atributos de cor durante o armazenamento refrigerado.....</u>	72
5.4.3	<u>Variação dos teores de compostos fenólicos totais durante o armazenamento refrigerado.....</u>	75
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	79
	REFERÊNCIAS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Equações cinéticas usadas para predição de inativação enzimática.	23
Tabela 2 – Parâmetros utilizados nos tratamentos de otimização para POD, em temperatura de 75 °C.	41
Tabela 3 – Composição físico-química dos diferentes lotes de caldo de cana <i>in natura</i> utilizados no presente trabalho.	45
Tabela 4 – Inativação enzimática de PFO em caldo de cana na rampa de aquecimento durante tratamento convencional em diferentes temperaturas.	51
Tabela 5 – Índices estatísticos para avaliação da performance dos modelos cinéticos para descrever a inativação de PFO em caldo de cana.	54
Tabela 6 – Coeficientes do modelo de Weibull para descrever a atividade enzimática residual de PFO em caldo de cana nos tratamentos convencionais e com termossonicação.	54
Tabela 7 – Inativação enzimática de PFO ao final do tratamento convencional e com termossonicação na temperatura de 50 °C.	55
Tabela 8 – Índices estatísticos para avaliação da performance dos modelos cinéticos para descrever a inativação de POD em caldo de cana nos tratamentos convencionais e termossonicados.	57
Tabela 9 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencionais e termossonicados.	58
Tabela 10 – Comparativo dos parâmetros de cor do método <i>CIELab</i> das amostras ao final de tratamentos em determinadas temperaturas entre experimentos de aquecimento convencional e termossonicação.	59
Tabela 11 – Índices estatísticos para avaliação da performance do ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais de atividade enzimática residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencional e termossonicados.	62
Tabela 12 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de regime de pulsos.	65
Tabela 13 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de duração de sonicação.	67

Tabela 14 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de potência.	68
Tabela 15 – Parâmetros <i>CIELab</i> de cor para amostras tratadas de modo convencional e ultrassônico a 80 °C e armazenadas sob refrigeração.	72
Tabela 16 – Teores de compostos fenólicos totais (CFT) das amostras tratadas convencionalmente e ultrassonicamente a 80 °C durante armazenamento.	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático de uma planta de cana-de-açúcar, suas partes componentes (colmo, ponteiro e palha) e as respectivas composições em termos de umidade e biomassa (fibra e açúcar).	6
Figura 2 – Reação de escurecimento promovida pela PFO.	15
Figura 3 – Reação de escurecimento promovida pela POD.	17
Figura 4 – Bolhas de cavitação em caldo de cana tratado a 80 °C e 75 % de amplitude: a) célula com caldo de cana em sonicação, b) bolha de cavitação em destaque.	29
Figura 5 – Desenho esquemático da formação de bolhas de cavitação.	29
Figura 6 – Transmissão acústica em torno a uma bolha de cavitação.	30
Figura 7 – Representação da esfera <i>CIELab</i>	34
Figura 8– Sistema utilizado para o aquecimento convencional: a) banho de aquecimento, b) banho de manutenção, c) painel de válvulas de aquecimento, d) célula encamisada, e) agitador magnético, f) sistema de aquisição de dados.	37
Figura 9 – Equipamento de termossonicação: a) banho de aquecimento, b) banho de manutenção, c) painel de válvulas de aquecimento, d) célula encamisada, e) agitador magnético, f) sistema de aquisição de dados, g) equipamento de US, h) sonda de US acoplada aos sensores de temperatura.	38
Figura 10 – Fluxograma da Etapa I: experimentos de cinética de inativação em diferentes temperaturas.	40
Figura 11 – Fluxograma da Etapa II: experimentos de avaliação da influência dos parâmetros de processamento.	42
Figura 12 – Fluxograma da Etapa III: experimentos de avaliação da regeneração enzimática durante armazenamento refrigerado.	43
Figura 13 – Perfil de temperatura das amostras de caldo de cana durante o tempo de aquecimento convencional (linhas pretas) e a termossonicação (linhas cinzas).	50
Figura 14 – Atividade enzimática residual de PFO em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais.	51

Figura 15 – Valores experimentais (símbolos) e preditos pelo modelo de Weibull (linhas) para atividade enzimática residual de PFO em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos com e sem aplicação de ultrassom.	53
Figura 16 – Atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais e termossonicados a 50 e 60 °C.	55
Figura 17 – Atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais e termossonicados a 70 e 80 °C.	56
Figura 18 – Valores experimentais (símbolos) e preditos pelo modelo de Weibull (linhas) para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de regime de pulsos.	64
Figura 19 – Valores experimentais (símbolos) e preditos pelo modelo de Weibull (linhas) para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de duração de sonicação.	66
Figura 20 – Valores experimentais (símbolos) e preditos pelo modelo de Weibull (linhas) para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de potência.	68
Figura 21 – Atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo de armazenamento nos tratamentos convencionais e termossonicados a 80 °C.	70
Figura 22 – Aspecto visual do caldo de cana tratado convencionalmente (CV) e tratado com ultrassom (US) ao final do período de armazenamento por refrigeração: a) turbidez do líquido e b) e precipitado de borras.	73
Figura 23 – Variação do teor de compostos fenólicos totais para amostras tratadas de modo convencional e ultrassônico a 80 °C e armazenadas sob refrigeração.	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> / análise de variância.
ATR	Açúcar total recuperável.
CFT	compostos fenólicos totais.
CIELab	Espaço de cor L*a*b* da <i>Commission Internationale de l'Eclairage</i> (Comissão Internacional da Iluminação).
CV	Convencional, tratamento controle.
DAD	<i>Diode Array Detector</i> / Detector de Arranjo de Diodos.
DPO	Difenoloxidase.
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> / Ionização por Eletropulverização.
ESI – MS	<i>Electrospray Ionization - Mass Spectrometry</i> / Espectrometria de Massas com Ionização por Eletropulverização.
G	RCF, <i>relative centrifugal force</i> / força centrífuga relativa.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
LC – MS	<i>Liquid Chromatograph coupled Mass Spectrometer</i> / cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas.
MS	<i>Mass Spectrometry</i> / Espectrometria de Massas.
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial ou em tandem.
PFO	Polifenoloxidase (EC 1.10.3.1)
POD	Peroxidase (EC 1.11.1.7)
PTFE	Politetrafluoretileno.
RMSE	<i>Root mean squared error</i> / raiz do erro médio quadrático.
RNC	Registro Nacional de Cultivares.
SPE	<i>Solid phase extraction</i> / extração em fase sólida.
SST	Sólidos solúveis totais.
US	Ultrassom.
UV-vis	Ultravioleta visível.

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>A</i>	Atividade enzimática.
<i>a*</i>	Espaço de cor <i>a*</i> (coordenada vermelho/verde).
<i>aw</i>	Atividade de água.
<i>A/A₀</i>	Atividade enzimática residual.
<i>b</i>	Fator de escala.
<i>b*</i>	Espaço de cor <i>b*</i> (coordenada amarelo/azul).
<i>D</i>	Tempo de redução decimal.
ΔE	Diferença total de cor pelo método <i>CIELab</i> .
<i>k</i>	Constante da degradação enzimática.
<i>L*</i>	Espaço de cor <i>L*</i> (luminosidade).
<i>n</i>	Número.
<i>Rf</i>	Restrição edáfica por fertilidade.

Símbolos gregos

σ	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).
χ^2	<i>Chi</i> -quadrado.

Subscritos

<i>0</i>	Inicial.
<i>exp</i>	Experimental.
<i>pred</i>	Predito.
<i>Res</i>	Residual.
<i>t</i>	Tempo.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) é um cultivo agrícola de grande importância para o Brasil, país líder na sua produção mundial. Extensamente utilizada pelo setor sucroalcooleiro na produção de etanol e açúcar, é uma cultura versátil, relativamente barata e útil também nas pequenas propriedades rurais. Em menor escala, a partir da cana-de-açúcar produzem-se melado, rapaduras, açúcar mascavo, destilados potáveis e caldo de cana, muito presentes em agroindústria de menor porte e na agricultura familiar.

O caldo de cana-de-açúcar é uma bebida popular no Brasil, assim como em outros países tropicais, em especial na Índia. Em comum, o consumo do caldo de cana costuma ser feito a partir de comércio informal e com pouca precaução sanitária. Mesmo no mercado formal, o produto não costuma ser processado e envasado, sendo de consumo imediato. Há, de fato, pouquíssimas marcas de caldo de cana disponíveis no mercado, voltadas à distribuição regional bastante localizada, ou mesmo à venda para o mercado externo. Contribui decisivamente para a necessidade do consumo imediato a vasta flora micro-orgânica presente, as características físico-químicas, nomeadamente a alta atividade de água, o pH elevado e a abundância em açúcares, e a consequente alta perecibilidade. Também contribui o fato de o produto ser muito sensível a reações de oxidação provocadas pelas enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD), as quais trazem tons amarronzados ao produto, pouco desejados pelos consumidores. O tratamento térmico do caldo, que inativa enzimas e micro-organismos, pode trazer uma série de problemas de qualidade como a caramelização, a reação de Maillard, a perda de aromas, de frescor e de identidade gustativa. Contribuir para a consolidação de métodos inovadores de processamento e conservação do caldo de cana-de-açúcar é, portanto, uma área a ser explorada.

As chamadas tecnologias emergentes de processamento e conservação de alimentos são técnicas que se diferem das formas tradicionais de conservação. Há, dentre elas, tecnologias térmicas, como micro-ondas, radiofrequência e aquecimento ôhmico, e não térmicas, como alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado e

ultrassom. As tecnologias mencionadas têm sido aplicadas para inativação de micro-organismos e enzimas nos alimentos. Nesse contexto, as tecnologias que despertam bastante interesse são as denominadas não-térmicas, pois permitem diminuir ou mesmo eliminar os problemas advindos do aquecimento dos alimentos, evitando perdas nutricionais e sensoriais e aumentando a vida de prateleira dos produtos. As tecnologias emergentes encontram ainda apelo na busca por processos mais limpos e eficientes, já que podem gerar menos resíduos e, geralmente, têm ótimo aproveitamento de energia. Essas tecnologias permitem, na síntese do processamento de alimentos, a obtenção de produtos mais frescos, íntegros e menos processados, características desejadas pelos consumidores.

Dentre as tecnologias emergentes, o uso de ultrassom (US) desperta grande interesse, pois é uma tecnologia versátil que pode ser aplicada em diversas etapas do processamento de alimentos. Essa técnica consiste em submeter o alimento a ondas ultrassônicas de alta potência, provocando, principalmente, o fenômeno da cavitação. Cavitação são microbolhas formadas devido aos sucessivos ciclos de alta e baixa pressão formados pelas ondas propagadas no alimento, as quais colapsam violentamente, trazendo efeitos localizados de cisalhamento, aumento de pressão, aumento de temperatura e danos às estruturas celulares. Já se sabe que esses efeitos auxiliam na inativação de micro-organismos e enzimas, porém o efeito é muito variável em função da combinação de potência, tempo e temperatura utilizadas, conjugado ao fato de que o tipo de micro-organismo/enzima e composição do meio podem exercer influência na inativação. Nesse sentido, estudos de aplicação de US em diferentes condições e materiais biológicos auxiliam na consolidação da eficácia e confiabilidade da tecnologia como promotora de alimentos mais íntegros, saudáveis e seguros.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso da tecnologia de US para a inativação de enzimas oxidativas endógenas do caldo de cana-de-açúcar. Para melhor compreensão, o estudo está estruturado em seis capítulos. No Capítulo 2, serão apresentados os objetivos gerais e específicos. O Capítulo 3 é dedicado à fundamentação teórica e à revisão bibliográfica. O Capítulo 4 apresenta a metodologia a ser empregada para execução do projeto. O Capítulo 5 traz os

resultados e discussões de todas as etapas do estudo. Por fim, o Capítulo 6 apresenta as considerações finais e sugestões para a continuidade da pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo é avaliar a aplicação de termossonicação para a inativação de enzimas endógenas em caldo de cana-de-açúcar, buscando alternativas tecnológicas para a conservação e conseqüente comercialização do produto.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- avaliar a cinética de inativação da peroxidase e da polifenoloxidase durante aplicação de termossonicação em diferentes temperaturas;
- avaliar a influência das variáveis intensidade, duração de pulsos e tempo de sonicação na cinética de inativação da peroxidase durante aplicação de termossonicação;
- comparar os diferentes tratamentos quanto à sua efetividade na inativação de enzimas, determinando os parâmetros ideais de processamento;
- avaliar a atividade residual das amostras durante o armazenamento sob refrigeração para verificar a possibilidade de regeneração das enzimas;

avaliar mudanças de cor e de concentração de compostos fenólicos totais em diferentes temperaturas de processamento e no decorrer do armazenamento refrigerado.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo, serão abordados os pressupostos teóricos que embasam o projeto e a revisão bibliográfica que o fundamenta e orienta. Serão objeto de fundamentação e revisão a produção da cana-de-açúcar no Brasil e no Rio Grande do Sul, o caldo de cana, as enzimas presentes no caldo de cana e as tecnologias emergentes, em especial o US.

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea semiperene (HORII, 2004a; MANZATTO et al., 2009; SILVA, 2016a; SILVA et al., 2017), pertencentes à família *Poaceae* e à espécie *Saccharum officinarum* (MARIN et al., 2009). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) mantém o Registro Nacional de Cultivares (RNC) (BRASIL, 2018; SILVA et al., 2013). Nesse registro, encontram-se, em 2018, 202 cultivares de cana-de-açúcar, sendo oito pertencentes à espécie *Saccharum officinarum* L., e os demais, híbridos interespecíficos (*Saccharum* L.), dentre os últimos um geneticamente modificado (CULTIVARWEB, 2018).

A cana-de-açúcar tem seu sistema de produção constituído de uma safra decorrente do plantio, seguido de safras oriundas da rebrota das soqueiras (BRASIL, 2018), ciclos esses conhecidos como socas ou folhas (HORII, 2004a). É um cultivo exclusivo das regiões tropicais e subtropicais do mundo (SAXENA et al., 2016). Colmo, folhas e flores interessam como componentes ou produtos tecnológicos pelos sólidos solúveis – açúcares ou não-açúcares – que gerarão após industrialização (HORII, 2004a). A principal parte utilizada da cana é o seu colmo, inclusive constituindo sua maior composição, parte da qual obtém-se o caldo de cana (HORII, 2004b). A Figura 1 apresenta um desenho esquemático contendo as principais partes da cana e sua composição principal.

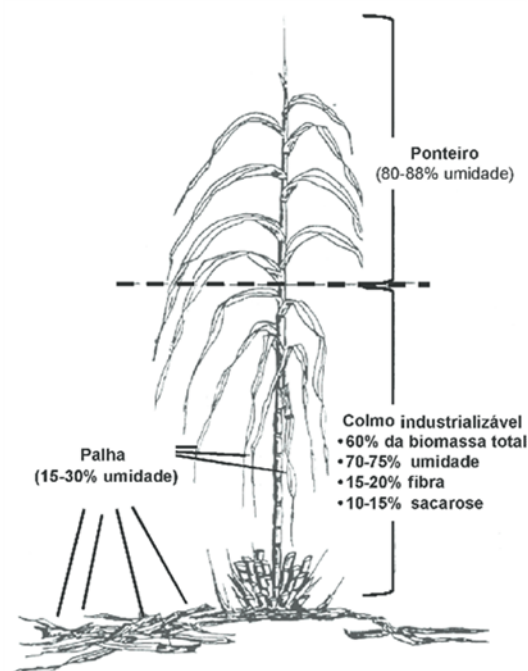


Figura 1 – Desenho esquemático de uma planta de cana-de-açúcar, suas partes componentes (colmo, ponteiro e palha) e as respectivas composições em termos de umidade e biomassa (fibra e açúcar) (MATSUOKA et al., 2012).

As diferentes variedades de cana-de-açúcar são classificadas em precoces, médias e tardias, levando em consideração o momento no qual atingem a maturação (maior teor de açúcares). Nos cultivos do centro ao sul do Brasil, as três classificações acima correspondem respectivamente, segundo Horii (2004b), aos meses de maio e junho, julho e a partir de agosto. É importante, contudo, destacar que há cultivares com ciclos entre 360-450 dias, chamadas “cana de ano”, e entre 451-540 dias, “cana de ano e meio” (BRASIL, 2018).

Antes de se realizar a colheita, é importante que se identifique o estágio de maturação da cana. Quanto maior a riqueza em sacarose, maior será a produção por tonelada de cana (CESAR; SILVA, 2003). O corte da cana-de-açúcar se dá quando a cana atinge seu ponto de maturação e o teor máximo de sacarose (ZAMBON; ARAÚJO, 2014). Neste ponto o caldo atinge um Brix mínimo de 18° (SOUZA; BRAGANÇA, 1999a, 1999b). Na fase de maturação, ao contrário do restante do ciclo, considera-se que a queda na temperatura tenha importância fundamental. Temperaturas mais baixas são responsáveis pela redução do ritmo vegetativo e auxiliam no processo de concentração da sacarose do colmo, podendo substituir a deficiência hídrica como fator determinante do início do processo (MARIN et al., 2009). O índice de maturação pode ser obtido pela leitura dos sólidos solúveis

totais (SST) no ápice e na base da cana, dividindo-se o primeiro resultado pelo segundo, conforme Santos (2016), que conceitua os seguintes índices: menor que 0,60 para cana verde; entre 0,60 e 0,85 para cana em processo de maturação; entre 0,85 e 1 para cana madura; maior que 1 para cana em processo de declínio de sacarose.

Diversos fatores influenciam na qualidade da cana e, por consequência, na qualidade de seus derivados. A variedade cultivada e os fatores edafoclimáticos do local de plantio são as primeiras fontes de variabilidade. Nesse aspecto, Horii (2004a) destaca:

A composição química e tecnológica da cana-de-açúcar varia em função de fatores como: variedade, espaçamento e perfilhamento; idade e corte; estágio de maturação, época de colheita, clima ao longo do ciclo; solo e fertilidade; adubação, compactação do solo, irrigação (água ou vinhaça), tratos culturais e fechamento; sanidade dos cultivares, brotação da soqueira, florescimento e chochamento, entre outros.

Contudo, indiferente das condições de cultivo, são fatores interferentes e decisivos na qualidade o grau de maturação, a ocorrência de queimadas, o fracionamento do colmo e o tempo entre colheita e processamento. Notoriamente, quanto maior o tempo entre colheita e processamento, maior é a influência na depreciação da qualidade técnica e industrial da cana. Isso se dá pela clara influência de micro-organismos deteriorantes, bem como de enzimas (HORII, 2004b).

3.1.1 A cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar chegou logo após o descobrimento do Brasil, mas a cultura ganhou importância econômica a partir da segunda metade do século XVI, quando os engenhos do Nordeste Brasileiro passaram a operar (MARIN et al., 2009). O favorável clima tropical quente e úmido, o fértil solo nordestino de massapé e a mão-de-obra escrava africana lançaram as bases para consolidar a produção canavieira no Brasil colônia (SOARES et al., 2013). Voltada inicialmente para a produção do açúcar, a cana-de-açúcar se transformou num dos principais ciclos econômicos e tornou-se um dos cultivos mais importantes do país, com uso crescente na produção de álcool combustível nos dias atuais (SOARES et al., 2013). O Brasil ocupa posição de destaque na produção mundial de cana-de-açúcar, figurando como maior

produtor (ABREU et al., 2013; CESAR; SILVA, 2003; MARQUES et al., 2013; PRATI; CAMARGO, 2008; ZAMBON; ARAÚJO, 2014). Atualmente, a cultura ocupa mais de 10 milhões de hectares, o que garante a liderança do país, seguido pela Índia (cerca de 5 milhões de ha) e Tailândia (cerca de 1 milhão de ha) (FAO, 2020). É um importante cultivo da economia brasileira, e o país mantém a liderança global na tecnologia de produção de etanol e açúcar.

Rica em sacarose, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima na manufatura de 70 % do açúcar do mundo (HUANG et al., 2015). No país, o cultivo é destinado, em sua maior parte, à produção de açúcar e de etanol e, em menor escala, para outras finalidades, como a alimentação animal e fabricação de aguardente, entre outras (BRASIL, 2018). Na atualidade, cada vez mais se descobrem novas funcionalidades, sobretudo para os resíduos. A importância da cana-de-açúcar é decorrente de sua múltipla utilidade, sendo empregada *in natura*, sob a forma de forragem para alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool (LUI et al., 2011).

O negócio da cana-de-açúcar no Brasil apresenta vultosos números. Dos valores de exportações do agronegócio em 2020 (dados disponíveis até fevereiro), o complexo sucroalcooleiro representou 8,18 % do total (AGROSTAT BRASIL, 2020). Os dados da última série histórica (2005/6 a 2018/19) trazem como média da área total colhida 7.944,5 mil hectares por ano, estimando para a safra corrente, 2019/20, 8.481,2 mil hectares segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020). A principal região produtora é Sudeste, com uma produção próxima a três vezes superior a segunda colocada, Centro-Oeste. Notoriamente, a região Sudeste deve sua posição isolada pela forte indústria sucroalcooleira do estado de São Paulo. A região Sul, por sua vez, teve a quarta maior área colhida, com 570,1 mil ha, distribuídos entre Paraná (569,1 mil ha) e Rio Grande do Sul (0,7 mil ha) (CONAB, 2020).

A análise da destinação da cana-de-açúcar na indústria sucroalcooleira é feita utilizando o conceito de açúcar total recuperável (ATR). Segundo a CONAB (2017), o ATR representa a quantidade útil de sacarose no caldo da cana-de-açúcar, e é a matéria-prima básica do processo de fabricação dos produtos finais. Do montante de ATR na safra 2018/19, 35,5 % foi destinado à produção de açúcar em todas suas formas, mostrando que a predominância do complexo sucroalcooleiro é para a produção de etanol, sendo que somente a produção de combustíveis (etanol anidro)

representou 19,2% de todo ATR (CONAB, 2020).

3.1.2 A cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul

A produção de cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul (RS), apesar de pequena em relação à nacional, tem importância por estar tradicionalmente associada às atividades desenvolvidas em áreas de pequena propriedade e agricultura familiar, relacionadas à criação de gado e ao processamento artesanal de vários produtos, como melado, rapadura, açúcar mascavo e cachaça (SILVA, 2016b; SOARES et al., 2013). A experiência da AGASA (Açúcar Gaúcho S.A.) foi considerada como uma iniciativa de sucesso, apesar de hoje não existir mais (MALUF et al., 2008).

Em 1974, a Comissão Especial para Estudo da Agroindústria Açucareira, da Assembleia Legislativa do Rio Grande do Sul, concluiu pela viabilidade da lavoura canavieira no estado, indicando maior potencial nas áreas localizadas nas regiões ecoclimáticas do Litoral Norte, Depressão Central e Alto Vale do Uruguai (MALUF et al., 2008). O Estado apresenta as áreas mais ao sul do Brasil com cultivo de cana-de-açúcar, tendo potencial para ampliação da sua produção em área e produtividade (SILVA et al., 2016). Nota-se uma concentração na região norte do estado em detrimento do sul, provavelmente pelo fato de que a última apresenta menores temperaturas e risco marcante de geadas (SOARES et al., 2013). O Zoneamento Agrícola de Risco Climático para a cultura de cana-de-açúcar em regime de sequeiro no Estado do Rio Grande do Sul considera que, dentre os 497 municípios gaúchos, 176 são indicados para o plantio de novas áreas destinadas à produção de etanol e açúcar e 204 municípios são indicados para o plantio destinado à produção de etanol, açúcar e outros fins (BRASIL, 2018). O RS dispõe de mais de 6 milhões de hectares com aptidão edáfica “recomendável” e praticamente 7 milhões de hectares com aptidão “pouco recomendável” (*rf*, restrição edáfica por fertilidade), facilmente potencializadas por meio de correção e manejo da fertilidade (ALBA; FLORES, 2013).

No Rio Grande do Sul, a cana pode ser plantada a partir do mês de setembro e a colheita pode iniciar a partir do mês de maio do próximo ano, conforme a região, data de plantio e maturação (MALUF et al., 2008). A época preferencial de plantio não é muito consensual. A colheita no litoral do estado é realizada de junho em

diante para cana soca e ressoca, quando as temperaturas baixas (entre 7 °C e 20 °C) e os dias curtos de inverno, ao desativarem o crescimento, promovem a maturação, determinando um acúmulo de sacarose até o ponto de colheita (MALUF et al., 2008). Na região Sul, o frio funciona como indutor de maturação e de acúmulo de açúcar, o que nas regiões Norte e Nordeste ocorre através de períodos secos, de modo que os excessos hídricos de inverno no RS podem ser considerados sem importância (MALUF et al., 2008). Temperaturas em torno de 17 °C são benéficas para a maturação, mas temperaturas muito baixas, 2,5 °C ou menos, podem interromper ou limitar a maturação (MALUF et al., 2008). O RS tem, em média, maior insolação no verão que os estados da região Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste (MALUF et al., 2008).

Enquanto o Brasil possui produtividade média de 72,8 t/ha, o RS fica bem abaixo, com 20,6 t/ha (SOARES et al., 2013). No entanto, estudos indicam que com bom manejo do solo e da planta, pode-se obter média de produção acima de 90 t/ha/ano por 5 a 7 anos (SILVA, 2016a; SILVA et al., 2017). Como possíveis causas da alegada baixa produtividade do canavial gaúcho, aponta-se provavelmente o destino da produção: produção de cachaça artesanal, açúcar mascavo, melado e alimentação de gado (SOARES et al., 2013). A cana de açúcar figurou entre as principais culturas agrícolas do RS nas safras de 2016 e 2017 (FEIX et al., 2017), o que ressalta a importância do cultivo para o estado.

3.2 O caldo de cana-de-açúcar

O caldo obtido da moenda da cana é popular em muitos países (BROCHIER et al., 2016; GARUD et al., 2017; SAXENA et al., 2016). O consumo de caldo de cana é muito popular no Brasil porque é considerado uma bebida refrescante e energética, a qual é vendida em restaurantes, supermercados, trailers e quiosques (FRATESCHI et al., 2013). O caldo de cana é uma bebida doce e barata, popular entre seus consumidores por causa de seu alto conteúdo em vitaminas e minerais, sendo rico em nutrientes como sacarose, frutose, glicose, aminoácidos e minerais (HUANG et al., 2015). A bebida hidrata rapidamente o corpo após prolongado calor e atividades físicas (KAYALVIZHI et al., 2016). O caldo de cana é um importante componente na indústria de sucos em toda a Ásia, onde vários tipos de bebidas à base de caldo de cana estão disponíveis no mercado, sendo ainda uma bebida popular e barata servida em tendas de beira de estrada na época de colheita

(HUANG et al., 2015).

O caldo de cana-de-açúcar é caracterizado como um líquido opaco, com cor variando de cinza a verde escuro (REZZADORI et al., 2013). É uma solução de sacarose, glicose e frutose, constituída de água (cerca de 82 %) e SST (em torno de 18 %), sendo estes sólidos agrupados em açúcares orgânicos, não açúcares e inorgânicos (SANTOS, 2016). O teor de SST pode variar em função de fatores ambientais, época de colheita, entre outros fatores, estando geralmente entre 15 e 25 °Brix. O pH é pouco ácido, variando entre 5 e 6, sendo mais comum o intervalo 5,2 - 5,4 (PRATI; CAMARGO, 2008). Sua composição varia com a variedade, idade e saúde da cana-de-açúcar, bem como com o solo e clima onde é cultivada (REZZADORI et al., 2013; BROCHIER et al., 2016). Legalmente, o caldo de cana é um suco, nos termos do Art. 18 do Decreto nº 6 871, de 04 de junho de 2009, e como tal, não deve ser fermentado, concentrado ou diluído, obtido exclusivamente da cana madura (BRASIL, 2009). A Instrução Normativa Nº 37, de 1º de outubro de 2018, editada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define suco de cana-de-açúcar ou garapa o produto obtido da parte comestível da cana, tendo como parâmetros mínimos 14 °Brix de sólidos solúveis totais, 5,5 de pH e 0,05 g de ácido cítrico por 100 g de caldo (BRASIL, 2018).

O caldo de cana se constitui num sistema coloidal muito complexo, no qual o meio de dispersão é a água. Neste sistema, alguns constituintes, como os açúcares, as amidas e os aminoácidos, estão em dispersão molecular de difícil separação; os ácidos orgânicos e os sais minerais apresentam-se dissociados; e as matérias corantes, sílica, gomas, pectinas, proteínas e partículas de cera estão em estado de dispersão coloidal (PRATI; CAMARGO, 2008). A doçura é determinada pelo açúcar em maior concentração no produto e diferentes açúcares apresentam variável sensibilidade de doçura (HUANG et al., 2015). O nitrogênio é encontrado no caldo de cana, principalmente na forma de aminoácidos (30,5% do total de N) e amidas (24,1 % do total de N), existindo menores quantidades de proteínas e outros compostos, como nitratos (17,8 % do total de N) (PRATI; CAMARGO, 2008). O teor de coloides (gomas/polissacarídeos) presente no caldo é bastante dependente da quantidade e tipo de ternos de moagem, pressão hidráulica e quantidade de água de embebição, sendo estimado em 0,02-0,29% (PRATI; CAMARGO, 2008).

Compostos fenólicos são importantes constituintes por serem responsáveis por características sensoriais de muitos alimentos (cor, adstringência e amargor, por

exemplo), sendo um dos mais abundantes antioxidantes na dieta humana (SANT'ANNA et al., 2013). Esses fitoquímicos podem modular a peroxidação de lipídeos envolvida na aterogênese, trombose e carcinogênese (ZHISHEN et al., 1999). São metabólitos secundários, e sua estrutura consiste em diversos grupos hidroxilas ligados a anéis aromáticos (SANT'ANNA et al., 2013). Os compostos fenólicos do caldo de cana (principalmente ácidos fenólicos e flavonoides), assim como os de outras plantas, têm considerável função fisiológica e morfológica na planta (HAVSTEEN, 2002). Muitas classes de flavonoides apresentam atividade antioxidante em relação a uma variedade de compostos prontamente oxidáveis, podendo eliminar O_2 e radicais superóxidos por simples transferência de elétrons (ZHISHEN et al., 1999). A oxidação desses compostos bioativos potencialmente leva a mudanças nas suas propriedades nutracêuticas (SANT'ANNA et al., 2013).

3.3 Processamento do caldo de cana

O caldo de cana é considerado um bom substrato para o desenvolvimento de um largo espectro de micro-organismos (BROCHIER et al., 2016). Geralmente, micro-organismos deteriorantes, como *Leuconostoc*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, e micro-organismos patogênicos, como coliformes, *Salmonella* e *Bacillus*, deterioram a qualidade das bebidas de cana (GARUD et al., 2017). A ação da PFO e POD sobre os compostos fenólicos do caldo podem causar escurecimento do produto. Por esse motivo, o caldo de cana fresco não pode ser armazenado por longo tempo, devendo ser consumido logo após a sua extração. Assim, a fermentação e o escurecimento limitam a comercialização do caldo de cana (HUANG et al., 2015), que é, na maioria das vezes, vendido por comerciantes informais, sob precárias condições higiênico-sanitárias (REZZADORI et al., 2013).

O processamento pode aumentar sua vida útil (HUANG et al., 2015), permitindo uma mais ampla comercialização do produto. Derivados de frutas e vegetais são geralmente pasteurizados ou esterilizados para assegurar sua segurança microbiológica e manter a qualidade sensorial e nutricional durante o armazenamento (HUANG et al., 2015). Embora o tratamento térmico possa reduzir a contagem microbiana do caldo de cana, esse processo pode causar reação de Maillard entre açúcares redutores e aminoácidos e também acelerar a destruição da clorofila (HUANG et al., 2015), alterando as características sensoriais e nutricionais do produto.

O escurecimento enzimático tem sido evitado por métodos térmicos e químicos, mas as perdas causadas pelas altas temperaturas e tempos de processamento levam pesquisadores a estudar outras alternativas para a inativação enzimática (SAXENA et al., 2016).

Há atualmente um aumento na demanda por produtos estáveis à temperatura ambiente, que sejam livres de conservadores químicos e de fácil utilização (SILVA; FARIA, 2006). Os consumidores buscam alta qualidade e segurança do alimento, bem como produtos naturais sem a adição de reagentes químicos (HUANG et al., 2015). Além disso, existe um crescente interesse da população por alimentos com alto conteúdo de antioxidantes, sendo de grande importância a manutenção desses compostos durante o processamento (HUANG et al., 2015). A eficácia de um tratamento é amplamente determinada pela sua habilidade de reter componentes nutricionais termossensíveis, como, por exemplo, o ácido ascórbico (SAXENA et al., 2016). Pesquisas nessa área permitem aumentar a vida útil, conservar sua qualidade nutricional e tornar o produto disponível para um amplo grupo de consumidores (KAYALVIZHI et al., 2016). Para viabilizar a ampla comercialização do caldo de cana, um método efetivo de conservação que possa controlar o crescimento microbiano e retenha a qualidade do caldo de cana fresco deve ser desenvolvido (HUANG et al., 2015).

3.4 Enzimas de interesse presentes em caldo de cana

Enzimas são biomoléculas responsáveis pela catálise de diferentes reações em sistemas biológicos (MOURA et al., 2007); são proteínas com atividade catalítica devido a seu poder específico de ativação e conversão de substratos em produtos (WHITAKER, 1996).

As enzimas têm grande impacto na qualidade dos alimentos, acelerando reações de 10^3 a 10^{11} vezes e sendo altamente seletivas a seus substratos (WHITAKER, 1996). A velocidade das reações catalisadas por enzimas costuma ser diretamente proporcional à concentração de enzima ativa e dependente de modo complexo das concentrações de substrato, inibidores e cofatores, e também da temperatura e do pH (WHITAKER, 1996). A atividade enzimática é governada pelo seu sítio ativo de ligação, baseado na configuração tridimensional da molécula de proteína; alterações no sítio ativo de ligação ou desnaturação das proteínas podem causar perdas na atividade ou mudanças funcionais na enzima (HUANG et al.,

2015).

A qualidade alimentar (textura, sabor e valor nutricional) de derivados de frutas e vegetais frescos ou processados pode ser influenciada pela atividade enzimática endógena residual até um certo ponto (HUANG et al., 2015). Estima-se que mais de 50% de algumas frutas tropicais sejam perdidas devido ao escurecimento enzimático, o que acomete também sucos e vegetais frescos, gerando esforços de pesquisa para o controle dessa atividade enzimática (WHITAKER, 1996).

A atividade de enzimas naturalmente presentes em frutas e também no caldo de cana, como PFO e POD, promove mudanças indesejáveis na cor, textura, sabor, aroma e na composição nutricional. Conseqüentemente, essas enzimas são de grande interesse de estudo, e muito esforço tem sido feito para chegar a métodos de controle do escurecimento enzimático, sendo a indústria de alimentos bem consciente dessa necessidade em muitos alimentos (WALKER, 2001).

3.4.1 Polifenoloxidase (PFO)

Polifenoloxidase (EC 1.10.3.1), oficialmente 1,2-benzenodiol ou oxigênio oxidoreductase, é frequentemente chamada de tirosinase, polifenolase, fenolase, catecoloxidase, cresolase ou catecolase, dependendo do substrato alvo da enzima em maior quantidade no material em estudo (WHITAKER, 1996). De acordo com Walker (2001), são conhecidas também por difenoloxidasas (DPO), compondo dois principais grupos: o-DPO, conhecidas por catecolases, polifenoloxidasas e tirosinases, e p-DPO, mais usualmente conhecidas como lacases. A PFO é uma das principais enzimas responsáveis pelo escurecimento do caldo de cana, consistindo, nesse produto, de duas frações, uma lábil e outra estável (SAXENA et al., 2016).

Os mecanismos de ação da PFO variam ligeiramente, mas produzem diversos fenóis como produtos da catalisação. Compostos fenólicos como o ácido p-hidroxibenzóico, catecol, ácido cafeico, gossipol e quercetina são encontrados em todos os tecidos vegetais, os quais podem, durante a maceração, ser oxidados a quinonas pelo oxigênio molecular em pH alcalino. Inicialmente, a PFO oxida o-difenóis a o-benzoquinona, e os compostos formados, altamente reativos, podem reagir com os grupos sulfidril, α -amino e ϵ -amino irreversivelmente, sendo muito mais rápida a reação com os dois primeiros (WHITAKER, 1996). A Figura 2 ilustra a

reação de escurecimento promovida pela PFO.

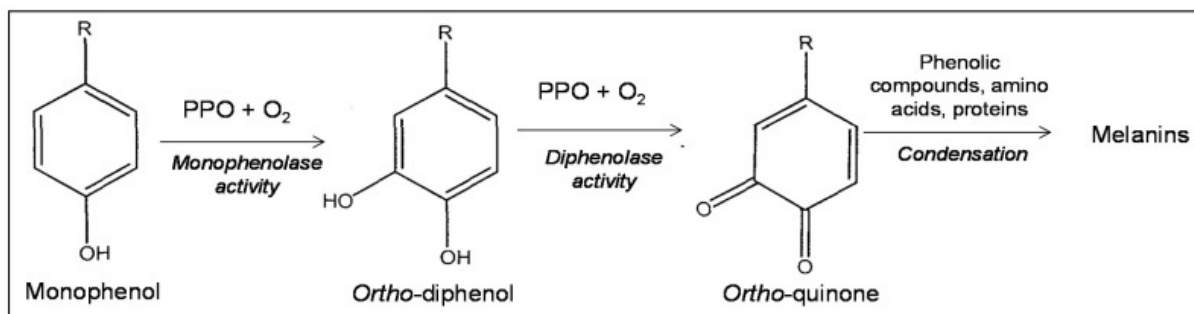


Figura 2 – Reação de escurecimento promovida pela PFO (TARANTO et al., 2017).

As quinonas também podem promover reações de condensação, tendo como resultado pigmentos marrons de alta massa molar, por vezes referidos como taninos, os quais permanecem altamente reativos e prontamente combinam-se com os grupos sulfidril e amino das proteínas (WHITAKER, 1996). Reações entre quinonas e grupo amino diminuem a digestibilidade e biodisponibilidade de proteínas compostas por lisina e cisteína; as o-benzoquinonas reagem com o grupo ϵ -amino dos resíduos lisil de proteínas, insolubilizando proteínas e trazendo perdas nutricionais (WHITAKER, 1996). É importante destacar que essas reações de oxidação podem ocasionar também mudanças de textura e sabor nos alimentos.

Qualquer dos grupo de PFO catalisam a oxidação de o-DPO e p-DPO a suas respectivas quinonas, que podem reagir não-enzimaticamente em cadeia e formar pigmentos marrom escuros a pretos, conhecidos como melanoidinas (WALKER, 2001). A o-benzoquinona é instável e, posteriormente à oxidação das o-DPO e p-DPO, catalisa a oxidação não-enzimática por O_2 , que gera melaninas por polimerização, uma das responsáveis pelas características indesejadas de escurecimento de frutas e de seus derivados (WHITAKER, 1996). A PFO também oxida antocianinas, a partir da reação dessas com o-benzoquinona através de um mecanismo não-enzimático, formando antocianinas oxidadas e produtos de degradação (WHITAKER, 1996). Nesse caso, contudo, as antocianinas tornam-se descoloridas e o mecanismo de ação se dá, primeiro, pela oxidação do pirocatecol a o-benzoquinona, a qual oxida as antocianinas, formando compostos descoloridos (MARKAKIS, 1982).

Além da inibição ou destruição da enzima, há meios químicos de prevenção da ocorrência de escurecimento enzimático. Ações como eliminação de oxigênio e de fenóis, adição de ácido ascórbico, bissulfito de sódio e tióis podem prevenir o

escurecimento, atuando na redução do produto inicial, o-benzoquinona, evitando a formação de melanina; contudo, a mudança nos níveis dessas substâncias pode trazer novamente o escurecimento enzimático, dado que as enzimas continuam ativas (WHITAKER, 1996). Alguns fenóis não-substratos, como 4-hexilressorcinol e ácido benzóico, são inibidores efetivos de algumas PFO, em função de ligação competitiva desses inibidores no sítio de ligação do composto redutor (WHITAKER, 1996). O escurecimento enzimático pode ser prevenido também pela alteração dos fenóis substratos, ligando-os ao polietilenoglicol, à polivinipolipirrolidona ou ao Sephadex® (gel reticulado de dextrana para filtração), bem como por metilação enzimática de um ou mais grupo(s) hidroxil do substrato fenólico, o que pode ser especialmente útil em sucos (WHITAKER, 1996). Segundo Walker (2001), com base em diversos autores, é possível controlar o escurecimento enzimático de PFO através da adição de ácido ascórbico, que reduz os quinoides resultantes da reação à seus fenóis de origem, ou da cisteína, que se combina com quinonas formando tioéteres sem cor, bloqueando qualquer reação posterior de formação de cores escuras. Contudo, o autor alega que a inibição da atividade enzimática efetiva deve envolver algum tipo de interação no sítio ativo de ligação da enzima, por exemplo, inibição por agentes quelantes de cobre ou ácidos cinâmicos.

Em relação ao pH ótimo de atividade enzimática, a PFO beneficia-se de pH próximos à neutralidade (REZZADORI et al., 2013), tendo demonstrado atividade ótima na faixa de 6,1 a 6,3 (SIDDIQ; DOLAN, 2017). Chisari et al. (2007) encontraram valores de 4,0 e 4,5 em duas variedades distintas de morango. Carvalho; Orlanda (2017), pesquisando a atividade de PFO em buritis, encontraram o valor ótimo de pH 7,0, verificando completa inativação da enzima abaixo de pH 2,0 e acima de pH 10,0.

Chisari et al. (2007) encontraram como temperatura ótima para PFO valores entre 50 e 65 °C em morangos, observando cerca de 80 % da atividade máxima entre 40 e 65 °C e, por outro lado, baixa atividade em temperatura de 4 °C (16 a 32 % da atividade máxima). Os mesmos autores verificaram que a estabilidade a 50 °C foi de 60 a 120 min, enquanto em 60 °C, após 20 min, já era possível atingir mais do que uma redução decimal. Carvalho; Orlanda (2017) avaliaram a estabilidade térmica de PFO de buriti em altas temperaturas, reportando que uma inativação de aproximadamente 60% foi alcançada em 4 min a 77 °C; na temperatura de 57 °C, foi observada baixa inativação mesmo após 20 min de tratamento térmico convencional

(cerca de 11 %).

3.4.2 Peroxidase (POD)

Peroxidase (EC 1.11.1.7), oficialmente denominada como doador peróxido, hidrogênio-peróxido ou oxidoreductase, é uma enzima oxidativa que, assim como a PFO, tem ampla ocorrência em vegetais *in natura* e em produtos alimentícios processados à base de vegetais. Atua na reação enzimática com peróxidos, sendo sua atividade limitada pela disponibilidade de componentes aceptores de elétrons como radicais superóxidos, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos (CHISARI et al., 2007). A enzima reduz esses compostos, enquanto que um doador de elétrons é oxidado (BRITO et al., 2005). A POD pode participar da destruição de vitamina C, catalisar a perda de cor dos carotenoides na ausência de ácidos graxos insaturados e promover a descoloração de antocianinas, sendo que, em muitos casos, o produto da oxidação é colorido e serve como base para a determinação colorimétrica da atividade da POD (BRITO et al., 2005). A Figura 3 ilustra a reação de escurecimento promovida pela POD.

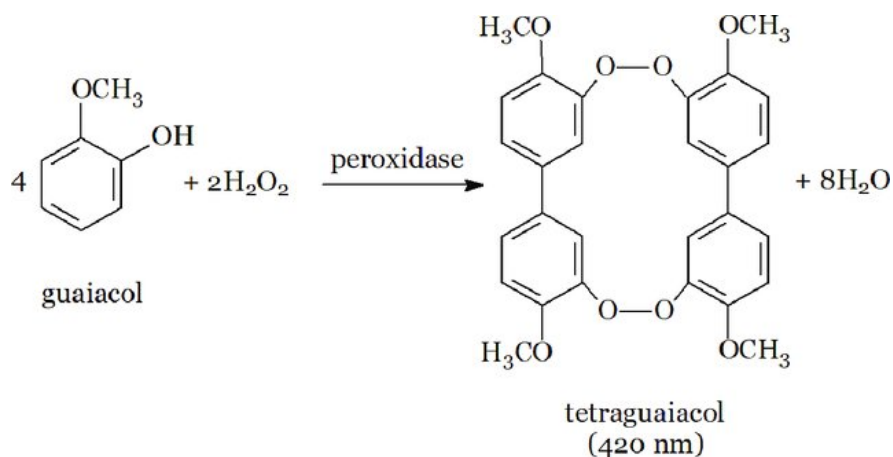


Figura 3 – Reação de escurecimento promovida pela POD (CLERICI et al., 2014).

Chisari et al. (2007) encontraram como pH ótimo para POD valores entre 6,0 e 6,5 para duas variedades distintas de morango, observando decréscimo de atividade em pH mais ácido provavelmente devido à instabilidade da enzima nesse pH. Rojas et al. (2017; 2016) avaliaram a atividade de POD em água de coco utilizando pH 6,0 como sendo o pH ótimo para a enzima. Brito et al. (2005), em um estudo sobre a atividade de POD de duas variedades de abacaxi, observaram

atividade ótima em pH 4,5, verificando baixa atividade em pH inferior a 2,6 e superior a 7,0; além disso, foi observada estabilidade da enzima (mais de 80 % da atividade enzimática estava preservada) após 24 h a 50 °C na faixa de pH de 4,0 a 9,0. A grande variabilidade de respostas encontradas na literatura indica que a composição das matérias-primas influencia na atividade enzimática, havendo a necessidade de uma cuidadosa escolha dos parâmetros adotados de acordo com o produto em questão. Brochier (2018), determinando condições ideais para a atividade de POD em caldo de cana, verificou maior atividade enzimática entre pH 5,5 e 6,0, aduzindo ser essa a faixa normalmente encontrada no caldo de cana.

Brito et al. (2005) observaram uma temperatura ótima de 45 a 55 °C para atividade da POD em abacaxi. Os autores verificaram que POD permaneceu estável após 30 min em temperaturas inferiores a 50 °C; por outro lado, a 70 °C a atividade reduziu a 15%, e a 80 °C, atingiu a inativação completa; não obstante, apenas 60 a 120 s a 90 °C foram necessários para a inativação de POD. Em relação à regeneração, os autores verificaram que amostras tratadas a 75 °C por 10 min apresentaram 5 e 12 % de regeneração da atividade de POD após 3 h a 25 °C e 24 h a 5° C, respectivamente.

Bagatini et al. (2018), em estudo de regeneração de POD em caldo de cana tratado de modo convencional e ôhmico, observaram diversos comportamentos em função da temperatura e do modo de tratamento. Em tratamento convencional, a 70 °C, não observaram diferença significativa em relação à atividade enzimática inicial; a 80 °C, observaram aumento em 7 e 14 dias de armazenamento após tratamento térmico de 15 min, enquanto que após tratamento de 30 min, a regeneração foi mais alta e desde o começo do armazenamento, efeito atribuído à maior liberação de outros substratos para POD. Em aquecimento ôhmico, contudo, a regeneração enzimática decresceu após 30 min de tratamento a 80 °C graças aos efeitos não térmicos, segundo os autores.

Chisari et al. (2007) encontraram valores de temperatura ótima de POD de aproximadamente 25 °C em morangos, observando progressiva diminuição da atividade em temperaturas acima de 30 °C, chegando a 90 % de inativação em 70 °C. Por outro lado, observaram uma menor atividade a 4 °C (34 a 47 % da atividade máxima). Rojas et al. (2017; 2016) também relataram um temperatura ótima próxima a 24 °C para POD de água de coco.

Brochier (2018), ao testar, devido a restrições técnicas, temperatura máxima

de 60 °C em caldo de cana, não obteve a temperatura ótima, indicando possível termorresistência da enzima e atividade máxima em temperatura ainda mais alta do que a máxima pesquisada.

Chisari et al. (2007) verificaram que a atividade de POD a 50 °C após 60 min foi de cerca de 20 a 40 % da atividade máxima, sendo mais termolábil do que PFO. Essa constatação contrasta com a maioria das informações encontradas na literatura, que consideram POD um indicador de eficiência de tratamento térmico justamente por ser uma enzima com alta resistência térmica enzimática (ROJAS et al., 2017).

Como é possível verificar, esses valores variam muito entre diferentes estudos e matérias-primas, havendo a necessidade de se procurar parâmetros em experimentos e matérias-primas mais próximas aos desejados.

3.4.3 Isoenzimas

Isoenzimas são enzimas de um único organismo que possuem qualitativamente a mesma atividade enzimática, mas diferenciam-se quantitativamente em atividade e estrutura por diferenças nas sequências de aminoácidos ou por modificações pós-translacionais, como glicosilação e ativação proteolítica, entre outras (WHITAKER, 1996). As enzimas podem ter muitos estados intermediários, relacionados aos diferentes valores de energia interna do sistema, estados que podem apresentar atividade enzimática igual, maior ou menor do que o estado inicial da enzima (ROJAS et al., 2017).

As enzimas precisam de energia para passar de um estado a outro, de forma que, a todo aumento de energia do sistema, espera-se uma mudança conformacional, que pode mudar a atividade enzimática (ROJAS et al., 2017). As isoenzimas, frequentemente, têm estabilidades térmicas diferentes, trazendo dificuldade para que determinado tratamento, em uma dada temperatura, inative as enzimas por completo. Da mesma forma, isoenzimas podem apresentar diferenças na inibição por substrato (WHITAKER, 1996).

A POD possui diversos perfis de resistência ao aquecimento por poder ter mais de uma atividade catalítica simultaneamente (BROCHIER et al., 2016). Por outro lado, a composição de PFO varia em diferentes plantas, sendo que os estudos em caldo de cana sugerem uma mistura de duas isoformas, uma termolábil e outra

termoestável, com diferentes sensibilidades térmicas: a fração lábil é mais facilmente inativada a 60-70 °C, enquanto a fração estável torna-se suscetível à inativação a 80-90 °C (SAXENA et al., 2017).

3.4.4 Inativação enzimática

Inibidores enzimáticos são importantes meios de controle da atividade enzimática, ligando-se reversível e irreversivelmente às enzimas. Podem ser proteínas, carboidratos e outros tipos de moléculas, incluindo alguns produtos de catálise enzimática (WHITAKER, 1996). A inibição, segundo o autor, pode ser:

- competitiva, quando o substrato e o inibidor competem pela ligação à enzima;
- não-competitiva, quando o inibidor não compete com o substrato pela ligação à enzima, podendo ambos ligarem-se a ela simultaneamente;
- incompetitiva, quando o inibidor não pode ligar-se à enzima livre, mas sim a um ou mais complexos intermediários;
- alostérica, quando a ligação do inibidor à enzima se dá em múltiplas subunidades da mesma.

A desnaturação das enzimas elimina a atividade enzimática, podendo ser alcançada por modificação química dos grupos essenciais do sítio ativo de ligação, por irradiação, por solventes orgânicos, por eliminação do substrato, por forças de cisalhamento, altas pressões e altas temperaturas (WHITAKER, 1996). Alterações de pH podem afetar a atividade enzimática, como já mencionado no item anterior. Alta temperatura também exerce influência ao desnaturar enzimas, ainda que possa aumentar a cinética enzimática das enzimas que permanecem ativas.

Diversos processos aplicados aos alimentos inativam enzimas, intencionalmente ou não, mas nem todos eles levam à instantânea ou completa inativação (WHITAKER, 1996). É importante destacar a possível ocorrência de regeneração das enzimas, levando a atividade enzimática residual inclusive a níveis equivalentes aos observados nas condições anteriores aos pré-tratamentos.

O branqueamento é uma técnica amplamente utilizada em vegetais e frutas *in natura*, aplicando-se temperaturas brandas para inativação de enzimas que impactam na qualidade do produto. O sucesso desses tratamentos é verificado a partir de indicadores termoestáveis, enzimas importantes nos diferentes alimentos e que apresentam boa resistência ao calor. Algumas das enzimas indicadoras mais

comuns usadas em controle de qualidade de processos em alimentos são a peroxidase em vegetais e frutas, a fosfatase alcalina em laticínios e produtos cárneos e a catalase em leite e alguns vegetais (WHITAKER, 1996). No caso do caldo de cana, a enzima indicadora é a POD.

A energia absorvida de tratamentos como aquecimento ôhmico, campo elétrico pulsado, sonicação e radiação ultravioleta pode levar a mudanças na estrutura espacial da enzima, geralmente provocando uma parcial modificação estrutural, quando os sítios ativos de ligação podem ficar melhor expostos, aumentando a atividade enzimática. Contudo, quando sais e açúcares estão presentes, a modificação estrutural pode expor sítios de ligação a essas substâncias, podendo reduzir a atividade enzimática (AUGUSTO et al., 2015).

A inativação enzimática por US, tecnologia utilizada nesse trabalho e abordada com mais detalhes no Item 3.5.1, é primordialmente atribuída à cavitação, sendo tanto maior a inativação das enzimas quanto maior a intensidade de sonicação (DIAS et al., 2015). A inativação de enzimas monoméricas geralmente envolve tanto desfragmentação da enzima quanto formação de agregados, enquanto que enzimas poliméricas tendem a fragmentar-se em subunidades monoméricas durante a sonicação (DIAS et al., 2015).

Embora o escurecimento enzimático causado por PFO e POD possa ser evitado por reversão ou bloqueio das reações de produção de produtos de coloração escura, a maior efetividade nesse objetivo é atingida através da inativação da atividade enzimática, sobretudo com métodos que envolvam algum tipo de interação no sítio ativo de ligação da enzima (WALKER, 2001).

Illera et al. (2018), em estudo sobre inativação de PFO em suco de maçã através de termossonicação, afirmam que os efeitos sinérgicos entre temperatura e ultrassom são mais efetivos em maiores temperaturas, uma vez que maiores potências de sonicação originaram menores atividades enzimáticas residuais na temperatura mais alta estudada, 67 °C. Comparando o tratamento convencional de suco de maçã à termossonicação, houve aumento da atividade de PFO no tratamento convencional nas temperaturas mais baixas (52 °C e 60 °C); para a termossonicação, por outro lado, em qualquer temperatura, houve diminuição da atividade enzimática, com resultado mais expressivo a 67 °C.

Anaya-Esparza et al. (2017) pesquisaram a influência da termossonicação em néctar de graviola; utilizando máxima potência de sonicação e temperatura média de

54 °C, obtiveram 99 % de redução da atividade de PFO, atribuída ao efeito combinado de cavitação e temperatura no processo de desnaturação. Os autores obtiveram redução da atividade de PFO em qualquer das combinações de tempo (2, 6 e 10 min) e temperatura (30, 40 e 50 °C) avaliadas; contudo não puderam avaliar os efeitos não térmicos por não terem estabelecido tratamentos controle com igual perfil térmico.

Illera et al. (2018) estudaram o efeito de diferentes gases dissolvidos na inativação de PFO em termossonicação de suco de maçã. Com uso de nitrogênio líquido, foi obtida maior cinética de inativação em relação ao ar atmosférico. Com gás carbônico, as taxas iniciais de inativação não apresentaram diferenças em relação ao ar atmosférico, contudo taxas de reação maiores foram obtidas com a continuidade da termossonicação. Em todos os casos, a inativação de PFO foi maior com o uso de N₂.

Um dos mecanismos propostos para a inativação enzimática por US é a formação de radicais livres. Illera et al. (2018) estudaram a formação desses compostos em solução tampão de citrato de pH 3,9, termossonicada na presença de ar atmosférico, N₂ e CO₂. Os autores não observaram produção de H₂O₂ nos cinco primeiros minutos quando os gases eram ar e N₂, e após isso, até 20 min de tratamento, estabeleceram uma relação linear na produção do composto em função do tempo, sem diferenças estatísticas entre os diferentes gases. Com o uso de CO₂, o tempo sem formação de H₂O₂ aumentou para 15 minutos, mas os resultados ao fim do tratamento não diferiram dos demais gases, o que indica apenas uma inibição parcial de CO₂ na produção de H₂O₂. Já na análise da produção de nitratos, a maior taxa foi obtida com o uso de N₂, sem observar diferença entre os valores obtidos com o uso de CO₂ e ar. A análise da produção de nitritos revelou taxas menores para N₂ e CO₂. Os resultados, para os autores, podem explicar parcialmente a maior inativação de PFO com o uso de gases em substituição ao ar atmosférico.

3.4.5 Cinética de inativação enzimática

A cinética de inativação enzimática no processamento de alimentos pode ser descrita por vários modelos matemáticos. Muitos estudos consideram apenas uma a quatro possibilidades de diferentes isoformas, o que pode ser visto como uma simplificação, dada uma grande variabilidade possível, ainda que resulte em boa

descrição dos dados experimentais; levando-se em conta a complexidade da inativação enzimática, modelos apropriados devem ser usados para representar esse mecanismo complexo (ROJAS et al., 2017). Grande parte dos estudos disponíveis na literatura utiliza principalmente os modelos de primeira ordem simples, de primeira ordem com duas frações, de primeira ordem em série e o modelo de Weibull. A Tabela 1 apresenta as distintas equações de modelos matemáticos para predição da atividade enzimática.

Para Rojas et al. (2017), o modelo cinético mais usado é o clássico modelo de primeira ordem, que descreve o mais simples comportamento de inativação de uma enzima ao considerar apenas uma única isoforma, hipótese também defendida por Augusto et al. (2015). Essa equação considera que o mecanismo de inativação descreve a passagem das formas nativas da enzima para um único estado devido à desnaturação, considerando como apenas uma fração a ser inativada (AUGUSTO et al., 2015).

Tabela 1 – Modelos cinéticos utilizados para predição de inativação enzimática.

Modelo	Equação ^a
*Primeira ordem	$A/A_0 = \exp(-k \cdot t)$
Distintas isoenzimas	$A/A_0 = A_L \cdot \exp(-k_L \cdot t) + A_R \cdot \exp(-k_R \cdot t)$
*Duas frações	$A/A_0 = \alpha \cdot \exp(-k_L \cdot t) + (1 - \alpha) \cdot \exp(-k_R \cdot t)$
*Primeira ordem multicomponente	$\frac{A}{A_0} = \frac{[\exp(-k_1 \cdot t) + r \cdot \exp(-k_2 \cdot t)]}{1 + r}$
*Conversão fracional	$A/A_0 = A_r + (A_0 - A_r) \cdot \exp(-k \cdot t)$
*Distribuição de Weibull	$A/A_0 = \exp(-b \cdot t^n)$
Enésima ordem	$A/A_0 = [A_0^{1-n} + (n - 1) \cdot k \cdot t]^{1/(n-1)}$
*Séries	$\frac{A}{A_0} = \alpha_2 + [1 + (\alpha_1 \cdot k_1/k_2 - k_1) - (\alpha_2 \cdot k_2/k_2 - k_1)] \cdot \exp(-k_1 \cdot t) - [(\alpha_1 \cdot k_1/k_2 - k_1) - (\alpha_2 \cdot k_1/k_2 - k_1)] \cdot \exp(-k_2 \cdot t)$

^a A corresponde à atividade enzimática em um dado tempo t , A_0 à atividade enzimática inicial ($t = 0$), k à constante da inativação enzimática em uma determinada temperatura (s^{-1}), t ao tempo (s), b ao fator de escala (unidade) e n ao fator de forma. Fonte: Brochier et al. (2016).

O modelo de Weibull é caracterizado por dois parâmetros: b , o fator de escala e n , o fator de forma (WEIBULL, 1952; WEIBULL; 1951). Quando aplicado a dados de sobrevivência, o modelo considera que organismos ou moléculas individuais em uma população não têm idêntica resistência e sensibilidade a agentes letais, e mesmo os tempos de inativação variam para cada organismo ainda que a população

seja pura, em função das variações biológicas; no caso das enzimas, isso é notado pela existência de isoenzimas e agregados (moléculas que se ligam à enzima e exercem ação protetora) com diferente resistência ao aquecimento (ROJAS et al., 2017).

Para Saxena et al. (2017), no modelo de Weibull, a inativação enzimática é tratada como função da atividade enzimática residual, que depende de diversos fatores, como diferenças na intensidade do tratamento ou desenvolvimento de resistência ao aquecimento pela enzima. Brochier et al. (2016) aplicaram esse modelo para descrever a cinética de inativação de POD e PFO em caldo de cana, caracterizando o parâmetro b como sendo a taxa de reação térmica e o parâmetro n como determinante do formato da distribuição, sugerindo uma degradação contínua da enzima.

A presença de diferentes frações de enzima e de estados intermediários pode resultar em uma cinética de inativação mais complexa. Duas frações enzimáticas são frequentemente observadas em estudos de inativação, envolvendo frações sensíveis e resistentes, trazendo a necessidade de um modelo de primeira ordem de duas frações, composto de uma constante de inativação da fração resistente e outra constante de inativação da fração sensível (AUGUSTO et al., 2015).

Alguns casos de inativação enzimática podem ocorrer em duas etapas: uma equivale à desnaturação da enzima nativa a uma forma intermediária, que pode ter inativação maior ou menor do que a forma nativa. Na segunda etapa, a forma intermediária é inativada devido à desnaturação. Essa abordagem considera, então, dois estados da enzima, nativo e intermediário, cada um sendo inativado por cinética de primeira ordem, levando a um modelo de primeira ordem em série (AUGUSTO et al., 2015).

Brochier et al. (2016), avaliando a performance de diversos modelos cinéticos para descrever a atividade de POD durante tratamento térmico via aquecimento ôhmico em caldo de cana, encontraram, em qualquer das condições, ajustes superiores utilizando o modelo de Weibull. Os autores reportaram um ajuste ainda menos adequado com os modelos de primeira ordem e primeira ordem multicomponente, justificando o fato por POD ser uma isoenzima e que, portanto, tem muitas isoformas de resistência atuando simultaneamente.

Augusto et al. (2015) pesquisaram a influência de tratamento ultravioleta em água de coco. Os autores observaram que a inativação de POD não seguiu uma

cinética de primeira ordem, já que duas regiões foram claramente identificadas quando a escala logarítmica foi utilizada. A taxa de inativação mudou após 20 min, quando a enzima passou a ser mais resistente ao fotoprocessamento. Conseqüentemente, apesar de o modelo de primeira ordem ter tido bom ajuste estatístico, a cinética enzimática não encontrou boa correlação com o modelo em atividades muito baixas (em torno de 5 % do valor inicial). Assim, o modelo de duas frações e o modelo de primeira ordem em série também foram testados, e, embora todos tenham tido bom ajuste estatístico, o que melhor adaptou-se aos dados foi o modelo fracional, sugerindo que POD tenha duas frações, inativadas simultaneamente. No estudo citado, também foi estudada a inativação de PFO, não tendo sido possível a modelagem dos dados de inativação ao modelo de primeira ordem, tendo ajustado-se melhor ao modelo de duas frações e, com menor acerto, ao modelo em série.

Illera et al. (2018), estudando a cinética de inativação de PFO em temperaturas de 52 a 67 °C através dos modelos de primeira ordem e de Weibull, observaram um aumento da constante de inativação enzimática e diminuição do valor de redução decimal com o aumento da temperatura no modelo de primeira ordem. No modelo de Weibull, através dos fatores de escala e de forma (b e n), houve diminuição do tempo de redução decimal com o aumento da temperatura em comparação aos valores obtidos pelo modelo de primeira ordem, o que trouxe ressalva dos autores em relação a uma possível superestimação do tempo de processamento para inativação de PFO se o modelo de primeira ordem fosse utilizado. Ao estudar a inativação enzimática de PFO provocada por diferentes gases, os autores obtiveram melhor ajuste dos dados ao modelo de Weibull, em relação ao modelo de primeira ordem.

3.5 Tecnologias emergentes para processamento de alimentos

Os processos térmicos são amplamente utilizados na indústria de alimentos, em especial para diminuição ou eliminação de enzimas e micro-organismos. Atualmente, a pasteurização e a esterilização convencional, utilizando trocadores de calor, entre outros equipamentos, para aquecer os alimentos por condução/convecção, ainda ocupam uma posição dominante na indústria de alimentos. Uma das principais aplicações das tecnologias emergentes é a substituição dos tratamentos térmicos ou a aplicação de processos mais brandos,

permitindo a conservação dos alimentos (JERMANN et al., 2015).

Apesar dos claros benefícios dos tratamentos térmicos, especialmente sobre a segurança dos alimentos e o tempo de prateleira, seus efeitos negativos também são conhecidos. Os processos tradicionais ainda são limitados por proporcionarem baixa eficiência de transferência de calor e sobreaquecimento devido ao tempo necessário para conduzir calor suficiente até o centro térmico dos alimentos (PEREIRA; VICENTE, 2010). As mudanças na composição nutricional e nas características sensoriais são os principais fatores críticos desses processos.

Nesse contexto, além do contínuo esforço na obtenção da melhoria de processos tradicionais, tecnologias inovadoras têm sido estudadas. As chamadas tecnologias emergentes dividem-se em tecnologias térmicas (aquecimento ôhmico, micro-ondas, radiofrequência, infravermelho, entre outras) e não térmicas (campo elétrico pulsado, ultravioleta, irradiação, alta pressão hidrostática, ultrassom, por exemplo). Essas tecnologias vêm sendo desenvolvidas desde o começo do século XX ou antes, no entanto algumas delas ainda não são adotadas em larga escala (JERMANN et al., 2015).

Devido a evidências científicas e maior difusão do conhecimento, os consumidores atualmente desejam alimentos não apenas com vida de útil estendida, mas também com melhorias na segurança e na qualidade sensorial e nutricional (JABBAR et al., 2014). O desenvolvimento das tecnologias emergentes no processamento de alimentos vai ao encontro das necessidades do consumidor sobre alimentos seguros, saudáveis e minimamente processados (KNORR et al., 2011). Não obstante, as tecnologias emergentes frequentemente representam maior eficiência energética, representando processos mais limpos e ambientalmente amigáveis.

Além da abordagem da eficiência em segurança dos alimentos e preservação ambiental, há de se considerar também os fatores relacionados ao custo de operação, já que sistemas modernos que não tenham boa adequação financeira dificilmente seriam adotados, assim como sistemas em uso podem ser facilmente substituídos por outros mais modernos que apresentem melhor custo operacional. Há, evidentemente, espaço para a melhoria da eficiência energética e para a redução de custos das tecnologias tradicionais. Segundo Jermann et al. (2015), o custo das tecnologias emergentes ainda é alto, o que limita a sua difusão, fato evidenciado em uma pesquisa de opinião de alcance mundial sobre as tecnologias

emergentes.

As tecnologias emergentes no processamento de alimentos, sejam térmicas ou não térmicas, muito interessam à pesquisa científica e mesmo às indústrias, contudo enfrentam obstáculos, como a falta de estudos comprobatórios de efeitos de destruição sobre micro-organismos e enzimas e o custo relativamente alto de implantação, apesar do apelo que o uso desses diferenciais possa ter na agregação de valor ao produto. Ainda que alguns avanços tecnológicos venham sendo desenvolvidos desde o começo do século XX, suas aplicações em alimentos continuam em uma fase que necessita de um volume substancial de pesquisas para provar sua viabilidade pragmática (JERMANN et al., 2015). Alguns dos efeitos na conservação e na qualidade de muitos alimentos tiveram inúmeras revisões e constituem informações valiosas para aprovação de regulamentações e como apoio para decisões de investimentos de indústrias alimentícias (PEREIRA; VICENTE, 2010). Estudar as tecnologias emergentes e a otimização de seus parâmetros para o processamento de alimentos é, portanto, uma das principais tarefas da área de Tecnologia de Alimentos. Limitações correntes ligadas ao alto custo, controle incompleto de variáveis associadas à operação dos processos e a falta de aprovação regulatória têm atrasado uma ampla implementação dessas tecnologias em escala industrial (JERMANN et al., 2015).

Dentre as tecnologias emergentes, o ultrassom se destaca por ser uma tecnologia que pode ser utilizada de forma combinada com outros processos, como com o próprio tratamento térmico. A combinação de tecnologias térmicas (incluindo as convencionais) e não-térmicas pode resultar em otimização do tempo de processamento e na melhoria das qualidades nutricionais, físico-químicas e sensoriais (LI; FARID, 2016).

3.5.1 Ultrassom

O ultrassom é considerado uma tecnologia não térmica, apesar de dissipar calor e aumentar a energia do sistema onde está sendo aplicado. Essa tecnologia consiste em aplicar em um meio ondas sonoras com frequências acima do limite de audição humana, normalmente mais altas que 20 kHz (RASO; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003).

US pode ser gerado por transdutores elétricos, que convertem energia elétrica

ou mecânica em energia sonora. O US pode ter duas faixas de aplicação em processamento de alimentos. US de alta frequência (2 - 10 MHz) e baixa potência (até 10 W/cm^2) não causa alterações físicas e químicas nas propriedades da matéria, como composição, estrutura e estado físico (GARUD et al., 2017). É utilizado para análise e diagnóstico, em testes não destrutivos de processamento de alimentos, provendo informações sobre as propriedades físico-químicas dos alimentos e auxiliando na percepção de conformidades e na monitoria da qualidade de processos e produtos. Já o US de baixa frequência (20 - 100 KHz) e alta potência (10 a 1000 W/cm^2) promove modificações na estrutura e composição dos alimentos, auxiliando em processos de emulsão, homogeneização, modificação de textura, melhoria da transferência de massa em processos de extração e cristalização, desintegração celular, entre outros (GARUD et al., 2017; KNORR et al., 2011).

O tratamento ultrassônico tem sido reportado como atrativo para a área de ciência e tecnologia de alimentos (KNORR et al., 2011; CAO et al., 2010) em função dos promissores efeitos no processamento e conservação (CAO et al., 2010), já que ocasiona poucas mudanças nos constituintes dos alimentos e pode ser utilizado em combinação com outras tecnologias, tradicionais ou emergentes. O US pode ser aplicado em muitas etapas do processamento de alimentos, como por exemplo em operações de limpeza, corte, emulsificação, homogeneização, extração, modificação de viscosidade e de textura, cristalização e redução de micro-organismos e enzimas, sendo principalmente usada em fluidos e fluidos contendo partículas (JERMANN et al., 2015).

A escolha de tratamento com uma das faixas depende unicamente dos objetivos a serem alcançados. Em baixas intensidades e amplitudes, a pressão das ondas induz transmissão acústica, enquanto altas intensidades e amplitudes resultam no processo de cavitação (KNORR et al., 2011). A Figura 4 ilustra a cavitação durante sonicação de caldo de cana. O US se propaga no meio líquido e transfere energia, aumentando a temperatura do meio, o que permite quantificar a energia transmitida (GARUD et al., 2017).

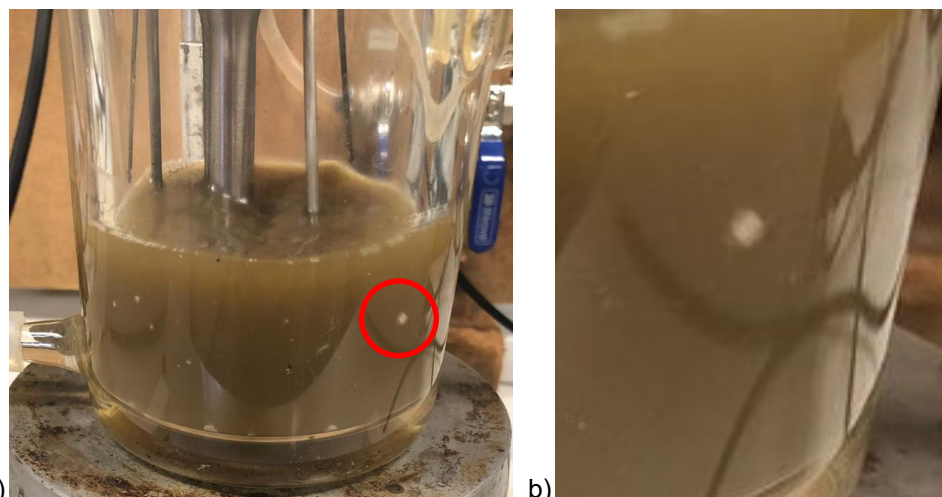


Figura 4 – Bolhas de cavitação em caldo de cana tratado a 80 °C e 75 % de amplitude: a) célula com caldo de cana em sonicação, b) bolha de cavitação em destaque.

O US pode ser propagado em um líquido como compressão alternada; havendo suficiente energia, ocorre a cavitação, que é a formação, aumento e rápido colapso de bolhas microscópicas (RASO; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003). Essas microbolhas de cavitação são geradas devido às diferenças de pressão, colapsando violentamente nos sucessivos ciclos da propagação de uma onda sônica (TIWARI et al., 2008). Como consequência, tem-se altas temperaturas localizadas, de mais de 5000 K, pressões de mais de 50000 kPa e grande efeito de cisalhamento; conseqüentemente, intensos níveis de energia e pressão locais geram algo como um efeito localizado de pasteurização sem causar um significativo aumento na temperatura do meio (TIWARI et al., 2009). A Figura 5 ilustra o desenho esquemático da cavitação.

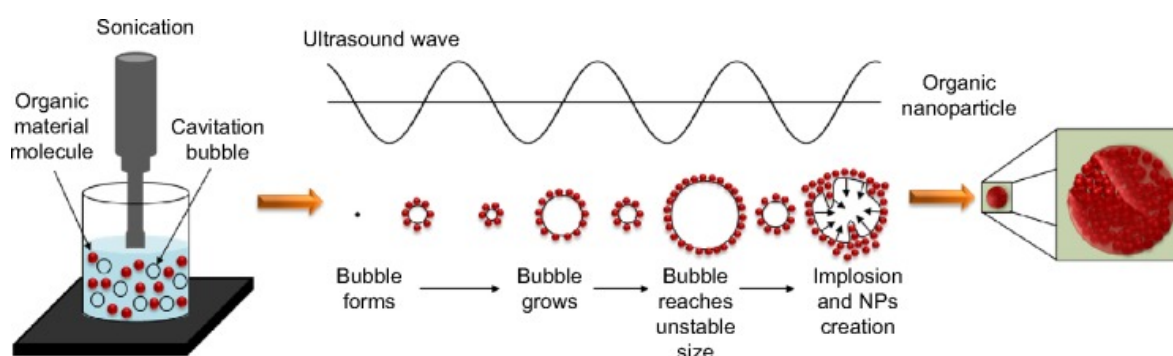


Figura 5 – Desenho esquemático da formação de bolhas de cavitação (Yariv et al., 2015).

A cavitação e os fenômenos associados são responsáveis pela maioria dos efeitos de US de alta energia no processamento de alimentos (KNORR et al., 2011).

A Figura 6 exibe a transmissão acústica em torno a uma bolha de cavitação. Em muitos casos, esses fenômenos, apesar de amplamente conhecidos, não foram estudados a fundo em escala industrial. Cavitação, microtransmissão, diferença de pressão acústica e aquecimento localizado são fenômenos que levaram a muitas melhorias em processos em escala laboratorial (KNORR et al., 2011).

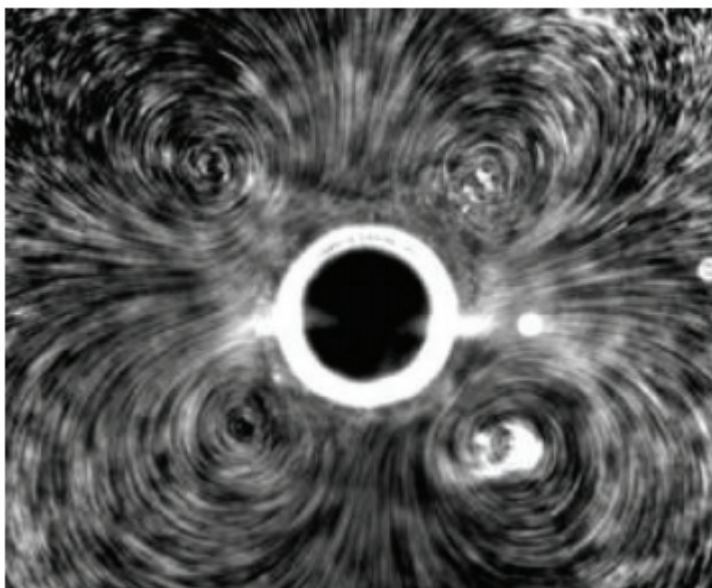


Figura 6 – Transmissão acústica em torno a uma bolha de cavitação (THO et al., 2007).

Apesar do interesse recente, a utilização de US em alimentos encontra suas primeiras referências no começo do século XX. Pesquisas sobre a potencialidade do US no processamento de alimentos remontam à década de 1920 (KNORR et al., 2011). A utilização em escala industrial necessitou algumas décadas para ter as primeiras experiências. O corte ultrassônico foi adotado na década de 1950, enquanto o fechamento de embalagens e a solda de plásticos foram adotados algumas décadas mais tarde, em 1990 (KNORR et al., 2011).

Em função do tempo em que US vem sendo estudado, da versatilidade de resultados e do interesse que desperta à indústria de alimentos, há muito campo de pesquisa explorado; contudo, ainda há espaço para mais conhecimento. O estado da arte atual da pesquisa de US na indústria alimentícia engloba temas como testes não destrutivos, medição de textura, estimulação de células viáveis, desidratação osmótica, leite fluidizado, extrusão, extração, homogeneização/emulsificação, inativação de micro-organismos e enzimas (KNORR et al., 2011). Numa pesquisa de opinião realizada por Jermann et al. (2015), foi constatado uma baixa expectativa quanto ao uso industrial de US, sendo o maior índice de uso indicado para a

indústria de bebidas (50 %). Os autores acreditam que os resultados devem-se ao fato de as aplicações mais comuns da tecnologia serem em emulsificação e diminuição de espuma em bebidas, bem como em limpeza de barris na produção de vinho.

O uso de US no processamento de alimentos se dá em três principais aspectos: estimulação de reações microbiológicas e enzimáticas, conservação de alimentos (assistência aos tratamentos térmicos) e melhoria dos processos de transferência de massa (principalmente secagem e extração) (KNORR et al., 2011). Destaca-se também os efeitos combinados de US e outras tecnologias, sejam convencionais ou emergentes. US combinado com calor, conhecido como termossonicação, é considerado uma alternativa para o processamento de alimentos, uma vez que reduz o tempo/temperatura de exposição do produto ao calor quando comparado com os tratamentos térmicos convencionais (GARUD et al., 2017). O processamento térmico pode ser melhorado com microtransmissão nas camadas limite do fluido, na redução de formação de películas pela cavitação, e maior formação de bolhas de gás durante a evaporação (KNORR et al., 2011).

Outro potencial interesse de aplicação da tecnologia ultrassônica é para a ativação ou inativação de enzimas. Efeitos positivos de ativação da atividade enzimática são encontrados com uso de US de baixa energia (KNORR et al., 2011), que atuam promovendo contato entre enzima e substrato (ROJAS et al., 2016). Para a inativação de enzimas, utiliza-se o US de alta energia. Verifica-se na literatura que a inativação de enzimas pode ser mais dificultosa do que a de micro-organismos, o que se explica, em síntese, por serem moléculas de maior resistência, por terem a capacidade de regeneração e pela ocorrência de isoenzimas. Estudos envolvendo ultrassom e atividade enzimática devem ser realizados caso a caso para que sejam elucidados efeitos de ativação e inativação, uma vez que complexos fenômenos estão envolvidos, como mudanças conformacionais variáveis nas enzimas, sobretudo mudanças estruturais das proteínas que podem modificar a atividade enzimática (ROJAS et al., 2017).

Múltiplos fatores influenciam a inativação enzimática durante o processamento ultrassônico, desde fatores externos, como condições ambientais, condições de operação, temperatura, tempo de processamento, densidade de potência ou intensidade e frequência, até fatores intrínsecos, como características da matriz do alimento, composição em relação às enzimas alvo e as características

delas (ROJAS et al., 2017). De fato, as propriedades dos diferentes alimentos (pH, atividade de água, pressão de vapor, força iônica, composição) e dos processos (tipo de equipamento, poder volumétrico, frequência, intensidade, amplitude, geometria e distribuição de ondas) influenciam a atividade enzimática (ROJAS et al., 2016). A pesquisa envolvendo inativação de enzimas encontra resultados superiores utilizando termossonicação, manossoinicação ou manotermossonicação, em detrimento à aplicação de US apenas (KNORR et al., 2011). US por si só é geralmente menos eficiente na inativação enzimática do que o tratamento térmico convencional, e por isso, a termossonicação é mais efetiva na inativação (ROJAS et al., 2017).

Saeeduddin et al. (2015) relatam uma tendência de diminuição da atividade enzimática para PFO, POD e pectinametilesterase em suco de pera com o aumento da temperatura de termossonicação. Para os autores, o aquecimento e as forças mecânicas do US têm um efeito sinérgico na inativação enzimática, possibilitando atingir os resultados esperados em menor temperatura. Abid et al. (2014) avaliaram a aplicação de termossonicação em temperaturas de 20 a 60 °C para redução da atividade de POD, PFO e pectinametilesterase e verificaram uma baixa redução de atividade em tratamentos de menor temperatura, o que corrobora os achados acima mencionados. Rojas et al. (2017), em um estudo sobre a influência de sonicação na atividade enzimática de POD de água de coco, concluíram que um tratamento com US por 30 min, 50 % de potência, sem assistência de tratamento térmico, promoveu apenas cerca de 27 % de inativação, sugerindo que tempos longos de tratamento e potências altas sejam empregadas.

Destaca-se que, após uma vasta pesquisa bibliográfica, nenhum estudo que avaliasse a aplicação de US para inativação de enzimas oxidativas em caldo de cana foi encontrado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse capítulo, são apresentados os materiais e equipamentos utilizados para a realização dessa pesquisa, bem como a metodologia empregada para realização dos experimentos e análise dos resultados. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), pertencente ao Departamento de Engenharia Química (DEQUI), bem como no Laboratório de Química e Processamento de Alimentos e no Laboratório de Equipamentos Especiais, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.1 Caldo de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar foi doada por uma propriedade rural situada no município de Veranópolis, RS, coordenadas geográficas 28°56'10"S e 51°32'58"O. A cana-de-açúcar, de variedade nativa, foi oriunda de canavial de 5 anos, em sistema de rebrota, colhida e moída em moenda mecânica. Após extração, o caldo foi homogeneizado, armazenado em sacos plásticos de polipropileno em volumes individuais de 150 mL e congelado em freezer doméstico a -18 °C. O transporte das amostras foi feito em recipiente com isolamento térmico e manutenção da temperatura. Para realização dos experimentos, o caldo foi descongelado em banho de água à temperatura ambiente, sendo então homogeneizado e conservado em banho de gelo até a posterior utilização.

Foram utilizados três distintos lotes de caldo, de modo que o produto fosse conservado congelado o menor tempo possível, a fim de manter suas características e não interferir nos experimentos. Vale ressaltar que as diferentes etapas da pesquisa foram conduzidas com um único lote, de modo a permitir sempre uniformidade entre a matéria-prima do controle e os tratamentos de cada etapa. O Lote I foi extraído em janeiro de 2019, o Lote II na primeira quinzena de agosto de 2019 e o Lote III na segunda quinzena de agosto de 2019.

4.2 Caracterização do caldo de cana

O caldo de cana *in natura* foi caracterizado através das principais análises que o tipificam, sempre em triplicatas. Foram realizadas as análises de sólidos

solúveis totais (°Brix) por refratômetro digital (MA871, Milwaukee Instruments, Rocky Mount, EUA), atividade de água em determinador digital (LabMaster-aw, Novasina, Lachen, Suíça), pH por potenciômetro digital (DM - 22, Digimed, São Paulo, Brasil) e condutividade elétrica por condutivímetro digital (DM - 32, Digimed, São Paulo, Brasil). Também foram realizadas as análises de cor, compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade de PFO e de POD, detalhadas na sequência.

4.2.1 Análise da cor

A cor das amostras foi determinada utilizando o método *CIELab*, com leitura dos espaços de cor L^* , a^* e b^* através de dois colorímetros: para o Lote I e para os experimentos de cinética da atividade enzimática em diferentes temperaturas (item 4.5), foi utilizado um colorímetro portátil (CR-400, Konica Minolta, Tóquio, Japão), e para todos os demais, foi utilizado um colorímetro de bancada (ColorQuest XE, Hunter Lab, Reston, EUA). O espaço de cor L^* refere-se à luminosidade da amostra, variando entre 0 e 100, equivalendo a preto e branco, respectivamente. Os espaços a^* e b^* variam entre -60 e 60, referindo-se, respectivamente, à variação verde/vermelho e azul/amarelo. Foi calculada a diferença total de cor (ΔE), conforme a equação 1 (CIE, 2004). Valores de ΔE iguais ou superiores a 2 indicam mudanças de cor perceptíveis à visão humana (MESNIER et al., 2014). A Figura 7 demonstra a esfera esquemática *CIELab* ilustrando os parâmetros estudados.

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Eq. 1})$$

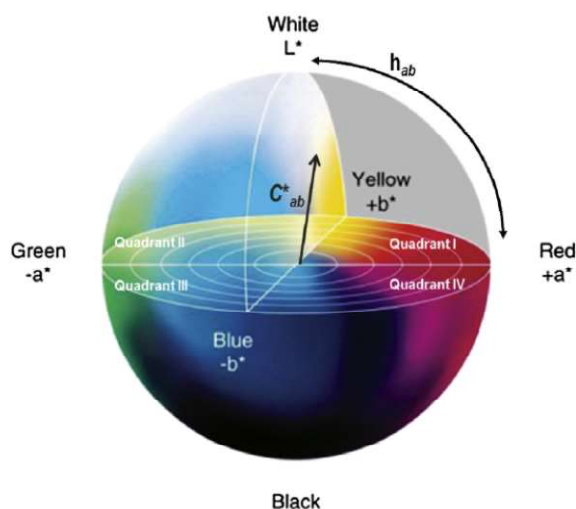


Figura 7 – Representação da esfera *CIELab* (SANT'ANNA et al., 2013).

4.2.2 Análise de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados por espectrofotometria *UV-Vis* (UV-1800, Shimadzu, Quioto, Japão), conforme metodologia preconizada por Waterhouse (2001). Para realização da técnica, 200 µL de amostra foram diluídos em 850 µL de água destilada, adicionados de 100 µL de reagente de Folin - Ciocalteu e 850 µL de solução aquosa a 7 % de carbonato de sódio. As amostras ficaram em repouso por uma hora e depois foram submetidas à leitura da absorbância a 765 nm, sendo os resultados obtidos por meio de equação da curva de calibração previamente realizada (equação 2).

$$y = 0,0098x + 0,0378 \quad (R^2 = 0,9976) \quad (\text{Eq. 2})$$

4.2.3 Análise de compostos flavonoides totais

Os compostos flavonoides totais foram determinados por espectrofotometria *UV-Vis* (UV-1800, Shimadzu, Quioto, Japão), conforme metodologia preconizada por Zhuang et al. (1992). Para tanto, 250 µL da amostra foram diluídos em 1.250 µL de água destilada e adicionados de 75 µL de solução aquosa a 5 % de nitrito de sódio. A mistura foi agitada e deixada em repouso por cinco minutos. Posteriormente, foi adicionado 150 µL de solução aquosa de 10 % de cloreto de alumínio, deixados em repouso de 6 minutos. Em seguida, 500 µL de solução de hidróxido de sódio 1 M e 775 µL de água destilada foram adicionados à mistura, que foi submetida à leitura de absorbância a 510 nm, sendo os resultados obtidos por meio de equação da curva de calibração previamente realizada (equação 3).

$$y = 0,0017x + 0,0198 \quad (R^2 = 0,9976) \quad (\text{Eq. 3})$$

4.2.4 Atividade enzimática de PFO

A análise de atividade de PFO foi realizada de acordo com protocolo descrito por Walker (2001), modificado por Brochier et al. (2016). Cada amostra compôs uma solução 1:5 (m:v) com tampão fosfato - citrato pH 5,4 (tampão McIlvaine) (WALKER, 2001). Para tanto, foram tomados 3 g de caldo de cana em um tubo tipo *falcon* de 15 mL, medidos através de balança semianalítica (BK 2000, Gehaka, São Paulo, Brasil). Aos tubos foram adicionados 12 mL da solução tampão, medidos por

micropipeta, agitando-se o montante em agitador tipo *vortex* (AP-56, Phoenix, Araraquara, Brasil), formando o chamado extrato enzimático. Por fim, o extrato foi centrifugado por 10 min a 6.000 rpm e 4 °C (5000R, CIENTEC, Belo Horizonte, Brasil).

Uma alíquota de 0,25 mL do extrato foi acondicionada em cubeta de acrílico de 1,5 mL, adicionada de 1,10 mL do mesmo tampão e de 0,20 mL de solução de catecol 0,6 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), homogeneizada rapidamente e lida em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Quioto, Japão) na absorvância de 420 nm a 25 °C. A mudança de coloração foi monitorada por 3 min, sendo realizada uma leitura por segundo. A atividade enzimática de PFO, denominada *A*, foi determinada a partir da variação na absorvância por minuto ($\Delta abs/min$) e dividida por 0,001; para tanto, foi utilizada somente a porção linear da curva, usando regressão linear. Uma unidade de atividade de PFO é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de aduto (catecol oxidado) por minuto nas condições descritas (CHISARI et al., 2007). As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto experimental, e o branco foi obtido pela substituição da amostra por água destilada.

4.2.5 Atividade enzimática de POD

A análise de atividade de POD foi realizada de acordo com protocolo descrito por Chisari et al. (2007), modificado por Brochier et al. (2016). O extrato enzimático foi preparado conforme procedimento descrito no Item 4.2.4. Uma alíquota de 0,50 mL do extrato foi acondicionada em cubetas de acrílico de 1,50 mL, adicionada de 0,75 mL do mesmo tampão, de 0,10 mL de solução de peróxido de hidrogênio 1 % (Labsynth, Diadema, Brasil) e de 0,25 mL de solução de guaiacol 0,5 % v/v (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil), homogeneizada rapidamente e lida em espectrofotômetro na absorvância de 460 nm a 25 °C. A mudança de coloração foi monitorada por 3 min, sendo realizada uma leitura por segundo. A atividade enzimática de POD foi calculada da mesma forma que a descrita no Item 4.2.4. Uma unidade de atividade de POD é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μ mol de guaiacol por minuto nas condições descritas (CHISARI et al., 2007). As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto experimental, e o branco foi obtido pela substituição da amostra por água destilada.

4.3 Tratamento Controle

O tratamento controle constou de experimentos que visavam a reproduzir um tratamento térmico convencional, através do uso de célula de vidro encamisada acoplada a um sistema de válvulas que permitia a entrada de água de dois banhos termostáticos quentes, uma para rápido aquecimento, outro para manutenção da temperatura. Os tratamentos controle, portanto, serão chamados de convencionais nesse trabalho. O sistema de aquecimento pode ser visualizado na Figura 8.

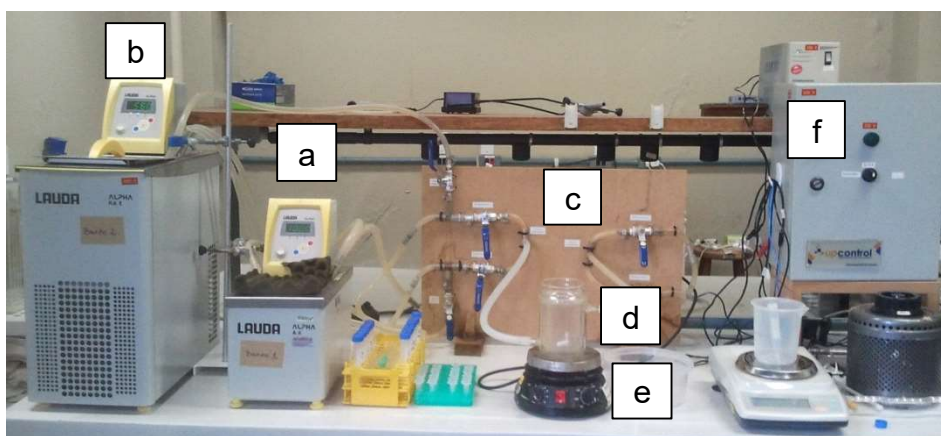


Figura 8 – Sistema utilizado para o aquecimento convencional: a) banho de aquecimento, b) banho de manutenção, c) painel de válvulas de aquecimento, d) célula encamisada, e) agitador magnético, f) sistema de aquisição de dados.

O experimento controle foi realizado com o mesmo perfil de temperaturas utilizado nos experimentos com US para possibilitar a avaliação dos efeitos não térmicos da tecnologia do US sobre a inativação das enzimas, assim como sobre parâmetros físico-químicos da matéria-prima estudada.

Para cada tratamento, utilizou-se 110 mL de caldo de cana. Dessa forma, iniciou-se o tratamento com o uso do banho de aquecimento regulado a 100 °C (Alpha A 6, Lauda, Lauda-Königshofen, Alemanha) até atingir a temperatura de tratamento (de 1,6 min a 3,6 min) quando suspendeu-se a passagem de água pela camisa do banho anterior e iniciou-se a passagem de água do banho de manutenção (Alpha RA 8, Lauda, Lauda-Königshofen, Alemanha), com temperaturas específicas para cada tratamento (50 a 80 °C).

Durante o experimento, as amostras foram constantemente agitadas utilizando um agitador magnético (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil). A execução dos experimentos foi monitorada através de um *data logger* (FieldLogger, Novus, Canoas, Brasil) com sensores de temperatura tipo pt-100 (Novus, Canoas, Brasil).

As amostras foram mantidas a temperatura constante de estudo e coletadas em intervalos de tempo específicos em cada etapa da pesquisa (de 0 a 25 min), sendo, em seguida, imediatamente resfriadas em banho de gelo.

4.4 Tratamento ultrassônico

O tratamento ultrassônico foi realizado utilizando os mesmos equipamentos que o tratamento controle, acoplado à célula um ultrassom tipo sonda de 1,2 cm de diâmetro e frequência de 20 kHz (Sonics modelo VC 750, Newtown, EUA), de modo a constituir um sistema de ultrassom de alta potência assistido termicamente (termossonicação). A Figura 9 mostra o sistema de termossonicação utilizado.

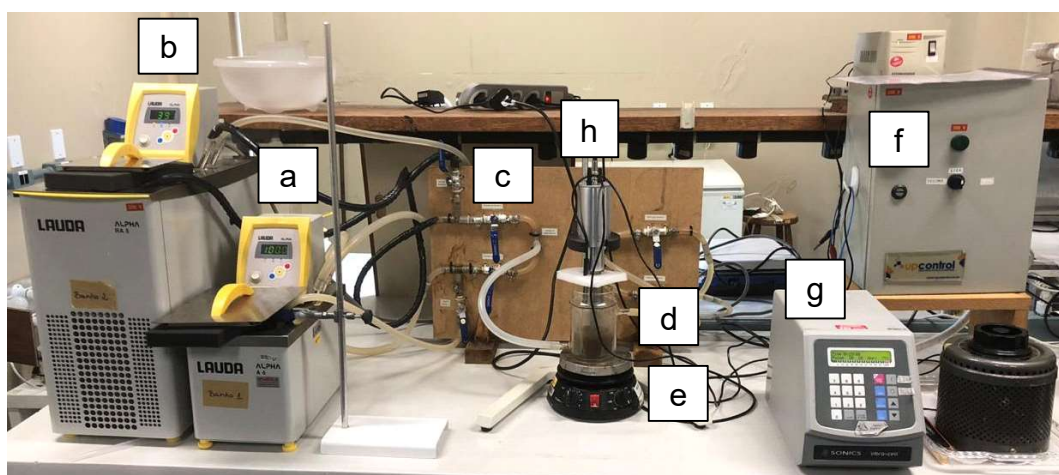


Figura 9 – Equipamento de termossonicação: a) banho de aquecimento, b) banho de manutenção, c) painel de válvulas de aquecimento, d) célula encamisada, e) agitador magnético, f) sistema de aquisição de dados, g) equipamento de US, h) sonda de US acoplada aos sensores de temperatura.

A intensidade de sonicação variou conforme o objetivo de cada experimento, de 75 a 100 % de amplitude, portanto sempre em tratamentos de baixa frequência e alta potência. As temperaturas de processamento foram as mesmas utilizadas nos tratamentos controle, o que permitiu, como já descrito, mensurar os efeitos não térmicos da tecnologia do US sobre a inativação das enzimas e sobre outros parâmetros físico-químicos estudados. Para tanto, o banho de manutenção teve temperaturas inferiores às dos experimentos controle (de 35,5 a 68,5 °C), neutralizando o aumento de temperatura causado pela sonicação. O ultrassom, em todos os casos, foi aplicado somente na fase isotérmica (após a rampa de aquecimento, a qual durou de 2,9 a 5 min).

4.5 Cinética de inativação em diferentes temperaturas – Etapa I

Os experimentos de cinética de inativação da POD em diferentes temperaturas foram realizados utilizando o caldo de cana do Lote I e serão referidos doravante como etapa I desse trabalho. A Figura 10 apresenta o fluxograma para realização dessa etapa. Os procedimentos consistiram em processar o caldo de cana em diferentes temperaturas: 50, 60, 70 e 80 °C \pm 2 °C. Para cada temperatura, foram feitos os tratamentos controle (Item 4.3) e com sonicação (Item 4.4), em triplicata. Antes do início do aquecimento, foi coletada a amostra *in natura*. O caldo foi aquecido com o banho de aquecimento até a temperatura desejada, quando foi substituído pelo banho de manutenção, ocasião em que se fez a coleta do tempo 0 min. Na fase isotérmica, foram coletadas amostras nos tempos 2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 min. Nos experimentos com sonicação, o ultrassom foi aplicado a partir do tempo zero, num regime de 75 % de potência e pulsos a cada 10 s, durando 20 s. As amostras coletadas foram armazenadas imediatamente em banho de gelo e assim mantidas até serem analisadas, determinando-se a atividade de POD segundo descrito no Item 4.2.5, e a cor, conforme descrito no Item 4.2.1.

Para PFO, devido à sua menor resistência térmica, foram realizados experimentos somente na temperatura de 50 °C, conforme descrito no Item 4.2.4. Para esses ensaios, foi utilizado o caldo de cana do Lote II. O caldo foi processado utilizando potência de 75 % e regime de pulsos a cada 10 s, durando 20 s. Na fase isotérmica, foram coletadas amostras nos tempos 0, 1, 3, 5, 7,5, 10 e 15 min. As amostras coletadas foram armazenadas imediatamente em banho de gelo e assim mantidas até serem analisadas.

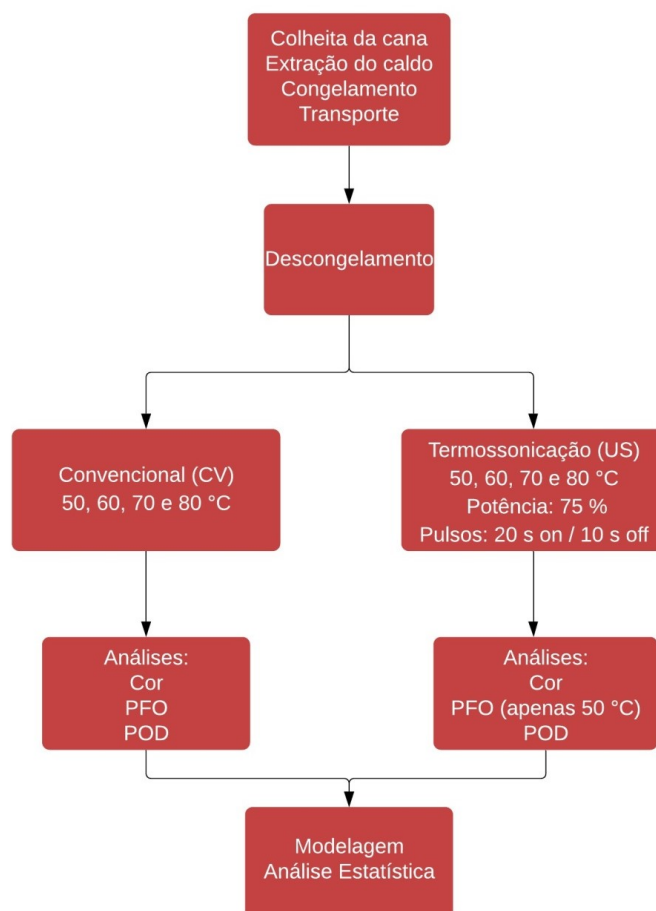


Figura 10 – Fluxograma da Etapa I: experimentos de cinética de inativação em diferentes temperaturas.

4.6 Avaliação da influência dos parâmetros de processamento – Etapa II

Os experimentos para avaliar a influência dos parâmetros de processamento foram realizados na temperatura de 75 °C somente para a enzima POD (Item 4.2.5). Foram avaliadas as variáveis potência, duração de pulsos e tempo de sonicação, conforme o descrito no item 4.4. Seis diferentes condições de US foram estabelecidas de acordo com a Tabela 2. Para esses experimentos, foi utilizado o caldo de cana do Lote II. O fluxograma com a descrição da etapa II é apresentado na Figura 11.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados nos tratamentos de otimização para POD, em temperatura de 75 °C.

Tratamento	Potência (%)	Pulsos (on/off)	Tempo de sonicação (min)
A	75	20 s/10 s	25
B	75	40 s/10 s	25
C	75	Contínuo	25
D	50	20 s/10 s	25
E	100	20 s/10 s	25
F	75	20 s/10 s	5

Paralelamente aos experimentos de US, foi conduzido um experimento controle, em triplicata, a 75 °C, para comparação, conforme descrito no Item 4.4. Antes do início do aquecimento, foi coletada a amostra *in natura*. Na fase isotérmica, foram coletadas amostras nos tempos 0, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 min. As amostras coletadas foram armazenadas imediatamente em banho de gelo e assim mantidas até serem analisadas.

A temperatura de 75 °C foi escolhida em função dos resultados da etapa prévia terem sido mais claros e efetivos em 70 e 80 °C. O regime de pulsos variou a sonicação para além daquela já estabelecida, de modo a verificar se um menor uso de sonicação, com as consequentes vantagens energéticas e de preservação do caldo de cana, seria suficiente para o efeito desejado de inativação enzimática. Da mesma forma que para o regime de pulsos, foram estabelecidas condições de amplitude de sonicação que visassem a uma possível melhoria nos quesitos eficiência energética e preservação do alimento, porém nesse caso, foi estabelecida uma condição menor e outra maior a já estabelecida.

Convém ressaltar que o experimento F baseia-se na hipótese de que danos à estrutura enzimática possam ser os responsáveis pelos efeitos de inativação, de modo que não seja necessária a sonicação durante todo o tratamento. Nesse sentido, Rojas et al. (2017) sugeriram algo semelhante: utilização de US como pré-tratamento, permitindo um tratamento térmico posterior menos severo. Para esse estudo, optou-se por realizar o tratamento com US no início da fase isotérmica para averiguar a possibilidade levantada pelos autores acima citados.

A fim de proporcionar maior clareza sobre a dinâmica de todo o presente estudo, esses procedimentos serão chamados de Etapa II, convenientemente ilustrados pela Figura 11.

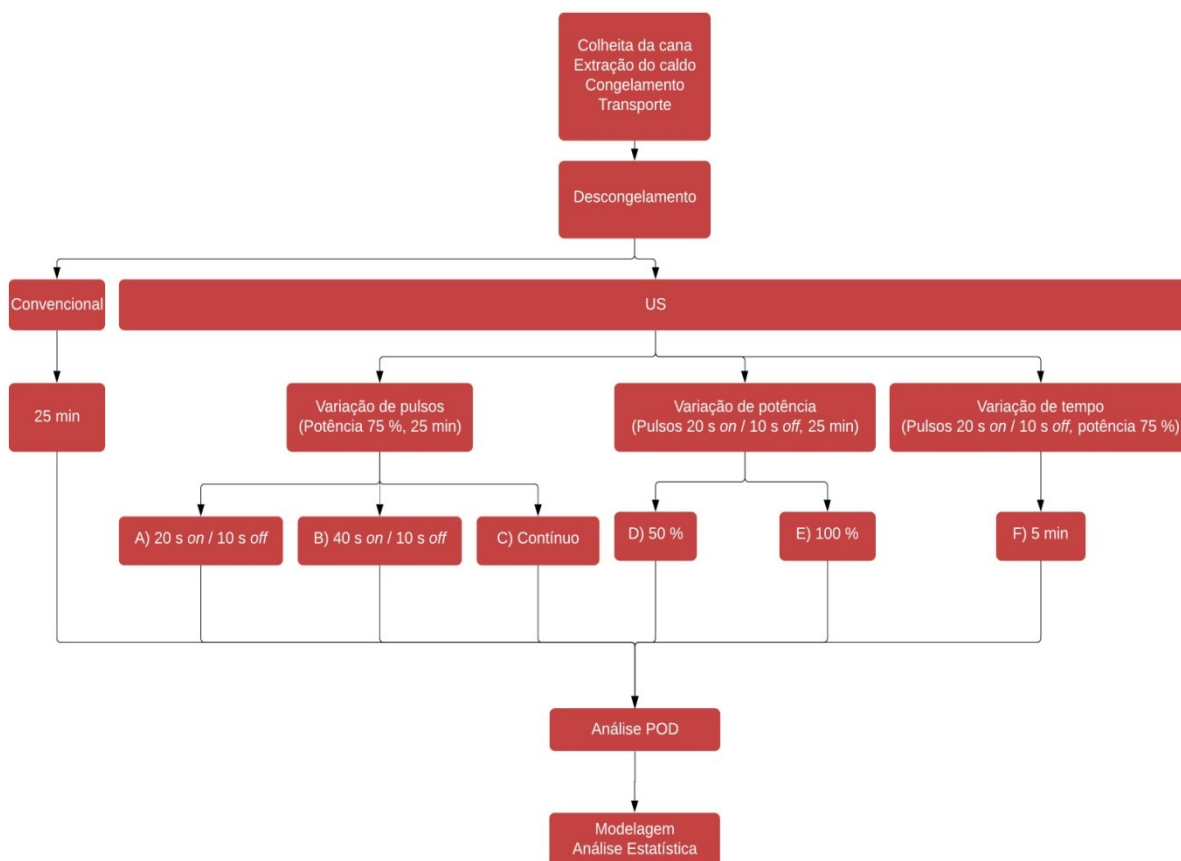


Figura 11 – Fluxograma da Etapa II: experimentos de avaliação da influência dos parâmetros de processamento.

4.7 Avaliação da regeneração enzimática durante armazenamento refrigerado – Etapa III

Os experimentos realizados para avaliar a regeneração da atividade enzimática de POD durante armazenamento refrigerado consistiram em processar o caldo a 80 °C (± 2 °C) por um tempo necessário para atingir a redução da atividade enzimática inicial em 90 %. Foram feitos os tratamentos controle e com sonicação (75 % de potência e pulsos a cada 10 segundos, durando 20 segundos), em triplicata, conforme o descrito nos Itens 4.3 e 4.4, respectivamente. O tempo de processamento foi obtido a partir do modelo cinético de Weibull, ajustado aos dados experimentais nas etapas anteriores, equivalendo a 36 min para o tratamento controle e 23 min para o tratamento termossonicado. Os experimentos dessa etapa foram realizados utilizando amostras do Lote III e estão apresentados na Figura 12.

Antes do início do aquecimento, foi coletada a amostra *in natura*. O caldo foi aquecido com o banho de aquecimento até a temperatura desejada, quando foi substituído pelo banho de manutenção, ocasião em que se fez a coleta do tempo

0 min. O caldo permaneceu em temperatura constante durante o tempo estabelecido pela modelagem matemática. Foram coletadas 9 amostras em tubos tipo *falcon* de 15 mL, cheios até o limite, tampados e vedados com filme plástico (Parafilm M, Bemis, Oshkosh, EUA). As amostras coletadas foram armazenadas imediatamente em banho de gelo para rápido resfriamento.

A condição de refrigeração consistiu em armazenamento na parte inferior de um refrigerador doméstico, em temperatura de 4 ± 2 °C. As amostras coletadas foram analisadas em diferentes tempos de conservação: 0, 1, 2, 4, 8, 14, 18, 22 e 32 dias. Para cada amostra refrigerada foi analisada a atividade enzimática residual de POD, concentração de compostos fenólicos totais e cor, de acordo com os protocolos descritos nos itens 4.2.5, 4.2.2. e 4.2.1

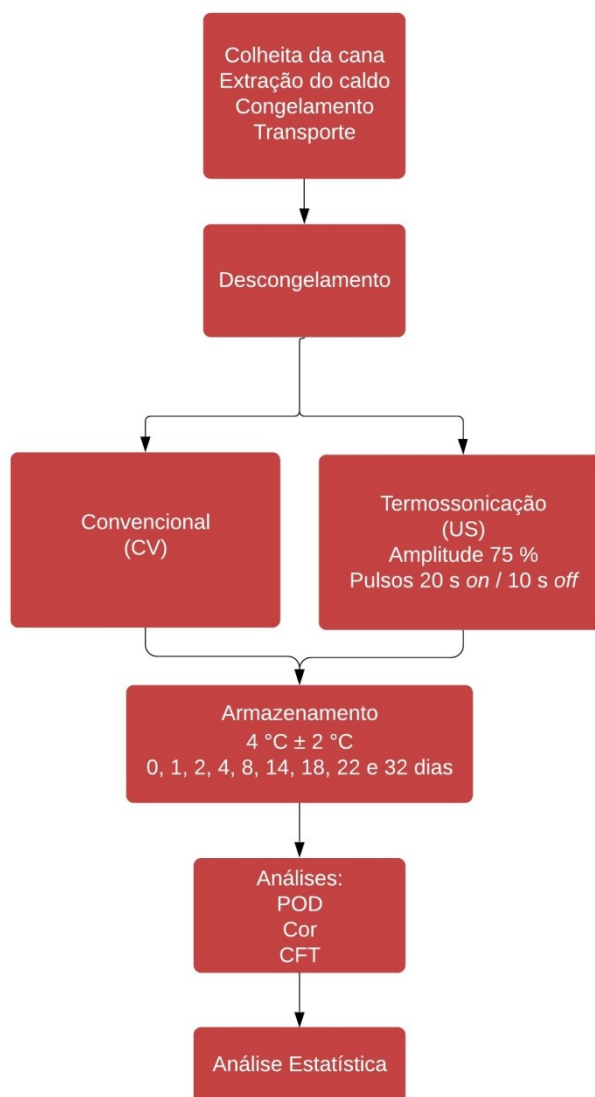


Figura 12 – Fluxograma da Etapa III: experimentos de avaliação da regeneração enzimática durante armazenamento refrigerado.

4.8 Modelagem matemática e análise estatística

A atividade enzimática residual (A/A_0 - para determinado tempo t e 0, respectivamente) em função do tempo de processamento foi ajustada a dois modelos: modelo de primeira ordem e o modelo de Weibull. Os dois modelos foram escolhidos em função de evidências bibliográficas que mostram ajustes mais adequados dessas equações para a cinética de inativação das enzimas estudadas (BROCHIER et al, 2016; ROJAS et al., 2017).

A modelagem matemática foi feita através de regressão não linear pelo algoritmo de Levenberg-Marquardt utilizando o software Statistica (versão 12.0, StatSoft Inc. Tulsa, EUA). O ajuste dos modelos foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2), pelo chi-quadrado (χ^2) e pela raiz do erro médio quadrático ($RMSE$). Os dois últimos parâmetros estão representados, respectivamente, nas equações 4 e 5.

$$\chi^2 = \frac{\sum(\alpha_{exp} - \alpha_{pred})^2}{(n-p)} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$RMSE = \frac{1}{n} \left[\sum_n (\alpha_{exp} - \alpha_{pred})^2 \right]^{0,5} \quad (\text{Eq. 5})$$

Nas equações acima representadas, α_{exp} corresponde aos valores experimentais, α_{pred} aos valores preditos, n ao número de observações e p ao número de parâmetros.

Os parâmetros cinéticos e demais propriedades avaliadas foram analisados e comparados utilizando-se teste *t de Student*, ANOVA e teste de Tukey com intervalo de confiança de 90 % (Statistica versão 12.0, StatSoft Inc. Tulsa, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo, são apresentados os resultados das diversas etapas desse trabalho de pesquisa. Além disso, os mesmos são relacionados aos dados disponíveis na literatura atual, em livros de referência e em periódicos da área de Ciência e Tecnologia de Alimentos e áreas conexas.

5.1 Caracterização físico-química do caldo de cana-de-açúcar

Os três diferentes lotes de caldo de cana *in natura* utilizados para a execução desse trabalho foram caracterizados físico-quimicamente, e os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição físico-química dos diferentes lotes de caldo de cana *in natura* utilizados no presente trabalho.

Parâmetro	Lote I	Lote II	Lote III
Período de colheita	janeiro de 2019	agosto de 2019	agosto de 2019
Sólidos solúveis (°Brix)	19,6 ± 0,7 ^a	17,3 ± 0,1 ^b	17,6 ± 0,2 ^b
pH	5,38 ± 0,05 ^b	5,63 ± 0,02 ^a	5,68 ± 0,05 ^a
Cond. elétrica (μS·cm ⁻¹ , 20 °C)	1.955 ± 57 ^c	2.249 ± 54 ^b	3.647 ± 14 ^a
Atividade de água	0,947 ± 0,002 ^b	0,962 ± 0,001 ^a	-
<i>L</i> [*]	49 ± 5	74,65 ± 0,08 ^a	27,0 ± 0,1 ^b
<i>a</i> [*]	-0,42 ± 0,05	-0,6 ± 0,1 ^b	0,48 ± 0,02 ^a
<i>b</i> [*]	18 ± 2	23,2 ± 0,1 ^a	0,59 ± 0,01 ^b
Fenólicos totais (mg EAG·L ⁻¹)	476 ± 26 ^a	480 ± 23 ^a	490 ± 39 ^a
Flavonoides totais (mg EC·L ⁻¹)	480 ± 59 ^a	509 ± 18 ^a	424 ± 20 ^a
Atividade de POD (UAE·min ⁻¹ ·g ⁻¹)	3.044 ± 331 ^b	3.196 ± 294 ^b	4.813 ± 527 ^a
Atividade de PFO (UAE·min ⁻¹ ·g ⁻¹)	1.148 ± 114 ^b	2.170 ± 239 ^a	-

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

Como pode ser observado na Tabela 4, o teor de sólidos solúveis foi maior para a amostra do Lote I, que foi colhida no verão de 2019. A presença de maior teor de açúcares pode ser compreendida em função de que em uma região de clima temperado, a planta produz mais açúcares durante a estação de verão, proporcionando maior acúmulo na planta quando a colheita é realizada nessa estação. Por outro lado, e de modo convergente, os dois lotes colhidos no inverno apresentaram menor teor de sólidos solúveis e não apresentaram diferença estatística significativa entre si. Brochier et al. (2016; 2018) encontraram valores de

16,4 e 20 °Brix para cana de açúcar proveniente da mesma localidade e colhidas em diferentes estações do ano, resultado similar ao reportado nesse trabalho. Silva; Faria (2006) obtiveram 19 °Brix para a variedade de cana 'RB72-454' colhida em região quente, o que está de acordo com o clima durante a colheita do Lote I. Saxena et al. (2016) obtiveram valores de $19,6 \pm 0,1$ °Brix para a variedade de cana 'Pharma'. Rezzadori et al. (2013), em estudo com cana da variedade 'SP 3250', obtiveram valores de $22,1 \pm 0,5$ °Brix.

O pH do caldo de cana das plantas colhidas no inverno não apresentou diferença estatística significativa entre si, contudo foi maior do que o pH do caldo colhido no verão. Em geral, a maior insolação do verão proporciona maior combustão e salificação de ácidos orgânicos, contribuindo para o aumento do pH, o que não se confirmou nesse estudo. Também é importante lembrar que a maior absorção de sais minerais por algumas variedades pode ocasionar importantes mudanças no pH, elevando-o, a despeito apenas do fator acidez. Brochier et al. (2016) obtiveram resultado compatível com o pH do Lote I ($5,36 \pm 0,05$), tendo utilizado cana da mesma origem, colhida no inverno. As mesmas autoras, em um estudo com cana de verão, encontraram pH de $5,41 \pm 0,04$ (BROCHIER et al., 2018). Silva; Faria (2006) obtiveram pH de 5,3 para a variedade de cana 'RB72-454' colhida em região quente, o que está de acordo com o clima durante a colheita do Lote I. Saxena et al. (2016) obtiveram pH $5,42 \pm 0,07$ para a variedade 'Pharma'. Rezzadori et al. (2013), em estudo com cana da variedade 'SP 3250', obtiveram valor de pH de $5,32 \pm 0,03$.

A condutividade elétrica apresentou os valores mais variáveis dentre as amostras, havendo diferença estatística entre todas elas. A condutividade mais alta foi a do Lote III, seguida pela do Lote II, ambos de inverno. A mais baixa condutividade foi a do lote I, colhido no verão. Diferentes variedades e situações de cultivo podem fazer com que uma quantidade variável de sais minerais e ácidos orgânicos estejam presentes no caldo, aumentando o potencial de condutividade elétrica. Nesse sentido, o pH mais alto das colheitas de inverno coincide com o aumento desse parâmetro. Brochier et al. (2016) obtiveram valores de 2022 ± 35 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ em cana colhida no inverno, e posteriormente, de 1693 ± 20 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ em cana colhida no verão (BROCHIER et al., 2018).

A atividade de água, embora não tenha sido determinada no Lote III, apresentou diferença estatística significativa entre os Lotes I e II, tendo sido maior

no segundo. Uma possível causa dessa diferença talvez seja o teor de sólidos solúveis totais mais baixo da colheita de inverno, influenciando na pressão osmótica e, por consequência, na atividade de água. Apesar de que os teores de minerais também exerçam influência na a_w , é provável que essa influência não tenha sido suficientemente forte ao ponto de compensar a influência dos teores de sólidos solúveis totais. Novamente, o resultado do Lote I assemelha-se ao obtido por Brochier et al. (2016), $0,951 \pm 0,001$.

Os espaços de cor *CIELab* do Lote I não foram comparados aos dos demais em função de terem sido realizados em outro equipamento, conforme metodologia. Esse lote caracterizou-se por estar em uma zona de luminosidade considerada cinza, possivelmente devido à presença de borras, tornando o líquido opaco. O espaço de cor a^* denotou, por estar levemente negativo, um tom difuso tendendo ao verde, estando no limite da zona entre verde e vermelho. A ocorrência da cor vermelha pode ser explicada, mais uma vez, à presença de borras, que tornam o aspecto visual amarronzado, trazendo tom avermelhado ao líquido. Por sua vez, o espaço de cor b^* indica um líquido com leve coloração amarelada, característico do caldo de cana.

No Lote II, observa-se o caldo com maior luminosidade, tendo, portanto, cor menos acinzentada. O espaço de cor a^* denota um caldo com leve aspecto esverdeado, o que, conjugado com o tom amarelado de baixa intensidade revelado pelo espaço de cor b^* , permite concluir pelo aspecto esperado ao caldo de cana.

No Lote III, todos os parâmetros apresentam diferenças estatísticas significativas em relação ao Lote II, conseqüentemente, esperam-se caldos bastante distintos do ponto de vista visual. É o caldo com a menor luminosidade, característica que reforça um aspecto acinzentado. Diferentemente dos dois outros lotes, esse apresenta coloração levemente vermelha, como revela o espaço de cor a^* com valor positivo, provavelmente devido à presença de borras. Já o espaço de cor b^* apresentou os mais baixos valores, e embora também positivos, posicionam o caldo como pouco amarelo. É de se destacar o fato de que colheitas de épocas muito próximas tenham tido comportamentos diversos em relação ao aspecto visual, possibilitando supor que ínfimas diferenças de colheita, processamento e conservação possam trazer diferenças importantes nesse aspecto.

Brochier et al. (2018), analisando caldo de cana de mesma origem e estação climática, obtiveram como valores de espaço de cor L^* $31,3 \pm 0,2$, a^* $1,08 \pm 0,07$ e b^*

1.71 ± 0.07, valores que, segundo as autoras, caracterizam o caldo como pardo. Esses valores aproximam-se dos obtidos no Lote III.

Os compostos fenólicos totais não apresentaram diferenças estatísticas significativas dentre os diferentes lotes. Grande parte dos compostos fenólicos são fitoalexinas responsáveis pela defesa e proteção das plantas, de modo que situações de estresse e desequilíbrios fisiológicos podem contribuir para o aumento dessas substâncias (JEANDET et al., 2014). Contudo, não foi observada diferença de comportamento entre canas colhidas em períodos frios ou quentes, podendo representar a adaptação da planta ao clima temperado, bem como a baixa influência dele no mecanismo de defesa da planta. Outra hipótese é a de que a planta reage de modo semelhante às diferentes intempéries de verão e de inverno, de modo a não haver muita diferença entre os teores de compostos fenólicos totais. Todos os resultados encontrados se assemelham aos reportados por Brochier et al. (2016), 460 ± 33 mg EAG·L⁻¹, mas são substancialmente menores do que os valores encontrados pelas autoras num estudo posterior, 766 ± 52 mg EAG·L⁻¹ (BROCHIER et al., 2018).

Os compostos flavonoides totais, assim como compostos fenólicos totais, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os lotes, corroborando os resultados de compostos fenólicos totais. Contudo, chama atenção que os valores sejam elevados, presumindo que sejam a maioria dos compostos fenólicos presentes no caldo de cana. Os valores encontrados são, em média, cerca do dobro do obtido por Brochier et al. (2016), 222 ± 16 mg EC·L⁻¹.

A atividade enzimática de POD não apresentou diferença estatística significativa entre o Lote I, de verão, e o Lote II, de inverno; contudo ambos diferiram em relação ao Lote III, também de inverno, este último tendo maior atividade. Embora a situação climática tenha sido muito próxima, podem contribuir na compreensão desse fenômeno os estudos de Marques et al. (2013), que, ao analisarem a influência do regime pluviométrico no aumento da atividade enzimática de POD e PFO, observaram valores mais altos de atividade enzimática para períodos estios, fato que contribui para um estresse metabólico das plantas. O Boletim Climático do Instituto Nacional de Meteorologia (INMet) relata agosto como um mês com chuvas abaixo do padrão (MARQUES et al., 2019). Esse fato pode ser uma das causas para a ampla diferença entre a atividade enzimática dos dois lotes de inverno, contudo apresenta limitada explicação quando comparado ao dado de

verão, estação com menor precipitação e maiores temperatura e estresse hídrico. O valor do Lote III assemelha-se ao obtido por Brochier et al. (2016), $4631 \pm 469 \text{ UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. As autoras, em estudo posterior, observaram $18434 \pm 1337 \text{ UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, valor muito superior ao encontrados nos três lotes de caldo de cana do presente estudo, que deve-se, segundo as autoras, pelo fato de que o primeiro estudo foi realizado com cana-de-açúcar colhida no inverno, sendo a maior atividade de POD verificada no caldo de cana de verão.

A atividade enzimática de PFO foi comparada entre o lote de verão, Lote I, e um dos lotes de inverno, o Lote II, havendo diferença estatística significativa. Embora diversos fatores podem refletir na diferença de atividade entre lotes, dada a diferença da época de colheita, a hipótese de maior atividade enzimática em menor regime pluviométrico, segundo Marques et al. (2013), pode explicar parte dessa diferença. Brochier et al. (2016) obtiveram valor próximo ao observado no Lote II, $1920 \pm 124 \text{ UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Os resultados analíticos evidenciam uma matéria-prima de alta perecibilidade, pois é rica em açúcares e possui pH e atividade de água elevados, condições convenientes ao desenvolvimento de um amplo espectro de fungos e bactérias, consideração a qual também chegaram Brochier et al. (2016). Quaisquer dos lotes analisados apresentam resultados comparáveis aos intervalos citados na literatura, os quais são bastante vastos, De todo modo, evidencia-se o bom estado de maturação e sanidade das plantas e processamento e conservação adequados dos caldos de cana utilizados nesse estudo.

A comparação das diferentes amostras permite inferir que condições de clima, solos, tratos culturais e variedades de cana-de-açúcar podem trazer algumas diferenças significativas à composição do caldo, impondo uma necessidade de padronização da produção industrial, ou, com maior viabilidade industrial, enfatizar que pode ocorrer variabilidade no produto mais ou menos significativa a depender da época de colheita da cana, devido a motivos sazonais.

5.2 Cinética de inativação enzimática em diferentes temperaturas – Etapa I

Experimentos de cinética em temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C foram realizados sem (controle) e com a aplicação de ultrassom. A Figura 13 apresenta o perfil de temperatura das amostras de caldo de cana durante o tempo de tratamento.

É possível verificar que o perfil de temperaturas dos experimentos controle e termossônicos, tanto na fase de aquecimento quanto na fase isotérmica, são muito semelhantes, o que permite avaliar adequadamente os efeitos não térmicos da ultrassonicação.

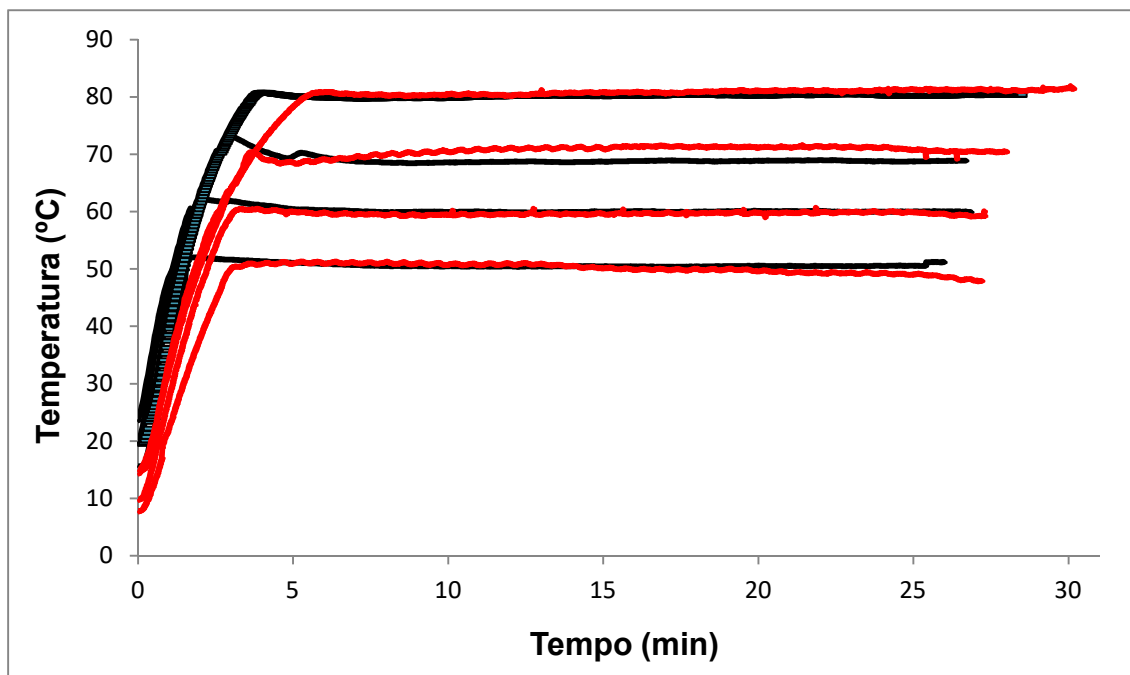


Figura 13 – Perfil de temperatura das amostras de caldo de cana durante o tempo de aquecimento convencional (linhas pretas) e a termossonicação (linhas vermelhas).

5.2.1 Atividade enzimática da PFO

A Figura 14 apresenta a atividade residual da PFO em caldo de cana ao longo do tempo para os tratamentos convencionais. Observa-se nessa figura dois grupos de comportamentos: um composto pelas temperaturas de 50 e 60 °C, com comportamento mais próximo ao exponencial, correspondendo ao esperado; e outro grupo composto pelas temperaturas de 70 e 80 °C, com comportamento irregular. Chama atenção o fato de que as temperaturas mais altas, das quais espera-se maior inativação e regularidade dos resultados, tenham comportamento tão diverso, pouco exponencial e resultados com enorme desvio padrão. Esse comportamento deve-se ao fato de que ocorreu, nas temperaturas mais elevadas, uma inativação elevada das enzimas ainda na fase de aquecimento. No tempo zero, início da fase isotérmica, a fração mais termolábil da enzima já havia sido inativada, impedindo uma avaliação adequada do comportamento da enzima durante todo o tratamento. A Tabela 4 apresenta a inativação observada na rampa de aquecimento, confirmando

a hipótese acima levantada. A partir de 60 °C, houve inativação superior a 50 %. Esse fato justifica os resultados discrepantes e pouco representativos da realidade, principalmente para as temperaturas mais elevadas. Diante dos resultados apresentados, optou-se por não realizar os experimentos com a aplicação do ultrassom para as temperaturas de 60, 70 e 80 °C.

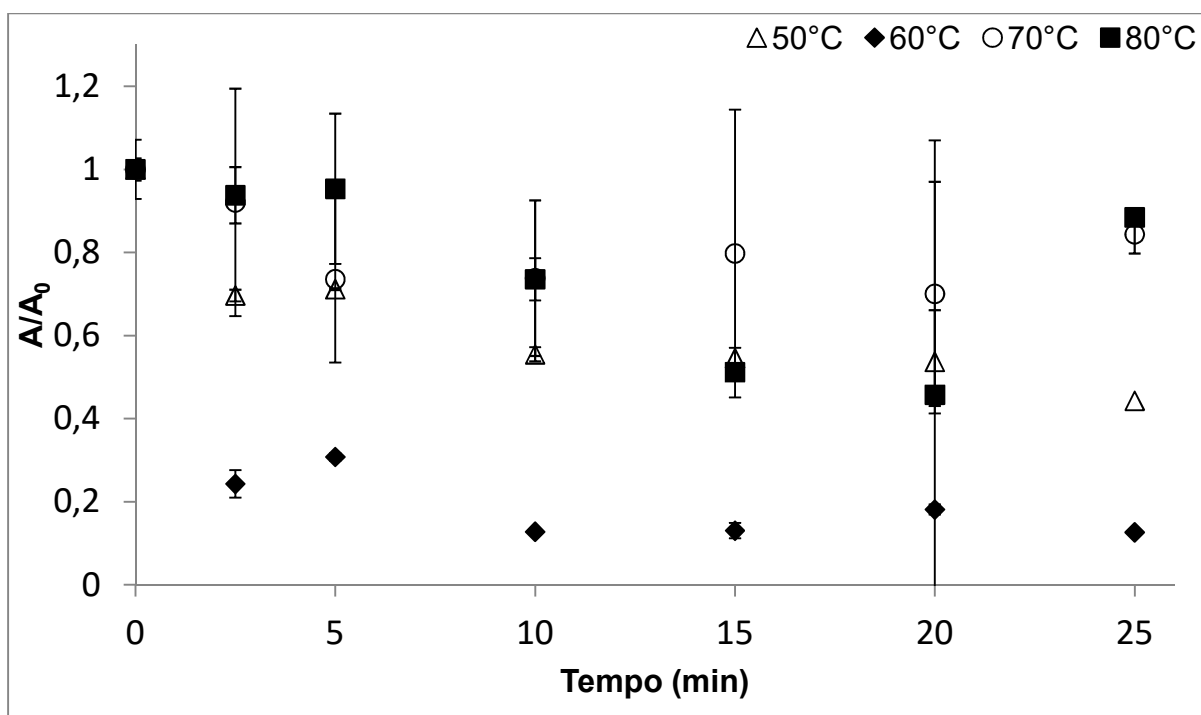


Figura 14 – Atividade enzimática residual de PFO em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais.

Tabela 4 – Inativação enzimática de PFO em caldo de cana na rampa de aquecimento durante tratamento convencional em diferentes temperaturas.

Tratamento	Inativação enzimática (%)
50 °C	39 ± 7
60 °C	76 ± 8
70 °C	97,3 ± 0,8
80 °C	97,4 ± 0,5

Os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes ao reportados por Brochier et al. (2016). Essas pesquisadoras realizaram estudos avaliando a influência do aquecimento ôhmico na inativação de PFO e POD em caldo de cana. Os experimentos realizados foram semelhantes aos conduzidos nesse trabalho, porém utilizando outra tecnologia emergente. As autoras acima mencionadas também observaram uma alta inativação da PFO, 91 % na fase de aquecimento (com duração de aprox. 3 min) na temperatura de 70 °C. Contudo, Saxena et al.

(2016), avaliando o efeito do aquecimento ôhmico na inativação de PFO em caldo de cana, obtiveram resultados diversos ao analisarem os tratamentos controle. Os autores encontraram a menor inativação de PFO em 60 °C após 5 min. Observaram, ainda, aumento da inativação com aumento de tempo e temperatura, mas não verificaram diferenças estatísticas entre a atividade residual em 80 e 90 °C, sugerindo o desenvolvimento de resistência da enzima à inativação após prolongada exposição ao calor, em acordo com outros autores citados naquela pesquisa.

Augusto et al. (2015), em estudo de inativação de PFO e POD em água de coco por radiação ultravioleta, não puderam determinar a atividade enzimática de PFO devido às baixas absorbâncias obtidas durante a avaliação das amostras em processamentos superiores a 30 min. Contudo, os autores avaliaram também a inativação de POD e minimizaram as consequências ocorridas com a inativação de PFO pelo fato de que, obtendo-se condição adequada à inativação de POD, a PFO, com ainda menor resistência, estaria igualmente inativa. Illera et al. (2018) atribuem a menor estabilidade de PFO à sua estrutura mais complexa, com três ou quatro subunidades em vegetais superiores, o que a torna mais suscetível à inativação.

Em função do comportamento irregular da atividade residual em função do tempo, não foi possível realizar a modelagem matemática dos tratamentos a 70 e 80 °C, seja utilizando o modelo de primeira ordem, seja utilizando o modelo de Weibull. Situação semelhante é descrita por Brochier et al. (2016), os quais não encontram condições para a modelagem por qualquer modelo para PFO em experimentos conduzidos a 60, 70, 75 e 80 °C. De acordo com esses autores, a modelagem de PFO não pode ser realizada porque apenas a fração mais termorresistente das isoenzimas permaneceram ativas durante a fase isotérmica. Como não foi adotado o modelo de primeira ordem bifásico, as diferentes frações enzimáticas (resistentes e não resistentes ao calor) não foram consideradas termos independentes e somadas, num modelo composto. Esse fato pode fornecer alguma explicação para que o modelo de primeira ordem não tenha tido bons ajustes nas condições estudadas, corroborando a possibilidade de ocorrência de isoenzimas termorresistentes.

Devido à alta taxa de inativação verificada ainda na rampa de aquecimento nos tratamentos controle e da clara baixa termorresistência de PFO, optou-se por repetir apenas o experimento a 50 °C, ajustando a duração da fase isotérmica e os tempos de coleta de amostra. Para tanto, utilizaram-se amostras do Lote II, e novos

experimentos foram conduzidos com e sem aplicação de ultrassom. A Figura 15 apresenta os resultados obtidos. Pode-se observar um comportamento exponencial e erros baixos, permitindo uma correta avaliação e comparação entre os tratamentos.

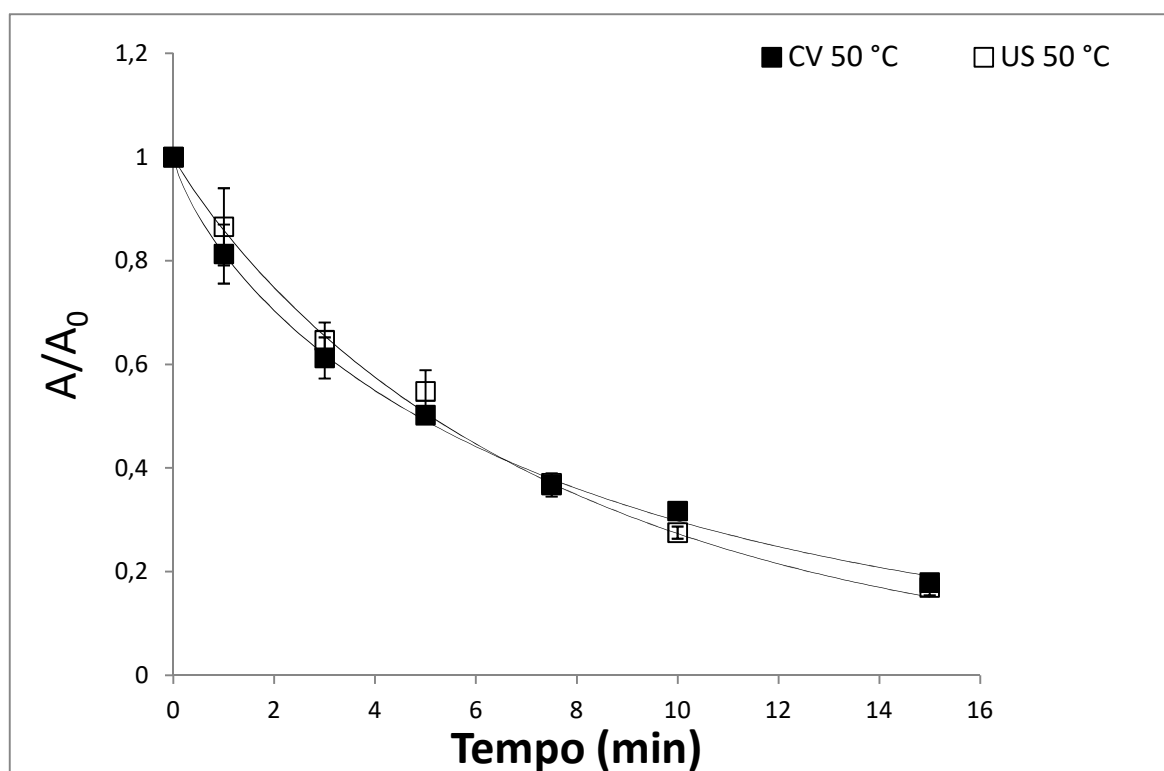


Figura 15 – Valores experimentais (símbolos) e preditos pelo modelo de Weibull (linhas) para atividade enzimática residual de PFO em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos com e sem aplicação de ultrassom.

A Tabela 5 apresenta os índices estatísticos para avaliação da performance dos modelos cinéticos testados para descrever de inativação de PFO na temperatura de 50 °C. Como pode ser observado, o modelo de Weibull mostrou-se mais adequado à modelagem, pois obteve R^2 maiores e χ^2 e $RMSE$ menores, tendo sido o modelo selecionado para descrever os dados experimentais de inativação da PFO. Destaca-se que, embora o modelo de primeira ordem também tenha encontrado muito bom ajuste, o modelo de Weibull foi utilizado em todo o restante do estudo, por isso foi o escolhido, de modo a padronizar a modelagem. Esse resultado assemelha-se aos reportados por Brochier et.al (2016), que encontraram no modelo de Weibull os melhores índices estatísticos para prever a atividade residual de PFO e POD em caldo de cana. No entanto, esse resultado contrasta o obtido por Saxena et al. (2017), os quais, em estudo cinético de PFO em caldo de

cana tratado de modo convencional e ôhmico, comparando os modelos de conversão fracional, primeira ordem simples e bifásico e de Weibull, obtiveram melhor ajuste ao modelo de primeira ordem bifásico.

A Tabela 6 apresenta os coeficientes do modelo de Weibull para atividade enzimática residual de PFO em caldo de cana nos tratamentos convencionais e com termossonicação. Os valores de b , representando a taxa de inativação enzimática, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Os valores de n , fator de forma, também não apresentam diferenças estatísticas significativas entre si e apresentam acentuada concavidade, reforçando a inativação enzimática crescente e rápida. Pode-se inferir, portanto, que a inativação enzimática da PFO em caldo de cana tratado a 50 °C não sofre influência significativa do tratamento ultrassônico.

Tabela 5 – Índices estatísticos para avaliação da performance dos modelos cinéticos para descrever a inativação de PFO em caldo de cana.

Tratamento	R ²		χ ²		RMSE	
	1ª ordem	Weibull	1ª ordem	Weibull	1ª ordem	Weibull
50 °C - CV	0,988	0,999	2,42·10 ⁻³	1,61·10 ⁻⁴	4,56·10 ⁻³	3,04·10 ⁻⁴
50 °C - US	0,998	0,999	5,02·10 ⁻⁴	3,12·10 ⁻⁴	9,48·10 ⁻⁴	5,90·10 ⁻⁴

Tabela 6 – Coeficientes do modelo de Weibull para descrever a atividade enzimática residual de PFO em caldo de cana nos tratamentos convencional e com termossonicação.

Tratamento	b	n
50 °C - CV	0,21 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,04 ^a
50 °C - US	0,15 ± 0,05 ^a	0,93 ± 0,15 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

Na Tabela 7 é apresentada a porcentagem de inativação da enzima ao final dos tratamentos. Além de reforçar a ausência de diferença estatística significativa, esse resultado aponta que em temperaturas baixas, longos tempos de processamento são necessários para a inativação da atividade enzimática de PFO. Após 15 min de tratamento a 50 °C, não foi possível atingir 90 % de inativação, valor buscado em processos de pasteurização de sucos e produto a base de fruta (SALOMÃO et al., 2009; FARAONI, 2006). Saxena et al. (2016) obtiveram como melhor binômio tempo/temperatura para caldo de cana em tratamento convencional os valores de 10 min/80 °C, com o qual a atividade residual no primeiro dia foi de 6,47 ± 0,25 %.

Tabela 7 – Inativação enzimática de PFO ao final do tratamento convencional e com termossonicação na temperatura de 50 °C.

Tratamento	Inativação enzimática final (%)
50 °C - CV	85 ± 2 ^a
50 °C - US	86 ± 1 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

5.2.2 Atividade enzimática de POD

As Figuras 16 e 17 apresentam a atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais e termossonicados. As temperaturas mais baixas no tratamento convencional, 50 e 60 °C, apresentaram perfil de atividade enzimática semelhante e alguns pontos de ativação enzimática, notadamente logo após o início da fase isotérmica e ao fim da mesma. Esse comportamento deve-se, provavelmente, ao fato de que essas temperaturas estão próximas à temperatura limite de atividade da enzima; acima dessas temperaturas, já se verifica um comportamento de inativação. Observação semelhante foi feita por Brochier et al. (2016) em relação à temperatura de 60 °C para tratamento de caldo de cana em modo convencional e ôhmico, atribuindo o perfil de ativação à provável temperatura próxima à ótima da enzima.

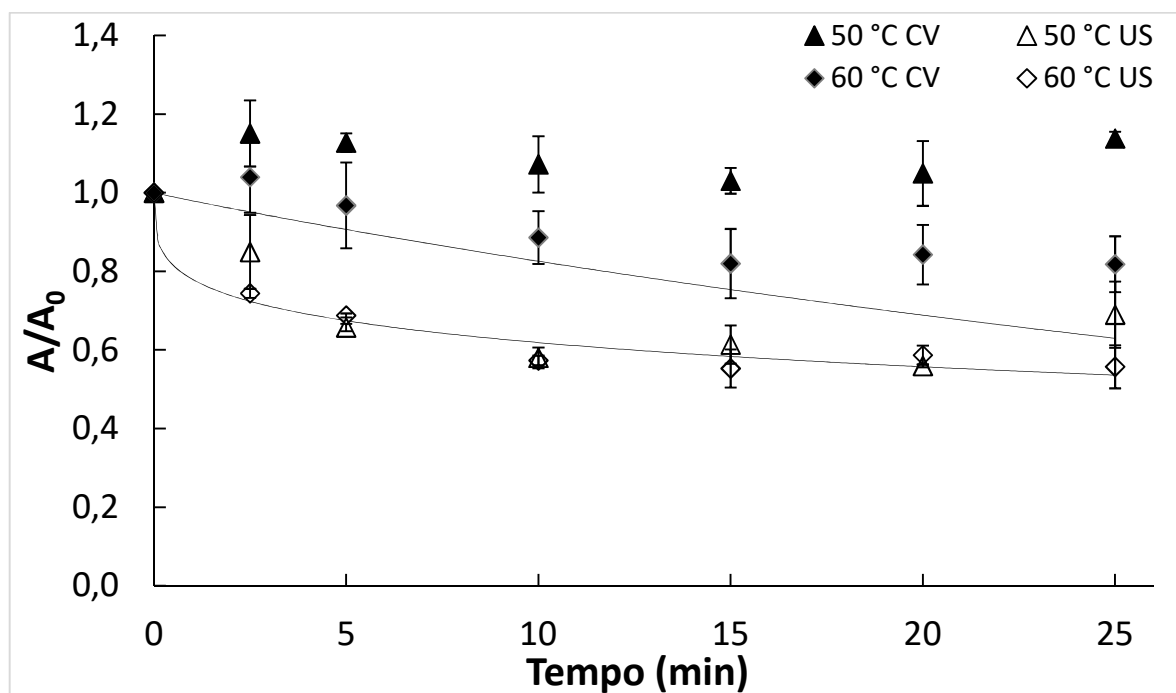


Figura 16 – Atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais e termossonicados a 50 e 60 °C.

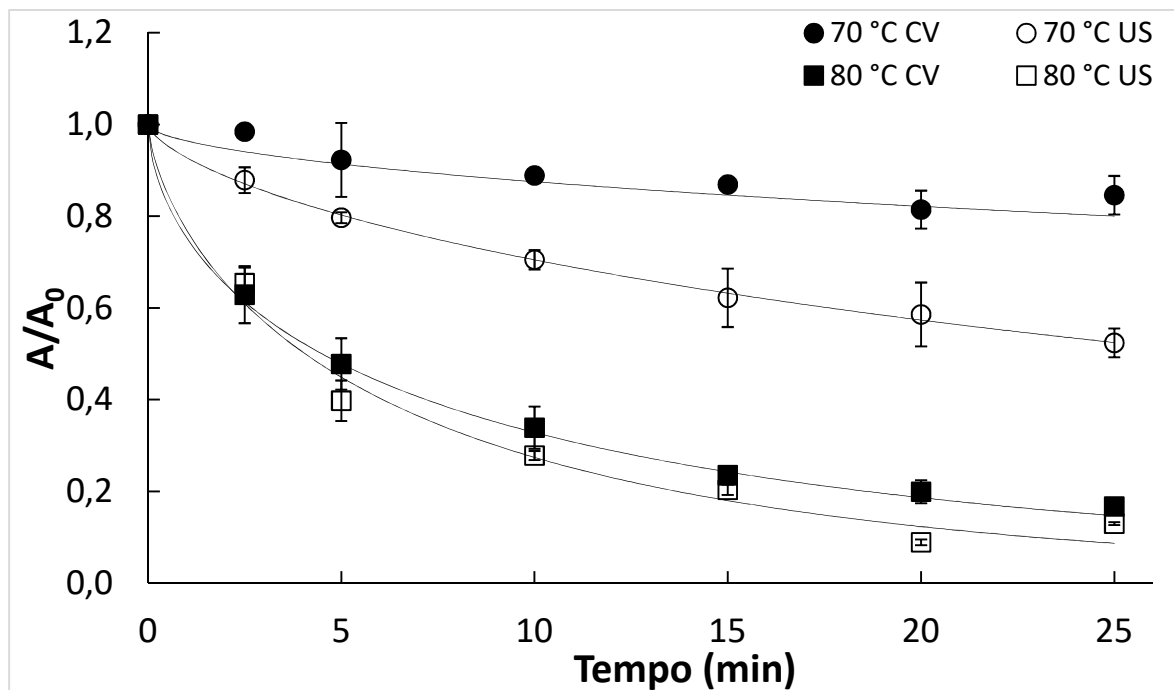


Figura 17 – Atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais e termossônicos a 70 e 80 °C.

Para as temperaturas de 50 e 60 °C, pode-se observar que os perfis de atividade enzimática dos tratamentos termossônicos assemelham-se entre si, mas diferem substancialmente dos convencionais. Para os tratamentos com ultrassom, verifica-se um efeito de inativação da POD, enquanto para os tratamentos convencionais um efeito de ativação é observado. A provável razão para essa diferença são os efeitos não térmicos do US, sugerindo que a cavitação e os fenômenos localizados de aumento de pressão e temperatura tenham potencial dano à atividade enzimática. Ressalta-se ainda que esse efeito é mais intenso na temperatura de 50 °C, pois há um maior distanciamento entre as curvas para os tratamentos convencional e com sonicação.

A temperatura de 70 °C apresentou perfis de atividade enzimática similares em relação ao comportamento para ambos os tratamentos, mas diferentes em valores, sendo os experimentos ultrassônicos os que apresentaram uma maior taxa de inativação, corroborando os resultados encontrados para as temperaturas de 50 e 60 °C. Na temperatura de 80 °C, obteve-se maior inativação, o que era esperado, uma vez que o aumento de temperatura promove aumento da taxa de inativação. Esses resultados são similares aos reportados por Brochier et al. (2016), que avaliaram temperaturas de 70, 75 e 80 °C, sendo que, quanto maior a temperatura aplicada, menor a atividade enzimática apresentada. As autoras observaram,

comparando aquecimento convencional e ôhmico, uma pequena diferença entre a atividade enzimática final de POD a 80 °C, com a menor atividade em favor do aquecimento ôhmico, embora esses resultados não possam ser diretamente comparados aos do presente estudo, dada a diferente natureza das tecnologias emergentes adotadas. Por fim, verifica-se que à medida que aumenta a temperatura de tratamento, diminuem as diferenças entre os tratamentos convencionais e com ultrassom. Esse efeito pode estar relacionado com a magnitude de ambos fatores na inativação da enzima: à medida que a temperatura aumenta, aumenta o efeito térmico sobre a inativação, o que acaba mascarando, ou encobrindo, os efeitos não térmicos do US. Dessa forma, a 80°C a influência da aplicação do US sobre a inativação enzimática se torna menos significativa frente à inativação térmica.

A Tabela 8 apresenta os valores mínimos e máximos para os índices estatísticos que avaliam a performance dos modelos de primeira ordem e de Weibull para descrever a inativação de POD nos diferentes tratamentos aplicados. Como pode ser observado na tabela, o modelo de Weibull apresentou maiores valores para o coeficiente de determinação e menores valores para o *RMSE*. Para o índice χ^2 , houve maior variabilidade, com os menores valores, em alguns casos, para o modelo de primeira ordem e os demais, a maioria deles, para o modelo de Weibull. Diante dos resultados, e levando-se em consideração dados da literatura para o mesmo produto (Brochier et al., 2016), optou-se pelo modelo de Weibull para o ajuste dos dados experimentais.

Tabela 8 – Índices estatísticos para avaliação da performance dos modelos cinéticos para descrever a inativação de POD em caldo de cana nos tratamentos convencionais e termossônicos.

Modelo	R^2	χ^2	<i>RMSE</i>
1ª ordem	[0,608; 0,976]	[$1,99 \cdot 10^{-5}$; $7,87 \cdot 10^{-3}$]	[$1,16 \cdot 10^{-2}$; $3,03 \cdot 10^{-3}$]
Weibull	[0,892; 0,9990]	[$6,89 \cdot 10^{-5}$; $1,64 \cdot 10^{-3}$]	[$6,89 \cdot 10^{-5}$; $1,64 \cdot 10^{-3}$]

De acordo com Brochier et al. (2016), o modelo de primeira ordem não leva em consideração a presença de isoenzimas, não sendo, portanto, o melhor modelo para prever a cinética de inativação da POD. Cabe ressaltar também que as diferentes isoformas podem comportar-se distintamente ao longo do tratamento e também podem “perceber” os efeitos não térmicos do US de modo diverso, o que pode ocasionar variabilidade no ajuste do modelo, por mais que o modelo de Weibull seja estocástico.

Nas Figuras 16 e 17 pode-se observar os valores experimentais e preditos pelo modelo de Weibull para atividade de POD nas condições estudadas. É necessário esclarecer que, devido ao perfil de ativação enzimática obtido nos tratamentos a 50 °C, não foi possível realizar a modelagem cinética de inativação desses dados. Embora a temperatura de 60 °C tenha apresentado ativação enzimática no início do tratamento convencional, um comportamento de inativação se estabelece à medida que o tratamento avança, tendo sido, portanto, possível o ajuste na modelagem cinética. Esse resultado difere do comportamento observado por Brochier et al. (2016), que relataram ativação nos perfis de atividade enzimática a 60 °C, tanto em aquecimento convencional quanto ôhmico, não conseguindo ajuste aos modelos matemáticos. Essa diferença entre resultados pode reforçar a hipótese de que 60 °C é uma temperatura limite para a atividade enzimática de POD, o que justifica o seu variável comportamento no perfil de atividade enzimática.

A Tabela 9 especifica os coeficientes do modelo de Weibull para os diferentes tratamentos aplicados. Comparando-se o tratamento convencional e com ultrassom numa mesma temperatura, verifica-se que os tratamentos diferem entre si nas temperaturas de 60 e 70°C para o parâmetro *b*. Na temperatura de 80°C, não houve diferença estatística entre os tratamentos aplicados. Esse resultado reforça a hipótese levantada de que, em altas temperaturas, o efeito do ultrassom é “mascarado” pelo elevado efeito térmico na inativação enzimática. Para o parâmetro *n*, fator de forma, não se observa diferença estatística entre os tratamentos numa mesma temperatura.

Tabela 9 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencionais e termossonicados.

Tratamento	<i>b</i>	<i>n</i>	<i>R</i> ²	χ^2	<i>RMSE</i>
60 °C CV	0,02 ± 0,02 ^a	0,961 ± 0,64 ^a	0,916	1,60 · 10 ⁻³	3,03 · 10 ⁻³
60 °C US	0,25 ± 0,08 ^b	0,285 ± 0,07 ^a	0,984	9,83 · 10 ⁻⁴	1,86 · 10 ⁻⁴
70 °C CV	0,04 ± 0,01 ^A	0,562 ± 0,17 ^A	0,911	1,22 · 10 ⁻³	2,31 · 10 ⁻³
70 °C US	0,07 ± 0,01 ^B	0,669 ± 0,05 ^A	0,999	6,89 · 10 ⁻⁵	1,30 · 10 ⁻⁴
80 °C CV	0,28 ± 0,08 ^a	0,594 ± 0,08 ^a	0,999	1,19 · 10 ⁻⁴	2,25 · 10 ⁻⁴
80 °C US	0,26 ± 0,04 ^a	0,694 ± 0,06 ^a	0,994	1,64 · 10 ⁻³	3,09 · 10 ⁻³

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

5.2.3 Avaliação da cor

A avaliação da cor durante os tratamentos térmicos, comparando ponto a

ponto, seria complexa e pouco eficaz, uma vez que não se observa variação de cor entre pontos próximos. Por outro lado, a comparação entre todos os pontos de todos tratamentos traria também uma série de diferenças estatísticas e conclusões muito genéricas. Dessa forma, nesse estudo, optou-se por comparar os atributos de cor no final do tratamento térmico, condição mais próxima à utilizada em um tratamento térmico para uma redução efetiva de atividade enzimática. A Tabela 10 apresenta os parâmetros *CIELab* de cor das amostras ao final dos 25 min de tratamento, comparando experimentos de aquecimento convencional e termossonicação na mesma temperatura.

Tabela 10 – Comparativo dos parâmetros *CIELab* de cor para amostras ao final de tratamentos convencional e de termossonicação.

Tratamento	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	ΔE^*
CV - 50 °C	40 ± 1 ^b	-0,6 ± 0,2 ^b	11,2 ± 0,1 ^b	1,72
US - 50 °C	47 ± 0,8 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	17 ± 1 ^a	2,30
CV - 60 °C	49 ± 2 ^A	-0,8 ± 0,1 ^B	14 ± 1 ^A	3,78
US - 60 °C	43,9 ± 1 ^B	0,38 ± 0,01 ^A	16,0 ± 0,1 ^B	3,18
CV - 70 °C	44 ± 2 ^α	-0,5 ± 0,3 ^β	11 ± 1 ^β	1,92
US - 70 °C	45 ± 2 ^α	0,90 ± 0,05 ^α	17,6 ± 0,2 ^α	5,55
CV - 80 °C	48 ± 1,81 ¹	-0,5 ± 0,1 ²	15 ± 1 ¹	5,71
US - 80 °C	44 ± 0,1 ¹	1,46 ± 0,02 ¹	0,8 ± 0,1 ¹	4,05

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras ou algarismos iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

ΔE^* : diferença de cor em relação à amostra *in natura*.

Analisando-se o espaço de cor *L**, duas temperaturas apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as formas de aquecimento: 50 °C, onde o tratamento ultrassônico apresentou maior luminosidade, e 60 °C, onde a maior luminosidade ocorreu com o tratamento convencional. Analisando os dados para cada método de aquecimento, também não se encontra uma relação entre aumento de temperatura e maior luminosidade. Não se pode concluir que o tratamento ultrassônico traga melhor luminosidade ao caldo de cana.

O espaço de cor *a** apresentou diferença estatística significativa para todas as temperaturas no comparativo entre métodos, tendo sempre sido negativo (cor verde) para os tratamentos convencionais, onde não existiram diferenças significativas entre diferentes temperaturas, e positivo (cor vermelha) para os ultrassônicos, onde existiram diferenças. Embora as diferenças tenham sido observadas apenas nos experimentos termossonicados, e apesar de o efeito da temperatura ter sido aleatório entre os tratamentos, não se pode afirmar contundentemente que o US foi

responsável pelas mudanças de cor verificadas, uma vez que o parâmetro a^* variou com alguma magnitude, podendo as diferenças serem atribuídas à própria composição das amostras. Também pode-se aventar que uma possível quebra de partículas de turbidez pela cavitação, ocasionando maior precipitação de borras, não parece ter auxiliado na obtenção de cores mais verdes.

O espaço de cor b^* foi positivo para todos os resultados, denotando o domínio da cor amarela. O parâmetro apenas não apresentou diferença estatística significativa entre métodos na temperatura de 80 °C. No comparativo de cada método, não foram observadas diferenças significativas. Como a variação do parâmetro nas diferentes temperaturas em método convencional foi aleatória, e dado o baixo desvio padrão de todos os resultados, é possível que o US proporcione maior coloração amarela, o que pode ser devido à ação da cavitação sobre as estruturas vegetais da parede celular da cana carreadas ao caldo, liberando ao meio compostos de coloração amarelada. Não houve diferença significativa no comparativo dos métodos de aquecimento apenas em 80 °C, sendo que, nas demais, os valores maiores sempre foram para os experimentos com US, havendo diferenças aleatórias no comparativo das diferentes temperaturas em cada método de aquecimento.

Brochier et al. (2018) relataram, após tratamentos térmicos convencionais e ôhmicos de caldo de cana, que os valores de L^* e b^* aumentaram e os de a^* diminuíram ao final do tratamento, indicando coloração mais amarelada e luminosa. Esse comportamento difere sensivelmente do verificado no presente estudo, onde os parâmetros não encontraram substancial variação. As autoras argumentam que diversos fatores podem contribuir para as mudanças observadas, como formação de compostos de cor ou degradação de outros em mecanismos como reação de Maillard, degradação térmica e elétrica dos compostos e a própria atividade das enzimas oxidativas. As autoras também sugerem que algumas mudanças de cor podem estar relacionadas à degradação de compostos fenólicos, que formam compostos coloridos e, no caso do estudo, decaíram 10 % na rampa de aquecimento, podendo ter sido transformados em pigmentos. Contudo, consideram difícil a correlação da degradação dos compostos fenólicos e mudanças nos espaços de cor devido à grande variedade de compostos fenólicos encontrados na cana de açúcar. Saxena et al. (2017) também observaram grande variabilidade nos atributos de cor de caldo de cana tratado por aquecimento ôhmico, variando

sensivelmente com temperatura e campo elétrico em tendências não muito claras, sobretudo em 80 e 90 °C.

O efeito da temperatura não pode ser diretamente correlacionado com as mudanças de cor, uma vez que houve variações paulatinas para maior e menor nos valores dos parâmetros estudados, e assim, não se pode afirmar que temperaturas maiores trouxeram maiores variações de cor, como seria esperado. Da mesma forma, as diferenças de comportamento de cor nos diferentes experimentos termossonicados também não permitem estabelecer com clareza a relação do US com determinados perfis de coloração do caldo de cana, podendo-se, no limite, inferir que a tecnologia traz menor luminosidade e maior tom avermelhado devido à suspensão das borras, que tornam-se menores sob sonicação, numa provável ação da cavitação, tornando-as mais dispersas após o tratamento. Segundo Rojas et al. (2017), sucos de frutas são compostos de partículas sólidas, como células inteiras, fragmento de tecidos e células e parede celular, dispersas em um soro viscoso (solução de água e componentes intracelulares, como açúcares e sais). Essas partículas podem sofrer efeito adicional de ruptura de células quando US é aplicado, mudando a composição e as propriedades do meio.

Anaya-Esparza et al. (2017) não observaram diferença significativa nos parâmetros L^* e a^* para qualquer tratamento de sonicação entre 2 a 10 min e temperaturas de 30 a 50 °C em néctar de graviola, contudo diferenças nos valores de b^* foram percebidas em 2, 3 e 7 min, atingindo baixas diferenças totais de cor.

Abid et al. (2014), em estudo de temperaturas de termossonicação de 20 a 60 °C na melhoria de qualidade do suco de maçã, verificou aumento nos parâmetros L^* , a^* e b^* . Para os autores, a precipitação de partículas instáveis devido à termossonicação pode ser a responsável pelo aumento na luminosidade. Os autores citaram que as mudanças de cor podem ser por efeitos isolados ou combinados das variáveis tempo e temperatura. No estudo em questão, foi verificada alta atividade de PFO e POD durante os tratamentos, o que pode ter afetado os parâmetros de cor, contudo as diferenças não foram perceptíveis a olho nu.

Illera et al. (2018) avaliaram mudanças significativas em todos atributos de cor após a termossonicação de suco de maçã, com decréscimo do espaço de cor L^* e aumento dos espaços a^* e b^* . O decréscimo em L^* foi atribuído à homogeneização promovida pela sonicação. A diferença total de cor, comparada ao suco *in natura*, foi perceptível em 60 e 67 °C, atribuída à reação de Maillard e aos vários fenômenos

físicos, químicos e biológicos provocados pela cavitação, bem como a possíveis reações de oxidação causadas pela ruptura celular. Os autores ainda avaliaram a formação de hidroximetilfurfural como indicador de escurecimento não enzimático em tratamentos de termossonicação, observando valor constante em qualquer condição, garantindo, portanto, que reações de escurecimento não enzimático não foram significativas.

Para os valores de diferença total de cor (ΔE), em relação à amostra *in natura*, não se pode afirmar que a temperatura ou a sonicação exerceram influência nos resultados, pois percebe-se um comportamento aleatório de mudança de cor em qualquer ordem em que são analisados os dados. O parâmetro ΔE advém de cálculos a partir dos parâmetros L^* , a^* e b^* , sendo difícil estabelecer relação direta entre parâmetros de processamento e variações na diferença de cor. De todo modo, pode-se afirmar que há sempre diferença entre a cor do caldo *in natura* e do caldo no final do processamento.

5.3 Avaliação da influência dos parâmetros de processamento – Etapa II

Nessa etapa do trabalho, foi avaliada a influência de algumas variáveis (regime de pulsos, potência e tempo de aplicação) do ultrassom na cinética de inativação da POD. Os resultados serão apresentados na forma de gráficos, que foram estruturados analisando a influência do regime de pulsos, do tempo de tratamento e da potência de sonicação individualmente.

Tabela 11 – Índices estatísticos para avaliação da performance do ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais de atividade enzimática residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencional e termossonicados.

Tratamento	Potência (%)	Pulsos (on/off)	Tempo de sonicação (min)	R^2	χ^2	RMSE
CV	-	-	-	0,996	$6,26 \cdot 10^{-4}$	$1,18 \cdot 10^{-3}$
A	75	20 s/10 s	25	0,998	$2,91 \cdot 10^{-4}$	$5,50 \cdot 10^{-4}$
B	75	40 s/10 s	25	0,984	$3,19 \cdot 10^{-3}$	$6,02 \cdot 10^{-3}$
C	75	Contínuo	25	0,996	$1,75 \cdot 10^{-3}$	$3,31 \cdot 10^{-3}$
D	50	20 s/10 s	25	0,990	$8,98 \cdot 10^{-4}$	$1,69 \cdot 10^{-3}$
E	100	20 s/10 s	25	0,993	$1,38 \cdot 10^{-3}$	$2,61 \cdot 10^{-3}$
F	75	20 s/10 s	5	0,994	$6,81 \cdot 10^{-4}$	$1,28 \cdot 10^{-3}$

Para maior clareza, e para fins comparativos, os dados do tratamento convencional e do tratamento de termossonicação utilizado como referência serão repetidos em todos os gráficos. Como não houve variação na temperatura de processamento, 75 °C, essa informação será omitida doravante. Convém ainda ressaltar que os resultados foram modelados utilizando apenas o modelo de Weibull, que foi o escolhido para representar os dados experimentais na etapa anterior por se mostrar o mais adequado para tanto. A Tabela 11 apresenta os índices estatísticos que avaliam a performance da modelagem para os 7 tratamentos realizados nessa etapa. Pode-se observar um ajuste adequado do modelo aos dados experimentais.

5.3.1 Avaliação da influência do regime de pulsos do ultrassom na inativação enzimática de POD

Foram estabelecidos os regimes de pulsos de duração de 20 s com intervalos de 10 s (tratamento A), duração de 40 s com intervalos de 10 s (tratamento B) e a sonicação contínua (tratamento C), com 75 % de amplitude de sonicação. A Figura 18 apresenta os valores experimentais e preditos da atividade residual de POD nos tratamentos convencionais e termossonicados com variação de regime de pulsos. Observa-se que há uma grande diferença entre os resultados do tratamento convencional e qualquer dos tratamentos termossonicados, trazendo a hipótese da efetividade do tratamento ultrassônico na diminuição da atividade enzimática. Como já referido anteriormente, a cavitação é apontada por diversas vezes na literatura como possível causa de danos à estrutura enzimática, contribuindo para a diminuição da atividade da enzima.

A Tabela 12 apresenta os coeficientes do modelo de Weibull e os valores de redução decimal para os tratamentos convencional e termossonicados com variação de regime de pulsos. Percebe-se que, tanto para o coeficiente b , definido como taxa de inativação enzimática, quanto para o coeficiente n , fator de forma, o tratamento convencional se distingue significativamente de todos os tratamentos termossonicados.

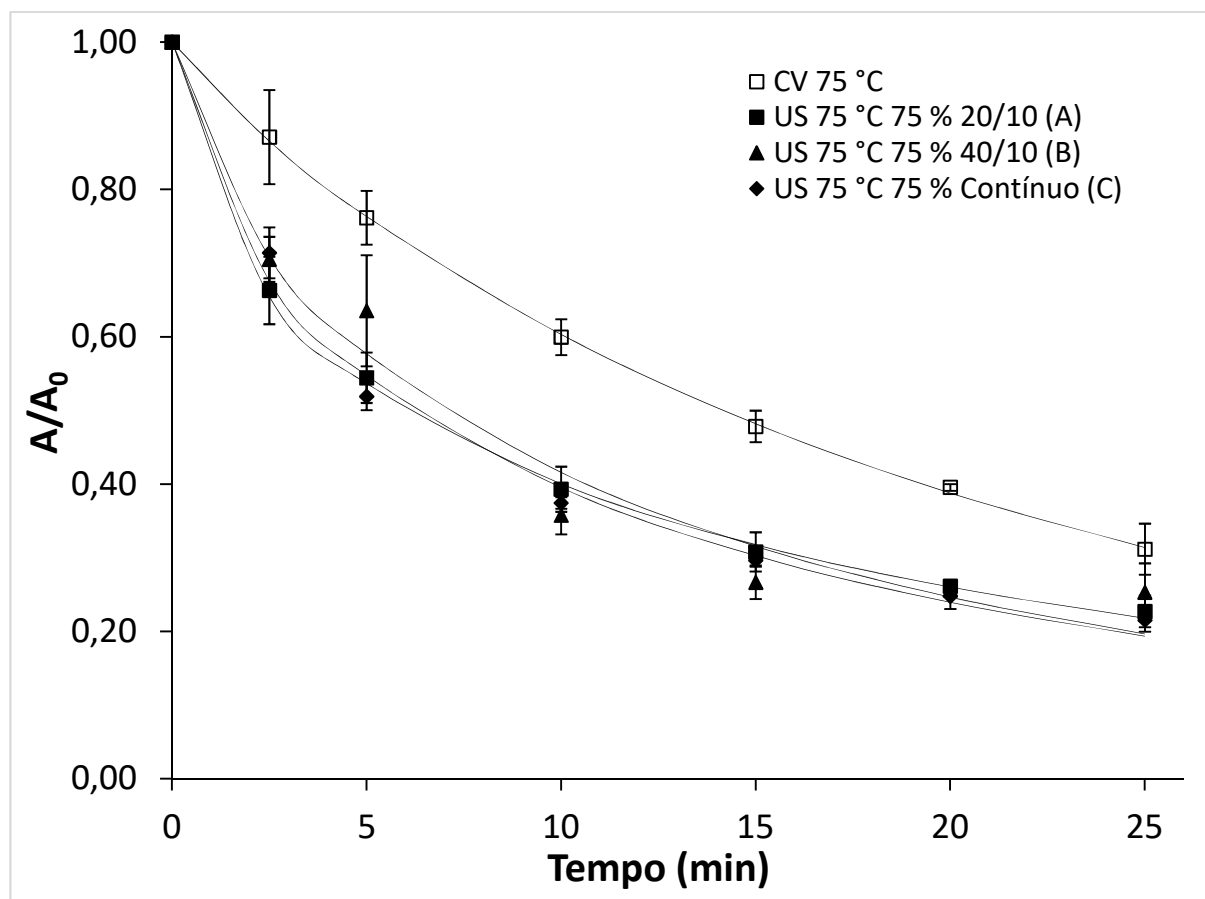


Figura 18 – Valores experimentais (símbolos) e preditos pelo modelo de Weibull (linhas) para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencional e termossônicos com variação de regime de pulsos.

Em estudo semelhante, Illera et al. (2018), ao estudarem a influência do regime de pulsos na inativação de PFO em suco de maçã, observaram que a sonicação contínua proporcionava maior inativação enzimática, argumentando que, embora o regime de pulsos possa significar economia de energia, é menos efetivo na inativação de PFO. Em razão de não haver diferenças significativas entre os diferentes regimes de pulsos no presente estudo, tendo-se em vista que os tratamentos com US proporcionaram maior inativação enzimática e que o regime de pulsos permite melhor aproveitamento de energia, os resultados levam à conclusão de que a termossonicação pulsada é uma alternativa para o processamento do caldo de cana visando a inativação enzimática. É importante ressaltar que essa etapa do estudo não analisou o comportamento de compostos bioativos e nutricionais, existindo a perspectiva de que a sonicação possa ser também promotora de valor funcional e nutricional.

Tabela 12 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de regime de pulsos.

Tratamento	Pulsos	<i>b</i>	<i>n</i>
CV	-	0,06 ± 0,02 ^b	0,90 ± 0,09 ^a
A	20 s / 10 s	0,25 ± 0,05 ^a	0,57 ± 0,06 ^b
B	40 s / 10 s	0,19 ± 0,04 ^a	0,68 ± 0,07 ^b
C	Contínuo	0,18 ± 0,06 ^a	0,68 ± 0,07 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

5.3.2 Avaliação da influência do tempo de sonicação na inativação enzimática de POD

Para avaliar a influência do tempo de sonicação na inativação de POD, além do experimento com aplicação de sonicação ao longo de todo o tratamento (A), foi estabelecido um tratamentos de sonicação em que a aplicação de US se deu apenas nos cinco minutos iniciais do processamento (tratamento F). O experimento foi realizado a 75 °C, com 75 % de potência de US e com pulsos de 20 s em intervalos de 10 s; portanto, doravante apenas referir-se-á ao tempo de sonicação como distinção entre os tratamentos. Essa estratégia permitiu avaliar se possíveis danos iniciais às enzimas bastavam para a efetividade da sonicação no tratamento térmico. A Figura 19 apresenta os valores experimentais e preditos para atividade residual de POD nos tratamentos convencional e termossonicados com variação do tempo de sonicação.

Verifica-se na Figura 19 que o tratamento com menor atividade residual de POD foi aquele com sonicação durante todo o tempo de tratamento térmico (tratamento A). O experimento com 5 minutos iniciais de termossonicação apresentou um comportamento distinto: até 15 min houve uma maior inativação do que o tratamento convencional; contudo, após 15 min, a atividade enzimática residual passou a ser superior ao CV. Poderia aventar-se a hipótese de que o menor tempo de sonicação afetou apenas as isoformas menos resistentes, justificando que a retomada da atividade de POD após 15 min fosse devido à atividade das isoenzimas termoestáveis. Essa atividade pode ter tornado-se superior ao tratamento controle pela ação da cavitação que pode haver possibilitado uma maior exposição do sítio ativo de ligação, aumentando a efetividade da ação enzimática. O resultado demonstra que a sonicação somente é efetiva se ocorrer paralelamente ao longo de todo o tratamento térmico.

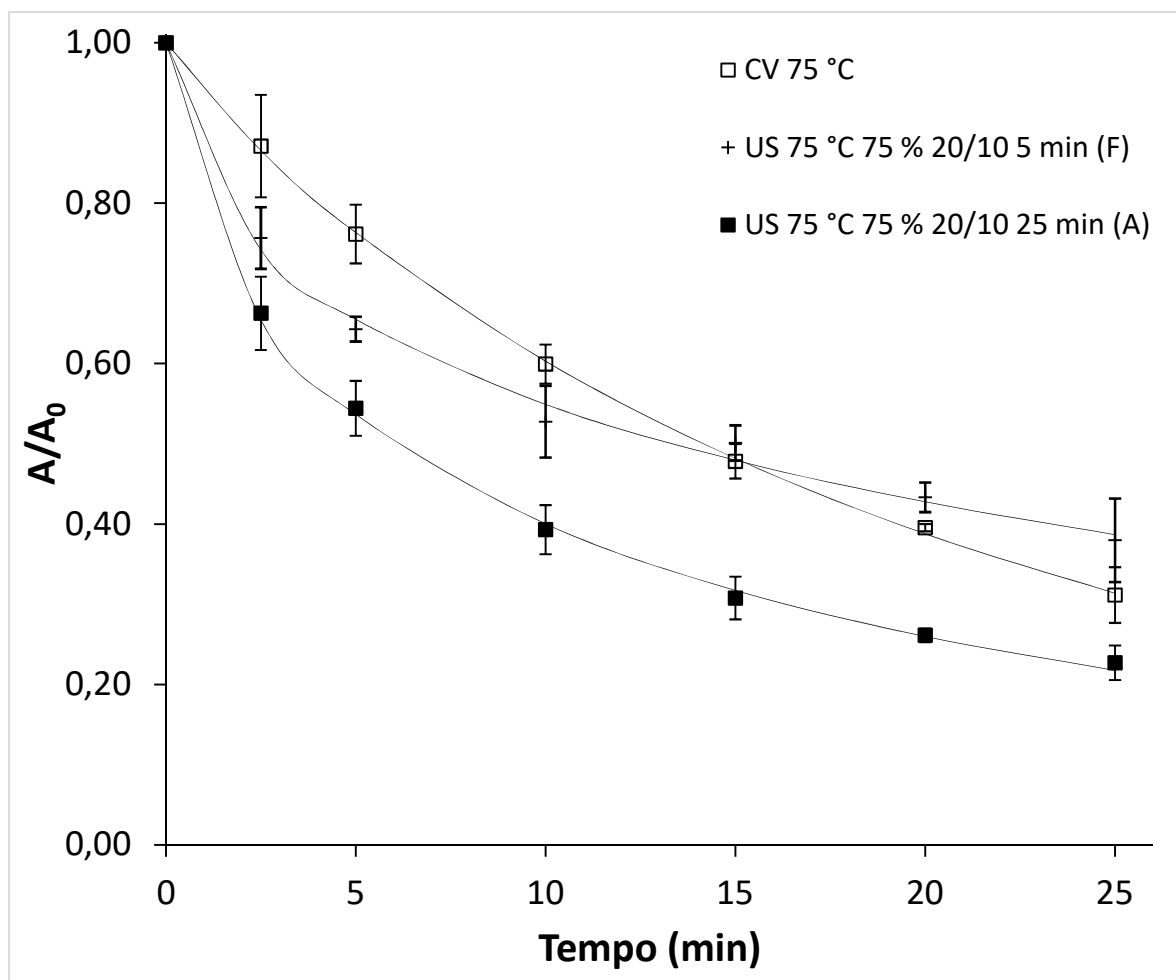


Figura 19 – Valores experimentais (símbolos) e preditos pelo modelo de Weibull (linhas) para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencional e termossônicos com variação de duração de sonicação.

A Tabela 13 apresenta os coeficientes do modelo de Weibull para a atividade residual de POD. Analisando-se o parâmetro b , verifica-se que o tratamento A e F diferem estatisticamente do tratamento convencional. Contudo, os tratamentos A e F não diferem entre si. Analisando-se o coeficiente n , referente à forma, há diferença significativa entre o tratamento convencional e todos os sonicados, sem haver diferença dentre os últimos. Essa avaliação estatística dos parâmetros do modelo não conseguiu distinguir o melhor tratamento a ser aplicado uma vez que os tratamentos A e F não diferem entre si. Isso pode ter acontecido porque o parâmetro b é bastante influenciado pelos pontos iniciais da curva de cinética onde ocorre a maior porcentagem de inativação da enzima. Contudo, o tratamento F não pode ser aplicado pois ao final a atividade residual aumentou consideravelmente, sendo superior ao tratamento convencional.

Tabela 13 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencional e termossonicados com variação do tempo de sonicação.

Tratamento	<i>b</i>	<i>n</i>
CV	0,06 ± 0,02 ^b	0,90 ± 0,09 ^a
F	0,19 ± 0,04 ^a	0,50 ± 0,07 ^b
A	0,25 ± 0,05 ^a	0,57 ± 0,06 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

5.3.3 Avaliação da influência da potência do ultrassom na inativação enzimática de POD

Para a avaliação do efeito da potência de sonicação, foram avaliadas as amplitudes de sonicação de 50 % (tratamento *D*), 75 % (tratamento *A*) e 100 % (tratamento *E*). A Figura 20 apresenta os valores experimentais e preditos da atividade residual de POD nos tratamentos realizados.

A análise da Figura 20 demonstra que a sonicação com potência de 50 % (tratamento *D*) afetou a atividade enzimática de forma muito semelhante ao tratamento convencional. Por outro lado, os tratamentos com sonicação de 75 e 100 % (*A* e *E*, respectivamente) apresentaram maiores taxas de inativação do que os demais. Dessa forma, há uma aparente potencialização dos danos às enzimas em amplitudes maiores, provavelmente devido à cavitação mais violenta, levando a uma menor atividade enzimática.

A Tabela 14 apresenta os coeficientes do modelo de Weibull para atividade residual de POD nos tratamentos aplicados. Comparando-se o coeficiente *b*, há diferença estatística na taxa de inativação enzimática entre o tratamento *A* (75 % de potência) e todos os demais. O comparativo do coeficiente *n*, fator de forma, apresenta apenas diferença estatística clara entre os tratamentos *A* e convencional, sendo que os tratamentos termossonicados não diferem entre si, e os tratamentos *D* e *E* não diferem do convencional. Desse modo, 75 % de amplitude demonstrou ser a melhor potência para inativação, resultado que permite a racionalização do uso de energia e do tempo de tratamento, podendo, provavelmente, contribuir para uma melhor manutenção do potencial funcional e nutricional do produto.

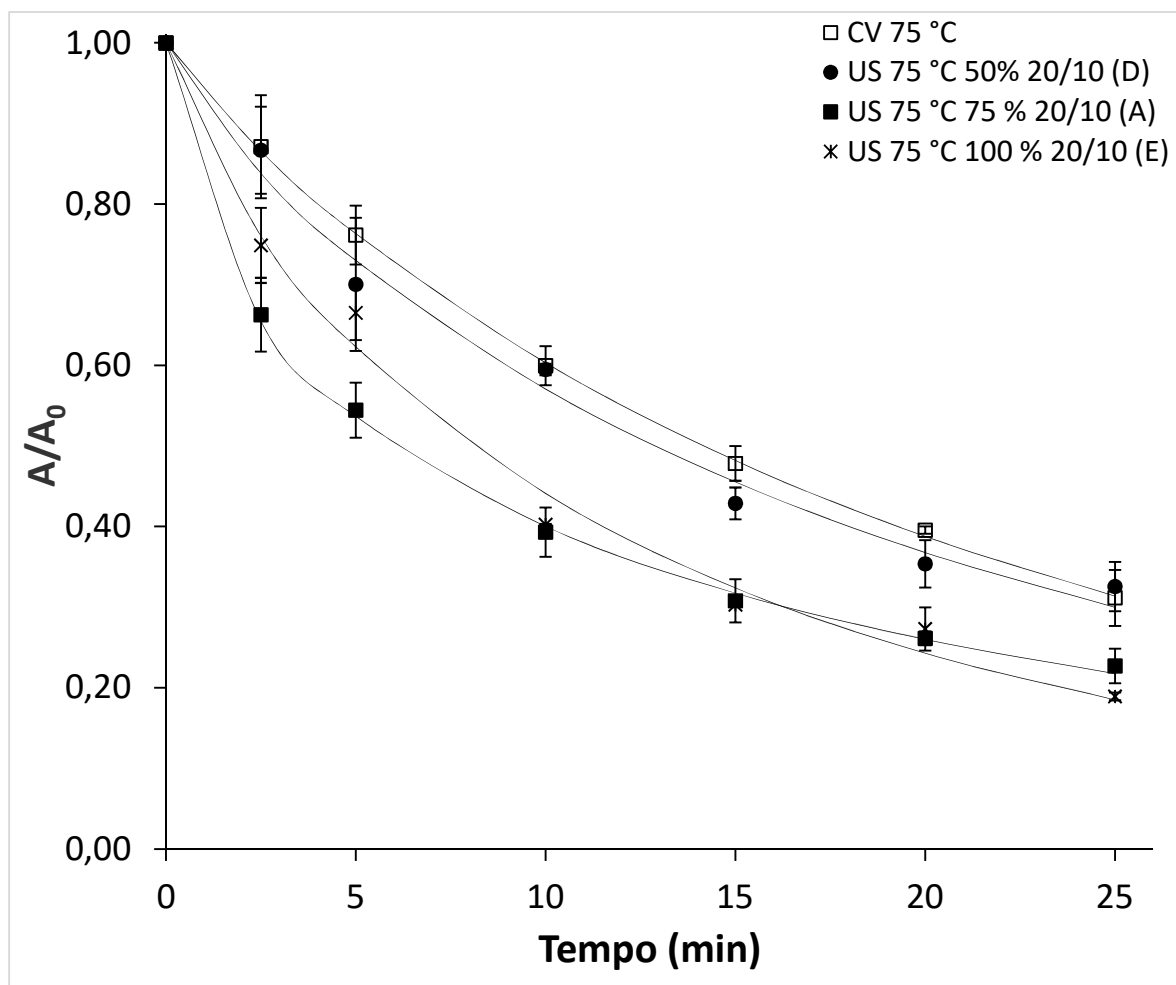


Figura 20 – Valores experimentais (símbolos) e preditos pelo modelo de Weibull (linhas) para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de potência.

Tabela 14 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade enzimática residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencional e termossonicados com variação de potência.

Tratamento	Amplitude	<i>b</i>	<i>n</i>
CV	-	0,06 ± 0,02 ^b	0,90 ± 0,09 ^a
D	50 %	0,12 ± 0,09 ^b	0,79 ± 0,18 ^{ab}
A	75 %	0,25 ± 0,05 ^a	0,57 ± 0,06 ^b
E	100 %	0,13 ± 0,01 ^b	0,79 ± 0,04 ^{ab}

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

Illera et al. (2018) estudaram o efeito da variação de potência durante termossonicação de suco de maçã para a inativação de PFO utilizando um aparelho de 20 kHz de frequência constante e amplitudes de 25 a 100 %. Os autores observaram a menor atividade enzimática residual (36 ± 6 %) na máxima amplitude, relacionando a maior inativação ao aumento da zona de líquido sob cavitação e ao aumento das bolhas de cavitação. Por outro lado, foi observado aumento na

atividade enzimática quando foi aplicada a menor amplitude, atribuída à homogeneização provocada pela sonicação, que ocorre pela ação da energia acústica proporcionando liberação de enzimas usualmente aderidas à parede celular.

5.4 Avaliação da regeneração da atividade enzimática de POD durante armazenamento refrigerado – Etapa III

Para avaliar a possibilidade de regeneração da POD durante armazenamento refrigerado, as amostras foram tratadas convencionalmente e ultrassonicamente a 80 °C, em triplicata. Os tratamentos foram dimensionados de forma que 90 % da atividade enzimática inicial fosse reduzida. Dessa forma, através da modelagem matemática realizada anteriormente com os dados dos experimentos de cinética da atividade enzimática de POD (Item 5.2), foi possível obter o tempo de processamento adequado. Os tempos calculados a partir do modelo de Weibull para cada modo de processamento, como exposto no capítulo de Materiais e Métodos, foram de 36 min para o tratamento convencional e 23 min para o tratamento termossônico.

5.4.1 Atividade residual de POD durante o armazenamento refrigerado

Ao final de cada tratamento, as amostras foram analisadas quanto à atividade residual de POD, sendo esse ponto o dia 0 de armazenamento. Os resultados experimentais de atividade residual ao final do tratamento foram de $6,0 \pm 1,0$ % e $4,4 \pm 0,8$ % para os tratamentos convencional e com sonicação, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os resultados, que foram considerados satisfatórios, pois obteve-se a redução almejada de, no mínimo, 90 % da atividade enzimática. Além de mostrar efetividade na redução da atividade enzimática, evidenciou-se o bom ajuste do modelo de Weibull para os dados de cinética da inativação enzimática nessa temperatura.

A Figura 21 apresenta a atividade residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo de armazenamento sob refrigeração para amostras tratadas convencionalmente e termossônicas a 80 °C. Pode-se observar um comportamento variável da atividade enzimática residual ao longo do tempo de

armazenamento para ambos tratamentos. A atividade de POD aumentou nos dois primeiros dias de armazenamento, diminuindo no quarto dia, e após, tornou a aumentar. A máxima atividade foi verificada em 18 dias, regredindo em 22 dias a valores próximos aos do início do armazenamento. A partir do dia 18, o tratamento ultrassônico apresentou leve decréscimo, mostrando-se mais estável durante todo o tempo de armazenamento do que o tratamento convencional, que aumentou a atividade enzimática a níveis semelhantes aos do segundo dia.

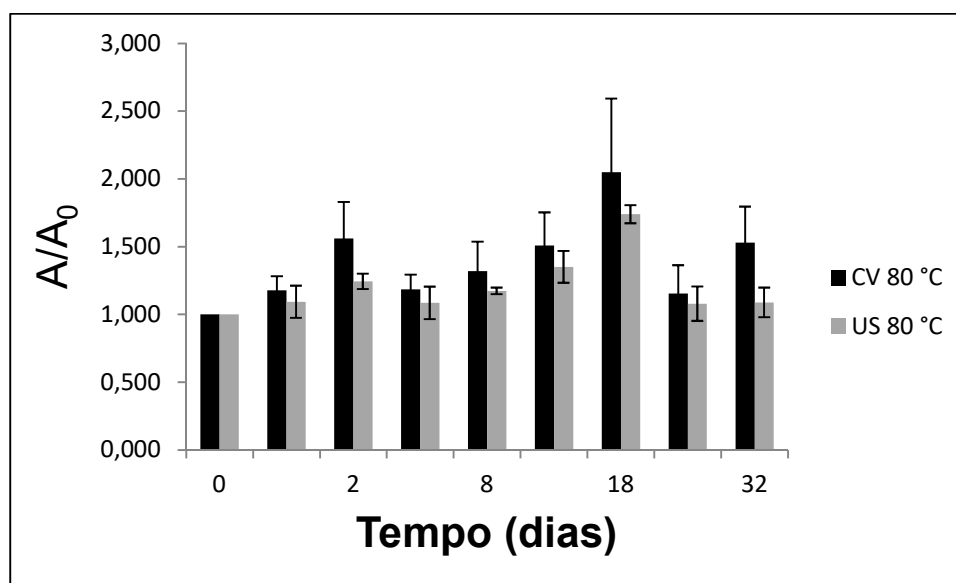


Figura 21 – Atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo de armazenamento nos tratamentos convencionais e termossonicados a 80 °C.

Frateschi et al. (2013), estudando a influência de diferentes concentrações de O₂ na conservação de colmos de cana variedade SP 19-1011, observaram tendência semelhante na atividade residual de POD: menor valor em 4 dias de armazenamento, aumentando após esse dia, independente do tratamento. Bagatini et al. (2018) verificaram regeneração de POD em caldo de cana tratado de modo convencional a 80 °C durante 15 min no 7° e 14° dias de armazenamento. Esse comportamento diferiu do observado no tratamento equivalente realizado com aquecimento ôhmico, o qual manteve atividade enzimática residual sem diferença estatística em relação ao início do armazenamento. Contudo, nesse mesmo estudo, os autores verificaram que quando o tempo de tratamento passava a 30 min, havia alta regeneração de POD no aquecimento convencional, desde o início do armazenamento, com picos de 80 % de regeneração, enquanto no aquecimento ôhmico, a atividade de POD diminuía durante o armazenamento, diferindo

significativamente da atividade enzimática inicial. A hipótese dos autores é que o maior tempo de tratamento tenha liberado compostos que favorecem a atividade de POD, não fazendo objeção, porém, do porquê esse comportamento não se repetiu na amostra tratada via aquecimento ôhmico.

A atividade residual normalizada de POD no último dia de armazenamento refrigerado foi de $1,5 \pm 0,3$ e $1,1 \pm 0,1$ para as amostras aquecidas convencionalmente e com aplicação de ultrassom, respectivamente. A análise estatística demonstrou que há diferença estatística entre a atividade residual de POD de ambos tratamentos. Dessa forma, pode-se dizer que o US foi efetivo em reduzir o tempo de tratamento térmico, permitindo um processamento mais conveniente do caldo de cana, uma vez que menores tempos de aquecimento permitem preservar mais as características nutricionais e sensoriais do produto. Portanto, há clara evidência da efetividade do tratamento ultrassônico em trazer maior estabilidade ao caldo de cana processado durante o armazenamento refrigerado ao longo do tempo, já que a atividade de POD foi significativamente menor no tratamento termossônico após o período de armazenamento. A provável causa das diferenças seja o já alegado efeito da cavitação sobre a estrutura da enzima.

Em estudo semelhante avaliando a aplicação de US em água de coco, Rojas et al. (2017) encontraram uma diferença de 30% no tempo de tratamento térmico para a primeira redução decimal a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ com o uso de US em pré-tratamento térmico, sugerindo que o US pode modificar agregados enzimáticos e reduzir o seu efeito protetor no processo de inativação térmica, ademais de diminuir o número de isoformas, com resistências equivalentes.

Os binômios temperatura/tempo sugeridos no presente estudo foram de $80\text{ }^{\circ}\text{C}/36\text{ min}$ para o tratamento convencional e $80\text{ }^{\circ}\text{C}/23\text{ min}$ para o tratamento ultrassônico. Silva; Faria (2006), em estudo comparativo entre diferentes formas de processamento, obtiveram esterilidade comercial utilizando como binômio $141\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ s}$ no tratamento térmico de caldo de cana produzido pelo sistema asséptico, e $110\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ s}$ no enchimento a quente. Esses valores servem apenas de parâmetro, pois o presente estudo não objetivou a esterilidade comercial, apenas a redução decimal.

5.4.2 Variação dos atributos de cor durante o armazenamento refrigerado

A Tabela 15 apresenta os parâmetros *CIELab* de cor do método durante o armazenamento do caldo de cana tratado de modo convencional e ultrassônico a 80 °C. Inicialmente, serão analisadas as diferenças entre os tratamentos, e, posteriormente, os valores nos tempos finais de armazenamento.

Tabela 15 – Parâmetros *CIELab* de cor para amostras tratadas de modo convencional e ultrassônico a 80 °C e armazenadas sob refrigeração.

Tratamento	Amostra	L^*	a^*	b^*	ΔE
CV	IN	30 ± 1^{ab}	$0,9 \pm 0,1^b$	$0,92 \pm 0,04^b$	-
	Dia 0	29 ± 1^{ab}	$0,5 \pm 0,1^b$	$1,7 \pm 0,9^b$	1,9
	Dia 1	27 ± 3^b	2 ± 1^{ab}	2 ± 1^{ab}	30,9
	Dia 8	32 ± 1^a	$3,0 \pm 0,3^a$	5 ± 1^a	12,6
	Dia 22	$32,8 \pm 0,5^a$	$3,0 \pm 0,4^a$	5 ± 1^a	16,7
	Dia 32	$31,6 \pm 0,6^{a,B}$	$2,2 \pm 0,8^{ab,A}$	$3 \pm 1^{ab,A}$	7,7
US	IN	27 ± 1^b	$1,0 \pm 0,1^a$	$1,4 \pm 0,2^b$	-
	Dia 0	32 ± 2^{ab}	$0,2 \pm 0,1^b$	$1,7 \pm 0,1^b$	4,5
	Dia 1	29 ± 3^{ab}	$0,5 \pm 0,2^b$	6 ± 3^a	4,8
	Dia 8	$33,1 \pm 0,1^a$	$0,38 \pm 0,02^b$	$1,8 \pm 0,1^b$	5,7
	Dia 22	$33,4 \pm 0,5^a$	$0,3 \pm 0,2^b$	$1,8 \pm 0,1^b$	6,0
	Dia 32	$33,4 \pm 0,2^{a,A}$	$0,3 \pm 0,2^{b,B}$	$1,6 \pm 0,1^{b,A}$	6,0

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

O espaço de cor L^* apresentou diferenças significativas, aumentando ao longo do tempo de armazenamento para os dois tratamentos, indicando aumento da luminosidade. O caldo tratado por termossonicação apresentou maior luminosidade ao fim do armazenamento, com diferença estatística em relação ao caldo tratado por método convencional. Frateschi et al. (2013) obtiveram valores de L^* que, embora oscilassem no armazenamento e independente da variação de O_2 nos diferentes tratamentos, foram menores do que os valores iniciais. Isso reforça que a diminuição da atividade enzimática proporciona maior luminosidade à medida em que diminui o amarronamento do caldo.

O espaço de cor a^* teve valores que aumentaram no tratamento convencional e diminuíram no tratamento ultrassônico, ambos com diferenças significativas, implicando em diferenças também entre os tratamentos após a conservação, tendo o caldo termossonicado menos coloração verde. Já o espaço de cor b^* teve picos entre o primeiro e o oitavo dia em ambos tratamentos, decrescendo posteriormente

ao longo do armazenamento. Apesar de chegar a valores baixos no final do armazenamento, esses foram maiores do que os iniciais, não diferindo, contudo, entre tratamentos.

A Figura 22 apresenta o aspecto do caldo de cana de ambos tratamentos ao fim do período total de armazenamento. Constata-se visualmente que há dois padrões visuais distintos de turbidez, sendo o líquido mais límpido e com mais depósito a amostra que sofreu o tratamento convencional. Embora o aspecto mais límpido possa parecer mais conveniente, torna o produto menos próximo ao padrão visual de costume, mais turvo. As observações visuais corroboram algumas das características analíticas. Esperava-se que o caldo tratado convencionalmente, por ter menos borras, tivesse a maior luminosidade, o que não se confirmou. Por outro lado, a maior presença de borras suspensas no caldo termossonicado, as quais têm um aspecto marrom-avermelhado, de fato tornou o caldo menos verde. Imaginava-se que a cavitação ocasionaria uma maior precipitação de borras devido à quebra de partículas de turbidez. Contudo, o ultrassom ocasionou a diminuição do tamanho das partículas de turbidez, além de liberar mais compostos nelas presentes, deixando-as menores, menos densas e, portanto, mais suspensas. É conveniente destacar que a diferença visual de turbidez era percebida desde o primeiro dia. Como consequência, o caldo termossonicado visualmente tem aspecto mais avermelhado do que o caldo tratado convencionalmente, que é mais amarelado.

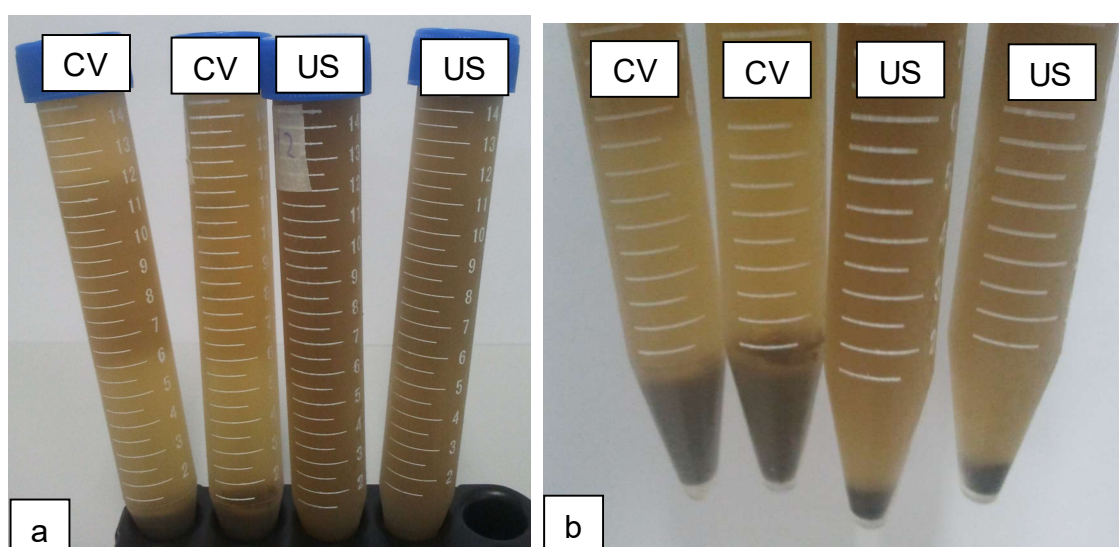


Figura 22 – Aspecto visual do caldo de cana tratado convencionalmente (CV) e tratado com ultrassom (US) ao final do período de armazenamento por refrigeração: a) turbidez do líquido e b) e precipitado de borras.

Tiwari et al. (2008) aplicaram a termossonicação em suco de laranja e obtiveram valores de turbidez que, embora não variassem linearmente com o aumento da potência de sonicação, foram em todos os casos maiores do que o do tratamento convencional, além de observarem menores valores de a^* e b^* . Dias et al. (2015), contudo, apontam que a precipitação parcial de partículas instáveis pode ter aumentado os valores de L^* em suco de graviola, uma vez que as partículas poderiam ser oxidadas a compostos de cor escura. Os autores também verificaram queda dos valores de a^* e b^* , valores de ΔE^* tanto maiores quanto maiores eram as potências de sonicação. Os mesmos atribuem a queda dos parâmetros de cor à cavitação e aos efeitos localizados de temperatura e pressão, indicando a sonicação como tratamento alternativo, uma vez que as diferenças analíticas não eram facilmente percebidas a olho nu.

Gani et al. (2016) obtiveram maior retenção de cor em morangos termossonicados, apesar de todos tratamentos terem apresentado queda de coloração. É importante salientar que a matriz de cor do morango difere muito em relação à cana, não sendo possível comparações diretas entre elas.

Embora os compostos fenólicos possam ser precursores de cor, não se pode afirmar que o maior teor observado no caldo termossonicado (resultado apresentado e discutido com mais detalhes a seguir) foi o responsável por alterações de cor. Isso porque os derivados coloridos dos compostos fenólicos geralmente possuem cor avermelhada, sendo que o valor de a^* diminuiu no tratamento com US e aumentou no convencional, oposto ao que se esperava se fossem correlacionados dados de compostos fenólicos e cor. Também não se pode atribuir qualquer diferença de cor à ação de enzimas oxidativas, uma vez que PFO, embora não analisada, foi claramente inativada em temperaturas e tempos menores aos aplicados nos tratamentos de regeneração enzimática. Além disso, a atividade da POD não diferiu significativamente entre os tratamentos, tendo uma redução de 90 % ao final do processamento.

Em relação aos valores de ΔE^* , a diferença de cor no tratamento convencional, embora inicie com menor valor, atinge valores substanciais no primeiro dia, diminuindo progressivamente até o fim do período de armazenamento. O caldo tratado convencionalmente, portanto, apresenta menos estabilidade no aspecto visual. Já o caldo tratado termossonicamente, embora apresente diferença de cor mais alta no início do armazenamento, mostra-se mais estável à diferença de

cor durante o restante do período, com tendência de baixo aumento até o fim da conservação. A presença do aspecto velado proporcionado pela turbidez do caldo termossonicado pode explicar o comportamento mais estável das diferenças de cor. Do mesmo modo, a maior propensão à sedimentação de borras no caldo tratado convencionalmente pode ser uma explicação para que sejam apresentadas diferenças de cor mais severas. Como a atividade enzimática não aumentou em qualquer tratamento, não se pode inferir que esse possa ter sido um dos motivos para a diferença de cor entre tratamentos.

5.4.3 Variação dos teores de compostos fenólicos totais durante o armazenamento refrigerado

A Tabela 16 apresenta os teores de compostos fenólicos totais das amostras tratadas convencionalmente e ultrassonicamente a 80 °C durante armazenamento sob refrigeração. A termossonicação propiciou o aumento significativo do teor de compostos fenólicos após o tratamento térmico, não observando-se diferença estatística do início ao fim do armazenamento refrigerado. O tratamento convencional, embora não tenha apresentado diferença estatística entre o caldo *in natura* e o caldo armazenado até o primeiro dia, apresentou decréscimo do segundo dia em diante, chegando ao fim do armazenamento com um teor de fenólicos significativamente menor.

Tabela 16 – Teores de compostos fenólicos totais (CFT) das amostras tratadas convencionalmente e ultrassonicamente a 80 °C durante armazenamento sob refrigeração.

Amostra	Compostos fenólicos totais (mg EAG·L ⁻¹)	
	CV	US
IN	516 ± 30 ^{ab}	384 ± 15 ^b
Dia 0	523 ± 4 ^a	466 ± 33 ^a
Dia 1	448 ± 55 ^{bc}	472 ± 19 ^a
Dia 8	418 ± 19 ^c	468 ± 24 ^a
Dia 14	404 ± 34 ^c	468 ± 26 ^a
Dia 18	437 ± 8 ^c	458 ± 23 ^a
Dia 32	429 ± 23 ^c	482 ± 4 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância. IN: *in natura*.

A Figura 23 apresenta a variação do teor de compostos fenólicos totais normalizado em função da amostra *in natura* para amostras tratadas de modo convencional e ultrassônico a 80 °C e armazenadas sob refrigeração. Para o

tratamento convencional, há decréscimo significativo do teor de compostos fenólicos já no primeiro dia, mantendo-se estável até o fim do armazenamento. Já no tratamento termossônico, não há diferença estatística de compostos fenólicos durante todo o período de armazenamento. Se comparados os caldos tratados por aquecimento convencional e termossônica durante todo período de armazenamento, o caldo termossônico apresenta maiores teores de compostos fenólicos, com diferença significativa. Essa observação permite avaliar como positiva a sonicação na obtenção de maiores teores de compostos fenólicos e na maior estabilidade dos mesmos ao longo do tempo de conservação.

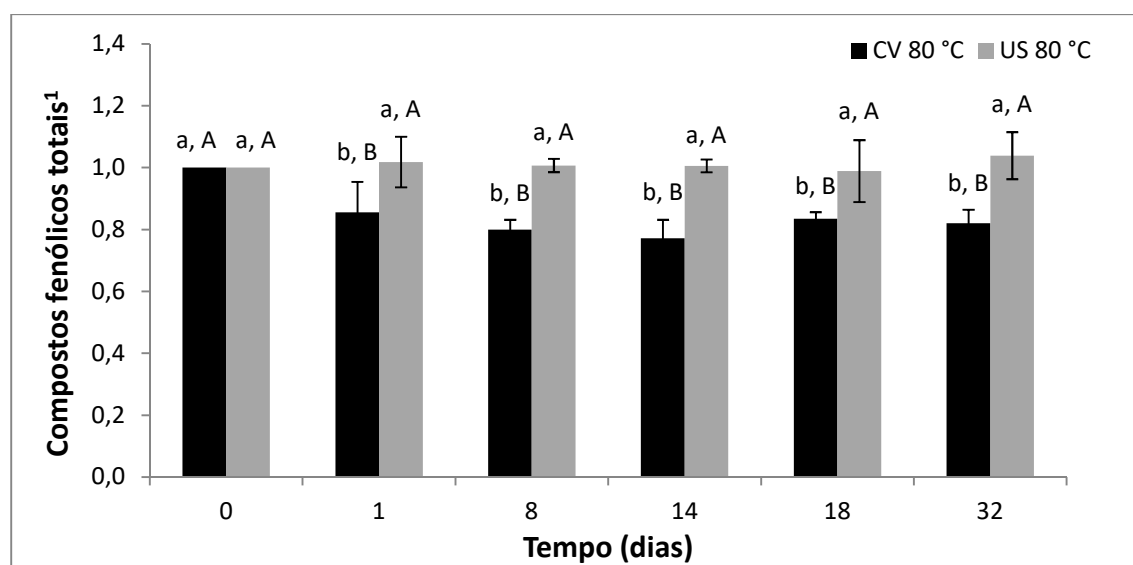


Figura 23 – Variação do teor de compostos fenólicos totais para amostras tratadas de modo convencional e ultrassônico a 80 °C e armazenadas sob refrigeração.

¹Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Médias com letras minúsculas iguais no mesmo tratamento e médias com letras maiúsculas iguais no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si ao nível de 10 % de significância.

Dias et al. (2015), analisando a influência da amplitude de sonicação (20, 30, 60, 90 e 100 %) e do tempo de tratamento (3 a 10 min) em suco de graviola, não observaram diferenças significativas no teor de compostos fenólicos em qualquer das combinações estudadas, apesar de verificarem queda dos teores em todos experimentos com US, e de obterem a melhor performance em tempo médio (6 min) e com a máxima intensidade de sonicação. Os autores atribuíram o fato à possível formação de radicais livres.

Hasan et al. (2014) identificaram queda de compostos fenólicos e antocianinas após tratamento ultrassônico e, de modo oposto, aumento de resveratrol em um estudo para produção de suco de uva enriquecido em resveratrol.

Os autores aduziram que a formação de peróxido de hidrogênio devido à aplicação de ultrassom degrada antocianinas, bem como provoca a ruptura da superfície da célula. Sobre a queda de CFT, sugeriram diversos mecanismos: oxidação e pirólise por radicais hidroxila, ruptura celular, aumento do pH pela degradação de ácido málico em resposta à respiração causada pela maior permeabilidade da membrana celular e pela produção de nitritos, nitratos e peróxido de hidrogênio, convertendo compostos fenólicos em quinonas não antioxidantes ou outros metabólitos intermediários. Os autores também atribuem o aumento de resveratrol ao estímulo da enzima resveratrol sintase, que controla o acúmulo do composto.

Saeeduddin et al. (2015) observaram queda de fenólicos totais e flavonoides totais em suco de pera tratado de modo convencional; para o tratamento ultrassônico reportaram um aumento a 25 °C e um decréscimo a 45 e 65 °C, atribuindo os resultados à alta sensibilidade dos compostos à temperatura. Todavia, os autores verificaram maior retenção de fenólicos com a termossonicação, apresentando o binômio 10 min/65 °C como alternativa eficaz de pasteurização. Os autores afirmam que as diferenças encontradas se devem aos efeitos não térmicos do US, e que o aumento do teor de compostos fenólicos pode ser devido à disrupção das paredes celulares como consequência da súbita mudança de pressão causada pela implosão de bolhas de cavitação, permanecendo as formas combinadas desses compostos no líquido.

Abid et al. (2014), em um estudo para avaliar diferentes temperaturas de termossonicação (20 a 60 °C) na melhoria de qualidade do suco de maçã, verificaram aumento de CFT e flavonoides totais em 20 °C, mas decréscimo nas demais temperaturas, atribuindo o fato ao comportamento termolábil dos fenólicos. Santhirasegaram et al. (2013) observaram queda de CFT nos experimentos com tratamento convencional e aumento naqueles termossonicados em suco de manga, atribuindo o aumento da concentração à reação do anel aromático de polifenóis com os radicais hidroxila gerados pela sonicação, aumentando a capacidade antioxidante, bem como à ativa remoção do O₂ ocluso.

Illera et al. (2018), ao avaliarem o conteúdo de CFT em suco de maçã termossonicado, identificaram leve acréscimo nos teores de fenólicos, em relação ao tratamento convencional, com diferenças significativas nas maiores temperaturas estudadas, 60 e 67 °C, quando assistidas de saturação por N₂. Os autores atribuíram o aumento à maior disrupção das paredes celulares, que pode levar à

liberação de compostos fenólicos ligados quimicamente.

Gani et al. (2016) avaliaram a influência de US na conservação de morangos e obtiveram aumento dos compostos fenólicos totais com aplicação do US, sendo esse aumento maior quanto maior tempo de sonicação até o limite de 60 min, quando houve diminuição de CFT, creditada, pelos autores, à excessiva cavitação. Segundo os autores, o aumento da concentração com o aumento do tempo de sonicação deve-se à quebra das paredes celulares pela cavitação, com melhor dissolução de compostos polifenólicos, de modo que um efeito sinérgico entre sonicação, temperatura e tempo proporcionou um aumento da extratibilidade de fenóis totais.

Tomadoni et al. (2016), em estudo de conservação de suco de morango tratado por termossonicação, verificaram um aumento de compostos fenólicos durante o armazenamento tanto no suco tratado quanto no suco *in natura*, argumentando que a causa poderia ser a senescência e decomposição da estrutura celular e a consequente liberação de ácidos fenólicos livres e aminoácidos livres, provocando o aumento de polifenóis no suco não tratado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a aplicação de tratamentos térmicos assistidos por ultrassom na inativação de enzimas oxidativas em caldo de cana. Para tanto, foram estabelecidas condições isotérmicas e diversas temperaturas e parâmetros de operação foram avaliados. O estudo dividiu-se em três partes. Inicialmente, foram realizados os estudos prévios de inativação enzimática em diferentes temperaturas, com parâmetros fixos pré-determinados. Os dados foram analisados e modelados cineticamente, de modo a permitir a continuidade da pesquisa. A etapa seguinte constou de experimentos de otimização, fixando-se a temperatura e variando os parâmetros de sonicação. Nessa etapa, os melhores parâmetros foram determinados, servindo de base para o estudo da avaliação da regeneração enzimática durante armazenamento sob refrigeração, que consistiu na terceira etapa do trabalho. Nos próximos parágrafos, serão detalhadas as considerações finais e indicadas as necessidades e possibilidades de continuidade do estudo.

Foram utilizados, ao todo, três diferentes lotes de caldo de cana. A caracterização de cada lote permitiu verificar que há considerável variabilidade da cana-de-açúcar frente a diferentes situações climáticas. Os teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais demonstraram ser os parâmetros que menos tiveram influência da época de colheita. O pH variou em função da época de colheita, porém de forma menos atrelada à diminuição de acidez de períodos quentes, parecendo estar mais dependente da nutrição mineral da planta. Os sólidos solúveis foram previsivelmente mais abundantes na colheita de verão. A atividade de água pareceu ser inversa à pressão osmótica exercida pelo maior acúmulo de açúcares, ao passo que a condutividade elétrica foi menor em maior concentração de carboidratos, acompanhando a tendência de variação do pH. A cor variou bastante, quase sempre exibindo média luminosidade, cor verde ou ligeiramente avermelhada e amarela, variando sem uma tendência clara. A atividade enzimática de PFO e POD variou consideravelmente, com tendência a haver maior atividade em menor disponibilidade hídrica da lavoura. Dessa forma, tanto a alta atividade de enzimas oxidativas quanto a variação desse produto agrícola impõem necessidade industrial de estabilização do produto e de padronização ou enaltecimento da

variação de lote a lote devido a questões sazonais.

A análise dos efeitos da sonicação na inativação de PFO foi limitada devido à baixa resistência térmica dessa enzima. Observou-se uma alta inativação na rampa de aquecimento nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C, impedindo uma avaliação correta da atividade enzimática residual na fase isotérmica do tratamento ultrassônico. Com a adoção de novos parâmetros, em 15 minutos cerca de 85 % da enzima foi inativada, sem diferença estatística entre tratamentos, o que fez do US um tratamento não efetivo na diminuição de PFO.

A atividade residual de POD nas diferentes temperaturas testadas, no entanto, apresentou perfis diferenciados. Nas temperaturas mais baixas, foi possível verificar pontos de ativação enzimática, sobretudo a 50 °C, temperatura na qual sequer existiu condições para modelagem cinética. No entanto, para 70 e 80 °C, a inativação foi notória desde o começo do tratamento. As maiores diferenças entre tratamentos convencional e com US foram observadas nas menores temperaturas, devido aos efeitos não térmicos e à menor influência da inativação térmica. O ultrassom, portanto, promoveu uma maior taxa de inativação de POD.

O modelo matemático de Weibull apresentou os melhores ajustes para a cinética de inativação da PFO e POD, obtendo os melhores índices estatísticos e predizendo a atividade enzimática de forma satisfatória na maioria dos experimentos.

A variação de regime de pulsos não apresentou diferenças estatísticas significativas entre nenhum dos tratamentos de sonicação; contudo, todos os tratamentos de termossonicação diferiram do tratamento convencional. O regime de pulsos otimiza o uso de energia e limita os efeitos de aquecimento, sendo efetivo e vantajoso.

A variação da potência trouxe aumento de inativação enzimática sem relação direta com o aumento da amplitude. O tratamento de potência intermediária, 75 %, foi o único com diferença significativa em relação ao tratamento convencional. Além de boa performance energética, a potência reduzida mitiga os efeitos de aquecimento localizado, evita corrosão da sonda, sendo efetiva para a diminuição da atividade enzimática.

A aplicação de sonicação somente nos 5 primeiros minutos de tratamento não se mostrou uma alternativa efetiva, com uma atividade residual ao final do processo maior do que a observada no tratamento convencional.

De forma geral, a regeneração de POD durante armazenamento refrigerado foi baixa, contudo significativamente menor no tratamento termossônico. O uso de US foi eficaz na redução do tempo de tratamento, pois a uma mesma temperatura, diminuiu-se o processamento em cerca de 1/3 do tempo do tratamento convencional, contudo sem afetar a taxa de regeneração da enzima após o processamento.

Os parâmetros do espaço de cor *CIELab* apresentaram variabilidade aleatória durante os tratamentos térmicos. No tempo final, todas temperaturas apresentaram diferenças de cor visíveis a olho nu. Os parâmetros L^* , a^* e b^* variaram sem necessariamente apresentar correlação com variações de temperatura, tempo e método de tratamento. Em todos os casos, o aspecto do caldo apresentou tons acinzentados e variou entre verde e levemente vermelho, sendo sempre amarelo. Os caldos tratados por termossonicação tenderam ao tom avermelhado, o que pode ser justificado pela maior homogeneização de borras e sedimentos de cor amarronzada, podendo ainda a geração de radicais livres ter contribuído para o escurecimento do caldo.

O tratamento ultrassônico permitiu melhor luminosidade do caldo ao longo do armazenamento, diminuindo o escurecimento enzimático, apesar de diminuir a coloração verde e aumentar a coloração amarela, fato também observado no processo convencional. O caldo sonicado apresentou turbidez semelhante ao caldo *in natura*, com partículas em suspensão. A percepção de diferença de cor, embora perceptível em ambos tratamentos, foi mais sutil na termossonicação.

Em relação ao teor de compostos fenólicos totais, apenas a termossonicação manteve níveis de fenólicos sem diferenças estatísticas em relação ao caldo *in natura*, mantendo constantes os teores ao longo do tempo de armazenamento, creditando-se o motivo à cavitação, que permite extrair mais compostos fenólicos, compensando as perdas por ação térmica.

A partir do presente estudo, pode-se concluir que a aplicação de ultrassom contribui para o aumento da inativação enzimática em caldo de cana, devendo ser aplicado em combinação com o calor, diminuindo o tempo ou a temperatura de processamento. A diminuição da severidade do tratamento térmico permite maior preservação de aspecto visual do produto e uma maior manutenção dos compostos fenólicos, cabendo uma determinação cuidadosa e específica de parâmetros de operação para que se obtenham os melhores resultados para cada situação.

A falta de maior detalhamento de parâmetros analíticos e de clara caracterização do caldo de cana na legislação brasileira pode ser beneficiada por ampla pesquisa que vise a compreender a grande variação dessa matéria-prima e originar intervalos de confiança condizentes com a realidade e mais em sintonia com a bebida, que se difere muito de sucos de frutas, sendo subsídio para possíveis fixações de Padrões de Identidade e Qualidade pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

São especialmente úteis mais estudos testando outras condições de tratamento ultrassônico em processamento de caldo de cana, dada a grande variabilidade da matéria-prima, a ocorrência de desvios analíticos importantes e a grande diversidade em resultados de diferentes estudos. A realização de um estudo de custos adequado para avaliar a viabilidade de implantação da tecnologia também se faz necessária. A influência da sonicação em outras características nutricionais do caldo de cana, como vitaminas e compostos nitrogenados, pode fornecer subsídios para aumentar o valor agregado de produtos processados com ultrassonicação.

Estudos de análise sensorial do caldo processado em diferentes condições podem indicar se o caldo tratado termossonicamente mantém os bons atributos do caldo fresco e não adquire atributos indesejáveis. Do mesmo modo, testes junto ao mercado consumidor, sejam de aceitação, sejam de preferência, podem fornecer dados importantes sobre a aceitação dos produtos processados por US frente aos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ABID, M.; JABBAR, S.; HU, B.; et al. Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 984–990, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.12.003>>.
- ABREU, M. L.; SILVA, M. DE A.; TEODORO, I.; DE HOLANDA, L. A.; NETO, G. D. S. Crescimento e produtividade de cana-de-açúcar em função da disponibilidade hídrica dos Tabuleiros Costeiros de Alagoas. **Bragantia**, 2013.
- ALBA, J. M. F.; FLORES, C. A. **ZONEAMENTO EDÁFICO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA O ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**. Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2013.
- ANAYA-ESPARZA, L. M.; VELÁZQUEZ-ESTRADA, R. M.; SAYAGO-AYERDI, S. G.; et al. Effect of thermosonication on polyphenol oxidase inactivation and quality parameters of sour sop nectar. , v. 75, 2017.
- AUGUSTO, P. E. D.; IBARZ, R.; GARVÍN, A.; IBARZ, A. Peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) photo-inactivation in a coconut water model solution using ultraviolet (UV). **Food Research International**, v. 74, p. 151–159, 2015.
- BAGATINI, E.; BROCHIER, B.; MERCALI, G. D.; MARCZAK, L. D. F. Avaliação da aplicação de aquecimento ôhmico na inativação enzimática de peroxidase de caldo de cana e seu efeito na regeneração. 6º Simpósio de Segurança Alimentar. **Anais...** . p.1–6, 2018. Gramado: SBCTA-RS.
- BRITO, C. A. K. DE; SATO, H. H.; SPIRONELLO, A.; SIQUEIRA, W. J. CARACTERÍSTICAS DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE DE ABACAXIS (*Ananas comosus* (L.) Merrill) DA CULTIVAR IAC GOMO-DE-MEL E DO CLONE IAC-1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 244–249, 2005.
- BROCHIER, B. **Efeito do campo elétrico na inativação de enzimas do caldo de cana durante aquecimento ôhmico**. 2018. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BROCHIER, B.; MERCALI, G. D.; MARCZAK, L. D. F. Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. **LWT - Food Science and Technology**, 2016.
- BROCHIER, B.; MERCALI, G. D.; MARCZAK, L. D. F. Effect of ohmic heating parameters on peroxidase inactivation, phenolic compounds degradation and color changes of sugarcane juice. **Food and Bioprocess Processing**, v. 111, p. 62–71, 2018. Institution of Chemical Engineers. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.07.003>>.
- CAO, S.; HU, Z.; PANG, B.; et al. Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. **Food Control**, 2010.
- CARVALHO, J. O.; ORLANDA, J. F. F. Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. **Food Chemistry**, v. 233, p. 159–163, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.101>>.
- CESAR, M. A. A.; SILVA, F. C. DA. Processamento e produção de açúcar mascavo, rapadura e melado de cana-de-açúcar. **PEQUENAS INDUSTRIAS RURAIS DA CANA-DE-AÇÚCAR**. p.53–83, 2003. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica.

- CHISARI, M.; BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007.
- CLERICI, M.T.P.S.; SEBASTIÃO, R.H.; OLIVEIRA, L.C.; SANTO S, M.S.; MORAES, A.N.L.; CLARETO, S.S.. Escurecimento enzimático: uma aula prática. *Revista de Ensino de Bioquímica*, v. 2, n.2, 71-90, 2014.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perfil do Setor do Açúcar e do Etanol no Brasil. Edição para a safra 2015/16**. Brasília: CONAB, 2019.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Série histórica das safras**. Brasília: CONAB, 2020. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>>. Acesso em: 28/3/2020.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perfil do Setor do Açúcar e do Etanol no Brasil. Edição para a safra 2014/15**. Brasília: CONAB, 2017.
- DIAS, D. DA R. C.; BARRO, Z. M. P.; CARVALHO, C. B. O. DE; et al. Effect of sonication on soursop juice quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 883–889, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.043>>.
- FARAONI, A.S. **Efeito do tratamento térmico, do congelamento e da embalagem sobre o armazenamento da polpa de manga orgânica (*Mangifera indica*) cv. 'Ubá'**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- FEIX, R. D.; LEUSIN JÚNIOR, S.; AGRANONIK, C. **Painel do Agronegócio no Rio Grande do Sul — 2017**. Porto Alegre, 2017.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT - Statistics Division. Sugar cane production in 2018**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>.
- FRATESCHI, C. S.; DURIGAN, J. F.; MARQUES, M. M.; HOJO, E. T. D.; SANTOS, L. O. CUNHA JUNIOR, L. C.; TEIXEIRA, G. H. A. Storage of sugarcane stalks (*Saccharum officinarum* cv. SP 79-1011) in low oxygen atmospheres and the effects on enzymatic browning. **Postharvest Biology and Technology**, 2013.
- GANI, ADIL; BABA, W. N.; AHMAD, M.; et al. LWT - Food Science and Technology Effect of ultrasound treatment on physico-chemical , nutraceutical and microbial quality of strawberry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 496–502, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.067>> . .
- GARUD, S. R.; PRIYANKA, B. S.; NEGI, P. S.; RASTOGI, N. K. Effect of Thermosonication on Bacterial Count in Artificially Inoculated Model System and Natural Microflora of Sugarcane Juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2017.
- HASAN, M.; YUN, H.; KWAK, E.; BAEK, K. Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 21, n. 2, p. 729–734, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.008>>.
- HAVSTEEN, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, 96, 67e202.
- HORII, J. A cana-de-açúcar como matéria-prima. **Visão Agrícola**, v. 1, p. 88–90, 2004a.
- HORII, J. A qualidade da matéria-prima, na visão industrial. **Visão Agrícola**, v. 1, p. 91–93, 2004b.
- HUANG, H. W.; CHANG, Y. H.; WANG, C. Y. High Pressure Pasteurization of Sugarcane Juice: Evaluation of Microbiological Shelf Life and Quality Evolution

- During Refrigerated Storage. **Food and Bioprocess Technology**, 2015.
- ILLERA, A. E.; SANZ, M. T.; BENITO-ROMÁN, O.; et al. Effect of thermosonication batch treatment on enzyme inactivation kinetics and other quality parameters of cloudy apple juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, n. February, p. 71–80, 2018.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON ILLUMINATION. **Colorimetry**. Commission Internationale de l'Eclairage, 2004.
- JABBAR, S.; ABID, M.; HU, B.; et al. Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 16–21, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.007>>.
- JEANDET, P.; HÉBRARD, C.; DEVILLE, M. A.; et al. Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. **Molecules**, 5. nov. 2014. MDPI AG.
- JERMANN, C.; KOUTCHMA, T.; MARGAS, E.; LEADLEY, C.; ROS-POLSKI, V. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2015.
- KAYALVIZHI, V.; PUSHPA, A. J. S.; SANGEETHA, G.; ANTONY, U. Effect of pulsed electric field (PEF) treatment on sugarcane juice. **Journal of Food Science and Technology**, 2016.
- KNORR, D.; FROEHLING, A.; JAEGER, H.; et al. Emerging Technologies in Food Processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 203–235, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.food.102308.124129>>.
- LI, X.; FARID, M. A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. **Journal of Food Engineering**, 2016.
- LUI, J. J.; FIDELIS, R. R.; DIAS, M. A. R.; SARMENTO, R. A. Produtividade de rapadura de genótipos de cana-de-açúcar na Região de Dueré, Sul de Tocantins. **Semina: Ciências Agrárias**, 2011.
- MALUF, J. R. T.; WESTPHALEN, S. L.; MATZENAUER, R.; MALUF, D. E. **Boletim Fepagro nº 18: Zoneamento Agroecológico atualizado para a cultura da cana-de-açúcar no Estado do Rio Grande do Sul, visando à produção de açúcar e álcool**. 18º ed. Porto Alegre: FEPAGRO, 2008.
- MANZATTO, C. V.; ASSAD, E. D.; BACCA, J. F. M.; ZARONI, M. J.; PEREIRA, S. E. M. **Zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar. Expandir a produção, preservar a vida, garantir o futuro**. Rio de Janeiro, 2009.
- MARIN, F. R.; PELLEGRINO, G. Q.; ASSAD, E. D.; PINTO, H. S.; ZULLO JUNIOR, J. CANA-DE-AÇÚCAR. In: J. E. B. A. Monteiro (Org.); **Agrometeorologia dos Cultivos: O fator meteorológico na produção agrícola**. p.109–130, 2009. Brasília: INMET.
- MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. 1º ed. Nova Iorque: Academic Press, 1982.
- MARQUES, J.; DINIZ, G.; PRESTES, S. D.; VARONE, F.; SIMONETTI, C. **BOLETIM CLIMÁTICO – OUTUBRO-NOVEMBRO-DEZEMBRO (2019)**. Pelotas, 2019.
- MARQUES, T. A.; RAMPAZO, É. M.; MARQUES, P. A. A. Oxidative enzymes activity in sugarcane juice as a function of the planting system. **Food Science and Technology (Campinas)**, 2013.
- MATSUOKA, S.; ANTONIO, J.; GRANBIO, B.; MACCHERONI, W. Bioenergia de Cana. In: F. Santos; A. Borém; C. Caldas (Orgs.); **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol: tecnologias e perspectivas**. 2. ed. rev. ampl. ed., p.547–577,

2012. Porto Alegre: Mecenaz. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/302932714>>.
- MESNIER, Xavier et al. Heat and light colour stability of beverages coloured with a natural carotene emulsion: Effect of synthetic versus natural water soluble antioxidants. *Food Research International*, [s. l.], v. 65, n. PB, p. 149–155, 2014.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.; SECRETARIA DE POLÍTICA AGRÍCOLA. **PORTARIA Nº 45, DE 30 DE ABRIL DE 2018. Aprova o Zoneamento Agrícola de Risco Climático para a cultura de cana-de-açúcar, em regime de sequeiro, no Estado do Rio Grande do Sul.** 2018.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>>. Acesso em: 27/6/2020.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. CULTIVARWEB GERENCIAMENTO DE INFORMAÇÃO. Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 8/6/2018.
- MOURA, C. L. A. DE; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. **Determinação da Atividade de Invertase em Extratos Enzimáticos.** Fortaleza, 2007.
- PEREIRA, R. N.; VICENTE, A. A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, v. 43, n. 7, p. 1936–1943, 2010.
- PRATI, P.; CAMARGO, G. A. CARACTERÍSTICAS DO CALDO DE CANA E SUA INFLUÊNCIA NA ESTABILIDADE DA BEBIDA. *BioEng*, , n. 21, p. 37–44, 2008.
- RASO, J.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, n. 3, p. 265–285, 2003.
- REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 37, DE 1º DE OUTUBRO DE 2018.** Estabelece os parâmetros analíticos de suco e de polpa de frutas e demais quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade já fixados pelo Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da IN MAPA Nº 49, de 26 de setembro de 2018, para suco de fruta e polpa de fruta.
- REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. **DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.** 2009.
- REZZADORI, K.; PETRUS, R. R.; BENEDETTI, S.; CARMINATTI, C. A.; PETRUS, J. C. C. Effects of tangential microfiltration and pasteurisation on the rheological, microbiological, physico-chemical and sensory characteristics of sugar cane juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 2013.
- ROJAS, M. L.; TREVILIN, J. H.; ESTEVES, P.; AUGUSTO, D. The ultrasound technology for modifying enzyme activity. *Scientia Agropecuaria*, v. 7, n. 2, p. 145–150, 2016.
- ROJAS, M. L.; TREVILIN, J. H.; FUNCIA, E. DOS S.; GUT, J. A. W.; AUGUSTO, P. E. D. Using ultrasound technology for the inactivation and thermal sensitization of peroxidase in green coconut water. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 36, p. 173–181, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.028>>.
- SAEEDUDDIN, M.; ABID, M.; JABBAR, S.; et al. Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *LWT - Food*

- Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 452–458, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.005>>.
- SALOMÃO, B. C. M.; CHUREY, J. J.; ARAGÃO, G. M. F.; WOROBO, R. W. Modeling *Penicillium expansum* resistance to thermal and chlorine treatments. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 12, p. 2618–2622, 2009. International Association for Food Protection.
- SANT'ANNA, V.; GURAK, P. D.; FERREIRA MARCZAK, L. D.; TESSARO, I. C. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. **Dyes and Pigments**, 2013.
- SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; SOMASUNDRAM, C. Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1276–1282, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.005>>.
- SANTOS, R. C. DOS. Enfoques Tecnológicos na Produção do Açúcar Mascavo, Melado e Rapadura em Propriedades Rurais de Agricultores Familiares. In: Silva S; Montero C; Santos R; et al. (Orgs.); **Sistema de Produção da Cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul**. p.151–205, 2016. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado.
- SAXENA, J.; AHMAD MAKROO, H.; SRIVASTAVA, B. Effect of ohmic heating on Polyphenol Oxidase (PPO) inactivation and color change in sugarcane juice. **Journal of Food Process Engineering**, 2017.
- SAXENA, J.; MAKROO, H. A.; SRIVASTAVA, B. Optimization of time-electric field combination for PPO inactivation in sugarcane juice by ohmic heating and its shelf life assessment. **LWT - Food Science and Technology**, 2016.
- SIDDIQ, M.; DOLAN, K. D. Characterization and heat inactivation kinetics of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Food Chemistry**, v. 218, p. 216–220, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.061>>.
- SILVA, P. B. DA; UCHÔA, S. B. B.; TONHOLO, J.; et al. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DAS CULTIVARES DE CANA-DE-AÇUCAR DA REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO-RIDESA. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 2, p. 208–218, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.9771/S.CPROSP.2013.002.024>>.
- SILVA, SÉRGIO DELMAR DOS ANJOS E. Sistema de produção de cana-de-açúcar para agricultura familiar do RS. In: L. F. Wolff; C. A. B. Medeiros (Orgs.); **Alternativas para a Diversificação da Agricultura Familiar de Base Ecológica - 2016**. p.53–63, 2016a. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado.
- SILVA, SÉRGIO DELMAR DOS ANJOS E. Introdução e Importância Econômica da Cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. In: Silva S; Montero C; Santos R; et al. (Orgs.); **Sistema de Produção da Cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul**. p.17–18, 2016b. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado.
- SILVA, S. D. DOS A. E.; NAVA, D. E.; MONTERO, C. R. S.; STURZA, V. S. Sistema de produção de cana-de-açúcar para agricultura familiar. In: L. F. Wolff; C. A. B. Medeiros (Orgs.); **Alternativas para a Diversificação da Agricultura Familiar de Base Ecológica - 2017**. p.47–55, 2017. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado.
- SILVA, S. D. DOS A. E.; VERÍSSIMO, M. Á. A.; HÄRTER, A.; et al. Variedades de Cana-de-açúcar Recomendadas para o Rio Grande do Sul. In: S. D. dos A. Silva; Cândida Raquel Scherrer Montero; R. C. dos Santos; et al. (Orgs.); **Sistema de Produção da Cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul**. p.113–131, 2016. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado.

- SILVA, K. S.; FARIA, J. A. F. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE CALDO DE CANA ENVASADO A QUENTE E POR SISTEMA ASSÉPTICO 1. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 26, n. 4, p. 754–758, 2006.
- SOARES, F. U.; PRANKE, L. V.; BARCELLOS JR, J. T.; ZARNOTT, D. H.; ALBA, J. M. F. SITUAÇÃO SOCIOECONÔMICA DA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR. In: J. M. F. ALBA; C. A. FLORES (Orgs.); **ZONEAMENTO EDÁFICO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA O ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**. p.3–5, 2013. Brasília: Embrapa Clima Temperado.
- SOUZA, C. M. DE; BRAGANÇA, M. DA G. L. **Processamento artesanal da cana de açúcar: Rapadura**. 1999a.
- SOUZA, C. M. DE; BRAGANÇA, M. DA G. L. **Processamento artesanal da cana de açúcar: Melado**. 1999b.
- TARANTO, F.; PASQUALONE, A.; MANGINI, G.; et al. Polyphenol oxidases in crops: Biochemical, physiological and genetic aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, 10. fev. 2017. MDPI AG.
- TIWARI, B. K.; DONNELL, C. P. O.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; CULLEN, P. J. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 700–704, 2009. Swiss Society of Food Science and Technology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.009>>.
- TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, 2008.
- THO P, MANASSEH R, OOI A. Cavitation microstreaming patterns in single and multiple bubble systems. **Journal of fluid mechanics**, v. 576, p. 191 -233, 2007.
- TOMADONI, B.; CASSANI, L.; PONCE, A.; MOREIRA, M. R.; AGÜERO, M. V. Optimization of ultrasound , vanillin and pomegranate extract treatment for shelf-stable unpasteurized strawberry juice. , v. 72, p. 475–484, 2016.
- WEIBULL, W. Statistical Distribution Function of Wide Applicability. **Journal of applied mechanics**, v. 103, p. 293–297, 1951.
- WHITAKER, J. R. Enzymes. In: O. R. Fennema (Org.); **Food Chemistry**. 3^o ed, p.432–616, 1996. Nova Iorque: Marcel Dekker.
- YARIV, I.; LIPOVSKY, A.; GEDANKEN, A.; LUBART, R.; FIXLER, D. Enhanced pharmacological activity of vitamin B12 and penicillin as nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3593–3601, 2015. Dove Medical Press Ltd.
- ZAMBON, J. J.; ARAÚJO, L. E. DE. Produção de Açúcar Mascavo e Rapadura a partir do processamento da cana-de-açúcar como alternativa de renda para a agricultura familiar. **Cadernos PDE**, v. II, p. 17–30, 2014.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 1999.