

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

## EFEITO DA TERMOSSONICAÇÃO NA INATIVAÇÃO DE PEROXIDASE DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

J.K. Medeiros<sup>1</sup>, J.R. Sarkis<sup>2</sup>, G.D. Mercali<sup>3</sup>

1 – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Campus Florianópolis – Continente – CEP: 88.075-010 – Florianópolis – SC – Brasil, Telefone: +55 (48) 3877-8400 – e-mail: jucelio.medeiros@ifsc.edu.br.

2 - Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 90.035-007 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: +55 (51) 3308-2860 – e-mail: julia@enq.ufrgs.br.

3 - Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: +55 (51) 3308-7862 – e-mail: giovana.mercali@ufrgs.br.

**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. 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 da peroxidase endógena do caldo de cana. Foram testadas temperaturas de 50 a 80 °C, com amplitude de US de 75 %, 25 min de tratamento ultrassônico e regime de pulsos, durando 20 s, em intervalos de 10 s. Foi observado efeito positivo do US na redução da atividade enzimática, sendo a aplicação dessa tecnologia uma alternativa para reduzir a severidade do processamento térmico, diminuindo o tempo ou a temperatura de processamento.

**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 polyphenoloxidase and peroxidase. The aim of this work was to evaluate the use of US for inactivation of endogenous peroxidase in sugarcane juice. Temperatures from 50 to 80 °C were tested with sonication amplitude of 75%, pulse regime of 20 s on / 10 s off and with sonication throughout the entire thermal process. The results indicated a positive effect of US on reducing enzyme residual activity, being US application an alternative to reduce the thermal processing severity, decreasing the processing time or temperature.

**PALAVRAS-CHAVE:** inativação enzimática, ultrassom, caldo de cana, peroxidase.

**KEYWORDS:** enzymatic inactivation, ultrasound, sugarcane juice, peroxidase.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



## 1. INTRODUÇÃO

O caldo de cana-de-açúcar é uma bebida popular no Brasil, assim como em outros países tropicais, em especial na Índia (BROCHIER et al., 2016; GARUD et al., 2017; SAXENA et al., 2016). 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. 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 conseqüente 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 de cana, 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.

O uso de ultrassom (US), uma tecnologia emergente não térmica, desperta grande interesse, pois é uma tecnologia versátil que pode ser aplicada em diversas etapas do processamento de alimentos (LI; FARID, 2016; KNORR et al., 2011). Essa técnica consiste em submeter o alimento a ondas ultrassônicas de alta potência, provocando, principalmente, o fenômeno da cavitação (RASO; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003). 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 (RASO; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003; TIWARI et al., 2008). 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 (ROJAS et al., 2016; KNORR et al., 2011).

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, portanto, teve como objetivo avaliar o uso da termossonicação para a inativação de enzimas oxidativas endógenas do caldo de cana-de-açúcar.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Caldo de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar foi doada por uma propriedade rural situada no município de Veranópolis, RS. Foi colhida e moída em moenda mecânica, em janeiro de 2019. 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. 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.

### 2.2 Tratamentos controle e ultrassônico

O tratamento controle constou de experimentos que visavam a reproduzir um tratamento térmico convencional, através do uso de uma célula de vidro encamisada acoplada a um sistema de válvulas que permitia

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

a entrada de água de dois banhos termostáticos quentes, uma para aquecimento, outro para manutenção da temperatura. Os tratamentos controle, portanto, serão chamados de convencionais nesse trabalho. 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. 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, 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. Durante o experimento, as amostras foram constantemente agitadas utilizando um agitador magnético (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil).

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 assistido termicamente (termossonicação). A amplitude de sonicação foi de 75 %. O regime de pulsos ultrassônicos foi de pulsos durando 20 s, em intervalos de 10 s. Esses parâmetros foram escolhidos visando a evitar sobrecarga do equipamento e otimizar o uso de energia. 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. O ultrassom, em todos os casos, foi aplicado somente na fase isotérmica (após a rampa de aquecimento).

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). Os procedimentos consistiram em processar o caldo de cana em diferentes temperaturas: 50, 60, 70 e 80 °C ± 2 °C. Para cada temperatura, foram feitos os tratamentos controle e com sonicação, 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. As amostras coletadas foram armazenadas imediatamente em banho de gelo e assim mantidas até serem analisadas. As amostras foram mantidas a temperatura constante de estudo e coletadas em intervalos de tempo específicos em cada etapa da pesquisa, sendo, em seguida, imediatamente resfriadas em banho de gelo.

### 2.3 Determinação da atividade de peroxidase

A análise de atividade de POD foi realizada de acordo com protocolo descrito por Chisari et al. (2007), 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 0,50 mL do extrato foi acondicionada em cubetas de acrílico de 1,5 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, denominada A, foi determinada a partir da variação na absorvância por minuto ( $\Delta\text{abs}/\text{min}$ ) e dividida por 0,001; para tanto, foi utilizada somente a porção linear da curva, usando regressão linear. As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto experimental, e o branco foi obtido pela substituição da amostra por água destilada.

### 2.4 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 ao modelo de Weibull, adotado 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).

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

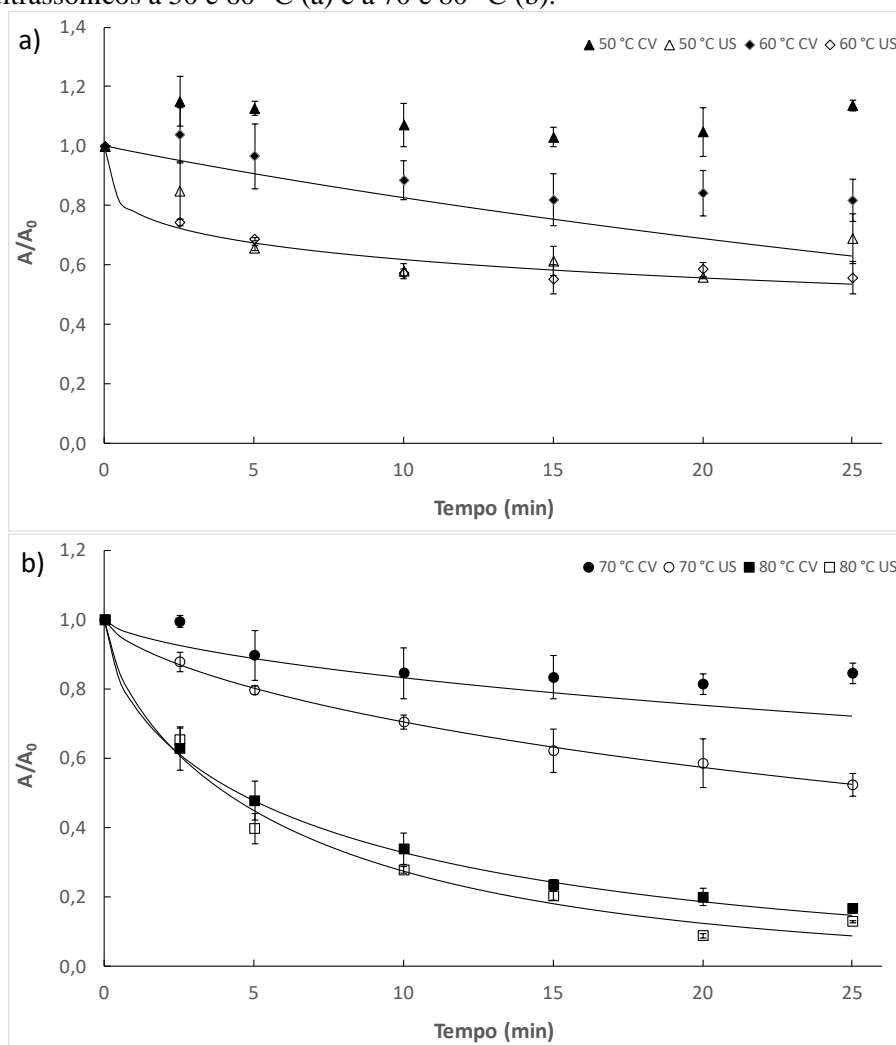


www.officeeventos.com.br

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 ( $\chi^2$ ) e pela raiz do erro médio quadrático ( $RMSE$ ).

Os parâmetros cinéticos e demais propriedades avaliadas foram analisados e comparados utilizando-se ANOVA e teste de Tukey com nível de confiança de 95% (Statistica versão 12.0, StatSoft Inc. Tulsa, EUA).

Figura 1 – Atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais e ultrassônicos a 50 e 60 °C (a) e a 70 e 80 °C (b).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a atividade enzimática residual de POD em caldo de cana ao longo do tempo nos tratamentos convencionais e ultrassônicos. 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, devido 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.

Para as temperaturas de 50 e 60 °C, pode-se observar que os perfis de atividade enzimática dos tratamentos com termossonicação 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 sonicacão.

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. Por fim, verifica-se que à medida que aumenta a temperatura de tratamento, diminui as diferenças entre os tratamentos convencionais e com ultrassom. À medida que a temperatura aumenta, aumenta o efeito térmico sobre a inativação, o que acaba encobrindo os efeitos não térmicos do US.

A Tabela 1 apresenta os valores para os índices estatísticos que avaliam a performance do modelo de Weibull para descrever a inativação de POD nos diferentes tratamentos aplicados. Como pode ser observado na tabela, houve um bom ajuste dos dados ao modelo, já que o índice  $R^2$  foi alto e os índices  $\chi^2$  e  $RMSE$  foram satisfatoriamente baixos. Cabe ressaltar também que as diferentes isoformas podem comportar-se distintamente ao longo do tratamento e também podem reagir aos 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.

Tabela 1 – Coeficientes do modelo de Weibull para atividade residual de POD em caldo de cana nos tratamentos convencionais e com termossonicação.

Tratamento	$b$	$n$	$R^2$	$\chi^2$	$RMSE$
60 °C CV	0,021 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,961 ± 0,64 <sup>a</sup>	0,916	1,60 · 10 <sup>-3</sup>	3,03 · 10 <sup>-3</sup>
60 °C US	0,249 ± 0,076 <sup>b</sup>	0,285 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,984	9,83 · 10 <sup>-4</sup>	1,86 · 10 <sup>-4</sup>
70 °C CV	0,043 ± 0,034 <sup>A</sup>	0,629 ± 0,39 <sup>A</sup>	0,911	1,22 · 10 <sup>-3</sup>	2,31 · 10 <sup>-3</sup>
70 °C US	0,075 ± 0,009 <sup>A</sup>	0,669 ± 0,05 <sup>A</sup>	0,999	6,89 · 10 <sup>-5</sup>	1,30 · 10 <sup>-4</sup>
80 °C CV	0,284 ± 0,076 <sup>a</sup>	0,594 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,999	1,19 · 10 <sup>-4</sup>	2,25 · 10 <sup>-4</sup>
80 °C US	0,262 ± 0,045 <sup>a</sup>	0,694 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,994	1,64 · 10 <sup>-3</sup>	3,09 · 10 <sup>-3</sup>

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5 % de significância.

Na Figura 1 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 1 especifica os coeficientes do modelo de Weibull para os diferentes tratamentos aplicados. Comparando o tratamento convencional e com ultrassom numa mesma temperatura, verifica-se que os tratamentos diferem entre si somente na temperatura de 60°C para o parâmetro  $b$ . Esse resultado reforça a hipótese levantada de que em altas temperaturas, o efeito do ultrassom é sobreposto 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.

## 4. CONCLUSÕES

A atividade residual de POD nas diferentes temperaturas testadas 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 promoveu uma maior taxa de inativação devido, provavelmente, às forças de cisalhamento produzidas pela cavitação que causam a ruptura de ligações de hidrogênio e das interações de Van der Waals das cadeias polipeptídicas da enzima. Esses fenômenos podem levar à alteração das estruturas secundária e terciária da proteína, com perda da atividade enzimática. Além disso, os radicais livres produzidos pela cavitação podem reagir com alguns resíduos de aminoácidos que participam na estabilidade da enzima, na ligação do substrato, ou na atividade catalítica da enzima.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- LI, X.; FARID, M. A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. **Journal of Food Engineering**, 2016.
- 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.
- 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>>. .
- 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.
- 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.
- WALKER, J. R. L. (2001). Expression and measurement of enzyme activity. In: WORLSTAD, R.E.; ACREE, T.E.; HAEJUNG, A.; DECKER, E.A.; PENNER, M.H.; REID, D.R.; SCHWARZ, S.J.; SHOEMAKER, C. F.; SPORNS, P. **Current protocols in food analytical chemistry**. Nova Iorque: John Willey and Sons, 2001. pp. C4.1.1eC4.1.15.