



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Avaliação da aplicação de aquecimento ôhmico na inativação enzimática e seu efeito no armazenamento de caldo de cana

Autor: Evandro Bagatini

Orientadora: Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadora: Bethania Brochier

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Bethania e Ligia, pelo auxílio e dedicação incansáveis para que este trabalho desse certo.

Aos bolsistas de iniciação científica, Giorgio e Andressa, por sempre estarem presentes e dispostos a ajudar.

A todos os demais componentes do LATEPA, por serem solícitos e animarem os dias no laboratório.

À minha família e ao meu namorado, pelo amor incondicional e pela compreensão e apoio ao longo dessa caminhada.

Aos meus amigos, por me ouvirem quando o estresse transbordava e por me motivarem a seguir em frente.

Aos professores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por compartilharem seu conhecimento, sendo fundamentais para a chegada deste momento.

Resumo

Tratamentos térmicos são os métodos mais utilizados na indústria alimentícia para promover a conservação de alimentos. O tratamento térmico convencional consiste no contato do produto com superfícies aquecidas por água ou vapor; esse método tem como grande problema a falta de uniformidade no aquecimento, podendo levar à perda de nutrientes e propriedades organolépticas devido ao superaquecimento localizado. Com o intuito de reduzir estes problemas, novas tecnologias para a conservação de alimentos vêm sendo estudadas e, entre elas, destaca-se o aquecimento ôhmico, que se baseia na passagem de corrente elétrica alternada no alimento, gerando calor de maneira uniforme por efeito Joule. No presente trabalho, foi avaliada a utilização do aquecimento ôhmico na inativação de peroxidase do caldo de cana e a regeneração da atividade enzimática ao longo do armazenamento do caldo tratado por 14 dias. Também foi realizado o estudo da cinética de inativação da enzima durante o processamento. Os experimentos tiveram uma duração de 30 min e foram realizados a 70 e 80 °C com tensões de 50 e 100 V, além de ensaios com aquecimento convencional para cada temperatura. Os ensaios executados a 70 °C não foram eficientes na inativação enzimática. Contudo, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento convencional e o aquecimento ôhmico a 100 V, com aproximadamente 25 e 40% de inativação, respectivamente. Com 80 °C conseguiu-se até 90% de inativação, mas sem diferença entre os métodos. O estudo cinético realizado com os dados obtidos demonstrou que o modelo de distribuição de Weibull é o que melhor se ajusta à cinética de inativação de peroxidase do caldo de cana nas condições estudadas. Em relação à regeneração da atividade enzimática residual durante o armazenamento refrigerado, para 70 °C não houve diferença entre os métodos aplicados. Já para 80 °C, as amostras tratadas com aquecimento ôhmico não apresentaram regeneração, ao contrário do método convencional, que apresentou até 80% de aumento da atividade. Por fim, conclui-se que, do ponto de vista da atividade de peroxidase, o tratamento com aquecimento ôhmico por 30 min a 80 °C apresenta-se como uma boa alternativa para o processamento de caldo de cana, que poderá ser consumido em até 14 dias.

Palavras-chave: aquecimento ôhmico, caldo de cana, peroxidase, inativação, cinética, regeneração, tratamentos térmicos.

Sumário

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Sumário	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
Lista de Símbolos	viii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 Cana-de-açúcar	2
2.2 Caldo de cana	3
2.3 Métodos de Tratamento Térmico	5
2.3.1 Método Convencional	5
2.3.2 Aquecimento Ôhmico	6
3 Materiais e Métodos	10
3.1 Caldo de Cana	10
3.2 Caracterização do Caldo	10
3.3 Aquecimento Ôhmico e Convencional	11
3.4 Análise de atividade enzimática	15
3.5 Cinética de inativação	16
3.6 Análise de Cor	17
3.7 Análise estatística	18
4 Resultados e Discussão	20
4.1 Caracterização do caldo de cana	20
4.2 Atividade residual de POD durante o tratamento	20
4.3 Atividade residual de POD durante o armazenamento	26
4.4 Análise de Cor	31
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	32
6 Referências	33

Lista de Figuras

Figura 2.1: Colmos da cana-de-açúcar.	2
Figura 2.2: Diagrama esquemático ilustrando o princípio do aquecimento ôhmico.	7
Figura 3.1: Diagrama esquemático do sistema de aquecimento ôhmico	11
Figura 3.2: Vista superior da célula ôhmica localizando os eletrodos e os termopares T1 e T3.	11
Figura 3.3: Interface gráfica do software de aquisição de dados.	12
Figura 3.4: Sistema de troca de banhos, onde: BP são os <i>by-pass</i> , E as entradas e S as saídas. Adaptado de GRINGS, 2016.	13
Figura 3.5: Sistema de aquecimento ôhmico do LATEPA.	13
Figura 3.6: Esfera CIELab.	18
Figura 4.1: Evolução da temperatura durante os experimentos via aquecimento convencional e ôhmico do caldo de cana.	21
Figura 4.2: Atividade residual de POD ao longo do tempo durante aquecimento ôhmico e convencional.	22
Figura 4.3: Valores de atividade residual experimentais e previstos para inativação de POD de caldo de cana.	25
Figura 4.4: Paridade entre dados experimentais e previstos para inativação de POD de caldo de cana.	25
Figura 4.5: Atividade residual de POD durante o armazenamento após tratamento a 70 °C por 15 min.	27
Figura 4.6: Atividade residual de POD durante o armazenamento após tratamento a 70 °C por 30 min.	28
Figura 4.7: Atividade residual de POD durante o armazenamento após tratamento a 80 °C por 15 min.	29
Figura 4.8: Atividade residual de POD durante o armazenamento após tratamento a 80 °C por 30 min.	30
Figura 4.9: Diferença total de cor ao longo dos tratamentos convencional e ôhmico.	31

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Composição centesimal do caldo de cana <i>in natura</i>	3
Tabela 3.1: Condições experimentais e de operação do Banho 2.....	15
Tabela 3.2: Modelos cinéticos usados para analisar a inativação da peroxidase.	16
Tabela 4.1: Caracterização do caldo de cana <i>in natura</i>	20
Tabela 4.2: Parâmetros estatísticos dos modelos cinéticos descrevendo a inativação de POD durante aquecimento ôhmico e convencional (70-80 °C).	23
Tabela 4.3: Coeficientes do modelo de distribuição de Weibull.....	24

Lista de Abreviaturas e Siglas

CD - dicroísmo circular

CH - conventional heating

DEQUI - Departamento de Engenharia Química

HTST - high temperature, short time

LATEPA - Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos

LTLT - low temperature, long time

POD - peroxidase

PPO - polifenoloxidase

RMSE - raiz do erro médio quadrático (*root mean square error*)

UHT - ultra high temperature

WD - Weibull Distribution

Lista de Símbolos

$\alpha_{experimental}$ atividade enzimática residual experimental

$\alpha_{prevista}$ atividade enzimática residual prevista

σ condutividade elétrica ($S.m^{-1}$)

χ^2 distribuição qui-quadrado

A atividade enzimática

A_0 atividade enzimática inicial

A/A_0 atividade enzimática residual

ΔA área dos eletrodos (m^2)

$\Delta abs/min$ absorvância por minuto

a^* parâmetro de cor, entre o verde e o vermelho

b^* parâmetro de cor, entre o azul e o amarelo

C^*_{ab} croma

E campo elétrico gerado no interior do alimento na direção z ($V.cm^{-1}$)

ΔE^* diferença total de cor

h_{ab} ângulo de tonalidade, *hue*

k constante da taxa de degradação

L^* parâmetro de cor, luminosidade

n número de observações

ΔP taxa de calor gerado (W)

ΔR resistência elétrica (Ω)

R^2 coeficiente de determinação

rpm rotação por minuto

t tempo (s) ou (min)

T temperatura (°C) ou (K)

ΔU diferença de potencial (V)

ΔV volume (m³)

Δz distância entre os eletrodos (m)

1 Introdução

O consumo do caldo de cana é muito apreciado em diversas partes do mundo, sendo considerado uma bebida energética e nutritiva; suas propriedades o tornam, contudo, um produto facilmente perecível e de difícil processamento. Tal fato faz com que o seu potencial econômico seja subaproveitado, pois o comércio fica restrito a feiras populares e bancas de beira de estrada, onde é consumido logo após a extração. Assim, propostas de tratamentos que mantenham suas propriedades organolépticas e nutricionais e forneçam uma considerável vida de prateleira, abririam portas para potenciais mercados consumidores.

Tratamentos térmicos são os mais utilizados para a conservação de sucos de frutas, sendo eficientes na inativação de enzimas e de microrganismos patogênicos. No entanto, os processos térmicos convencionais podem provocar a decomposição de componentes nutricionais e alterar as propriedades organolépticas do produto. Uma alternativa a estes métodos, que vem sendo estudada nos últimos anos, é o aquecimento ôhmico. Essa tecnologia fornece um aquecimento rápido e uniforme, diminuindo o tempo de processamento necessário e, conseqüentemente, ajudando a conservar as propriedades do alimento.

O presente trabalho tem como objetivos avaliar a aplicação de aquecimento ôhmico na inativação da enzima peroxidase presente no caldo de cana e posterior acompanhamento da atividade enzimática residual durante o armazenamento. Para tal, foram realizados experimentos com diferentes tensões do campo elétrico aplicado e temperaturas e, para fins de comparação, também foi realizado aquecimento convencional. Como complemento, foi realizado o estudo da cinética de inativação da enzima durante o tratamento para definir o modelo cinético que melhor se adequa à inativação de peroxidase do caldo de cana.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta do gênero *Saccharum*, que pertence à família das gramíneas (*Poaceae*), caracterizada por crescer na forma de moitas e possuir caule em colmo, identificado por nós bem marcados e entrenós distintos, com folhas longas na forma de lâminas. Sua casca apresenta tons do amarelo ao vermelho, e a polpa pode ser branca, verde, creme ou castanha (SILVA, J. P. N. Da; SILVA, M. R. N. Da, 2012). A Figura 2.1 mostra uma moita formada pelos colmos da cana-de-açúcar.



Figura 2.1: Colmos da cana-de-açúcar. Fonte: SILVA, J. P. N. Da; SILVA, M. R. N. Da, 2012.

Seu local de origem mais provável são as ilhas da Polinésia, com sua cultura disseminada no sul da Ásia pelos chineses e na África e Europa pelos árabes. No Brasil, foi introduzida pelos colonizadores portugueses, onde hoje está o estado de São Paulo (SILVA, J. P. N. Da; SILVA, M. R. N. Da, 2012). As variedades cultivadas atualmente foram obtidas por melhoramento genético realizado por meio do cruzamento entre as diversas espécies do gênero *Saccharum* (MORAIS, *et al.*, 2015).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo esta uma cultura de grande relevância para o agronegócio do país. A área a ser colhida na safra 2017/18 é de 8,77 milhões de hectares, com uma produção estimada em 646,4 milhões de toneladas. Isso coloca o Brasil em uma posição de destaque internacional como líder na tecnologia de produção de etanol e açúcar, como

também no uso de seus subprodutos e resíduos para a cogeração de energia, fabricação de rações e fertilização de lavouras (CONAB, 2017).

2.2 Caldo de cana

O caldo de cana, ou garapa, é obtido da moagem dos colmos da cana em moendas elétricas ou manuais, normalmente coado e servido com gelo. O caldo é considerado uma bebida energética, não alcoólica e nutritiva, sendo caracterizado como um líquido viscoso, opaco e de baixa acidez (pH 5,0 – 5,5). Sua coloração pode variar de parda a verde escuro, apresentando sabor doce e agradável. Sua composição é dependente da variedade, idade e sanidade da cana, condições climáticas e planejamento agrícola, conservando todos os nutrientes existentes na cana-de-açúcar (BROCHIER; MERCALI; MARCZAK, 2016; KUNITAKE, 2012; OLIVEIRA, A. C. G. De *et al.*, 2007). Na Tabela 2.1 é apresentada a composição centesimal do caldo de cana determinada em alguns estudos.

Tabela 2.1: Composição centesimal do caldo de cana *in natura*.

	(OLIVEIRA, 2007)	(NEPA, 2011)	(REZZADORI, 2014)
Valor calórico (Kcal)	73,80	73,00	80,82
Sólidos solúveis (°Brix)	22,74	-	19,35
Umidade (%)	81,14	81,30	79,47
Carboidratos (%)	18,20	18,20	19,95
Proteínas (%)	0,21	0,13	0,26
Cinza (%)	0,41	0,13	0,33
Vitamina C (mg/100 mL)	2,98	2,78	5,54

O caldo de cana se apresenta como um ótimo substrato para o crescimento de uma grande e diversificada microbiota por conter diversos nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água e pH entre 5,0 e 5,5 (CRISTINE *et al.*, 2006; OLIVEIRA, A. C. G. De *et al.*, 2007 *apud* Gallo, C. R.; Canhos, V. P., 1991). Devido a essas propriedades, o caldo de cana *in natura* sofre deterioração em menos de 24 horas após sua extração, mesmo sob refrigeração, prejudicando características como cor e sabor (YUSOF, S.; SHIAN; OSMAN, A., 2000).

O escurecimento é uma importante alteração que ocorre no caldo de cana e começa logo após sua extração através de quatro diferentes mecanismos: (1)

melanoidinas formadas da reação entre aminoácidos e açúcares via reação de Maillard; (2) degradação térmica e reações de condensação de açúcares (caramelização); (3) degradação alcalina e reações de condensação de açúcares redutores; (4) reações de oxidação de compostos fenólicos; os três primeiros são reações não enzimáticas e a oxidação dos compostos fenólicos é provocada por enzimas (BUCHELI; ROBINSON, 1994; OLIVEIRA, A. C. G. De *et al.*, 2007).

Segundo Bucheli e Robinson (1994) e Qudsieh *et al.* (2002), a mudança de cor que ocorre no caldo de cana está majoritariamente relacionada a reações de escurecimento enzimático. As enzimas responsáveis por este escurecimento são a polifenoloxidase (PPO) e a peroxidase (POD). A primeira catalisa a oxidação de *o*-fenóis para *o*-quinonas, posteriormente polimerizadas, dando origem a pigmentos escuros, enquanto que a POD pode causar o branqueamento da clorofila como também a oxidação de fenóis (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008; IÇIER; YILDIZ; BAYSAL, 2008; MIZOBUTSI *et al.*, 2010).

A POD está entre as enzimas mais comuns e termorresistentes presentes em tecidos vegetais. Sua termoestabilidade é muito alta e, dependendo da fonte da qual é obtida, sua completa inativação pode exigir a exposição por vários minutos a 80-100 °C. Por ser tão resistente, sua atividade residual é usada como indicador em processos de branqueamento. No entanto, isso pode levar a um tratamento térmico excessivo, comprometendo as propriedades do alimento. Além disso, se o tempo de processamento for curto, ocorrerá a regeneração de sua atividade durante o armazenamento do produto (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Por ser um alimento de difícil conservação e tratamento, o mercado do caldo de cana se restringe ao comércio de beira de estrada e feiras populares, onde é extraído e consumido na hora. Estudos mostram que, atrelada à forma com que o caldo é comercializado, as condições higiênico-sanitárias durante sua produção nem sempre são satisfatórias, representando riscos à saúde do consumidor (CRISTINE *et al.*, 2006; MOSUPYE; HOLY, VON, 2000).

Mesmo tendo comércio majoritariamente ligado ao mercado informal, o caldo de cana é muito apreciado em países populosos do leste asiático, como a Índia, China e a Malásia, e também aqui no Brasil. Portanto, o desenvolvimento de

métodos para o tratamento do caldo de cana, que consigam manter suas qualidades e frescor abririam caminho para um enorme mercado consumidor não explorado, como redes de *fast food*, shoppings, restaurantes e supermercados, locais em que a procura por alimentos naturais, saudáveis e com boas características nutricionais é cada vez maior (MAO; XU; QUE, 2007; OLIVEIRA, A. C. G. De *et al.*, 2007; YUSOF, S.; SHIAN; OSMAN, A., 2000).

2.3 Métodos de Tratamento Térmico

A maioria dos alimentos de origem vegetal e animal são suscetíveis à deterioração em função de que são um meio ideal para a proliferação de microrganismos e também devido à presença de enzimas. No intuito de conservá-los, é necessária a execução de processos que alterem as condições do meio, momentânea ou irreversivelmente, tornando inviável qualquer manifestação vital (GAVA, 1998).

Segundo Saxena, Makroo e Srivastava (2016), já foram pesquisadas inúmeras formas de tratamento capazes de prolongar a vida de prateleira do caldo de cana para sua entrada no mercado de processamento de sucos. Tratamento térmico é o método mais estudado e que apresenta bons resultados na inativação de microrganismos e enzimas, mas devido às altas temperaturas utilizadas, provoca perdas importantes nutricionais, de odor e de coloração. Porém, na última década, novas técnicas de tratamento têm tido sua aplicação estudada em vários substratos, das quais o aquecimento ôhmico tem ganhado grande popularidade.

2.3.1 Método Convencional

Os tratamentos térmicos convencionais consistem na aplicação de altas temperaturas por meio de troca térmica entre uma superfície aquecida por água ou vapor e o alimento a ser processado. Entre os processos utilizados estão a pasteurização e a esterilização; o primeiro é um método mais suave e o segundo emprega temperaturas maiores. Ambos os métodos acarretam em mudanças indesejáveis como perda de vitaminas e minerais, alterações no sabor, no aroma e textura do alimento (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; SARKIS, 2011).

A pasteurização LTLT (*Low Temperature, Long Time*) é aplicada em alimentos que são mais sensíveis a altas temperaturas, para a eliminação de patógenos

com baixa resistência térmica e microrganismos deteriorantes. No processamento de sucos de fruta, é operada com binômios tempo-temperatura próximos à faixa dos 30 min a 60 °C. Em virtude do longo tempo de processamento, ocorrem perdas de compostos de aroma voláteis e o aparecimento de sabores e aromas de cozido. Outra desvantagem da pasteurização é o fato deste tratamento ter sua efetividade em termos de vida de prateleira limitada a apenas alguns dias ou semanas (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007).

A fim de minimizar mudanças indesejáveis durante o processamento, existem os métodos HTST (*High Temperature, Short Time*) e UHT (*Ultra High Temperature*) que utilizam temperaturas elevadas por um curto período de tempo. Para fins de comparação, no tratamento de sucos de fruta os binômios estão na faixa de 1 min a 77 °C e 15 s a 88 °C. Porém, estas variações não fornecem um aquecimento uniforme e, pela transferência de calor ocorrer principalmente por condução e convecção, são criados consideráveis gradientes de temperatura, dificultando seu uso em produtos contendo partículas. Nesses tratamentos, pode ocorrer o superaquecimento do alimento que está em contato com a superfície aquecida, para se atingir a temperatura adequada nas regiões mais frias (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; GAVA, 1998; SARKIS, 2011).

2.3.2 Aquecimento Ôhmico

O aquecimento ôhmico, ou aquecimento Joule, é definido como um processo em que corrente elétrica alternada é passada através de um alimento que seja capaz de conduzir eletricidade convertendo energia elétrica em calor. A Figura 2.2: mostra a operação de aquecimento ôhmico, onde tem-se o contato de eletrodos inertes com o alimento que aquece internamente em consequência da resistência por ele exercida à passagem da corrente elétrica. Portanto, esta pode ser considerada uma tecnologia de geração de energia e não apenas de transferência de energia térmica (CASTRO *et al.*, 2004; SARKIS, 2011).

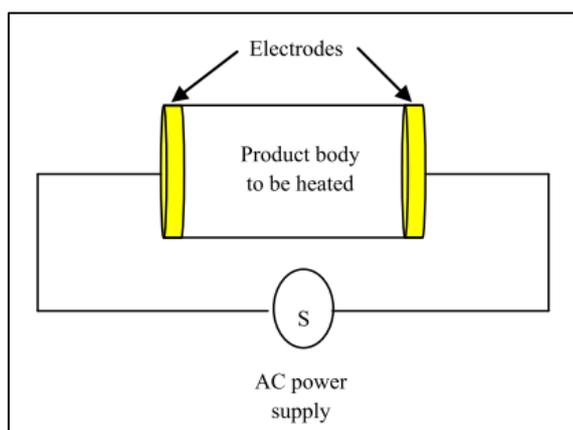


Figura 2.2: Diagrama esquemático ilustrando o princípio do aquecimento ôhmico.

Fonte: SAKR; LIU, 2014.

Por apresentar geração interna de calor, e não apenas depender da condução e convecção como a pasteurização, o aquecimento ôhmico oferece como grande vantagem um aquecimento muito rápido e uniforme. Deste modo, o gradiente de temperatura produzido no volume tratado é muito menor do que em métodos convencionais. Essa característica única permite com que alimentos contendo partículas sólidas possam ser satisfatoriamente processados, pois tanto a fase líquida como as partículas presentes são aquecidos a uma mesma taxa (GOULLIEUX; PAIN, 2005; SAKR; LIU, 2014).

Outras vantagens apresentadas pelo aquecimento ôhmico em relação aos métodos tradicionais de tratamento térmico são sua capacidade de preservar componentes nutricionais e a diminuição de incrustações devido ao rápido aquecimento, possibilitando um menor tempo de processamento. Em alimentos particulados, é possível manter a textura e a microestrutura das partículas por provocar menores tensões de cisalhamento. Além disso, possui alta eficiência energética, convertendo até 90% da energia elétrica em calor (CAPPATO *et al.*, 2017; ENGCHUAN; JITTANIT; GARNJANAGOONCHORN, 2014; GHNIMI *et al.*, 2008).

Como toda nova tecnologia a ser validada, o aquecimento ôhmico possui problemas a serem resolvidos e dificuldades para ser aplicado em determinados alimentos. Em consequência da sua dependência direta da condutividade elétrica, produtos que apresentem variações consideráveis dessa propriedade exigem que o processo seja ajustado conforme estas variações. Além disso, os eletrodos são passíveis à corrosão, necessitando substituição periódica (JAEGER *et al.*, 2016; SAKR; LIU, 2014).

Goullieux e Pain (2005) demonstraram o princípio matemático do aquecimento ôhmico, onde a taxa de energia gerada (ΔP) é a razão entre o quadrado da diferença de potencial (ΔU) e a resistência ôhmica (ΔR) exercida pelo alimento:

$$\Delta P = \frac{\Delta U^2}{\Delta R} \quad (2.1)$$

Uma vez que:

$$\Delta U = E \cdot \Delta z \quad (2.2)$$

e:

$$\Delta R = \frac{\Delta z}{\sigma \cdot \Delta A} \quad (2.3)$$

onde E é o campo elétrico gerado na direção z , Δz é a distância entre os eletrodos, ΔA é a área dos eletrodos e σ é a condutividade elétrica, a Equação 2.1 é reescrita como sendo:

$$\Delta P = \sigma \cdot E^2 \cdot \Delta A \cdot \Delta z = \sigma \cdot E^2 \cdot \Delta V \quad (2.4)$$

A Equação 2.4 comprova a natureza volumétrica do processo de aquecimento ôhmico e demonstra que a taxa de energia gerada é proporcional ao quadrado do campo elétrico, fazendo com que o aquecimento dependa diretamente da tensão fornecida ao sistema e seja inversamente proporcional à distância entre os eletrodos. Observa-se, ainda, que a condutividade elétrica exerce grande influência no tratamento, mostrando que a composição do produto será determinante para que sejam obtidos resultados satisfatórios (GOULLIEUX; PAIN, 2005).

Além de ser utilizado para atingir objetivos comumente esperados de um tratamento térmico convencional (eliminar microrganismos e inativar enzimas), o aquecimento ôhmico vem se mostrando aplicável para a realização ou auxílio de outros processos da indústria alimentícia que incluem branqueamento, evaporação, fermentação, desidratação e extração (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007). Tais informações demonstram o quão grande é o potencial do aquecimento ôhmico, abrindo caminho para novas pesquisas e validação de métodos a serem aplicados industrialmente.

Durante a pesquisa para a realização do presente trabalho, foram encontrados poucos estudos anteriores que avaliassem a inativação enzimática de POD por aquecimento ôhmico e nenhum que fizesse o posterior acompanhamento da atividade residual ou regeneração da enzima. Isso faz com que não se tenha uma base para comparações dos resultados obtidos, mas por outro lado, revela a importância e o caráter inovador deste estudo.

3 Materiais e Métodos

O presente capítulo tem por objetivo apresentar os procedimentos experimentais e os equipamentos utilizados. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e na Central Analítica, ambos pertencendo ao Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da UFRGS.

3.1 Caldo de Cana

O caldo de cana utilizado nos experimentos foi comprado na Banca nº 26, Rei do Lanche, no abrigo da Praça XV de Novembro, em Porto Alegre. Foram adquiridos 4 L de caldo, sendo que a cana-de-açúcar usada para extração já estava previamente descascada e sob refrigeração. O volume total foi homogeneizado em um recipiente 5 L e fracionado em porções de 225 mL acondicionadas em sacos plásticos com fecho. As amostras foram armazenadas em um freezer a -15 °C, visando manter suas propriedades para a realização dos experimentos.

3.2 Caracterização do Caldo

A caracterização do caldo é necessária para que seja possível comparar os dados obtidos no presente estudo com trabalhos posteriores que fizeram uso do mesmo substrato. Nesta etapa, foram determinadas propriedades físico-químicas como atividade de água, condutividade elétrica, pH e sólidos solúveis.

A atividade de água a 25 °C foi determinada utilizando um medidor de atividade de água (*Novasima*, modelo LabMaster-aw, Suíça), de acordo com o método 978.18 da AOAC (1990). Os sólidos solúveis foram determinados por refratometria (refratômetro portátil modelo SZJ-A) com leitura corrigida para 20 °C, conforme o método nº 932.12 da AOAC (2000).

O pH foi determinado utilizando um pHmetro (*Digimed*, modelo DM-22, Brasil), de acordo com o método 981.12 da AOAC (2000). O equipamento foi calibrado com três soluções tampão com pH iguais a 4,00, 7,00 e 10,06. Por sua vez a condutividade elétrica foi determinada usando um condutímetro (*Digimed*, modelo DM-3P, Brasil) calibrado com uma solução padrão de 1041 µS/cm e com temperatura de referência de 20 °C.

3.3 Aquecimento Ôhmico e Convencional

O equipamento de aquecimento ôhmico utilizado para os experimentos de inativação enzimática é composto por três partes: uma fonte de energia, um sistema de aquisição de dados e uma célula ôhmica. Na Figura 3.1 é apresentado o diagrama esquemático do sistema de aquecimento ôhmico.

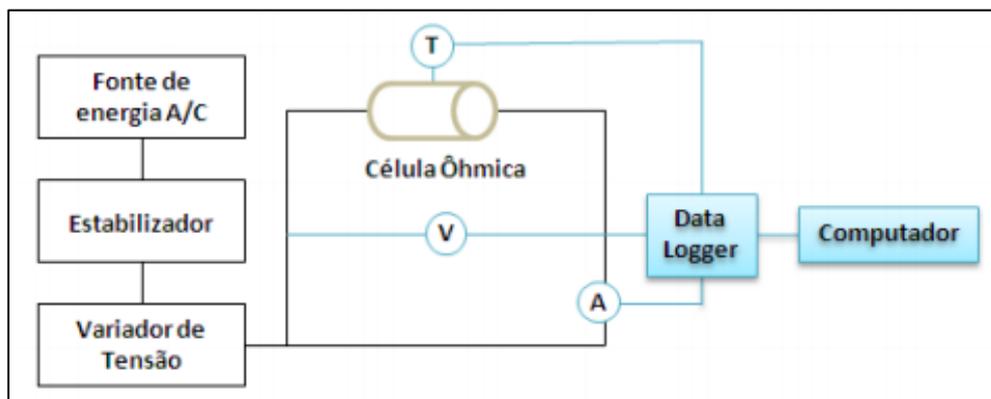


Figura 3.1: Diagrama esquemático do sistema de aquecimento ôhmico.

Fonte: SARKIS, 2011.

O sistema para fornecimento de energia é composto por um estabilizador (*Forceline*, modelo EV 1000 T/2-2, Brasil) ligado à rede local, utilizando corrente alternada com frequência de 60 Hz, um variador de tensão manualmente ajustável de 0 a 240 V (*Sociedade Técnica Paulista LTDA*, modelo Varivolt, Brasil) e um disjuntor (*Siemens*, Brasil). Na aquisição de dados, empregou-se um módulo de aquisição e registro (*Novus*, modelo Field logger, Brasil). O módulo foi responsável pelo monitoramento e aquisição dos valores de corrente elétrica, tensão e temperaturas (T1 e T3) em intervalos de 0,9 s. A Figura 3.2 mostra o local dos termopares T1 e T3 na célula ôhmica e a Figura 3.3 apresenta a interface gráfica do programa utilizado nos experimentos.

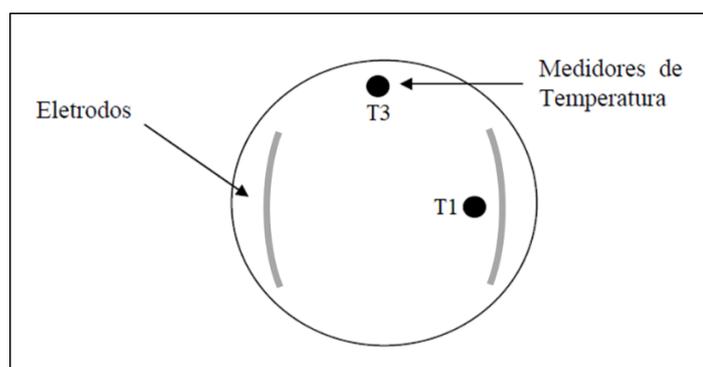


Figura 3.2: Vista superior da célula ôhmica localizando os eletrodos e os termopares T1 e T3. Adaptado de SARKIS, 2011.

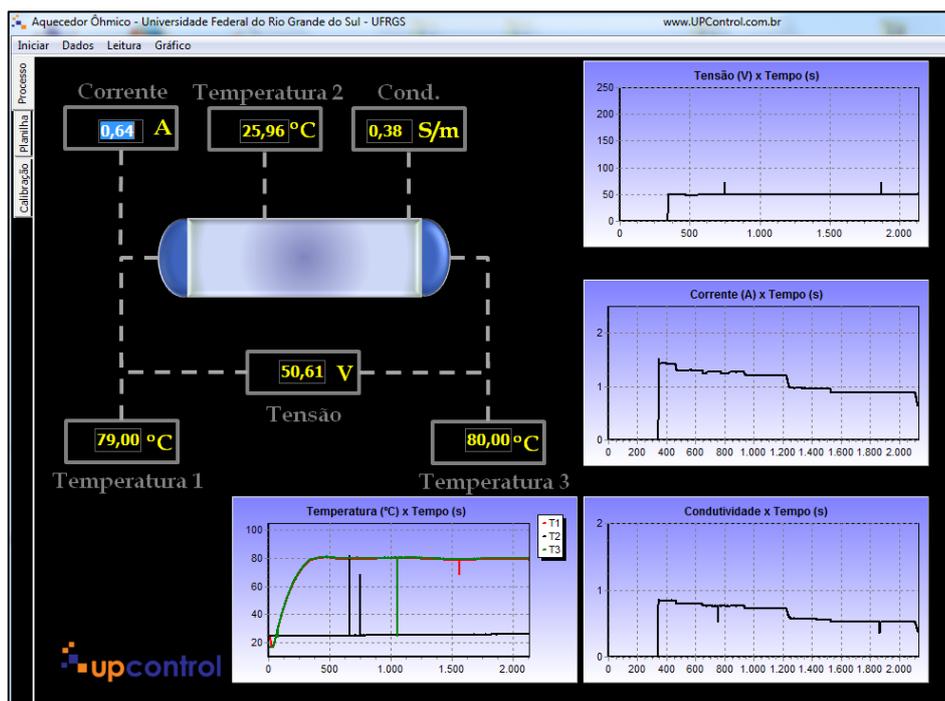


Figura 3.3: Interface gráfica do software de aquisição de dados.

A célula ôhmica consiste em um frasco de vidro encamisado, com capacidade para 500 mL com diâmetro e profundidade internos de 8 cm e 12,5 cm, respectivamente. Os eletrodos utilizados medem 6 cm de altura e possuem formato axial, a fim de se adequarem melhor ao formato e tamanho do reator. Em consequência do formato curvado, a distância entre os eletrodos varia entre 7,5 e 5,7 cm.

Antes de cada experimento, aproximadamente 20 min, uma amostra do caldo de cana foi retirada do freezer para ser descongelada. A mesma foi colocada em banho de água à temperatura ambiente para que o descongelamento fosse o mais rápido possível, de modo que não fossem prejudicadas suas características. Durante o processo, a água do banho foi trocada diversas vezes.

Com a amostra completamente descongelada e homogeneizada, foram pesados 200 g de caldo de cana na célula ôhmica que posteriormente foi fechada com a tampa contendo os eletrodos. Após o fechamento da célula ôhmica, os termopares foram inseridos na tampa nas posições já mostradas na Figura 3.2. O uso de dois termopares se justifica como uma maneira de assegurar que a amostra se encontra termicamente homogênea. Em seguida, na haste dos

eletrodos foram fixados conectores para permitir a passagem de corrente elétrica alternada proveniente do variador de tensão.

Durante os experimentos, foram utilizados dois banhos termostáticos, um para aquecimento e outro para controle da temperatura na célula ôhmica. O Banho 1 (Lauda, modelo ALPHA A 6) mantinha água aquecida a 98 °C e o Banho 2 (Lauda, modelo ALPHA RA 8) continha água para resfriamento com temperatura ajustada para cada condição a ser estudada. A Figura 3.4 mostra o sistema de troca de banhos, que consiste em um grupo de mangueiras e válvulas permitindo uma mudança rápida e precisa.

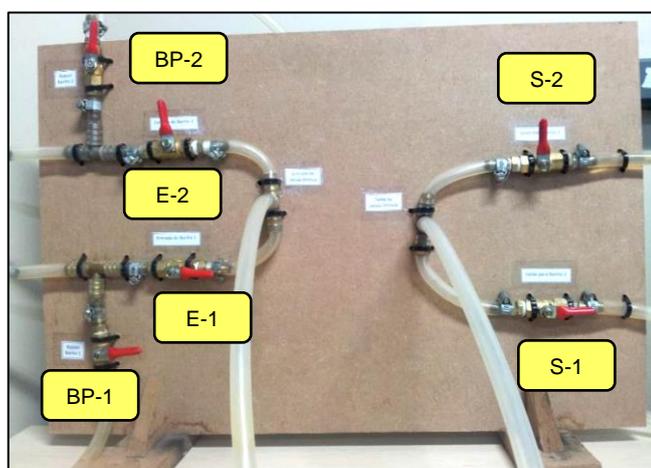


Figura 3.4: Sistema de troca de banhos, onde: BP são os *by-pass*, E as entradas e S as saídas. Adaptado de GRINGS, 2016.

A Figura 3.5 mostra o sistema de aquecimento ôhmico pronto para ser operado, já com a célula ôhmica devidamente conectada ao sistema de *by-pass* (troca de banhos) e o caldo de cana sendo agitado a 500 rpm por um agitador magnético (IKA, modelo C-MAG HS 10, Alemanha).

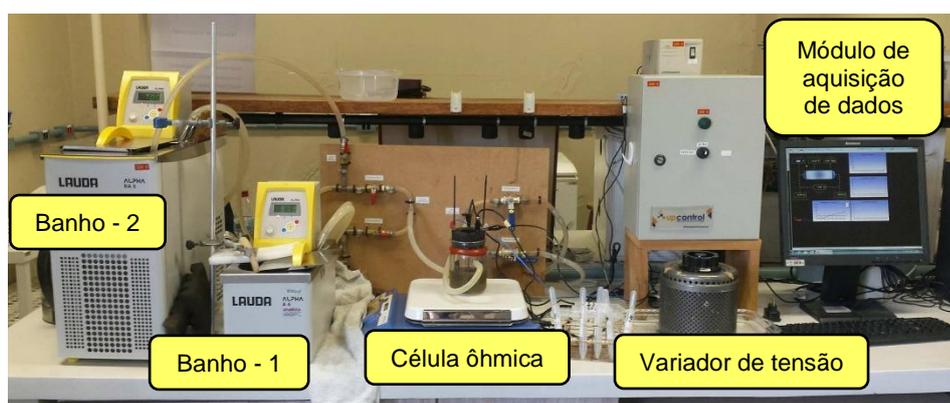


Figura 3.5: Sistema de aquecimento ôhmico do LATEPA.

O aquecimento foi iniciado fechando a válvula de *by-pass* e abrindo as válvulas de entrada e saída do Banho 1. Assim o sistema foi mantido até, aproximadamente, 2 °C abaixo da temperatura do experimento, quando, então, foi realizada a troca entre os banhos. A troca foi feita abrindo a válvula do *by-pass* e fechando a entrada e a saída do Banho 1, seguida da abertura da entrada e da saída e fechamento do *by-pass* do Banho 2. Atingida a temperatura desejada, deu-se início à passagem de corrente elétrica através do variador de tensão, sendo este considerado o “tempo 0” do experimento. Para o tratamento convencional, procedeu-se da mesma maneira, porém sem a passagem de corrente elétrica.

Os experimentos de inativação de POD tiveram 30 min de duração cada. Durante a fase isotérmica do tratamento foram coletadas amostras em sete tempos (0, 2, 5, 10, 15, 20 e 30 min) e armazenadas em tubos Falcon de 15 e 50 mL. Imediatamente após a coleta, os tubos foram acondicionados em um banho de gelo para impedir que o processo de inativação continuasse sendo feita, na sequência, a análise de atividade enzimática. Nos tempos 0, 2, 5, 10 e 20 min foram coletados 7 mL de amostra e nos tempos 15 e 30 min, 30 mL.

Os pontos com 15 e 30 min de processamento foram os escolhidos para terem sua atividade enzimática e cor avaliados durante o armazenamento. Portanto, foi necessário que um volume maior de amostra fosse coletado para a realização das análises no período de acompanhamento. Durante o armazenamento, os tubos Falcon foram acondicionados em uma geladeira (*Brastemp*, modelo BRM42, Brasil) com temperatura média de 1,5 °C.

Os ensaios de inativação enzimática foram conduzidos nas temperaturas de 70 e 80 °C e, para cada temperatura, foram aplicadas três diferentes tensões, 0 (aquecimento convencional - CH), 50 V (o que representa 7,6 V/cm) e 100 V (15,2 V/cm). Todos os experimentos foram realizados em duplicata para que possíveis erros experimentais fossem identificados. Na Tabela 3.1 são apresentadas as condições empregadas em cada experimento e a temperatura de operação do banho de resfriamento (Banho 2).

Tabela 3.1: Condições experimentais e de operação do Banho 2.

Tensão (V)	T do caldo (°C)	T do Banho 2 (°C)
0	70 ± 1	72 ± 1
0	80 ± 1	81 ± 1
50 ± 0,5	70 ± 1	59 ± 1
50 ± 0,5	80 ± 1	70 ± 1
100 ± 2,5	70 ± 1	6 ± 1
100 ± 2,5	80 ± 1	17 ± 1

3.4 Análise de atividade enzimática

A análise de atividade enzimática da POD foi baseada no protocolo descrito por Chisari, Barbagallo e Spagna (2007). Para o estudo da cinética de inativação foram analisados todos os pontos coletados durante o tratamento; para o acompanhamento da atividade de POD das amostras armazenadas foram feitas análises nos quatro dias seguintes ao experimento e, posteriormente, no sétimo e décimo quarto dias.

Inicialmente, foi preparado um extrato enzimático contendo uma parte de caldo de cana misturada com quatro partes de uma solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M com pH 7,0 em vortex (agitador de soluções *Phoenix Luferco*, modelo AP 56, Brasil). Os extratos foram mantidos abaixo de 4 °C para evitar ao máximo alterações durante o procedimento. Depois de prontos, os extratos foram centrifugados (*SIGMA*, modelo 2-16KL) por 10 min a 2 °C e 8403 rpm (7500 g).

Para leitura no espectrofotômetro (*PG Instruments Ltd*, T80 UV/VIS Spectrometer) foram preparadas cubetas de acrílico, com uma distância do caminho ótico de 1 cm, contendo 750 µL de solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M com pH 5,0, 100 µL de solução de peróxido de hidrogênio 1 g/100 g e 500 µL de sobrenadante do extrato enzimático centrifugado. Após a adição do extrato a temperatura da mistura foi elevada até 25 ± 1 °C com o auxílio de um copo de Becker contendo água na referida temperatura. A temperatura da solução na cubeta foi verificada com o auxílio de um termômetro digital (*Kasvi*, modelo K29-5030). Atingida a temperatura de leitura adicionou-se 250 µL de solução de guaiacol 1,5 g/100 g e, então, acompanhou-se a variação na absorbância a 460 nm por 60 s com intervalos de 1 s a cada leitura. No entanto, em consequência da

baixa atividade enzimática de POD apresentada nas amostras de 30 min dos experimentos a 80 °C com tensões de 50 e 100 V, o tempo de leitura precisou ser elevado para 120 s com intervalos de 2 s. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A atividade enzimática foi determinada pela variação na absorbância por minuto ($\Delta abs/min$) que foi chamada de A , nas condições de leitura. O valor de A foi obtido através de regressão linear, para a qual apenas a parte linear da curva de absorção foi levada em consideração. Então utilizou-se o conceito de atividade enzimática residual (A/A_0) que é a razão entre a atividade no tempo t (A) pela atividade do tempo $t = 0$ (A_0).

3.5 Cinética de inativação

Utilizando os dados obtidos de atividade enzimática residual durante o processamento do caldo de cana, foi realizado o estudo cinético da inativação de POD, associando os dados experimentais a vários modelos cinéticos já estabelecidos na literatura. Para tanto, foi empregado o uso de regressão não-linear com auxílio do software Statistica (versão 13.2, StatSoft, Inc. Tulsa, OK, EUA). Na Tabela 3.2 são apresentados os modelos avaliados juntamente com suas equações.

Tabela 3.2: Modelos cinéticos usados para analisar a inativação da peroxidase.

Nº Equação	Modelo	Equação
(3.1)	Primeira-ordem	$\ln \frac{A}{A_0} = -kt$
(3.2)	Isoenzimas distintas	$\frac{A}{A_0} = A_L \exp(-k_L t) + A_R \exp(-k_R t)$
(3.3)	Duas-frações	$\frac{A}{A_0} = a \exp(-k_L t) + (1 - a) \exp(-k_R t)$
(3.4)	Multicomponente primeira-ordem	$\frac{A}{A_0} = [\exp(-k_1 t) + r \exp(-k_2 t)] / (1 + r)$
(3.5)	<i>n</i> ésima ordem	$\frac{A}{A_0} = [A_0^{1-n} + (n - 1)kt]^{1/(n-1)}$
(3.6)	Conversão fracionária	$\frac{A}{A_0} = A_r + (A_0 - A_r) \exp(-kt)$
(3.7)	Distribuição de Weibull	$\frac{A}{A_0} = \exp(-bt^n)$

O modelo de primeira-ordem geralmente é o adotado para descrever inativação enzimática, o qual é baseado na premissa de que a quebra de apenas uma ligação ou estrutura é suficiente para inativar a enzima. Já o modelo de multicomponente de primeira-ordem é expresso como a soma da cinética de inativação térmica de cada componente, tendo sido aplicado para o estudo da inativação de isoenzimas (FUJIKAWA; ITOH, 1996; LADERO; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2006).

O modelo de isoenzimas distintas se caracteriza por uma diminuição de atividade enzimática descrita pela soma de dois decaimentos exponenciais, um para enzimas termolábeis (subíndice L) e outro para enzimas termoestáveis (subíndice R) (WEEMAES *et al.*, 1998). Porém, segundo Chen e Wu (1998), por meio do modelo de duas frações, sugerem que o extrato de plantas possuem várias isoenzimas e que podem ser separadas em dois grupos, um mais termorresistente do que o outro, sendo os dois grupos inativados seguindo uma cinética de primeira-ordem. Nesse modelo, o coeficiente a é a atividade da fração de isoenzima termolábil relativa a atividade enzimática total.

O modelo de conversão fracionada se refere a um processo de inativação de primeira-ordem que considera que o zero de atividade enzimática não será atingido, mesmo com prolongada exposição ao calor, devido à presença de frações extremamente termorresistentes. O termo A_r representa a atividade após o sistema atingir o equilíbrio (RIZVI; TONG, 1997).

A distribuição de Weibull assume que a taxa momentânea de sensibilidade térmica ao calor depende apenas da intensidade do aquecimento transiente e da atividade residual, não dependendo da taxa com que ela foi atingida. Esta distribuição possui dois parâmetros, que são b e n . Onde n determina a forma da curva de distribuição e b determina a taxa de inativação (RUDRA SHALINI; SHIVHARE; BASU, 2008).

3.6 Análise de Cor

A cor do caldo de cana foi identificada utilizando um colorímetro (*HunterLab*, modelo ColorQuest XE) para a determinação dos parâmetros do sistema CIELab, que são: a luminosidade L^* , o nível de verde a vermelho a^* e o nível de azul ao

amarelo b^* . Através destes valores foram calculados o croma (C_{ab}^*), que é a vivacidade, o ângulo hue , que define a tonalidade, e a diferença total de cor (ΔE). Por meio destes parâmetros é possível localizar a cor na esfera CIELab (Figura 3.6). As equações utilizadas são explicitadas a seguir.

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (3.8)$$

$$h_{ab} = \arctan(b^*/a^*) \text{ quando } +a^* \text{ e } +b^* \text{ (quadrante 1)} \quad (3.9)$$

$$h_{ab} = 180 + \arctan(b^*/a^*) \text{ quando } -a^*, +b^* \text{ (quadrante 2) e} \\ -a^*, -b^* \text{ (quadrante 3)} \quad (3.10)$$

$$h_{ab} = 360 + \arctan(b^*/a^*) \text{ quando } +a^* \text{ e } -b^* \text{ (quadrante 4)} \quad (3.11)$$

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta a^{*2} + \Delta b^{*2} + \Delta L^{*2}} \quad (3.12)$$

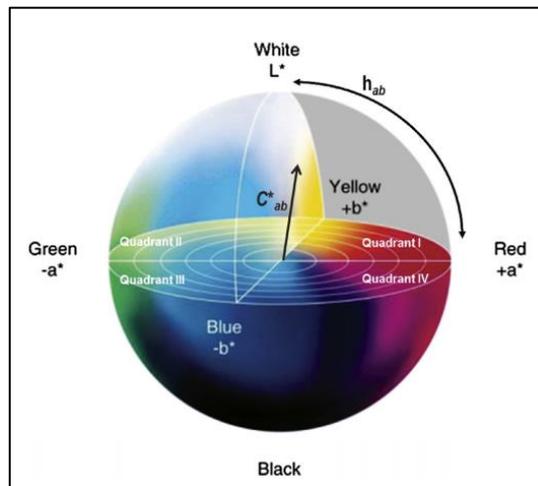


Figura 3.6: Esfera CIELab. Fonte: SANT'ANNA *et al.* (2013).

3.7 Análise estatística

Para avaliar a adequação dos modelos propostos para a inativação da peroxidase foram utilizados critérios físicos e estatísticos. Os critérios estatísticos incluíram o coeficiente de determinação (R^2), qui-quadrado (χ^2) e o erro quadrático médio ($RMSE$). χ^2 e $RMSE$ mostram o tamanho do erro de uma determinada estimativa e são calculados pelas Equações 3.13 e 3.14.

$$\chi^2 = \frac{\sum(\alpha_{previsto} - \alpha_{experimental})^2}{n-p} \quad (3.13)$$

$$RMSE = \frac{1}{n} [\sum_n (\alpha_{previsto} - \alpha_{experimental})^2]^{0,5} \quad (3.14)$$

onde n é o número de observações, p é o número de parâmetros. $\alpha_{previsto}$ e $\alpha_{experimental}$ são as atividades residuais previstas e experimentais, respectivamente. O critério físico utilizado é a ausência de parâmetros estimados negativos na temperatura determinada (BROCHIER; MERCALI; MARCZAK, 2016; RUDRA SHALINI; SHIVHARE; BASU, 2008).

Foram realizadas comparações entre as atividades residuais durante o armazenamento e entre os parâmetros do melhor modelo encontrado. Para tanto, utilizou-se análise de variância (ANOVA), teste- t de Student e teste de Tukey com um nível de confiança de 95% (Statistica versão 13.2, StatSoft, Inc. Tulsa, OK, EUA).

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização do caldo de cana

Na Tabela 4.1 são apresentados os resultados obtidos para a caracterização do caldo de cana *in natura*. Como já demonstrado em estudos feitos por Brochier *et al.* (2016) e Kunitake (2012), o caldo de cana fresco apresenta baixa acidez, com pH variando entre 5,1 e 5,4, uma alta atividade de água (0,951) e sólidos solúveis na faixa de 16,4 a 23,7 °Brix, confirmando os resultados obtidos. De acordo com Cristine *et al.* (2006), essas são propriedades que fornecem ótimas condições para o crescimento de microrganismos.

Tabela 4.1: Caracterização do caldo de cana *in natura*.

Parâmetros	Valores
pH (25 °C)	5,07 ± 0,02
Atividade de água (25 °C)	0,979 ± 0,001
Sólidos solúveis (°Brix)	19,1 ± 0,1
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$, 20 °C)	1944 ± 5
Atividade POD ($\text{UAE min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	12718 ± 1862

O caldo de cana também apresentou uma alta atividade enzimática de peroxidase, fortalecendo a necessidade da realização de um tratamento térmico para preservar suas qualidades. Além disto, por apresentar uma boa condutividade elétrica e grande quantidade de água, o aquecimento ôhmico se apresenta como uma boa alternativa para seu processamento.

4.2 Atividade residual de POD durante o tratamento

Nesta fase do estudo, foram quantificados e avaliados os valores de atividade residual de POD obtidos em cada experimento e, posteriormente, determinou-se qual dos modelos propostos melhor representava os dados experimentais. Com o modelo mais adequado definido, realizou-se uma comparação estatística entre os resultados obtidos para cada condição estudada.

Ao longo dos experimentos o Banho 1 foi utilizado para rapidamente aquecer a amostra até a temperatura a ser avaliada, com o objetivo de se obter uma mesma taxa de aquecimento em todos eles. Tal procedimento é necessário para que o efeito térmico seja igual em todas as condições, possibilitando a análise do efeito elétrico provocado pelo aquecimento ôhmico (CASTRO *et al.*, 2004). A Figura 4.1 apresenta um gráfico da temperatura em função do tempo para amostras tratadas via aquecimento ôhmico e convencional nas duas temperaturas ensaiadas. Os tempos necessários para atingir a temperatura de manutenção desejada foram de, aproximadamente, 3,5 e 5 minutos para 70 e 80 °C, respectivamente.

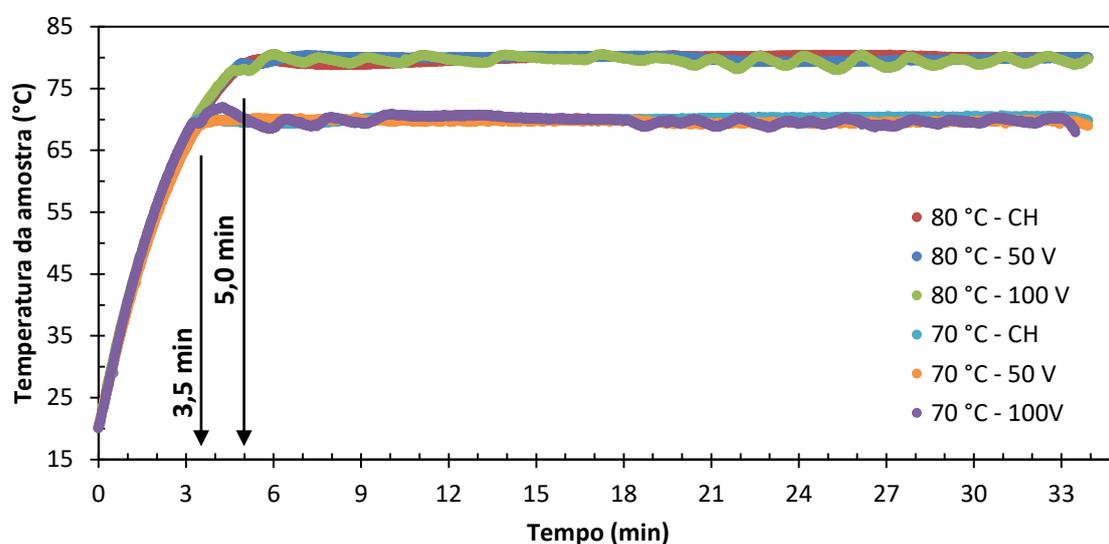


Figura 4.1: Evolução da temperatura durante os experimentos via aquecimento convencional e ôhmico do caldo de cana.

Na Figura 4.2 são apresentadas as curvas de inativação da POD ao longo dos experimentos de aquecimento ôhmico e convencional; por meio delas é possível acompanhar a atividade enzimática residual no decorrer do tratamento. A_0 representa a atividade enzimática no tempo 0, que é definido pelo início da passagem de corrente elétrica. Cabe ressaltar que durante a rampa de aquecimento, para se atingir a temperatura desejada, foi observada uma inativação parcial da POD. Para os ensaios a 80 °C a inativação foi de 27% e para 70 °C de apenas 10%.

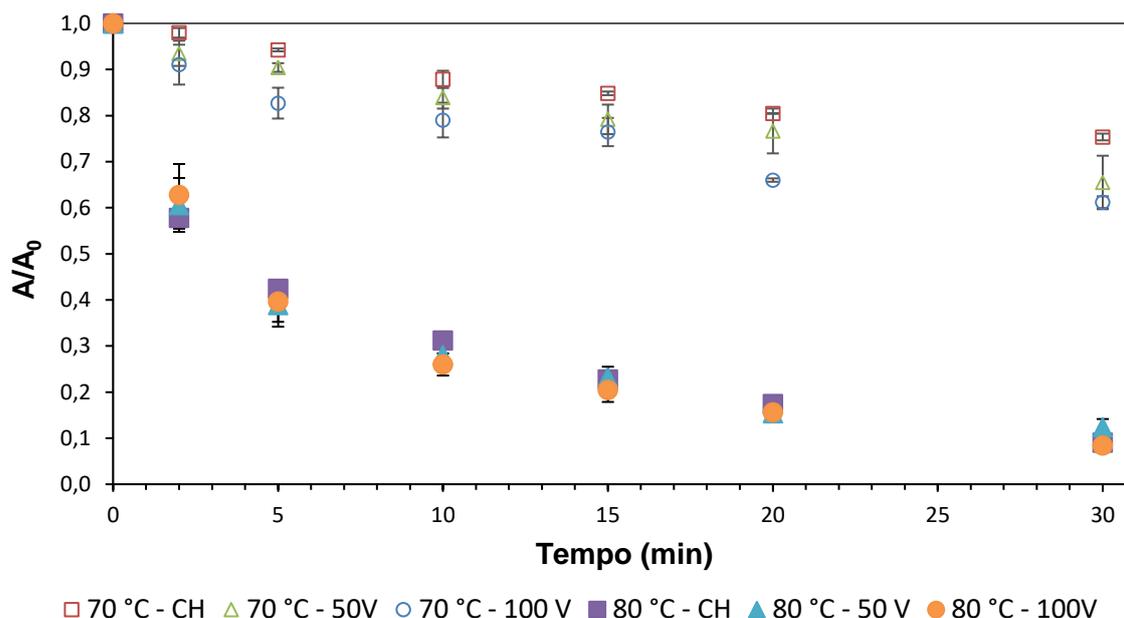


Figura 4.2: Atividade residual de POD ao longo do tempo durante aquecimento ôhmico e convencional.

A análise da figura indica que, em ambas as temperaturas avaliadas (70 e 80 °C), a atividade de POD decresceu ao longo do tempo e que quanto maior a temperatura aplicada, menor foi a atividade residual. Também, pode ser observado que para 70 °C o tratamento não foi eficiente, com uma inativação de, aproximadamente, 25% para o aquecimento convencional e de 40% para o ôhmico a 100 V. Já a 80 °C foi alcançada cerca de 90% de inativação, com valores similares entre os diferentes tratamentos.

A fim de se realizar uma comparação mais adequada, os dados de atividade enzimática residual foram ajustados a sete modelos cinéticos de inativação, já descritos apresentados na Tabela 3.2. Com o uso do *software* Statistica 13.2 foram calculados os parâmetros de cada modelo e os coeficientes de determinação (R^2) correspondentes. Utilizando os parâmetros encontrados, calcularam-se os valores previstos de A/A_0 para cada modelo e, por meio das Equações 3.13 e 3.14, os mesmos foram comparados aos valores experimentais, fornecendo os parâmetros de adequação (χ^2 e $RMSE$). Os valores mínimos e máximos obtidos para cada parâmetro estão explicitados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros estatísticos dos modelos cinéticos descrevendo a inativação de POD durante aquecimento ôhmico e convencional (70-80 °C).

Modelo	R^2	χ^2	$RMSE$
Primeira-ordem	[0,963; 0,896]	[0,00049; 0,01023]	[0,00751; 0,03524]
Isoenzimas distintas	[0,986; 0,940]	[0,00021; 0,00580]	[0,00428; 0,02223]
Duas-frações	[0,964; 0,875]	[0,00049; 0,01230]	[0,00751; 0,03873]
Multicomponente primeira-ordem	[0,964; 0,896]	[0,00049; 0,01023]	[0,00751; 0,03524]
<i>n</i> ésima ordem	[0,977; 0,996]	[0,00034; 0,00038]	[0,00565; 0,00635]
Conversão fracionária	[0,976; 0,977]	[0,00035; 0,00229]	[0,00578; 0,01632]
Distribuição de Weibull	[0,986; 0,997]	[0,00022; 0,00027]	[0,00477; 0,00574]

Os modelos de isoenzimas distintas, multicomponente primeira-ordem e *n*ésima ordem não foram fisicamente possíveis, pois apresentaram parâmetros com valores negativos. Dos modelos restantes, o de primeira-ordem, duas-frações e conversão fracionária apresentaram os valores mais baixos para R^2 e mais altos para χ^2 e $RMSE$, especialmente para os experimentos a 80 °C, que apresentaram uma inativação mais acentuada. Estes resultados se devem, possivelmente, ao fato de que a POD é uma isoenzima, logo, não possui uma cinética de inativação de primeira-ordem. Ela pode apresentar simultaneamente mais de uma isoforma com atividade catalítica, cada qual com diferentes níveis de termorresistência (CHAKRABORTY; RAO; MISHRA, 2015).

O modelo de distribuição de Weibull foi o que apresentou o melhor resultado em todos os parâmetros avaliados e, portanto, foi o escolhido para estimar a cinética de inativação de POD do caldo de cana. Como exposto na Equação 3.7, o modelo de distribuição de Weibull apresenta dois parâmetros, b e n . Os mesmos foram determinados para cada condição estudada por meio do uso do Statistica 13.2 e se encontram na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Coeficientes do modelo de distribuição de Weibull.

Condição empregada	b^*	n^*	R^2	χ^2	$RMSE$
70 °C - convencional	0,018 ± 0,004 ^B	0,82 ± 0,06 ^A	0,988	0,0001	0,0035
70 °C - 50 V	0,030 ± 0,005 ^{AB}	0,76 ± 0,01 ^{AB}	0,983	0,0002	0,0053
70 °C - 100 V	0,062 ± 0,011 ^A	0,61 ± 0,02 ^B	0,968	0,0006	0,0084
80 °C - convencional	0,37 ± 0,02 ^a	0,52 ± 0,01 ^a	0,998	0,0002	0,0052
80 °C - 50 V	0,38 ± 0,04 ^a	0,52 ± 0,06 ^a	0,987	0,0013	0,0112
80 °C - 100 V	0,34 ± 0,09 ^a	0,59 ± 0,08 ^a	0,997	0,0004	0,0066

* Letras iguais na mesma coluna não representam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas referem-se às temperaturas de 70 e 80 °C, respectivamente.

Analisando os dados expostos na Tabela 4.3 observa-se que para a temperatura de 80 °C não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os métodos de tratamento utilizado. Acredita-se que, nestas condições, os efeitos térmicos são superiores aos elétricos, impossibilitando a avaliação da influência da presença do campo elétrico durante o tratamento. No entanto, para 70 °C foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento convencional e o aquecimento ôhmico com tensão de 100 V. A taxa de inativação enzimática (b) obtida com o aquecimento ôhmico foi maior do que com o tratamento convencional, indicando que a presença do campo elétrico pode ser um fator que promova ou facilita a inativação de enzimas.

Utilizando os parâmetros determinados foram calculados os valores previstos para a inativação de POD ao longo do tempo. Com estes valores foram plotadas curvas comparando os dados experimentais e os previstos pelo modelo de distribuição de Weibull que são apresentadas na Figura 4.3. Para melhor visualização, apenas curvas para condições com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foram traçadas, essas foram identificadas como “WD” na legenda do gráfico.

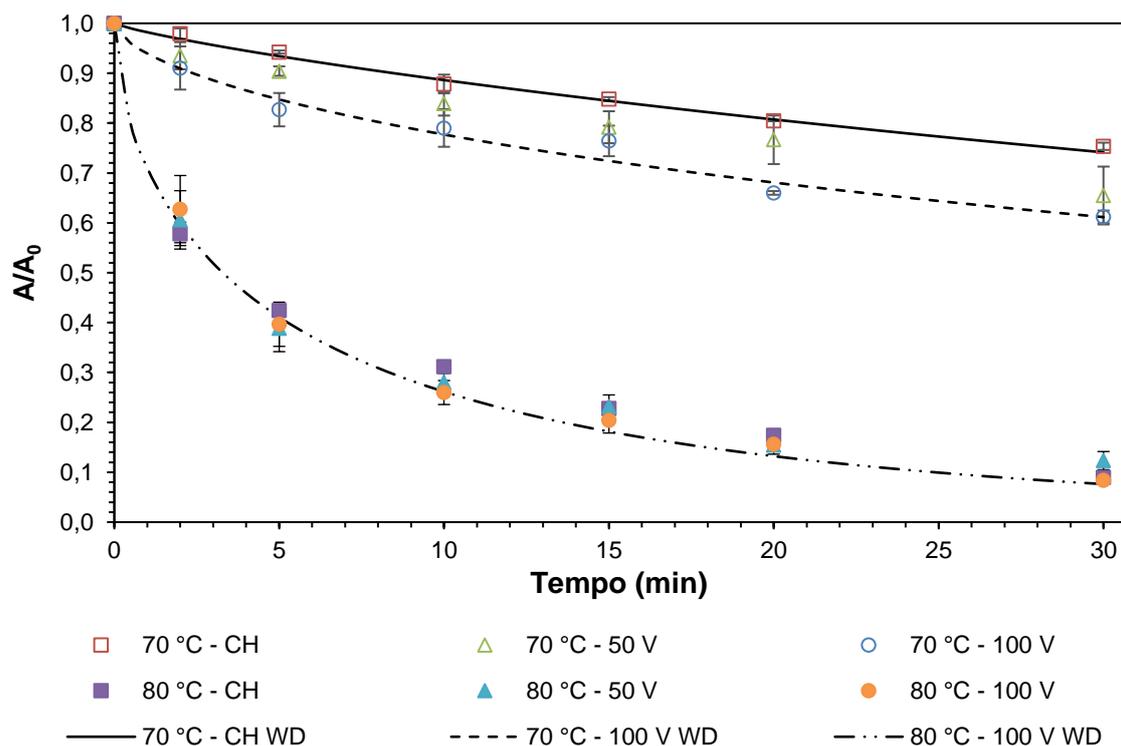


Figura 4.3: Valores de atividade residual experimentais e previstos para inativação de POD de caldo de cana.

A Figura 4.4 mostra um gráfico plotado para avaliar a paridade entre os dados experimentais e previstos, no qual as linhas tracejadas representam o intervalo de $\pm 5\%$ de confiança dos resultados. Como pode ser visto, todos os dados se encontram entre os limites de confiança, confirmando que o modelo de distribuição de Weibull descreve adequadamente a cinética de inativação de POD no caldo de cana. Brochier, Mercali & Marczak (2016) reportaram resultados condizentes com os encontrados no presente estudo para o caldo de cana.

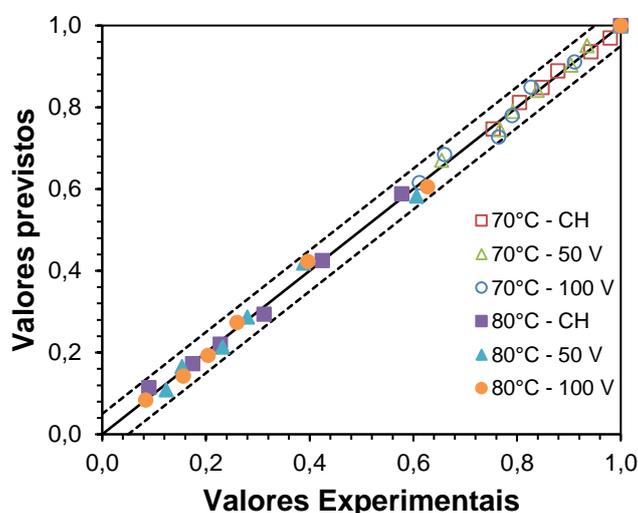


Figura 4.4: Paridade entre dados experimentais e previstos para inativação de POD de caldo de cana.

O aquecimento ôhmico faz uso de corrente alternada, logo, moléculas que possuam cargas e momento de dipolo, como as enzimas, se movimentarão em resposta ao campo elétrico (SAMARANAYAKE; SASTRY, 2016). Porém, a forma com que a presença de um campo elétrico afeta a inativação enzimática não é bem conhecida, existindo apenas hipóteses do que ocorre. A desnaturação de enzimas é causada pelo rearranjo e/ou pela destruição de ligações não-covalentes, interações hidrofóbicas e ligações iônicas da estrutura terciária da proteína. Segundo Castro *et al.* (2004), a presença de um campo elétrico pode influenciar reações bioquímicas, alterando o espaçamento molecular e aumentando as reações entre cadeias, situação que pode ter acontecido nos experimentos realizados nesse trabalho, principalmente nos tratamentos a 70 °C, em que foi observado efeito não-térmico.

Castro *et al.* (2004) realizou estudos com a aplicação de aquecimento ôhmico em diversas enzimas, como polifenoloxidase e pectinase e demonstrou que apenas algumas delas respondem à presença do campo elétrico, tendo sua inativação acelerada. Analisando os resultados obtidos, foi proposto que a perda de atividade enzimática e desnaturação da proteína, em virtude da presença do campo elétrico, ocorre devido à remoção do grupo prostético metálico presente nas enzimas afetadas. A POD contém o grupo prostético heme, composto por um anel porfirínico com um íon de ferro em seu centro (ADAMS, 1997; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008), o que vai ao encontro com esta hipótese e poderia explicar a diferença encontrada entre o tratamento convencional e o aquecimento ôhmico a 70 °C.

4.3 Atividade residual de POD durante o armazenamento

O caldo de cana processado ficou armazenado numa geladeira por um período de 14 dias. Foram armazenadas amostras com 15 e 30 min de tratamento e os resultados obtidos para atividade residual de POD são apresentados e discutidos a seguir. As atividades residuais ao longo do armazenamento foram calculadas em relação à atividade enzimática de POD observada no momento de coleta das amostras, logo, o nível de regeneração se refere à atividade da amostra quando coletada e não à atividade no tempo 0 do experimento.

Nas Figuras 4.5 e 4.6 são apresentados os dados de atividade residual de POD para os experimentos a 70 °C. Os resultados não mostraram diferença

significativa ($p < 0,05$) tanto entre os experimentos como também para a regeneração da enzima ao longo do tempo de armazenamento. Segundo Adams (1997), durante o processamento pode ocorrer apenas inativação parcial da POD, por meio da perda do seu grupo prostético, como também a completa desnaturação da mesma, devido a grandes mudanças em sua estrutura. Quando o tratamento for realizado em temperaturas mais brandas ou em temperaturas elevadas, mas por um curto espaço de tempo, o grupo prostético da POD pode dimerizar. Assim, ocorre uma recombinação entre o grupo prostético e a proteína desnaturada, resultando em isoenzimas semelhantes ou não às iniciais e, conseqüentemente, na regeneração da atividade enzimática. Logo, se o tratamento for a temperaturas e períodos de tempo maiores o grupo prostético não conseguirá se recombinar, resultando em uma baixa regeneração da atividade.

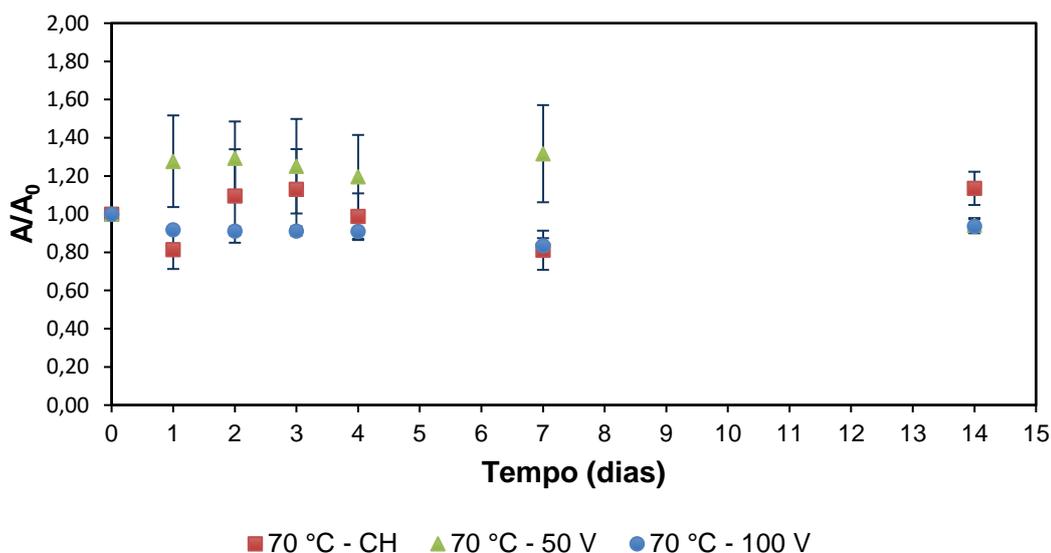


Figura 4.5: Atividade residual de POD durante o armazenamento após tratamento a 70 °C por 15 min.

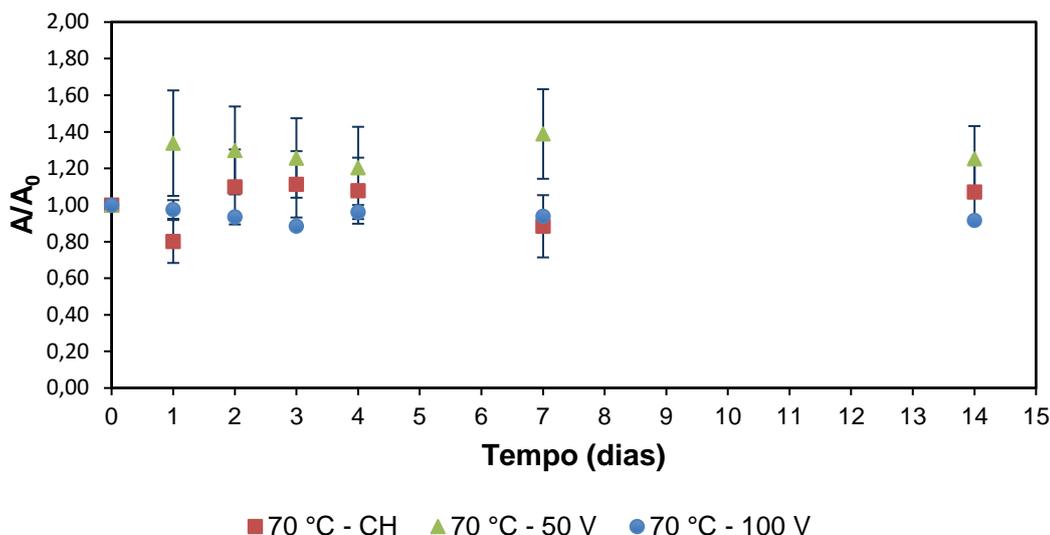


Figura 4.6: Atividade residual de POD durante o armazenamento após tratamento a 70 °C por 30 min.

A presença de grandes erros experimentais dificulta a comparação entre os dados, e devem ser o motivo pelo qual não se obteve uma diferença estatisticamente significativa. Foi necessário repetir quatro vezes o ensaio de aquecimento ôhmico a 70 °C e 100 V para que erros aceitáveis fossem obtidos. Acredita-se que a dificuldade para se conseguir dados mais concisos e com menores erros se deva à presença de várias isoenzimas de POD no caldo de cana e pela temperatura empregada ser próxima da temperatura ótima de atividade (~60 °C) (BROCHIER *et al.*, 2016). Soma-se a isso a falta de conhecimento e informação sobre as diferentes vias de regeneração da enzima. Segundo Mozhaev & Martinek (1982), a reativação pode ocorrer quando a inativação foi causada pela agregação da proteína, modificação de grupos SH (ou ligações S-S) ou como consequência de mudanças conformacionais irreversíveis.

Os resultados obtidos para o armazenamento das amostras processadas a 80 °C por 15 min são apresentados na Figura 4.7. Por meio de análise estatística, mostrou-se que para 15 min de tratamento não houve diferença significativa para a atividade residual entre os experimentos ao longo do armazenamento. Porém, o tratamento convencional apresentou uma regeneração de atividade enzimática significativa ($p < 0,05$) no primeiro, sétimo e décimo quarto dias de armazenamento. Já para os dois ensaios com aquecimento ôhmico não houve regeneração significativa ($p > 0,05$). Assim sendo, de acordo com a atividade enzimática de POD, o caldo de cana processado por 15 min por meio de

aquecimento ôhmico com 50 e 100 V ainda estaria em condições para ser consumido, ao contrário do caldo que passou pelo tratamento convencional.

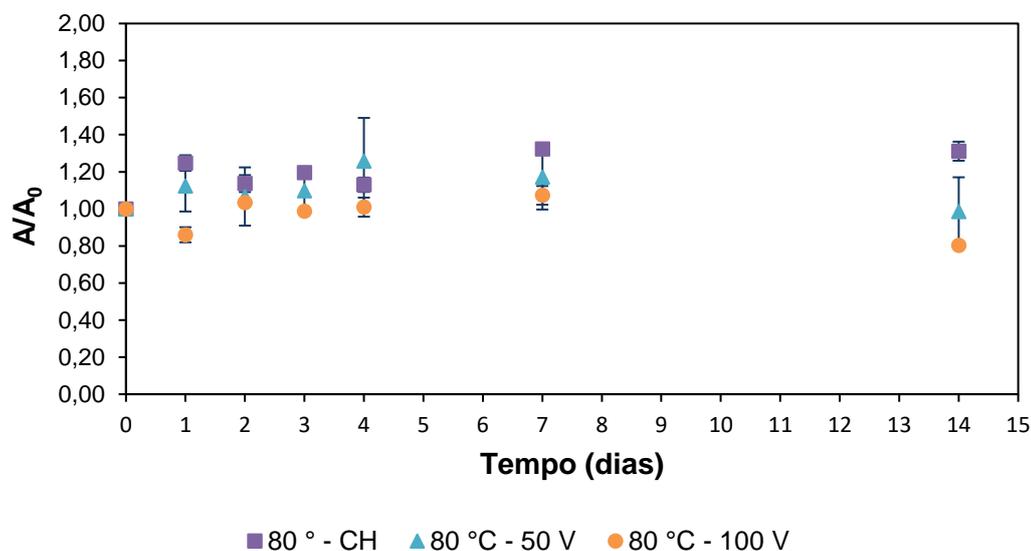


Figura 4.7: Atividade residual de POD durante o armazenamento após tratamento a 80 °C por 15 min.

Analisando os dados para 30 min a 80 °C, expostos na Figura 4.8, nota-se que, apesar de se obter uma diferença de apenas 10 pontos percentuais na inativação de POD com o aumento do tempo de tratamento, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as atividades enzimáticas residuais obtidas com o método convencional e o aquecimento ôhmico ao longo do armazenamento, ao contrário do resultado para 15 min, sugerindo um tempo de tratamento ideal de 30 min nessas condições. Enquanto em ambas as condições do aquecimento ôhmico não houve regeneração, a atividade enzimática teve um grande aumento após o tratamento convencional, que chegou a atingir picos de até 80% em relação à atividade de POD no dia do tratamento. Uma hipótese para essa diferença na regeneração para o tratamento convencional seria de que o maior tempo de tratamento térmico pode ter liberado outros substratos que favoreceram a ação da enzima, aumentando, assim, sua atividade; tal situação foi impedida com o uso de campo elétrico.

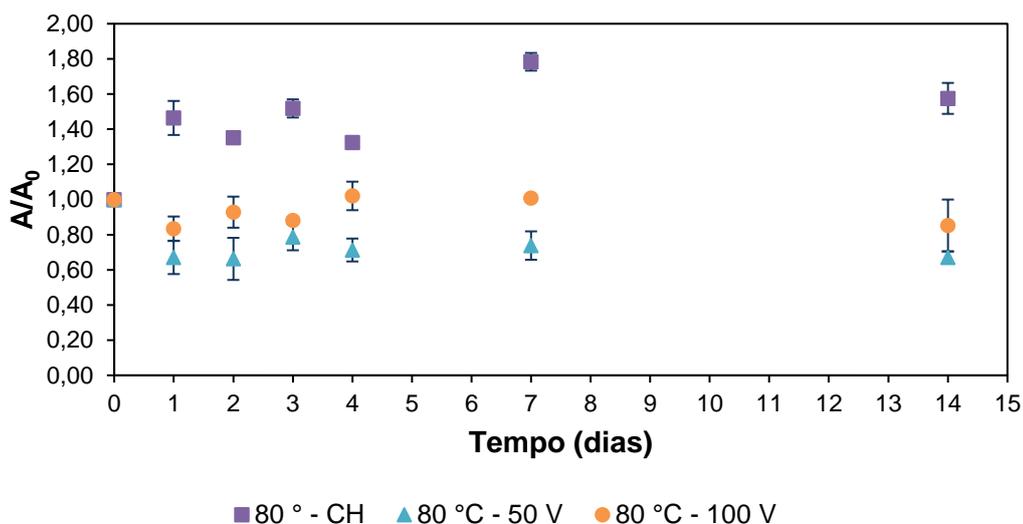


Figura 4.8: Atividade residual de POD durante o armazenamento após tratamento a 80 °C por 30 min.

De modo similar à regeneração obtida com o aquecimento convencional no presente trabalho, Schmidt & Vámos-Vigyázó (1985) observaram que em temperaturas mais baixas de tratamento (70 – 80 °C), os percentuais de regeneração também foram expressivos, variando de 80 até 100% da atividade inicial. Para conseguirem um nível de regeneração reduzido (~20%) foi necessária a realização de tratamentos com temperaturas de até 95 °C. No presente estudo, com a aplicação de aquecimento ôhmico, conseguiu-se evitar a regeneração da atividade de POD a apenas 80 °C, ou seja, com essa tecnologia é possível se atingir resultados satisfatórios em relação à regeneração de atividade enzimática, mesmo com temperaturas mais baixas, ajudando a reduzir danos ao alimento e melhorando sua qualidade final.

Não foram encontrados dados em relação à atividade enzimática da POD após aquecimento ôhmico com campo elétrico moderado na literatura, apenas trabalhos que utilizaram campo elétrico pulsado (*PEF*, do inglês *pulse electric field*), que usa gradiente de tensão maior do que 1 kV/cm, em que não houve regeneração da enzima, ou seja, a inativação foi total durante o tratamento. Zhong *et al.*, (2007) estudaram a atividade residual relativa da POD após 48 h de armazenamento a 4 °C em solução tampão de acetato tratada via *PEF*. À medida que o tempo de armazenamento foi prolongado, a sua atividade residual relativa mostrou uma ligeira inativação, mas nenhuma diferença significativa de atividade de POD foi exibida durante o armazenamento ($p > 0,05$). Por outro lado, Yeom *et al.*, (1999) observaram que a papaína apresentou uma diminuição significativa da

atividade relativa (cerca de 90% de redução) após o armazenamento durante 48 h a 4 °C independentemente da intensidade do campo elétrico.

A comparação entre os métodos de tratamento aplicados no presente estudo mostra que o aquecimento ôhmico apresenta uma grande vantagem em relação ao tratamento térmico convencional. Embora inicialmente a inativação obtida com os dois seja similar, durante o armazenamento não ocorre regeneração da POD no caldo de cana tratado com aquecimento ôhmico, tanto para 50, como para 100 V. Tal fato sugere que, do ponto de vista de atividade enzimática de POD, o caldo estará apto para ser consumido por até 14 dias após o tratamento. Para o caldo processado de modo convencional, a regeneração foi expressiva, já no dia seguinte ao tratamento, fazendo com que ele perca propriedades rapidamente, não se aconselhando seu consumo.

4.4 Análise de Cor

Os resultados obtidos para a análise de cor apresentaram grandes erros entre as duplicatas. Essa grande variação pode ser observada na Figura 4.9, que indica a diferença total de cor em relação ao caldo de cana *in natura* ao longo do experimento. Estes erros impossibilitaram que uma avaliação adequada dos dados fosse realizada. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido a possíveis reações de decomposição de algum componente do caldo de cana e a reações de oxidação dos eletrodos, consequentemente alterando a cor do produto.

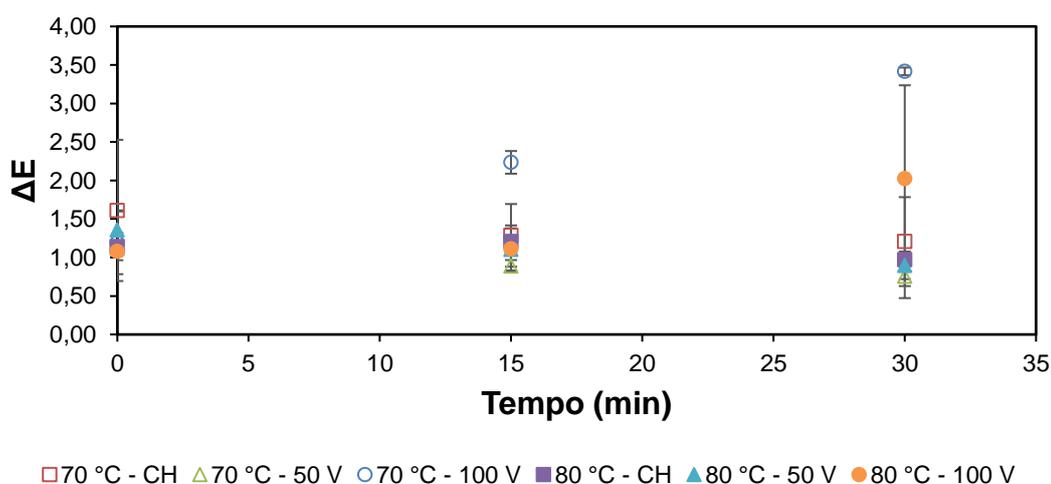


Figura 4.9: Diferença total de cor ao longo dos tratamentos convencionais e ôhmicos.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho realizou estudos da cinética de inativação de POD presente no caldo de cana através da aplicação de aquecimento ôhmico. Também foi avaliada a atividade enzimática residual de POD ao longo do armazenamento do caldo processado. Nos experimentos, foram avaliadas a variação da temperatura, do tempo de processo e da tensão aplicadas no tratamento. Para fins de comparação e apreciação de possíveis efeitos elétricos, foram realizados experimentos com tratamento térmico convencional.

Os tratamentos realizados a 80 °C mostraram-se mais eficientes na inativação de POD proveniente do caldo de cana do que os a 70 °C, atingindo índices de até 90% na redução de atividade enzimática. Com os dados de atividade enzimática residual foram avaliados os modelos cinéticos de inativação, dos quais o modelo de distribuição de Weibull foi o que melhor se adequou aos resultados experimentais, confirmando o resultado de trabalhos anteriores. Para os experimentos a 70 °C foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento convencional e o aquecimento ôhmico com aplicação de 100 V. Já para 80 °C não foi encontrada diferença entre os tratamentos empregados, onde possivelmente os efeitos térmicos foram superiores aos elétricos nestas condições.

A avaliação das atividades enzimáticas residuais durante o armazenamento foi inconclusiva para os experimentos a 70 °C. Porém, para os experimentos a 80 °C, foi demonstrado que o processamento com aquecimento ôhmico por 30 min evitou a regeneração da atividade de POD ao longo dos 14 dias de acompanhamento. Por outro lado, o tratamento convencional apresentou grande regeneração da atividade enzimática quando conduzido na mesma temperatura. Isso mostra que o método sugerido se apresenta como uma boa alternativa para o processamento do caldo de cana e seu posterior consumo por um período de até 14 dias.

Como sugestões para trabalhos futuros, indica-se a realização de novos ensaios para a reavaliação da influência do tratamento na cor do caldo de cana e o uso de temperaturas mais elevadas para a inativação total da enzima. Além disso, sugere-se a análise de estruturas secundárias e terciárias da POD por dicroísmo circular (CD), para avaliação da inativação/regeneração enzimática.

6 Referências

ADAMS, J. B. Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation. **Food Chemistry**, 1997. v. 60, n. 2, p. 201–206.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Washington, DC: [s.n.], 1990.

_____. **Official Methods of Analysis**. Washington, DC.: [s.n.], 2000.

AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 2007. v. 46, n. 6, p. 584–602.

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. v. 74, p. 396–403. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.001>>.

BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. Contribution of Enzymic Browning to Color in Sugarcane Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1994. v. 42, n. 2, p. 257–261.

CAPPATO, L. P. *et al.* Ohmic heating in dairy processing: Relevant aspects for safety and quality. **Trends in Food Science and Technology**, 2017. v. 62, p. 104–112. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.010>>.

CASTRO, I. *et al.* The Effect of Electric Field on Important Food-processing Enzymes: Comparison of Inactivation Kinetics under Conventional and Ohmic Heating. **Journal of Food Science C: Food Chemistry and Toxicology**, 2004. v. 69, n. 9, p. C696–C701. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09918.x/abstract%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09918.x>>.

CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S.; MISHRA, H. N. Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2015. v. 27, p. 57–68. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.11.003>>.

CHEN, C.; WU, M. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. **Journal of food science**, 1998. v. 63, n. 5, p. 1–4. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1998.tb17891.x/abstract>>.

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. v. 55, n. 9, p. 3469–3476.

CONAB. **SAFRA 2017/18 N. 2 - Segundo levantamento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, 2**. Brasília: [s.n.], 2017.

CRISTINE, A. *et al.* Análise das Condições do Comércio de Caldo de Cana em Vias Públicas de Municípios Paulistas Safety Analysis of Sugarcane Juice Vending in Public Ways of Municipal Districts of São Paulo State. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 2006. v. 13, n. 2, p. 6–18.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry**. [S.l.]: [s.n.], 2008.

ENGCHUAN, W.; JITTANIT, W.; GARNJANAGOONCHORN, W. The ohmic heating of meat ball: Modeling and quality determination. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2014. v. 23, p. 121–130. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.02.014>>.

FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, 1996. v. 31, n. 1–3, p. 263–271.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 1ª ed. [S.l.]: NOBEL, 1998.

GHNIMI, S. *et al.* Design and performance evaluation of an ohmic heating unit for thermal processing of highly viscous liquids. **Chemical Engineering Research and Design**, 2008. v. 86, n. 6, p. 626–632.

GOULLIEUX, A.; PAIN, J.-P. Ohmic heating. **Emerging Technologies for food processing**. Sun, D.-W. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2005, p. 241–265.

GRINGS, M. F. **Estudo da Influência da Tensão durante o Aquecimento Ôhmico da Polpa de Acerola**. [S.l.]: [s.n.], 2016.

IÇIER, F.; YILDIZ, H.; BAYSAL, T. Polyphenoloxidase deactivation kinetics during ohmic heating of grape juice. **Journal of Food Engineering**, 2008. v. 85, n. 3, p. 410–417.

JAEGER, H. *et al.* Opinion on the use of ohmic heating for the treatment of foods. **Trends in Food Science and Technology**, 2016. v. 55, p. 84–97.

KUNITAKE, M. T. **Processamento e estabilidade de caldo de cana acidificado**. [S.l.]: [s.n.], 2012.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006. v. 38, n. 1–2, p. 1–9.

MAO, L. C.; XU, Y. Q.; QUE, F. Maintaining the quality of sugarcane juice with blanching and ascorbic acid. **Food Chemistry**, 2007. v. 104, n. 2, p. 740–745.

MIZOBUTSI, G. P. *et al.* Peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. **Sci. Agric. (Piracicaba)**, 2010. v. 67, n. 2, p. 213–217.

MORAIS, L., K. *et al.* Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar. 2015. p. 7–31.

MOSUPYE, F. M.; HOLY, A. VON. Microbiological hazard identification and exposure assessment of street food vending in Johannesburg, South Africa.

International Journal of Food Microbiology, 2000. v. 61, n. 2–3, p. 137–145.

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

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela brasileira de composição de alimentos. **NEPA - Unicamp**, 2011. p. 161. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>.

OLIVEIRA, A. C. G. De *et al.* Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2007. v. 27, n. 4, p. 863–873.

QUDSIEH, H. Y. M. *et al.* Effect of maturity on chlorophyll, tannin, color, and polyphenol oxidase (PPO) activity of sugarcane juice (*Saccharum officinarum* var. yellow cane). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002. v. 50, n. 6, p. 1615–1618.

REZZADORI, K. *et al.* Crossflow microfiltration of sugarcane juice: effects of processing conditions and juice quality. **Food Science and Technology (Campinas)**, 2014. v. 34, n. 1, p. 210–217. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000100030&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

RIZVI, A. F.; TONG, C. H. Fractional Conversion for Determining Texture Degradation Kinetics of Vegetables. **Journal of Food Science**, 1997. v. 62, n. 1, p. 1–7. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04356.x>>.

RUDRA SHALINI, G.; SHIVHARE, U. S.; BASU, S. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. **Journal of Food Engineering**, 2008. v. 85, n. 1, p. 147–153.

SAKR, M.; LIU, S. A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2014. v. 39, p. 262–269. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.061>>.

SAMARANAYAKE, C. P.; SASTRY, S. K. Effect of moderate electric fields on inactivation kinetics of pectin methylesterase in tomatoes: The roles of electric field strength and temperature. **Journal of Food Engineering**, 2016. v. 186, p. 17–26. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.04.006>>.

SANT'ANNA, V. *et al.* Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. **Dyes and Pigments**, 2013. v. 98, n. 3, p. 601–608. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.04.011>>.

SARKIS, J. R. **Construção de um sistema de aquecimento ôhmico e sua aplicação no tratamento térmico de polpa de mirtilo**. [S.l.]: [s.n.], 2011. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufrgs.br/da.php?nrb=000790986&loc=2011&l=825a2ad281aeba0f>>.

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. v. 71, p. 329–338.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.015>>.

SCHMIDT, K.; VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Heat inactivation of a soluble peroxidase extract from acetone powder of kohlrabi and its reactivation after heat treatment. **Food Chemistry**, 1985. v. 16, n. 2, p. 103–113.

SILVA, J. P. N. Da; SILVA, M. R. N. Da. **Noções da Cultura da Cana-de-Açúcar**.

WEEMAES, C. A *et al.* Pressure-Temperature Inactivation of. **Biotechnology and Bioengineering**, 1998. v. 60, n. 3, p. 292–300.

YEOM, H. W.; ZHANG, Q. H.; DUNNE, C. P. Inactivation of papain by pulsed electric fields in a continuous system. **Food Chemistry**, 1999. v. 67, n. 1, p. 53–59.

YUSOF, S.; SHIAN, L. S.; OSMAN, A. Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. **Food Chemistry**, 2000. v. 68, n. 4, p. 395–401.

ZHONG, K. *et al.* Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. **Food Chemistry**, 2007. v. 100, n. 1, p. 115–123.