



**TAYNÁ MÁRCIA TEIXEIRA FERREIRA**

**ESTUDO CINÉTICO DINÂMICO DA DEGRADAÇÃO  
ENZIMÁTICA DA ÁGUA DE COCO DE COCO SUBMETIDA  
A TERMOSONICAÇÃO**

**LAVRAS – MG  
2019**

**TAYNÁ MÁRCIA TEIXEIRA FERREIRA**

**ESTUDO CINÉTICO DINÂMICO DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA ÁGUA DE  
COCO SUBMETIDA A TERMOSONICAÇÃO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof(a). Dr(a). Vanessa Rios de Souza  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2019**

**TAYNÁ MÁRCIA TEIXEIRA FERREIRA**

**ESTUDO CINÉTICO DINÂMICO DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA ÁGUA DE  
COCO SUBMETIDA A TERMOSONICAÇÃO.**

**KINETIC DYNAMIC STUDY OF ENZYMATIC DEGRADATION OF COCONUT  
WATER SUBMITTED TO THERMOSONICATION PROCESS.**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 18 de Novembro de 2019.  
Dr(a). Vanessa Rios de Souza  
Dr. Cleiton Antônio Nunes  
Maria Cecília Evangelista Vasconcelos Schiassi

Prof(a). Dr(a). Vanessa Rios de Souza  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2019**

À minha família que acreditou em mim e não mediu esforços  
para me apoiar e tornar tudo isso possível.  
Com todo o meu amor, carinho e gratidão  
DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus por abençoar e guiar meu caminho e minhas escolhas diariamente.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do trabalho.

À CAPES pelo apoio durante a pesquisa.

Ao Ministério da Educação pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais Márcia e Avelino pela confiança, apoio e amor incondicional.

Ao meu avô Reginaldo por acreditar em mim e ser o espelho de amor, ética e caráter que guia minha conduta.

À minha avó Maria de Nazaré por todo o incentivo, amor e confiança.

À minha irmã e afilhada Maria Eduarda por ser uma das maiores razões e motivações para minhas conquistas.

À minha família paterna: avó Marília, madrinha Magali e tias Rainali e Daiane por todo apoio, carinho e amor.

Ao meu namorado Josias por acreditar em mim mesmo quando eu mesma não acreditava.

Aos amigos da Engenharia de Alimentos pela amizade, estudos e companheirismo durante a graduação.

À minha orientadora Vanessa pela atenção, dedicação, compromisso e amizade ao longo desses anos de orientação.

Ao PET Engenharia de Alimentos por todo o desenvolvimento pessoal e profissional que me proporcionou.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

A água de coco é uma bebida muito apreciada por sua refrescância além do alto valor nutricional e capacidade de reposição eletrolítica, o que faz com que seu consumo venha crescendo nos últimos anos. A alta demanda e a dificuldade de transporte e comercialização da bebida no fruto tornam necessária sua extração e industrialização, conferindo segurança, praticidade e aumento da vida útil devido à inativação microbiológica e enzimática. No entanto, os processamentos tradicionalmente aplicados são termicamente rigorosos, causando danos sensoriais e nutricionais que prejudicam a aceitabilidade da bebida. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a cinética de degradação enzimática da água de coco pelo processo de termossonicação em comparação com o tratamento térmico convencional, através da realização de um estudo cinético dinâmico de inativação térmica. Foram definidos 5 tratamentos tratados por termossonicação (50% - 15 min; 70% - 10 min; 90% - 5 min; 90% - 10 min e 100% - 5 min), sendo o perfil de temperatura reproduzido no tratamento térmico convencional totalizando 10 tratamentos. A avaliação da destruição enzimática ao longo do tempo de processamento foi realizada em intervalos de tempo pré-definidos, expressa em porcentagem de atividade referente à amostra controle (100%). O estudo cinético da inativação térmica das enzimas baseou-se na definição da temperatura de referência, pela análise do coeficiente de correlação entre  $D_{ref}$  e  $z$  versus  $T_{ref}$  para vários valores escolhidos arbitrariamente, e na estimação dos parâmetros térmicos, pela análise de regressão global por modelo secundário. Ao comparar a atividade das enzimas, observou-se que a termossonicação causou uma redução muito maior que o tratamento térmico convencional na maioria dos experimentos realizados, deixando evidente o efeito sinérgico do ultrassom com temperatura. Em condições menos intensas de processamento por termossonicação, como a de 50%/15min (UI=0,450 W/mL) a estimação da cinética de degradação foi muito imprecisa, entretanto, em condições termosônicas mais intensas, ou seja, 90% / 5 min (0,640 W / mL) e 70% / 10 min (0,645 W / mL), a estimativa teve uma precisão maior e resultou em uma redução de mais de 50% da atividade de PPO e POD. Em todos os tratamentos realizados os valores de  $D$  e  $z$  das enzimas se mostraram muito inferiores na termossonicação, indicando maior taxa de inativação e menor resistência térmica nesse tratamento quando comparado ao tratamento térmico convencional, sendo que a PPO se mostrou mais resistente ao calor e menos ao ultrassom em relação à POD.

**Palavras-chave:** Água de coco. Termossonicação. Estudo cinético dinâmico. Peroxidase. Polifenoloxidase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore de coqueiro ( <i>Cocos Nucifera</i> L.) de variedade anã. ....	15
Figura 2 - Cocos da variedade anã com 6, 9 e 12 meses de maturação, respectivamente. ....	16
Figura 3 - Evolução do rendimento dos principais produtores mundiais de coco, no período de 2010 a 2017. ....	17
Figura 4 - Comparação de água de coco com e sem efeito do escurecimento enzimático. ....	19
Figura 5 - Mecanismo de escurecimento enzimático pela polifenoloxidase. ....	20
Figura 6 - Mecanismo de escurecimento enzimático pela peroxidase. ....	20
Figura 7 - Banho Ultrassônico. ....	28
Figura 8 - Probe Ultrassônica. ....	28
Figura 9 - Crescimento de bolha e implosão num líquido irradiado com ultrassom. ....	29
Figura 10 - Dano à membrana celular causado pela cavitação (microstreaming). ....	30
Figura 11 - Curva padrão de morte ou destruição térmica. ....	33
Figura 12 - Curva padrão de tempo de morte ou destruição térmica. ....	34
Figura 13 - Fluxograma do estudo da cinética de inativação térmica de um componente de interesse qualquer. ....	36
Figura 14 - Fluxograma de realização de tratamento de 5 minutos. ....	39
Figura 15 - Análise de regressão das enzimas PPO e POD, respectivamente sobre os tratamentos térmicos e por termossonicação à 50%/15min (UI=0,450 W/mL). ....	45
Figura 16 - Análise de regressão das enzimas PPO e POD, respectivamente, sob os tratamentos térmicos e por termossonicação à 70%/10 min (UI=0,645 W/mL). ....	46
Figura 17 - Análise de regressão das enzimas PPO e POD, respectivamente, sob os tratamentos térmicos e por termossonicação à 90%/5 min (UI=0,640 W/mL). ....	47
Gráfico 1 - Perfis de temperatura obtidos nos tratamentos ultrassônicos realizados. ....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de características das variedades de coco: Anã, Híbrido e Gigante... 14	14
Tabela 2 - Brasil. Área plantada com coqueiros (em hectares), quantidade produzida de coco (em mil frutos) e produtividade (mil frutos/ha). 1990 – 2010..... 17	17
Tabela 3 - Brasil. Área plantada com coqueiros (em hectares), quantidade produzida de coco (em mil frutos) e produtividade (mil frutos/ha). Variações absoluta e relativa (em %). 1990 – 2010. .... 17	17
Tabela 4 - Modelos matemáticos para energia acústica específica de PPO e POD. .... 38	38
Tabela 5 - Atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, em relação ao controle, no final do tratamento por termossonicação e tratamento térmico equivalente, para cada um dos experimentos realizados..... 43	43
Tabela 6 - Estimação dos parâmetros cinéticos obtidos para o tratamento por termossonicação (TS) à 50%/15min (UI=0,450 W/mL) e tratamento térmico (TT) equivalente..... 46	46
Tabela 7 - Estimação dos parâmetros cinéticos obtidos para tratamento por termossonicação à 70%/10 min (UI=0.645 W/mL) e tratamento térmico equivalente. .... 47	47
Tabela 8 - Estimação dos parâmetros cinéticos obtidos para tratamento por termossonicação à 90%/5 min (UI=0,640 W/mL) e tratamento térmico equivalente. .... 48	48

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Água de coco .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Ação enzimática na água de coco .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Polifenoloxidase .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Peroxidase .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Métodos de conservação tradicionais .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Tecnologias Emergentes de Conservação.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Tecnologia de ultrassom.....</b>	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Cinética de Inativação Térmica.....</b>	<b>32</b>
<b>3.7</b>	<b>Estudos Cinéticos de Inativação Térmica .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento Experimental .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Termossonicação .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Tratamento Térmico .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Atividade Enzimática .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Polifenoloxidase (PPO).....</b>	<b>41</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Peroxidase (POD) .....</b>	<b>41</b>
<b>4.6</b>	<b>Estudo Cinético .....</b>	<b>41</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Definição da Temperatura de Referência.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Estimação dos Parâmetros Térmicos.....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeito Sinérgico do Ultrassom com a Temperatura .....</b>	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Estudo cinético dinâmico de inativação enzimática .....</b>	<b>45</b>
	<b>50%/15 min (UI=0,450 W/mL).....</b>	<b>45</b>
	<b>70%/10 min (UI=0.645 W/mL).....</b>	<b>46</b>
	<b>90%/5 min (UI=0,640 W/mL).....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A água de coco é definida pelo Ministério da Agricultura e Pecuária através do art. 20 do Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 (BRASIL, 2009a) como bebida não alcoólica obtida da parte líquida do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera*) não diluída e não fermentada, extraída e conservada por processo tecnológico adequado. É uma bebida pouco calórica, muito apreciada por seu sabor adocicado e refrescância além de possui alto valor nutricional, funcional e capacidade de reposição eletrolítica (CARVALHO et al., 2006).

Apesar de estéril e estável dentro do fruto, ao ser extraída e entrar em contato com o ambiente, a água de coco é rapidamente degradada, o que torna sua vida útil muito curta, incompatível com as demandas do mercado (MAGALHÃES et al., 2005). Ao contrário da maioria dos alimentos em que a degradação está relacionada à reações químicas e atividade microbiológica, na água de coco as principais alterações indesejáveis são dadas pela ação enzimática, sobretudo das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), o que inviabiliza a comercialização da bebida extraída sem a realização de um tratamento de conservação adequado (FROEHLICH, 2015).

Atualmente, a água de coco é processada por tratamentos térmicos à altas temperaturas muitas vezes associados à adição de conservantes, o que apesar de eficiente na esterilização microbiológica e inativação enzimática, acarreta em depreciações nutricionais e sensoriais do produto, diminuindo a qualidade e aceitação do consumidor (ROSA; ABREU, 2000). A fim de oferecer uma bebida industrializada segura, de armazenamento prolongado e características próximas à *in natura*, diversas tecnologias vem surgindo como alternativa para seu processamento (CHOURIO et al., 2018).

A tecnologia ultrassônica é uma tecnologia emergente, que consiste na aplicação de ondas de som de alta frequência (entre 20 kHz e 1 GHz) no alimento, causando o efeito conhecido como cavitação acústica (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Na cavitação, pequenas bolhas são criadas após a submissão de uma fase líquida ao ultrassom que crescem e oscilam rapidamente antes de entrar em colapso pela mudança de pressão (CHEMAT et al., 2017). A mudança de pressão exerce um dano direto à membrana das células microbianas ocasionando o rompimento, enquanto modifica a conformação proteica das enzimas, reduzindo sua atividade (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Assim, a tecnologia tem efeito de conservação, permitindo a redução dos tempos de processamento e riscos físicos e químicos, o que possibilita a preservação das características de qualidade do produto além de ser

ecologicamente correto e oferecer grandes vantagens em termos de produtividade e seletividade (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). No entanto, o tratamento exclusivamente por ultrassom não é capaz de inativar completamente enzimas e nem destruir esporos bacterianos, sendo necessária sua associação com outros métodos para esse efeito (SCHUINA, 2014).

A termossonicação, associação de ultrassom com calor, é considerada a mais eficiente por gerar uma sinergia entre as técnicas, unindo o efeito da cavitação com o da temperatura (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). Essa sinergia pode permitir a diminuição da duração e intensidade do tratamento térmico convencional devido ao aumento da taxa de inativação microbiológica e enzimática, reduzindo dessa forma os danos sensoriais e nutricionais indesejáveis, o que torna a termossonicação uma tecnologia com grande potencial para a indústria alimentícia (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Diversos trabalhos vêm demonstrando a eficácia da técnica de termossonicação como uma técnica efetiva de conservação de alimentos como suco de laranja (SCHUINA, 2014), água de coco (RIBEIRO et al., 2017), agrião (CRUZ; VIEIRA; SILVA, 2006), suco de amora (CAO et al., 2018) e purês de pera, maçã e morango (SULAIMAN et al., 2015).

O estabelecimento da termossonicação, assim como qualquer outro processamento térmico, para conservação de alimentos e a avaliação de sua eficácia é baseado no estudo cinético de inativação do microrganismo, enzima ou componente de interesse (HUANG, 2009). Nesse estudo, são estabelecidos parâmetros como o valor D (tempo em uma temperatura definida para reduzir 1 ciclo log do componente de estudo) e z (variação de temperatura necessária para reduzir o tempo de tratamento em 90%), associados ao tratamento (FONTAN et al., 2012). O conhecimento desses parâmetros permite a determinação do processamento térmico adequado a que o alimento deve ser submetido para atingir níveis microbiológicos e enzimáticos considerados seguros para o consumo, estabilidade na vida de prateleira e mínimas alterações indesejáveis (SIMPSON; ABAKAROV, 2009).

Tradicionalmente, o estudo cinético é realizado de forma estática, considerando submissão do alimento em uma temperatura fixa por determinado período de tempo (HUANG, 2013). Essa condição isotérmica dificilmente é reproduzida na prática, onde o produto passa por um período de aquecimento e resfriamento, o que reduz a confiabilidade do estudo cinético realizado de maneira convencional (ALMEIDA, 2012). Por esse motivo a realização de estudos cinéticos em condições dinâmicas é imprescindível para a avaliação da cinética de inativação

microbiana em condições realistas, permitindo a otimização de processos mais confiáveis (CATTANI et al., 2016).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar a cinética de degradação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase a partir do processo de termossonicação em comparação com o tratamento térmico convencional na água de coco sob condições dinâmicas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Verificar o efeito sinérgico do ultrassom com a temperatura na inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase (D e z) da água de coco.

Determinar os parâmetros cinéticos de inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase (D e z) em água de coco sob o processo de termossonicação.

Determinar os parâmetros cinéticos de inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase (D e z) em água de coco sob o processo de térmico convencional.

Verificar o efeito do ultrassom com a temperatura na cinética de inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em água de coco

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Água de coco

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) pode ser encontrado em três variedades principais: gigante, anã e híbrida, utilizadas majoritariamente para culinária, extração de água e adaptação da planta a ambientes adversos, respectivamente (ARAGÃO; ISBERNER; CRUZ, 2001). A Tabela 1 apresenta um quadro comparativo entre as principais características dessas variedades de coco.

Tabela 1 - Comparação de características das variedades de coco: Anã, Híbrido e Gigante.

Características	Variedades de coqueiros		
	Anã	Híbrido	Gigante
Início da floração (ano)	2 a 3	3 a 4	5 a 7
Vida útil	30 a 40	50 a 60	60 a 80
Tamanho do fruto	Pequeno	Intermediário	Grande
Crescimento	Lento	Intermediário	Rápido
Porte (m)	8 a 10	20	35
Espaçamento (m)	7,5 x 7,5 x 7,5	8,5 x 8,5 x 8,5	9 x 9 x 9
Número de plantas por hectare	205	160	142
Produção de frutos (frutos/planta/ano)	150 a 200	130 a 150	60 a 80
Produtividade de frutos (frutos/ha)	30 a 40 mil	20 a 24 mil	8 a 12 mil
Peso do fruto (g)	900	1200	1400
Peso da noz (g)	550	700	800
Peso médio albúmen sólido (g)	250	400	350
Produtividade copra (Kg/ha)	3 a 4 mil	4 a 5 mil	2 a 2,5 mil
Teor médio de óleo (%)	25,41	66,01	67,02
Teor médio de ácido láurico (%)	50,16	50,65	52,04
Produtividade de ácido láurico (kg/ha)	380 a 510	1300 a 1700	650 a 900
Produção de água (ml)	200 a 300	400 a 550	500 ou mais
Destino produção	In natura Agroindústria	In natura Agroindústria	In natura Agroindústria

Fonte: Brainer (2018).

O coqueiro (*Cocos nucifera*) é uma das plantas arbóreas mais úteis e importantes do mundo, especialmente em regiões tropicais úmidas, podendo gerar um sistema auto-sustentável de exploração, através do fornecimento de água, alimento, óleo, matéria-prima para saboaria, folhas para telhados de palha, entre outros insumos (ARAGÃO; ISBERNER; CRUZ, 2001).

No Brasil, a intensa produção de coco, sobretudo na região litorânea, é concentrada no atendimento à demanda alimentícia, com destaque à água de coco, bebida natural, pouco

calórica e com sabor agradável e refrescante (GONÇALVES et al., 2015). A variedade anã (FIGURA 1), responsável pela produção em grande escala da água de coco, é caracterizada pela precocidade, possuindo o início do florescimento aos três anos de idade com produção média de 130 a 150 frutos/planta/ano (ROSA; ABREU, 2000).

Figura 1 - Árvore de coqueiro (*Cocos Nucifera* L.) de variedade anã.



Fonte: Imagem da Web (2019).

A água de coco é definida pelo Ministério da Agricultura e Pecuária através do art. 20 do Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 (BRASIL, 2009a) como bebida não alcoólica obtida da parte líquida do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera*) não diluída e não fermentada, extraída e conservada por processo tecnológico adequado.

No geral, o líquido é formado 2 meses após a abertura natural da inflorescência, atingindo o volume máximo (entre 250 e 500 mL) assim como o maior teor de açúcares e características sensoriais desejáveis do 5º ao 7º mês, o que torna este o ponto ideal de colheita (ROSA; ABREU, 2000). A partir do 8º mês, ocorre queda progressiva no teor de açúcares, endurecimento do albúmem (até então gelatinoso), redução do volume de água e aumento do conteúdo lipídico até o completo amadurecimento do fruto, no 12º mês (ARAGÃO; ISBERNER; CRUZ, 2001). A Figura 2 exemplifica os diferentes estágios de maturação da variedade anã do coco verde.

Figura 2 - Cocos da variedade anã com 6, 9 e 12 meses de maturação, respectivamente.



Fonte: Menezes (2018).

A bebida tem pH entre 4 e 5,6 e é composta por 95,5% de água e 4,2% de macronutrientes, sendo 0,1% de proteína, 0,1% de gordura, 4% de carboidratos. Os outros 0,3% são micronutrientes, tais como a Vitamina C (2,2 a 3,7 mg/%), pequenas proporções de vitaminas do complexo B e sais minerais, sendo eles iodo (105 mg), potássio (312 mg), cálcio (29 mg), magnésio (30 mg), ferro (0,10 mg), cobre (0,04 mg), fósforo (37 mg), enxofre (24 mg) e cloro (183 mg/100 mL) (FONTAN et al., 2012; FROEHLICH, 2015).

A concentração elevada de sais minerais confere à água de coco características de reposição eletrolítica, sendo possível encontrar na literatura aplicações terapêuticas, tais como a utilização de forma oral ou intravenosa em casos de problemas gastrointestinais e recuperação de atletas (GONÇALVES et al., 2015). Com a crescente busca pelo consumo de produtos naturais e mais saudáveis, a água de coco, bebida refrescante e pouco calórica com sabor doce e levemente adstringente, tende a aumentar sua representatividade no mercado nacional (MAGALHÃES et al., 2005).

Segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (TABELAS 2 e 3), de 1990 a 2010 a produção de coco no país aumentou cerca de 158% e a área plantada em 28%, indicando a expansão do cultivo de coqueiros em território brasileiro (CAVALCANTE, 2015). Em termos de rendimento, o Brasil é o maior produtor de coco do mundo (FIGURA 3) devido a fatores como a tecnologia empregada na cultura, sistemas intensivos de cultivo e variedades melhoradas do tipo anão e híbrido (BRAINER, 2018).

Tabela 2 - Área plantada com coqueiros (em hectares) no Brasil, quantidade produzida de coco (em mil frutos) e produtividade (mil frutos/ha). 1990 – 2010.

	1990	2000	2010
<b>Área plantada</b>	215.652	266.577	276.934
<b>Quant. produzida</b>	734.418	1.301.411	1.895.635
<b>Produtividade</b>	3,41	4,88	6,85

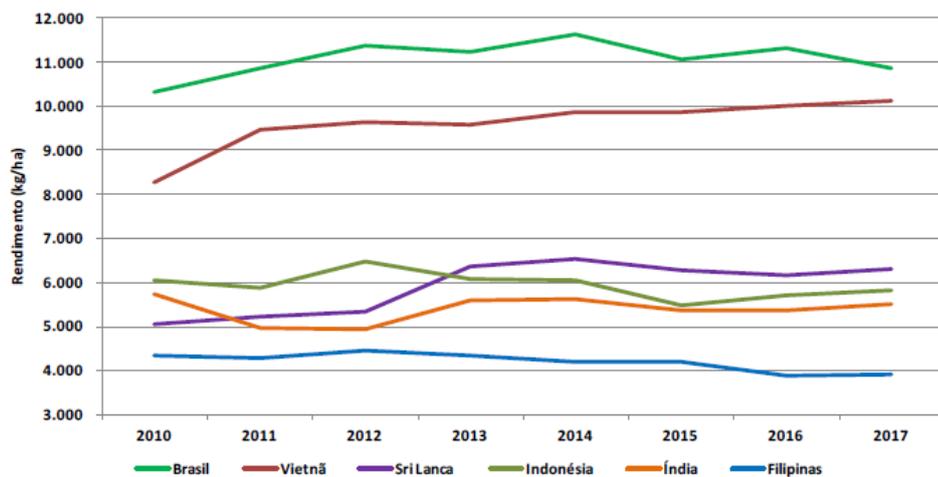
Fonte: Adaptado de Cavalcante (2015).

Tabela 3 - Área plantada com coqueiros (em hectares) no Brasil, quantidade produzida de coco (em mil frutos) e produtividade (mil frutos/ha). Variações absoluta e relativa (em %). 1990 – 2010.

	Variação Absoluta			Variação Relativa		
	1990-2000	2000-2010	1990-2010	1990-2000	2000-2010	1990-2010
<b>Área plantada</b>	50.925	10.357	61.282	23,61	3,89	28,42
<b>Quant. produzida</b>	566.993	594.224	1.161.217	77,20	43,57	158,11
<b>Produtividade</b>	1,48	1,96	3,44	43,35	40,21	101,00

Fonte: Adaptado de Cavalcante (2015).

Figura 3 - Evolução do rendimento dos principais produtores mundiais de coco, no período de 2010 a 2017.



Fonte: Brainer (2018).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas (ABIR), um estudo realizado pela consultoria de mercado Euromonitor em 2017, mostra que o Brasil se destaca como um dos principais produtores de água de coco envasada

do mundo, responsável pela produção de mais de 160 milhões de litros da bebida com uma trajetória ascendente com expectativa de expansão anual média de 9,2% em volume consumido até 2020, tomando parte do mercado de refrigerantes, o que estimula o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem seu envase em grande escala e com manutenção de sua estabilidade e características desejáveis (ABIR, 2019).

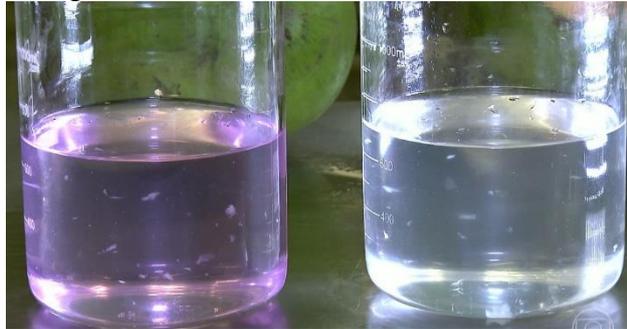
Tradicionalmente a bebida é comercializada dentro do fruto, garantindo sua estabilidade e esterilidade por um período de aproximadamente 10 dias após a colheita, desde que armazenados adequadamente, o que gera um grande problema de logística e transporte para regiões mais distantes (ROSA; ABREU, 2000). Assim, Magalhães et al. (2005) justificam o desenvolvimento de técnicas e processamento que permitam sua extração e envase, facilitando a comercialização e permitindo a conservação e aumento da vida útil da bebida.

### **3.2 Ação enzimática na água de coco**

A água de coco é considerada uma bebida estéril dentro do fruto, no entanto, após a abertura, além dos microrganismos possivelmente incorporados pelas condições higiênicas dos utensílios utilizados, está sujeita a alterações em sua coloração devido a exposição ao oxigênio (FROEHLICH, 2015). Segundo Freitas et al. (2008), a deterioração de frutas e vegetais, tais como mudança de sabor, cor textura e valor nutricional está relacionada com a presença de enzimas do grupo das oxiredutases, como a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO).

Essas enzimas estão naturalmente presentes na bebida e tem papel importante no fruto in vivo, uma vez que estão associadas com sua maturação e possuem atividade máxima em frutos de 5 a 7 meses, que decai com o amadurecimento (MAGALHÃES et al., 2005). Contudo, em contato com o oxigênio desencadeiam reações indesejáveis, principalmente o desenvolvimento da coloração rosada consequente do escurecimento enzimático, um dos fatores limitantes para sua comercialização (FIGURA 4) (ROSA; ABREU, 2000).

Figura 4 – Comparação de água de coco com e sem efeito do escurecimento enzimático.



Fonte: Imagem da Web (2019).

A peroxidase e a polifenoloxidase participam de várias reações oxidativas que provocam mudança de cor, degradação de clorofila, oxidação fenólica e do ácido indol acético, causando modificações no flavor, cor, textura e qualidade nutricional em frutas e vegetais. Campos et al. (1996) notaram que o pH da água de coco (entre 4 e 5,6) é favorável para a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, uma vez que apresentam pH ótimo de 5,5 e 6, respectivamente, entretanto a redução do pH ou a refrigeração da água de coco não são suficientes para completa inativação enzimática, tornando necessária a utilização de um processamento térmico eficiente.

Devido a sua alta termorresistência, superior à de bactérias deteriorantes potencialmente presentes no alimento, tais enzimas podem ser consideradas indicadores biotecnológicos de efetividade do processo de pasteurização (MATSUI, 2006). A avaliação da eficiência de um processo térmico envolvendo a água de coco depende da cinética de inativação térmica dessas enzimas (CARVALHO et al., 2006). Assim, a determinação de condições que possibilitem a inativação enzimática, além da eliminação microbiana, resulta na obtenção de uma bebida segura e estável para ser distribuída em regiões distantes da que é produzida (FONTAN et al., 2012).

### 3.2.1 Polifenoloxidase

A polifenoloxidase (PPO) é uma enzima do grupo das oxiredutases que possui como grupo prostético o cobre (Cu) e oxida difenois na presença de oxigênio molecular, cujo polimerização dos produtos forma compostos de cor escura, causando o efeito de escurecimento enzimático (CARVALHO et al., 2006). O nome polifenoloxidase é relacionado a duas enzimas que se diferem pela especificidade de seus substratos. A primeira, denominada tirosinase, polifenoloxidase ou catecol oxidase, hidroxila monofenóis a o-dihidroxifenóis, oxidando-os a o-quinonas, podendo ser considerada a mais importante no escurecimento oxidativo de frutas e



tratamento térmico na água de coco e concluíram que o processamento a 90°C é o mais eficiente, 550 segundos para a polifenoloxidase e 310 para a peroxidase, mostrando que a primeira é mais resistente ao tratamento, no entanto, quanto maior a temperatura e maior o tempo de exposição, maiores são os danos causados nas características sensoriais da bebida.

Gonçalves et al. (2015) analisaram o efeito da cinética de ativação térmica das enzimas peroxidase e polifenoloxidase da água de coco, e observaram que as enzimas apresentam diferença na termoestabilidade, observando que a polifenoloxidase é a mais termorresistente, já que quando submetida ao tratamento térmico a 90°C por 10 minutos apresentou uma redução de 50,75% de atividade enquanto na peroxidase essa redução foi de 95%.

A maior termorresistência da polifenoloxidase também foi observada por Ribeiro et al. (2017), que ao avaliar o efeito sinérgico da termossonicação na redução da atividade enzimática na água de coco, perceberam que o tratamento térmico convencional foi capaz de reduzir no máximo 25% de atividade para PPO e 40% para POD nos tratamentos realizados.

### **3.3 Métodos de conservação tradicionais**

Segundo Froehlich (2015), com a evolução de embalagens, processos e métodos de comercialização, hoje o consumidor tem a facilidade de encontrar a água de coco em regiões distantes do litoral em todas as estações do ano, permitindo seu transporte e armazenamento. Existem diferentes formas de extrair e conservar a água de coco e o tempo de estocagem tem dependência direta do método de conservação utilizado, o qual deve garantir a estabilidade microbiológica da bebida além de buscar a inibição da atividade enzimática, mantendo o máximo possível as características sensoriais encontradas no fruto “*in natura*” (ARAGÃO; ISBERNER; CRUZ, 2001; MAGALHÃES et al., 2005).

A Instrução Normativa nº 27, de 22 de julho de 2009 que estabelece o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade da água de coco, permite a classificação da água de coco como resfriada, pasteurizada, congelada, esterilizada, concentrada, desidratada e reconstituída (BRASIL, 2009). Os métodos de conservação aplicados na água de coco envasada devem minimizar o tempo de exposição ao oxigênio e o tempo de processo, além de garantir a segurança microbiológica da bebida, sendo cabível a correção de parâmetros como brix e acidez e o uso de aditivos a fim de buscar a padronização do produto (ROSA; ABREU, 2000).

A água de coco envasada e refrigerada, convencionalmente comercializada em garrafas plásticas do tipo “PET” (polietileno-tereftalato) deve ser mantida a uma temperatura de 5 a 8°C e tem vida útil de cerca de três dias. Após esse período a bebida sofre processos de mudanças

de cor, associados majoritariamente a alterações bioquímicas causadas pela atividade enzimática, além do aumento da carga microbiana, o que impossibilita sua comercialização (ROSA; ABREU, 2000).

É importante enfatizar que o resfriamento em si não promove inativação enzimática apenas retarda sua atividade na bebida. Segundo Campos et al. (1996), na temperatura de 5°C a atividade enzimática encontrada para as enzimas polifenoloxidase e peroxidase foi de 46 e 236%, respectivamente, reforçando a necessidade de aplicação de um processo de conservação complementar visando aplicação da vida útil da bebida (CAMPOS et al., 1996).

O congelamento da água de coco aumenta sua vida útil em três a seis meses e pode ser feito de forma lenta ou rápida, porém, deve ser realizado no menor tempo possível a fim de preservar as características sensoriais do produto e, tanto as enzimas quanto os microrganismos presentes terão suas atividades retardadas (FROEHLICH, 2015).

O congelamento lento é realizado em câmaras frigoríficas com temperaturas de -18 a -20°C por um período de 8 a 12 horas, isso faz com que a formação de cristais de gelo seja gradativa promovendo o congelamento não-uniforme e um fenômeno conhecido como crioconcentração, no qual os açúcares e sais se concentram na última parte a ser congelada, desestabilizando a bebida. Para evitar esse problema e aumentar a eficiência do processo, pode ser realizado o congelamento rápido por criogenia, sistema composto por uma unidade geradora de frio, com serpentina de evaporação submersa em uma solução criogênica que congela a bebida rapidamente e pode atingir temperaturas de até -30°C (ROSA; ABREU, 2000). Devido à alta sucessibilidade da bebida ao crescimento microbiano, é recomendada a aplicação de um processamento térmico como a pasteurização a fim de reduzir a contaminação e garantir a segurança (FROEHLICH, 2015).

O uso de tratamentos complementares à refrigeração e congelamento permite a extensão da vida útil em até 6 meses e consiste na pasteurização da bebida, podendo ou não ser acompanhada pela correção do pH para valores inferiores a 4,5 e uso de aditivos como conservantes, antioxidantes e acidulantes (CARVALHO et al., 2006). O principal objetivo da utilização de calor como método complementar ou principal de conservação de água de coco é interromper ou erradicar a carga microbiológica da bebida, garantindo a segurança do consumidor além de, paralelamente, inativar enzimas e compostos indesejáveis presentes (PRADES et al., 2012). A intensidade desse tratamento define a vida útil do produto e as

condições de armazenamento, que pode ser de 30 dias sob refrigeração após a pasteurização e até 6 meses em temperatura ambiente após a esterilização (ROSA; ABREU, 2000).

Pasteurização é a submissão do produto a temperaturas entre 75 e 90°C por períodos de 20 a 500 s, conduzida sobretudo para a redução dos níveis de contaminação microbiológica por células viáveis e conseqüentemente aumento de sua vida útil (FROEHLICH, 2015). Normalmente o processo é realizado em trocador de placas com sistema de aquecimento e resfriamento controlados e o binômio tempo versus temperatura é estabelecido de acordo com o equipamento disponível e as características do que está sendo processado (ROSA; ABREU, 2000).

O binômio efetivo de pasteurização da água de coco é definido por Campos et al. (1996) como 300 s a 90 °C e é capaz de aumentar a vida útil para 30 dias da bebida refrigerada a 5°C e para 6 meses da congelada a -18°C (FROEHLICH, 2015). A água de coco pasteurizada é produzida principalmente por pequenas e médias empresas, por tratar-se de um processo que assegura as condições higiênicas do produto, além de ampliar as possibilidades de comercialização e venda, sem possuir custo elevado de implementação, sendo uma das formas mais populares do mercado (FROEHLICH, 2015).

Segundo Rosa e Abreu (2000), atualmente a única forma de viabilizar a estocagem da água de coco à temperatura ambiente é através da esterilização. O método possui maior intensidade (temperaturas superiores a 100°C) e é capaz de inibir, além de células microbianas viáveis, o crescimento de esporos bacterianos patogênicos e deteriorantes, os quais não são afetadas pelo processo de pasteurização (CARVALHO et al., 2006). Também conhecida como processo UHT (Ultra High Temperature) e utilizada por grandes empresas, a consiste na submissão da bebida à temperaturas próximas de 140°C por alguns segundos, o que garante a esterilidade comercial e permite o acondicionamento em embalagens longa vida à temperatura ambiente por até 6 meses (FROEHLICH, 2015).

Tradicionalmente, tratamentos térmicos de pasteurização e esterilização são os métodos utilizados para destruir microrganismos e enzimas nos alimentos, no entanto, sua eficácia depende da temperatura e do tempo de tratamento, o que pode levar à perda de nutrientes, desenvolvimento de sabores e cores indesejáveis, e deterioração das propriedades organolépticas (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018).

Segundo Rosa e Abreu (2000), tanto processos com baixas temperaturas e alto tempo (pasteurização) quanto altas temperaturas e baixo tempo (esterilização) acarretam na

degradação de elementos nutritivos como vitaminas e proteínas, além de alterar indesejavelmente as características sensoriais da água de coco, o que compromete sua aceitabilidade e limita a comercialização (ROSA; ABREU, 2000). As indústrias do setor tem investido na tentativa de manutenção das propriedades da bebida através da otimização do processo e da aplicação de tecnologias alternativas de conservação (MATSUI, 2006).

### **3.4 Tecnologias Emergentes de Conservação**

Apesar da eficiência dos métodos térmicos de conservação na esterilização microbiológica e inativação enzimática da água de coco, as perdas nutricionais e sensoriais da bebida são muito significativas (MATSUI et al., 2008). Segundo Prades et al. (2012), a alta termorresistência das enzimas presentes torna necessária a aplicação de processamentos muito rigorosos para sua inativação, os quais induzem diversas modificações indesejáveis nas características da bebida. Visando a atenuação dos efeitos deletérios dos tratamentos térmicos convencionais, o estudo de tecnologias emergentes de conservação de água de coco tem sido cada vez mais estimulado (CHOURIO et al., 2018).

Tecnologias emergentes estão sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas a fim de reduzir alterações indesejáveis dos alimentos (associadas aos tratamentos térmicos convencionais), além de impactos ambientais (NASCIMENTO; SILVA; BARBOSA, 2013). As tecnologias térmicas modificam a forma de aquecimento do produto permitindo a diminuição de sua rigorosidade e conseqüentemente os efeitos do calor no alimento. Por sua vez, as não térmicas utilizam efeitos físicos e/ou químicos para inativação microbiana e enzimática, podendo ser utilizadas sozinhas ou associadas à temperatura para diminuir a intensidade do tratamento (ALMEIDA, 2015; NASCIMENTO; SILVA; BARBOSA, 2013). Métodos como o microondas (FRANCO et al., 2015; MATSUI et al., 2008) a ultrafiltração (FROEHLICH, 2015; PRADES et al., 2012), a alta pressão (HUANG et al., 2017) e a irradiação (AWUA; DOE; AGYARE, 2011; BERK, 2009; NIEMIRA; GAO, 2012) vem sendo estudados para aplicação em alimentos, podendo vir a ser uma opção de processamento para a água de coco.

O processamento por microondas só é possível quando os componentes presentes possuem habilidade dielétrica, o que significa que são capazes de converter parte da energia eletromagnética (frequência entre 300MHz e 300GHz) em energia térmica, causando o aquecimento (FRANCO et al., 2015). Esse aquecimento é consequência do rompimento de ligações fracas de hidrogênio resultantes da rotação dipolar das moléculas de água livre pela migração eletroforética de íons dissolvidos em um campo elétrico com alta velocidade de

mudança de polaridade (MATSUI et al., 2008). O potencial de utilização do tratamento térmico por microondas se dá pela possibilidade de redução de tempo de processamento e melhoria da qualidade geral, uma vez que transmite energia por todo o volume reduzindo os efeitos maléficos do alto tempo de exposição à temperatura que ocorre em processos convencionais (FRANCO et al., 2015). Alguns estudos mostram que existe um efeito letal não térmico nas enzimas associado à natureza das microondas o que reduz o impacto da temperatura e melhora a retenção de constituintes termolábeis e características sensoriais, reduzindo os danos ao produto. Apesar disso, o uso do método ainda é limitado pelo aquecimento não uniforme, o alto custo do processo e a baixa repetibilidade (MATSUI et al., 2008).

A tecnologia de microfiltração caracteriza-se como um processo de esterilização a frio, sendo capaz de eliminar a carga microbiana do produto conservando características nutricionais e organolépticas (FROEHLICH, 2015). Nesse processo, o tamanho e a forma dos solutos, bem como a distribuição de tamanho dos poros da superfície determinam a seletividade da membrana e conseqüentemente o que será separado (GONÇALVES et al., 2015).

No estudo de aceitabilidade sensorial de água de coco submetida à ultrafiltração, Gonçalves et al. (2015), observou que 94% dos provadores gostaram da bebida, mostrando que o método não tem efeito significativo no sabor e refrescância da água de coco. Nos casos analisados por Prades et al. (2012), a atividade da polifenoloxidase foi reduzida consideravelmente e a da peroxidase tornou-se indetectável, comprovando a efetividade do método para inativação enzimática e controle microbiológico. Apesar disso, a água de coco submetida a esse processo se mostrou mais clarificada e com redução da turbidez e conteúdo de proteína em 24% e de concentração de compostos como K, Mg, Ca, Fe e Cu em 10, 16, 19, 20 e 22%, respectivamente, um dos principais critérios de qualidade referente à água de coco que limita a utilização do método (PRADES et al., 2012).

A tecnologia de alta pressão consiste no acondicionamento do alimento em um recipiente flexível e hermeticamente fechado que será submetido à alta pressão (entre 100 e 600 MPa) por alguns minutos, normalmente em temperatura ambiente. A transferência de pressão é dada por um líquido, normalmente água, que garante a uniformidade de pressão entre o interior e a superfície do alimento, causando a eliminação de microrganismos e macromoléculas, como as enzimas, através do rompimento celular (HUANG et al., 2017).

O método é muito versátil, uma vez que não é afetado pelo tamanho e formato das embalagens, permitindo o processamento de diferentes produtos e volumes no mesmo lote,

além de ter opções de variação de tempo, o que garante uma flexibilidade de trabalho de acordo com o alimento utilizado (NOVAES et al., 2012). Além disso, a alta pressão não afeta pequenas moléculas como as responsáveis por características sensoriais e nutricionais, possibilitando a garantia da segurança e estabilidade do produto mantendo suas propriedades originais (HUANG et al., 2017).

O que limita a popularização do tratamento de alimentos por alta pressão é a necessidade de manutenção da refrigeração após processo, além de não terem sido observados efeitos suficientes em enzimas e esporos bacterianos (HUANG et al., 2017). Ainda, o método é limitado pelo elevado custo, principalmente no investimento inicial, fazendo com que a tecnologia seja aplicada atualmente apenas em países desenvolvidos e em produtos de alto valor agregado (NOVAES et al., 2012).

A irradiação é uma tecnologia emergente não térmica que vem sendo estudada para o uso em alimentos, especialmente líquidos, por sua efetividade na destruição de microrganismos, parasitas e insetos, além da possibilidade de tratamento pós embalagem (BERK, 2009). Historicamente, o foco principal da pesquisa da aplicação de irradiação em bebidas tem sido a extensão da vida útil, relacionada à inativação microbiana e redução principalmente de leveduras e bolores, os quais apresentam maior resistência ao método (NIEMIRA; GAO, 2012).

As radiações ionizantes são radiações penetrantes que possuem energia suficiente para ionizar átomos e moléculas e podem ser classificadas como baixa (3 kGy), média (0,3 e 10 kGy) ou alta (0,10 kGy) intensidade (BERK, 2009; NIEMIRA; GAO, 2012). O efeito químico e biológico da irradiação pode ser consequência da própria ionização (direto), que induz reações como oxidação, redução, polimerização e hidrólise, ou resultado da ação de moléculas e radicais livres formados pela instabilidade dos íons (indireto) (NIEMIRA; GAO, 2012). Acredita-se que a destruição de células de microrganismos seja causada principalmente pelo mecanismo de efeito direto, enquanto modificações químicas, como a destruição de vitaminas, são geralmente atribuídas à ação indireta (BERK, 2009).

Awua, Doe e Agyare (2011) avaliaram o efeito da irradiação gama (5 kGy) na água de coco e concluíram que o tratamento foi eficiente na esterilização, entretanto, observou-se o desenvolvimento de uma coloração amarelada na bebida. Por ser um método penetrante, pode ser aplicado após a embalagem, entretanto, limitações físicas como massa, densidade aparente, geometria e espessura do produto, assim como tamanho, forma e orientação da embalagem podem ter um impacto significativo no processo (NIEMIRA; GAO, 2012). Além disso, ainda

existem fatores econômicos e sociais que limitam a entrada da radiação ionizante na indústria alimentícia, já que o método possui alto custo de implementação e o consumidor costuma, erroneamente, associar radiação com radioatividade e desastres nucleares, criando certa rejeição (BERK, 2009).

### **3.5 Tecnologia de ultrassom**

A tecnologia ultrasônica faz o uso de fenômenos físicos e químicos diferentes dos tradicionalmente utilizados nas técnicas de extração, processo e conservação de alimentos, reduzindo tempos de processamento e riscos físicos e químicos, mantendo as características de qualidade do produto além de ser ecologicamente correto e oferecer grandes vantagens em termos de produtividade e seletividade (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). Esse método surge como uma maneira de melhorar processos através dos efeitos da cavitação e tem se mostrado de grande interesse para a indústria alimentícia (SCHUINA, 2014).

Os ultrassons são oscilações da matéria que se propagam em forma de ondas mecânicas com uma frequência que pode variar entre 20 kHz e 1 GHz. O método mais utilizado para divisão dos ultrassons baseia-se no resultado da ação das ondas e está diretamente relacionado à suas aplicações, classificando como ondas de baixa e alta intensidade (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018).

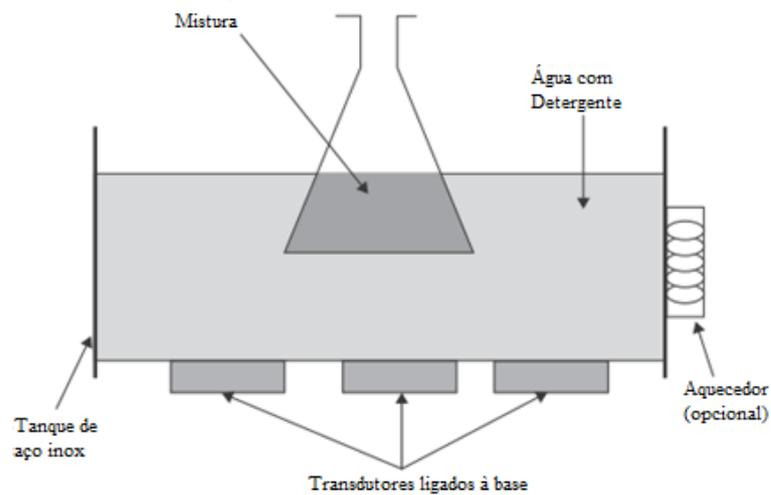
Inicialmente, o ultrassom era utilizado em alimentos apenas em alta frequência para majoritariamente análises não destrutivas do produto, no entanto, recentemente a baixa frequência surgiu como tecnologia para conservação de alimentos (SCHUINA, 2014). Ultrassons de baixa intensidade usam frequências superiores a 100 kHz em intensidades abaixo de 10 kW/m<sup>2</sup> e objetivam transmissão de energia através do meio sem que haja mudança de estado, uma vez que a matéria retorna ao estado de equilíbrio original após o processo. Por outro lado, ultrassons de alta intensidade tem frequências entre 18 e 100 kHz em intensidades superiores a 10 kW/m<sup>2</sup> e objetivam a alteração do meio pelo qual as ondas se propagam, já que mudanças permanentes ocorrem nesse processo e a matéria atinge um novo estado de equilíbrio (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018).

Existem dois tipos de equipamentos comumente utilizados em laboratório para aplicação de ultrassom: o banho ultrasônico e a probe ultrasônica. O banho ultrasônico (FIGURA 7) é normalmente utilizado para soluções de desgaseificação, limpeza de matérias ou em dispersões sólidas em solvente, já que ocasiona a redução do tamanho das partículas sólidas aumentando sua solubilidade (CHEMAT et al., 2017). Apesar de ser um processo simples e de

condução fácil, tem baixa reprodutibilidade, uma vez que fornece baixa intensidade e é altamente influenciado pelo conteúdo de água do banho e o material utilizado no experimento, limitando seu uso em reações químicas (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

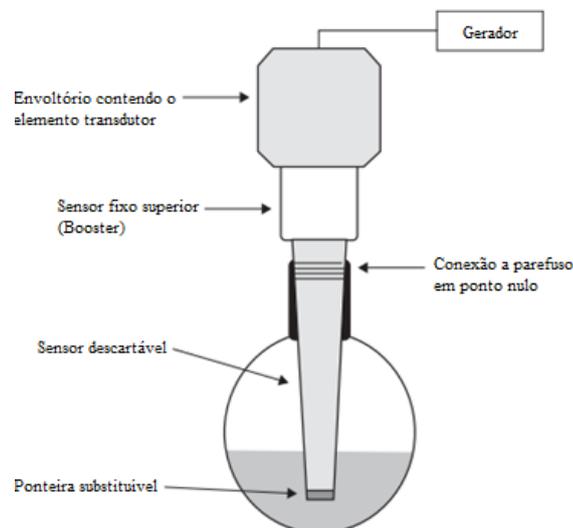
A probe ultrasônica (FIGURA 8) é imersa diretamente no recipiente de reação o que faz com que a intensidade seja distribuída em uma superfície pequena, reduzindo a atenuação e aumentando o poder ultrasônico. A rápida elevação da temperatura da amostra de pequeno volume em que a probe é inserida é motivo para maior atenção em sua utilização (CHEMAT et al., 2017).

Figura 7 - Banho Ultrassônico.



Fonte: Adaptado de Paniwnyk (2014).

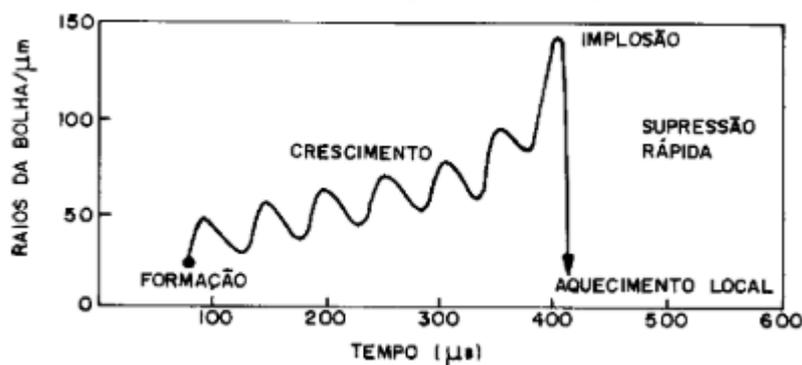
Figura 8 - Probe Ultrassônica.



Fonte: Adaptado de Paniwnyk (2014).

A aplicação do ultrassom em alimentos está relacionada com um fenômeno denominado cavitação acústica (FIGURA 9), no qual pequenas bolhas são criadas após a submissão de uma fase líquida ao ultrassom que crescem e oscilam rapidamente antes de entrar em colapso pela mudança de pressão (CHEMAT et al., 2017). Na cavitação, ondas sonoras provocam ciclos de compressão e expansão em líquidos, que formam pequenas bolhas quando a pressão negativa criada pelo ciclo de expansão é baixa o suficiente para superar forças intermoleculares, as quais se expandem e se contraem nos ciclos subsequentes. As implosões causadas fragmentam ou perturbam a superfície acelerando a transferência de massa por difusão (SCHUINA, 2014).

Figura 9 - Crescimento de bolha e implosão num líquido irradiado com ultrassom.



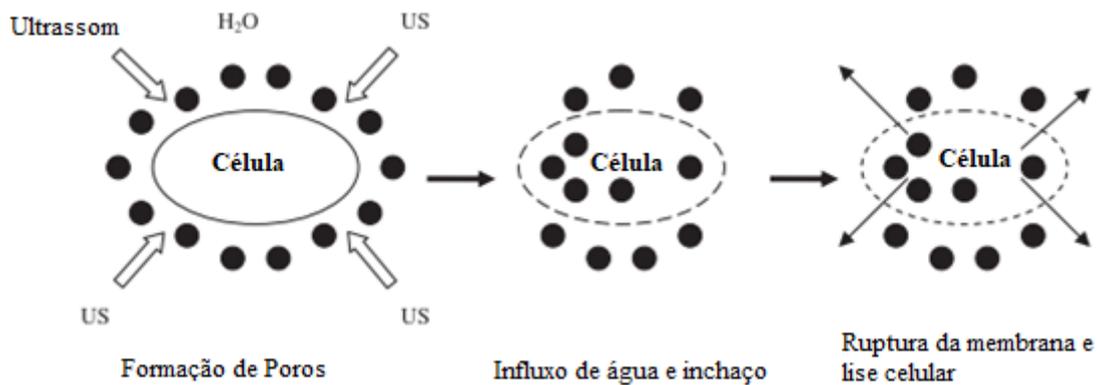
Fonte: Martines, Davolos e Jafelicci (2000).

Segundo Schuina (2014), existem dois tipos principais de cavitação, a transiente e a estática, que se diferenciam pelo comportamento das bolhas formadas. Na cavitação estática, produzida por ultrassons de baixa intensidade, as bolhas são duradouras e permanecem estáveis por vários ciclos de compressão e expansão (SCHUINA, 2014). As bolhas induzem à microfiltração do líquido circundante, o que também pode induzir estresse em diferentes espécies de microrganismos (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Na cavitação transiente, produzida por ultrassons de alta intensidade, a vibração aumenta o tamanho das bolhas progressivamente até o momento em que ela colapsa violentamente, fator relacionado com a inativação de enzimas e microrganismos do meio (SCHUINA, 2014). A bolha de implosão, além de produzir altas forças de cisalhamento capazes de danificar fisicamente a membrana celular, produzem altas temperaturas e pressões locais que desintegram as células bacterianas (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Além disso, a alta diferença de pressão e temperatura é capaz de formar radicais hidroxil com a molécula da água (sonólise), o que pode reagir com outras substâncias químicas presentes, contribuindo para o efeito inibitório (SCHUINA, 2014).

Apesar de ainda pouco utilizadas no processamento de alimentos, foi comprovado que ondas ultrassônicas de alta intensidade são capazes de romper células e desnaturar enzimas, enquanto as de baixa podem modificar seu metabolismo (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Durante a cavitação, a mudança de pressão exerce um dano direto à membrana da célula microbiana causando o efeito chamado de *microstreaming* (FIGURA 10). Uma força de cisalhamento localizada significativa atinge a parede celular dos microrganismos ocasionando o rompimento, sendo esse o principal efeito bactericida do tratamento ultrassônico (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

O efeito do ultrassom na inativação enzimática é causado majoritariamente pela desnaturação protéica consequente da formação de radicais livres, sonólise da água ou forças de cisalhamento do colapso das bolhas (SCHUINA, 2014). No entanto, os efeitos das ondas ultrassônicas sobre as proteínas são muito complexos, já que a sensibilidade aos ultrassons depende das condições do tratamento e da natureza da enzima (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018).

Figura 10 - Dano à membrana celular causado pela cavitação (microstreaming).



Fonte: Chemat, Zill-e-Huma e Khan (2011).

A composição e volume do alimento processado, a natureza das ondas ultrassônicas, o tempo de exposição, o tipo de microrganismos e a temperatura são fatores críticos de processamento (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). O tratamento exclusivamente por ultrassom não é capaz de inativar completamente enzimas nem destruir esporos bacterianos, sendo necessária sua associação com outros métodos para esse efeito (SCHUINA, 2014). Segundo Verruck e Prudencio (2018), os métodos mais comuns de associação com o ultrassom são:

- Manossonicação: combinação de ultrassom e pressão (MS).
- Termossonicação: combinação de ultrassom e calor (TS)
- Manotermossonicação: combinação de ultrassom, pressão e calor (MTS)

A combinação do tratamento térmico com a tecnologia de ultrassom (Termossonicação) é muito mais eficiente que qualquer outra no que diz respeito ao tempo de processo e consumo de energia no processamento (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). O uso da ultrassonicação com calor gera uma sinergia entre as técnicas, através da associação entre os efeitos da cavitação com os da temperatura, permitindo a diminuição da duração e intensidade do tratamento e a aceleração a taxa de esterilização, o que pode diminuir danos sensoriais e nutricionais do alimento, como a perda de sabor, homogeneidade e vitaminas, consequentes do processamento térmico convencional (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Shuina (2014) avaliou o efeito da termossonicação em suco de laranja e mostrou que a submissão ao tratamento com ultrassom a 40 kHz e temperatura de 60 °C por 10 min é tão eficiente quanto a pasteurização convencional tanto na inativação enzimática quanto na redução da contaminação microbiana. Ainda, apresenta menores perdas nutricionais e maior aceitação sensorial, concluindo que a termossonicação tem potencial como alternativa ao método tradicional de conservação. Ribeiro et al. (2017), no estudo do efeito sinérgico de ultrassom com temperatura na água de coco, observaram que o uso da termossonicação causou uma redução muito drástica e até inativação completa da enzima, enquanto o tratamento térmico convencional com mesmo perfil de temperatura teve redução máxima de 25% para polifenoloxidase e 40% para peroxidase, indicando a possibilidade de redução do tempo de processamento e consequentemente danos sensoriais e nutricionais.

A crescente busca por um produto industrializado e seguro com manutenção das características o mais próximo possível das originais torna a termossonicação uma tecnologia com grande potencial para a indústria de alimentos, em especial as de bebidas (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). No entanto é importante enfatizar que para que um processamento térmico, como a termossonicação, seja validado é necessária a realização de um estudo cinético de inativação térmica. Esse tipo de estudo é de fundamental importância, pois permite o conhecimento dos parâmetros cinéticos de resistência térmica e consequentemente possibilitam a otimização dos parâmetros do processo (FONTAN et al., 2012).

### 3.6 Cinética de Inativação Térmica

O estabelecimento de um processamento térmico para conservação de alimentos e a avaliação de sua eficácia é baseado no estudo cinético de inativação do microrganismo, enzima ou componente de interesse (HUANG, 2009). Esses estudos devem ser cuidadosamente conduzidos e buscam a determinação do binômio tempo-temperatura (tempo necessário de um processamento térmico à uma certa temperatura) ou outros parâmetros do processo capazes de fazer com que sejam atingidos níveis seguros de inativação microbiana (letalidade) e garantida a segurança e aumento da vida útil do alimento, preservando, tanto quanto possível, sua qualidade nutricional e sensorial (FONTAN et al., 2012; SIMPSON; ABAKAROV, 2009). Além de otimizar os processos a nível de segurança e estabilidade alimentar, o estudo pode evitar a subutilização da capacidade da empresa, promovendo um melhor desempenho econômico, o que o torna de grande importância para a indústria alimentícia a determinação de processos que permitam inativar microrganismos patogênicos e deterioradores e enzimas indesejáveis, mas cuja destruição de fatores de qualidade seja minimizada (ALMEIDA, 2012).

Para a realização do estudo cinético, é necessária a definição dos parâmetros de inativação térmica do composto, microrganismo ou enzima alvo do processo (FONTAN et al., 2012). Segundo Almeida (2012), isso se dá pelo fato de existir uma relação entre o tempo de exposição e temperatura que deve ser estabelecida para garantia de segurança do processo com o mínimo possível de destruição de fatores de qualidade. A reação de inativação de microrganismos por calor é historicamente considerada uma reação de primeira ordem, ou seja, com comportamento linear no qual a contagem logarítmica de bactérias diminui linearmente com o tempo em condições isotérmicas (HUANG, 2009). Apesar disso, comportamentos não lineares também são reportados, o que estimula a realização de estudos mais aprofundados (HUANG, 2013). Em condições lineares, o processo de inativação térmica pode ser descrito pela Equação 2.1:

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (3.1)$$

Onde  $\frac{dC}{dt}$  é a taxa de redução com o tempo da concentração ( $C$ ) do microrganismo alvo do processo e  $k$  a constante cinética da reação que refere-se à velocidade específica de morte ou destruição.

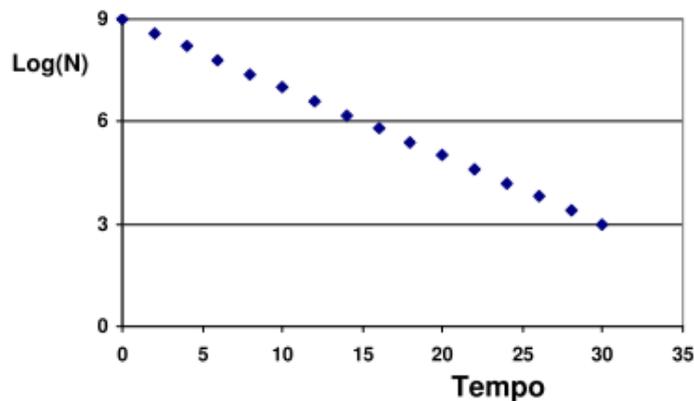
Após a integração da Equação 2.1 para obtenção de uma equação geral que contemple o processo isotérmico de inativação, é obtido o modelo de Rahn, mostrado na equação 2.2:

$$\ln(C) = \ln(C_0) - kt \quad (3.2)$$

O termo de concentração é convenientemente expresso em logaritmo de base 10 (Equação 2.3) em ciência dos alimentos para linearizar a plotagem dos resultados em um gráfico, conhecido como curva de morte ou destruição térmica (FIGURA 11) (HUANG, 2009). Considerando um tratamento térmico com temperatura constante, pode-se definir o tempo necessário para reduzir a população microbiana de um alimento a um nível desejado como valor de esterilização, usualmente representado por “ $F_T$ ” (ALMEIDA, 2012).

$$\log(C) = \log(C_0) - \frac{F_T}{D_T} \quad (3.3)$$

Figura 11 - Curva padrão de morte ou destruição térmica.



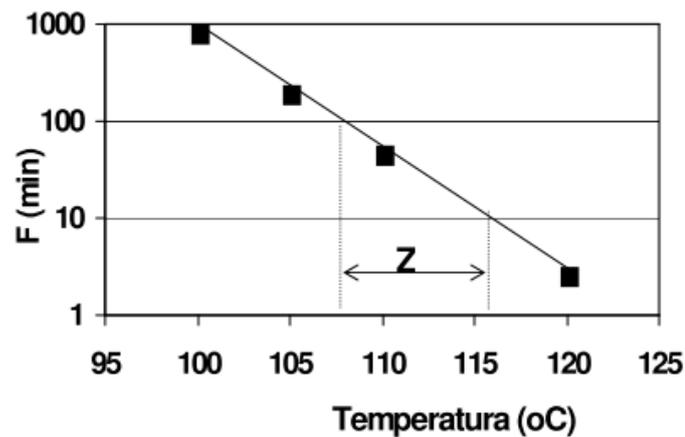
Fonte: Adaptado de Passos (2006).

O termo “D” evidenciado na Equação 2.3, aparentemente igual a  $\ln(10)/k$  ou  $2,303/k$ , é um dos parâmetros de importância do estudo cinético de inativação térmica (HUANG, 2009) e representa o intervalo de tempo à temperatura constante necessário para redução de 90% da concentração microbiana, enzimática ou do componente alvo, também conhecido como tempo de redução decimal (FONTAN et al., 2012). Esse termo está diretamente associado à resistência térmica, a qual depende de vários fatores tais como: tipo e

forma em que se encontra (vegetativa ou esporulada), no caso de microrganismos, assim como as características do meio, associadas às propriedades do alimento, como pH, atividade da água e composição em gordura, hidratos de carbono e sais (ALMEIDA, 2012).

Um segundo parâmetro de extrema importância em cálculos térmicos se refere ao valor  $z$ , que é obtido através do inverso da inclinação da curva de tempo de morte ou tempo de destruição térmica - variação de logaritmo de  $D$  ou  $F$  versus temperatura (FIGURA 12) (ALMEIDA, 2012). Esse parâmetro indica a sensibilidade relativa do microrganismo ou algum composto ao calor, representando a elevação necessária da temperatura para causar redução de 90% ou um ciclo logarítmico do tempo do tratamento térmico ( $D$  ou  $F$ ) (HUANG, 2013). Quanto maior o valor de  $z$ , menor a sensibilidade do componente à temperatura (ALMEIDA, 2012).

Figura 12 - Curva padrão de tempo de morte ou destruição térmica.



Fonte: Adaptado de Passos (2006).

Na prática, são utilizados tratamentos térmicos normalizados calculados previamente, considerando a carga microbiana normal que os alimentos podem conter e a resistência térmica de microrganismos presentes, tornando possível a determinação de tratamentos térmicos equivalentes (ALMEIDA, 2012). O modelo, proposto por Bigelow com base na curva de tempo de morte ou tempo de destruição térmica, que representa o efeito da temperatura no valor de esterilização, é expresso de acordo com a equação 2.4:

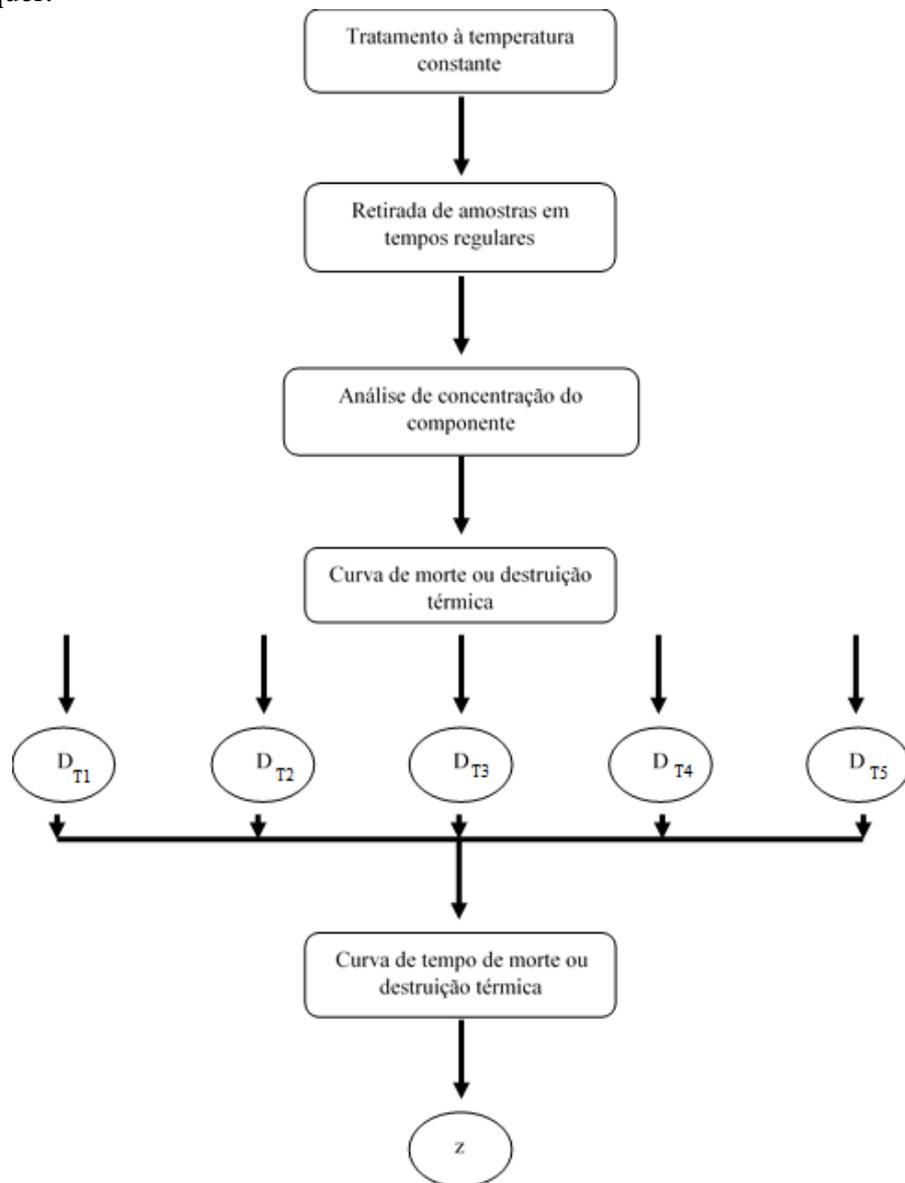
$$\begin{aligned}
 F_T &= F_{T_{ref}} \times 10^{\frac{(T_{ref}-T)}{z}} \\
 D_T &= D_{T_{ref}} \times 10^{\frac{(T_{ref}-T)}{z}}
 \end{aligned}
 \tag{3.4}$$

Onde  $T_{ref}$  corresponde ao valor da temperatura de referência,  $F_{T_{ref}}$  o valor de F à temperatura de referência,  $D_{T_{ref}}$  o valor de D à temperatura de referência e  $z$  (°C) a elevação da temperatura (em °C) (ALMEIDA, 2012).

### 3.7 Estudos Cinéticos de Inativação Térmica

A determinação dos parâmetros cinéticos de inativação normalmente é realizada pela submissão de amostras ao calor em diferentes temperaturas constantes, cujo tempo total do tratamento é ajustado de acordo com a temperatura utilizada. As amostras são retiradas em intervalos regulares previamente determinados, imediatamente resfriadas para cessar o aquecimento e é feita a determinação da concentração do microrganismo ou composto de interesse. A partir dos dados obtidos e seguindo a Equação 2.3, a regressão linear da curva de morte ou destruição térmica permite encontrar o valor D relativo à cada temperatura. Por fim, a regressão linear da curva de Log(D) (ou Log(F)) em função da temperatura, gera a curva de tempo de morte ou destruição térmica, cujo a inclinação define o valor  $z$  (ALMEIDA, 2012; HUANG, 2013). A Equação 1.4 permite a determinação de tratamentos equivalentes, ou seja, binômios tempo/temperatura diferentes capazes de gerar a mesma destruição (ALMEIDA, 2012). A Figura 13 mostra o fluxograma simples de realização do estudo cinético de inativação térmica tradicional (estático) para um componente de interesse, seja ele microrganismo ou enzima.

Figura 13 - Fluxograma do estudo da cinética de inativação térmica de um componente de interesse qualquer.



Fonte: Do autor (2019).

O uso de modelos matemáticos capazes de prever a sobrevivência microbiana durante o processamento térmico consiste na estimativa dos parâmetros em condições isotérmicas validadas em condições dinâmicas realistas (CATTANI et al., 2016). O modelo de primeira ordem pode ser considerado preciso e confiável em estudos isotérmicos, entretanto, mesmo que essas condições sejam necessárias para determinar a resistência térmica dos microrganismos, na realidade processamentos térmicos nunca ocorrem em temperatura constante (HUANG, 2013).

Embora relativamente direta, a determinação dos valores de  $D$  sob diferentes condições de temperatura é trabalhosa e requer grandes quantidades de dados experimentais (HUANG, 2013). Em processos não isotérmicos, em que o alimento passa por um período de aquecimento e resfriamento, o parâmetro  $k$  deixa de ser constante e passa a ser função da temperatura, reduzindo a confiabilidade do estudo cinético realizado de maneira convencional (ALMEIDA, 2012).

Segundo Cattani et al. (2016), por fatores como as propriedades da estrutura do modelo, fenômenos de resistência ao estresse induzido ou ao efeito sobre a precisão das estimativas, parâmetros obtidos por modelos matemáticos de condições isotérmicas não são capazes de prever condições dinâmicas. Por esse motivo a realização de estudos cinéticos em condições dinâmicas é imprescindível para a avaliação da cinética de inativação microbiana em condições realistas, permitindo a otimização de processos mais confiáveis (CATTANI et al., 2016).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

O experimento foi conduzido no Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados cocos verdes com 4 a 5 semanas de maturação e sem nenhum dano visual, adquiridos no mercado local. Primeiramente, os cocos foram lavados e sanitizados com álcool. O mesocarpo do fruto foi perfurado por um abridor de cocos específico para extração da água. Posteriormente, a água de coco extraída foi filtrada em papel filtro (Whatman nº4) para remoção de partes sólidas que pudessem interferir no processamento e leituras no espectrofotômetro. Em seguida foram homogeneizadas para obtenção de uma solução representativa de todos os frutos utilizados e, por fim, a mistura foi dividida em frascos com a porção exata a ser utilizada em cada um dos 5 tratamentos e mantida congelada à -4°C até o momento do processamento.

### 4.2 Delineamento Experimental

À partir dos modelos matemáticos propostos por Ribeiro et al. (2017), dispostos na Tabela 4 que relaciona amplitude ( $X_1$ ) e tempo ( $X_2$ ) com a atividade das enzimas PPO e POD (Y), foram definidos cinco tratamentos por termossonicação. Basicamente foram fixadas diferentes amplitudes (baixa, média e alta), sendo elas 50, 70, 90 e 100%. Com base no modelo foi determinado o tempo necessário para se ter uma redução significativa (maior que 60%) de ambas as enzimas. Dessa forma os tratamentos aplicados foram: 50% - 15 min; 70% - 10 min; 90% - 5 min; 90% - 10 min e 100% - 5 min.

Tabela 4 - Modelos matemáticos para energia acústica específica de PPO e POD.

Atributos	Modelo de Superfície de Resposta
PPO (%)	$Y = 446,20 - 7,50X_1 - 20,72X_2 + 0,21X_1X_2 + 0,03X_1^2 + 0,21X_2^2$
POD (%)	$Y = 865,02 - 17,06X_1 - 34,90X_2 + 0,37X_1X_2 + 0,08X_1^2 + 0,25X_2^2$

Legenda: Y(atividade), X1 (amplitude) X2 (tempo)

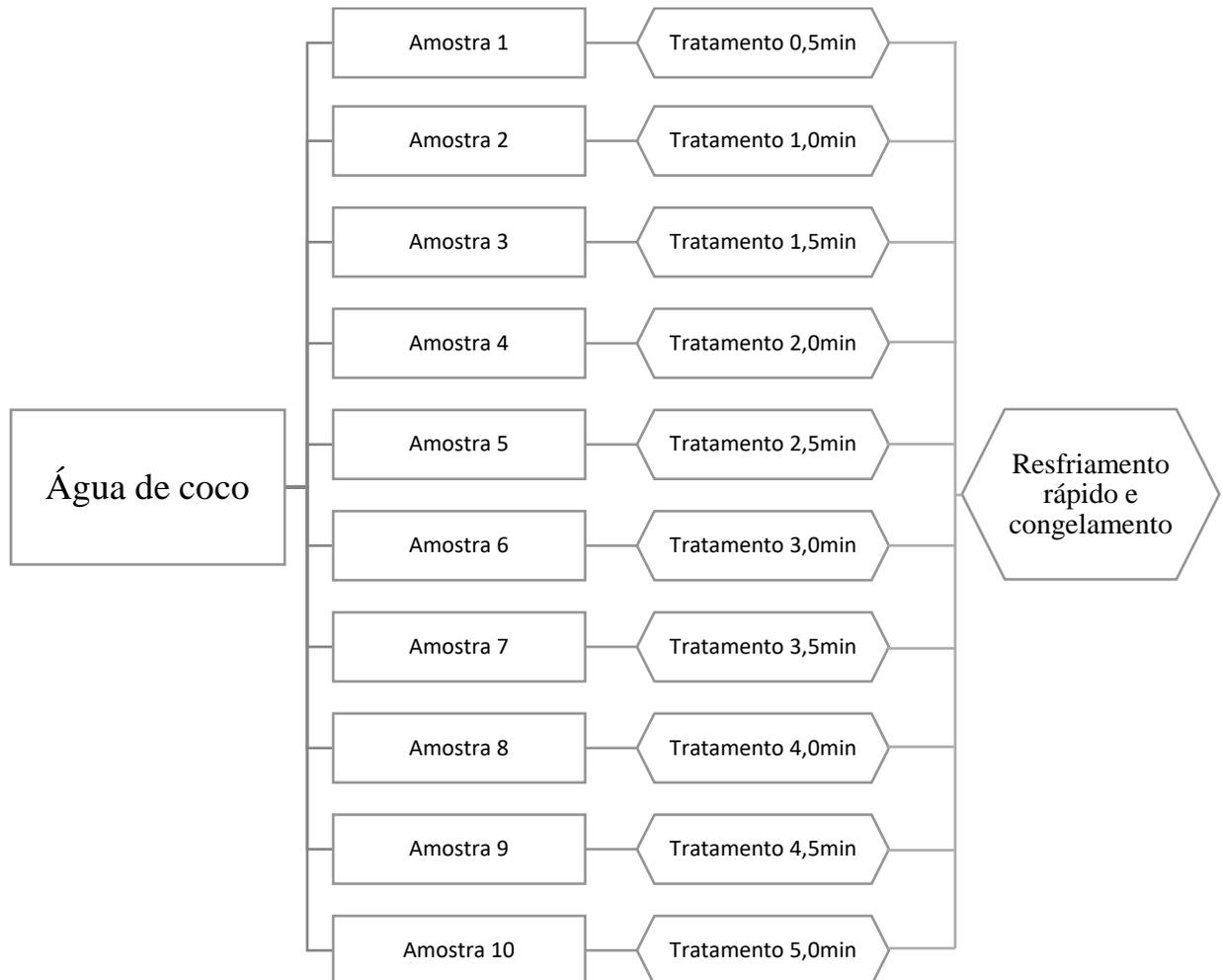
Fonte: (RIBEIRO et al., 2017).

A avaliação da destruição enzimática ao longo do tempo de processamento foi realizada em intervalos de tempo pré-definidos de modo a se obter, no mínimo, 10 pontos igualmente espaçados. Dessa forma, foi estabelecido que a frequência seria de 0,5, 1,0 e 1,5 min para os processos a 5, 10 e 15 min, respectivamente.

Devido à influência do volume da amostra no tratamento ultrassônico, caso fosse realizado um único processamento no volume total de água de coco com retirada de alíquotas

nos tempos determinados, a confiabilidade dos dados poderia ser comprometida. Assim, foram realizados, para cada tratamento (5, 10 e 15 min), 10 tratamentos com alíquotas de volume fixo com interrupção na frequência de tempo estabelecida para o processamento em questão. As amostras foram rapidamente resfriadas e congeladas, como exemplificado na Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma de realização de tratamento de 5 minutos.



Fonte: Do autor (2019).

### 4.3 Termossonicação

Seguindo os tratamentos definidos no item 2.2, a água de coco foi submetida ao processamento por termossonicação utilizando um ultrassom Q500 (QSonica) de 20 kHz e probe com 1 cm de diâmetro. A probe foi imersa 0,5 cm em um bécker de vidro com volume de água de coco de 50 mL, como forma de padronização do processamento.

Com o auxílio de um termômetro e um cronômetro, os dados de temperatura e sua respectiva variação em relação ao tempo foram registrados com intervalo de 30 segundos na

amostra submetida ao tempo completo de cada um dos tratamentos, a fim de determinar a potência (W) e a energia acústica específica (mW/mL) dos mesmos. Após cada tratamento térmico, as amostras foram imediatamente resfriadas através de imersão em banho de água fria com gelo, e então congeladas em tubos de vidro até análise da atividade enzimática por espectrofotometria.

A potência de cada tratamento foi determinada por método calorimétrico através da Equação 3.1 proposta por Baumann; Martin; Feng (2005).

$$\text{Potência (W)} = mC_p \left( \frac{dT}{dt} \right) \quad (4.1)$$

onde m é a massa (0,050 kg),  $C_p$  é o calor específico da água de coco (4056,5 J/kg°C) e  $dT/dt$  é a taxa de variação da temperatura durante a sonificação (°C/s).

A energia acústica específica (SAE) de cada tratamento será obtida em mW/mL pela razão da potência (W) pelo volume de água de coco da amostra (mL), conforme Equação 3.2.

$$\text{SAE} \left( \frac{\text{mW}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Potência}}{\text{Volume}} \quad (4.2)$$

#### 4.4 Tratamento Térmico

Com o intuito de analisar a eficiência do efeito sinérgico do ultrassom na cinética de inativação enzimática, os tratamentos por termossonicação forem replicados em banho-maria (Modelo Q215S2 – QUIMIS) com temperatura e tempo controlados para obter um perfil de processamento similar àquele obtido em cada tratamento por ultrassom. Utilizou-se um tubo de ensaio imerso no banho com 10 mL de água de coco por amostra e, com o auxílio de um cronômetro e um termômetro, o perfil de temperatura obtido em cada tratamento no ultrassom foi reproduzido. Após cada tratamento térmico, as amostras foram resfriadas imediatamente através de imersão em banho de água fria com gelo e então congeladas em tubos de vidro até a análise da atividade enzimática por espectrofotometria.

#### 4.5 Atividade Enzimática

Como indicativo de eficiência dos tratamentos, foi realizada a análise de atividade enzimática das enzimas PPO e POD, em duplicata, através do espectrofotômetro VIS 325–1000nm (Biospectro SP-22; Biospectro, Curitiba, PR, Brasil) em todas as amostras submetidas

ao processo de termossonicação e ao tratamento térmico. O mesmo procedimento foi realizado com o branco, substituindo a água de coco por água destilada.

A atividade enzimática foi expressa em porcentagem de atividade com referência à amostra de controle que não foi submetida aos tratamentos, através da Equação 3.3.

$$\text{Activity (\%)} = \frac{d(\text{Abs})}{dt} \cdot \frac{1}{V_{\text{amostra}}} \quad (4.3)$$

Sendo, *Abs* a absorbância registrada a cada 30 segundos em 425 nm e 470 nm para PPO e POD, respectivamente.

#### 4.5.1 Polifenoloxidase (PPO)

A atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) foi determinada através da metodologia descrita por Campos et al. (1996) com algumas modificações. Uma alíquota de 1,5 mL de solução tampão McIlvane (pH 6,6) preparado com ácido cítrico e fosfato de sódio foi adicionada na cubeta do espectrofotômetro, seguida pela adição de uma alíquota de 1 mL de água de coco e por fim, 1,5 mL de catecol (0,2 M), utilizado como substrato fenólico. A cubeta foi levemente agitada e colocada imediatamente no espectrofotômetro com comprimento de onda configurado para 425 nm. Cada amostra foi submetida a 30 minutos de análise, registrando-se a absorbância a cada 30 segundos.

#### 4.5.2 Peroxidase (POD)

A atividade da enzima peroxidase (POD) foi determinada através da metodologia descrita por Campos et al. (1996) com algumas modificações. Uma alíquota de 2,3mL de solução tampão McIlvane (pH 5,5) preparado com ácido cítrico e fosfato de sódio foi adicionada na cubeta do espectrofotômetro, seguida pela adição de uma alíquota de 1 mL de água de coco 0,2 mL de peróxido de hidrogênio (0,1%) e por fim, 0,5 mL de guaiacol (0,5%), utilizado como substrato fenólico. A cubeta foi levemente agitada e colocada imediatamente no espectrofotômetro com comprimento de onda configurado para 470 nm. Cada amostra foi submetida a 30 minutos de análise, registrando-se a absorbância a cada 30 segundos.

### 4.6 Estudo Cinético

O estudo cinético da inativação térmica das enzimas na água de coco baseou-se na definição da temperatura de referência e na estimação dos parâmetros térmicos, conforme detalhado nas seções subsequentes.

#### 4.6.1 Definição da Temperatura de Referência

Como descrito por Cattani et al. (2016), a estrutura do modelo proposto por Bigelow requer a atribuição de uma temperatura de referência finita ( $T_{ref}$ ). Assim, a partir da análise do coeficiente de correlação entre  $D_{ref}$  e  $z$  versus  $T_{ref}$  para vários valores escolhidos arbitrariamente, definiu-se um  $T_{ref}$  ótimo (DOLAN; VALDRAMIDIS; MISHRA, 2013; SCHWAAB; PINTO, 2007). Cada conjunto de dados possuía um perfil de temperatura diferente, logo, havia um  $T_{ref}$  ótimo para cada conjunto. Para fins comparativos, os valores de  $D_{ref}$  foram convertidos em um  $T_{ref}$  comum, discutido em resultados.

#### 4.6.2 Estimação dos Parâmetros Térmicos

A estimação dos parâmetros cinéticos para cada um dos processos térmicos e por termossonicação ( $D$ ,  $z_T$  e  $z_{US}$ ) foi obtida a partir da análise de regressão global através do modelo secundário conforme expresso na Equação 3.5 e 3.7, respectivamente, utilizando o software MATLAB. A eficiência do modelo foi avaliada por meio do MSE.

##### Efeito da Temperatura

- **Modelo primário**

$$\frac{d \ln \frac{A}{A_0}}{dt} = -k(T(t)) \quad (4.4)$$

- **Modelo Secundário**

$$k(T(t)) = -\frac{\ln 10}{z_T} \times \exp\left(\frac{\ln 10}{z_T} \times (T(t) - T_{ref})\right) \quad (4.5)$$

##### Efeito da Termossonicação

- **Modelo primário**

$$\frac{d \ln \frac{A}{A_0}}{dt} = -k(T(t), UI) \quad (4.6)$$

- **Modelo Secundário**

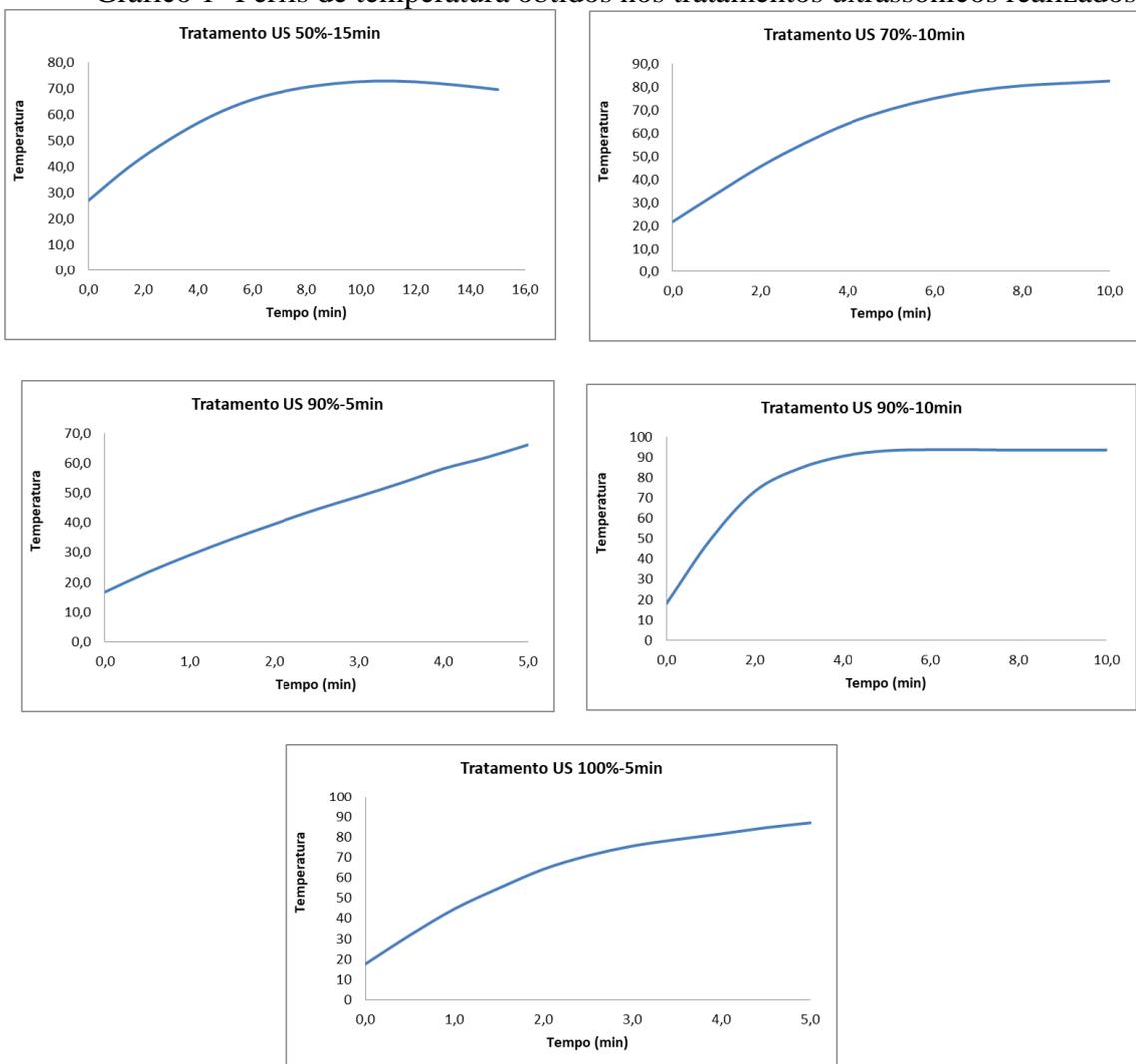
$$k(T(t)) = -\frac{\ln 10}{z_T} \times \exp\left(\frac{\ln 10}{z_T} \times (T(t) - T_{ref})\right) \times \exp\left(\frac{\ln 10}{z_{UI}} \times UI\right) \quad (4.7)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito Sinérgico do Ultrassom com a Temperatura

Para analisar o efeito sinérgico do ultrassom com a temperatura, observou-se a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase ao final dos tratamentos realizados, percentualmente comparadas à amostra controle (100% de atividade). O Gráfico 1 apresenta os perfis de temperatura obtidos nos tratamentos ultrassônicos e reproduzidos nos térmicos equivalentes. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

Gráfico 1- Perfis de temperatura obtidos nos tratamentos ultrassônicos realizados.



Fonte: Do autor (2019).

Tabela 5 - Atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, em relação ao controle, no final do tratamento por termossonicação e tratamento térmico equivalente, para cada um dos experimentos realizados.

Tratamento	PPO		POD	
	TT	TS	TT	TS
50%-15min	99,50%	55,72%	68,50%	52,86
70%-10min	65,50%	10,69%	100%	8,23%
90%-5min	71,01%	43,33%	48,26%	6,75%
90%-10min	29,45%	25,49%	1,32%	0,18%

Fonte: Do autor (2019).

Ao comparar a atividade das enzimas ao final dos tratamentos, é possível observar que a termossonicação causou uma redução consideravelmente maior que o tratamento térmico convencional na maioria dos experimentos realizados, principalmente para a POD que foi quase completamente inativada. Isso indica que o mesmo perfil térmico de processamento se tornou mais eficiente na inativação enzimática quando associado à tecnologia ultrassônica, o que deixa evidente o efeito sinérgico do ultrassom com temperatura na inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em água de coco. Com isso, é possível confirmar o que foi verificado no trabalho anterior desenvolvido pelo grupo de pesquisa, o qual avaliou o efeito sinérgico da termossonicação na redução da atividade enzimática na água de coco em diferentes tratamentos e constatou que o emprego do ultrassom resultou em grande ou até completa inativação, enquanto o tratamento térmico convencional com o mesmo perfil térmico foi capaz de reduzir no máximo 25% para PPO e 40% para POD (RIBEIRO et al., 2017).

Corroborando com os resultados encontrados para a inativação de PPO e POD em água de coco, vários outros estudos vem demonstrando o efeito sinérgico do ultrassom com temperatura. Cruz, Vieira e Silva (2007) analisaram o efeito de tratamentos térmicos e termosônicos na cinética de inativação da peroxidase em agrião e constataram que a aplicação da termossonicação para temperaturas acima de 85 °C e pelos mesmos tempos de branqueamento, levaram a maior inativação enzimática quando comparados aos processos de branqueamento a quente. Cao et al.(2018) estudaram a cinética de inativação de PPO e POD em suco de amora durante tratamentos térmicos e de ultrassom e verificaram que o tratamento com ultrassom pode reduzir a o tempo e aumentar a eficiência de inativação em comparação com o tratamento térmico. Sulaiman et al. (2015) também indicaram o efeito da termossonicação na inativação de polifenoloxidase em purês de pera, maçã e morango, mostrando que o ultrassom permitiu o uso de temperaturas mais baixas do que as aplicadas em tratamentos térmicos convencionais.

De acordo com Chemat, Zill e Huma e Khan (2011) o efeito do ultrassom no aumento da intensidade do tratamento térmico está relacionado com a associação entre os efeitos da cavitação com os da temperatura, permitindo a diminuição da duração e intensidade além da aceleração a taxa de esterilização. Esse efeito pode reduzir a severidade do tratamento, responsável por danos sensoriais e nutricionais (SULAIMAN et al., 2015) o que mostra que o método tem potencial como uma alternativa ao tratamento térmico utilizado atualmente para a água de coco.

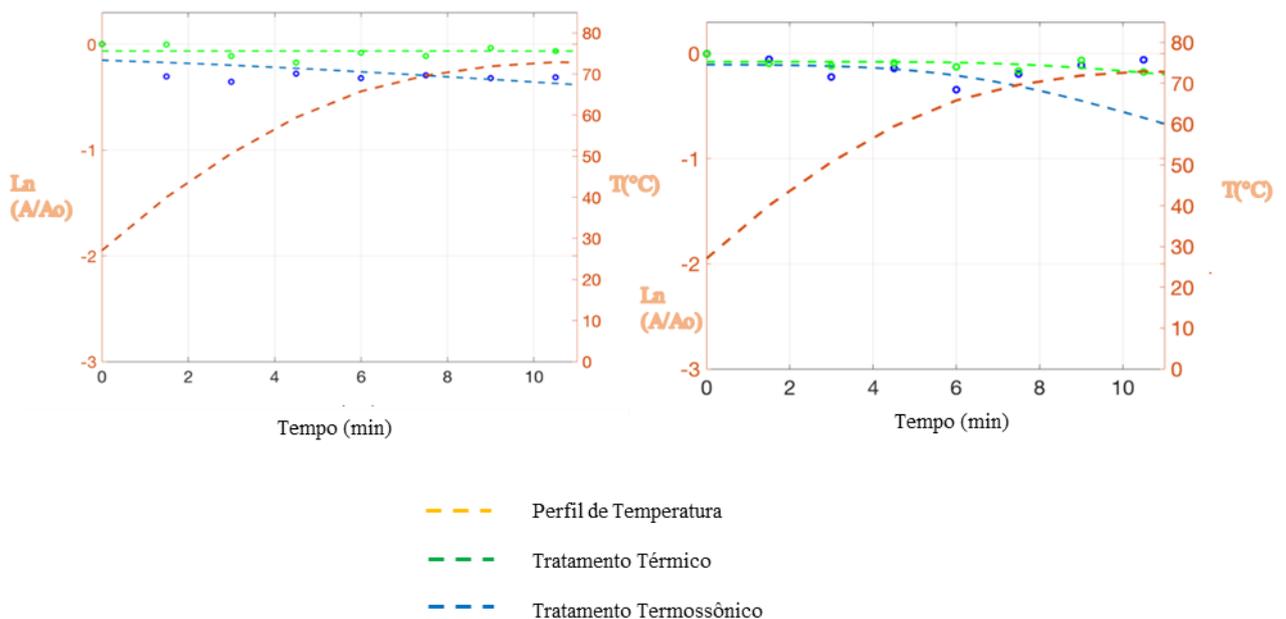
**5.2 Estudo cinético dinâmico de inativação enzimática**

Segue abaixo os resultados da análise de regressão do estudo cinético dinâmico de degradação da enzima PPO e POD em água de coco nos tratamentos térmicos e por termossonicação avaliados: 50%/15 min (UI=0,450 W/mL), 70%/10 min (UI=0.645 W/mL) e 90%/5 min (UI=0,640 W/mL). A temperatura de referência para o valor D apresentado foi definida como 70°C.

**50%/15 min (UI=0,450 W/mL)**

Na Figura 15 tem-se a representação gráfica da análise de regressão das enzimas PPO e POD sob o tratamento por termossonicação à 50%/15 min (UI=0,450 W/mL) e tratamento térmico equivalente. A Tabela 6 demonstra a estimação dos parâmetros cinéticos obtidos.

Figura 15- Análise de regressão das enzimas PPO e POD, respectivamente, sob o tratamento por termossonicação à 50%/15min (UI=0,450 W/mL) e tratamento térmico equivalente.



Fonte: Do autor (2019).

Tabela 6 - Estimação dos parâmetros cinéticos obtidos para o tratamento por termossonicação (TS) à 50%/15min (UI=0,450 W/mL) e tratamento térmico (TT) equivalente.

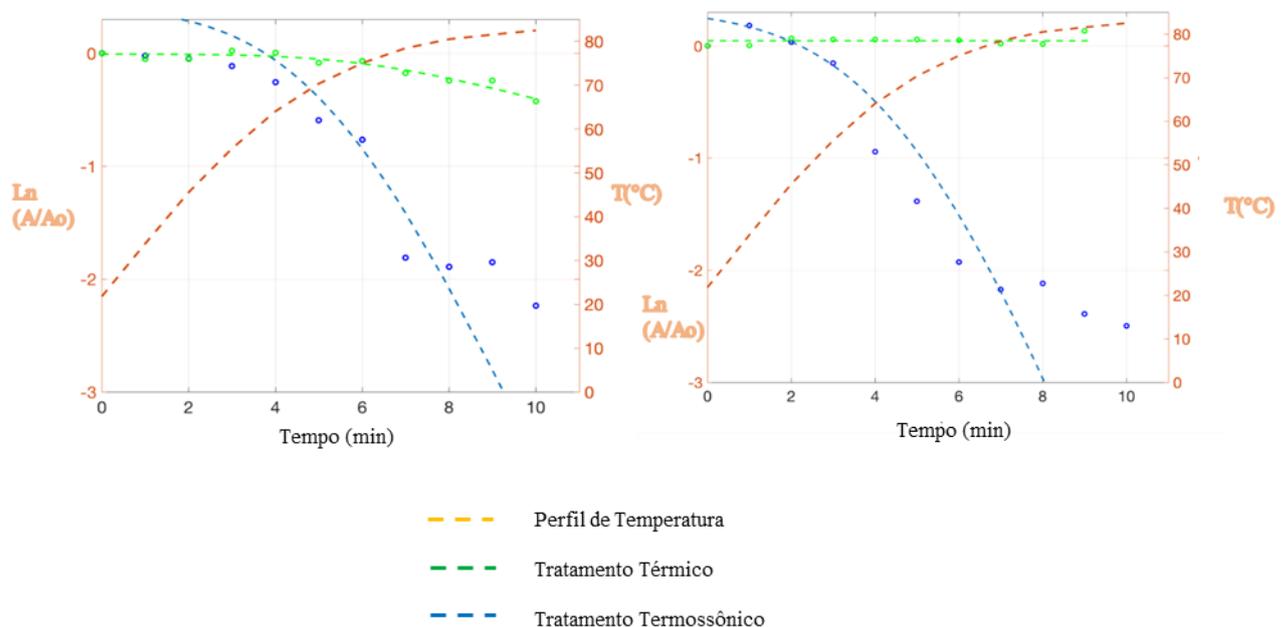
Parâmetros	PPO		POD	
	TT	TS	TT	TS
$D_{70^{\circ}\text{C}}$	499.840,00	95,30	124,15	28,82
$Z_{TT}$	38.100,00	163,00	11,32	22,77
$Z_{TS}$	-	-1045,90	-	25,32
$\text{Ln}(A/A_0)$	-0,07	-0,20	-0,08	-0,12
$D_{TS} / D_{TT}$	0,00		0,23	
<b>EQM</b>	0,00	0,02	0,00	0,18

Fonte: Do autor (2019).

### 70%/10 min (UI=0.645 W/mL)

Na Figura 16 tem-se a representação gráfica da análise de regressão das enzimas PPO e POD sob o tratamento térmico e por termossonicação à 70%/10 min (UI=0,645 W/mL). A Tabela 7 demonstra a estimativa dos parâmetros cinéticos obtidos.

Figura 16- Análise de regressão das enzimas PPO e POD, respectivamente, sob os tratamentos térmicos e por termossonicação à 70%/10 min (UI=0,645 W/mL).



Fonte: Do autor (2019).

Tabela 7 - Estimação dos parâmetros cinéticos obtidos para tratamento por termossonicação à 70%/10 min (UI=0.645 W/mL) e tratamento térmico equivalente.

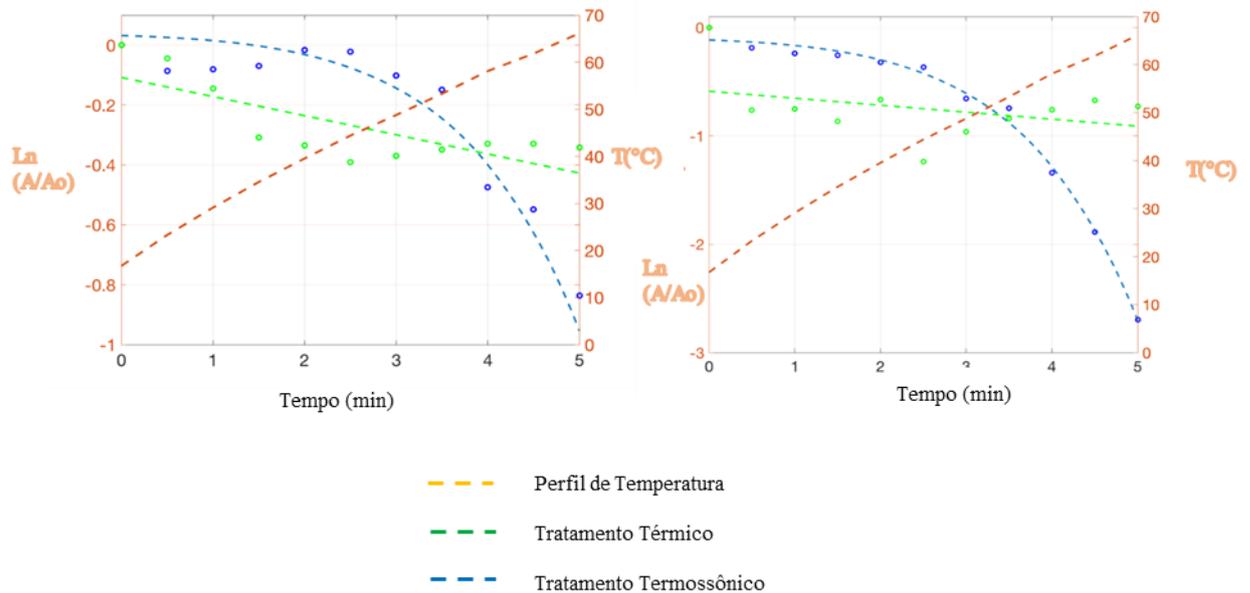
Parâmetros	PPO		POD	
	TT	TS	TT	TS
$D_{70^{\circ}\text{C}}$	74,78	6,13	61.441,00	5,05
$Z_{TT}$	24,75	40,37	91,13	51,30
$Z_{TS}$	-	50,88	-	14,87
$\text{Ln}(A/A_0)$	-0,01	0,39	0,05	0,24
$D_{TS} / D_{TT}$		0,08		0,00
<b>EQM</b>	0,00	0,49	0,00	1,14

Fonte: Do autor (2019).

### 90%/5 min (UI=0,640 W/mL)

Na Figura 17 tem-se a representação gráfica da análise de regressão das enzimas PPO e POD sob o tratamento térmico e por termossonicação à 90%/5 min (UI=0,640 W/mL). A Tabela 8 demonstra a estimacão dos parâmetros cinéticos obtidos.

Figura 17- Análise de regressão das enzimas PPO e POD, respectivamente, sob os tratamentos térmicos e por termossonicação à 90%/5 min (UI=0,640 W/mL).



Fonte: Do autor (2019).

Tabela 8 - Estimaco dos parâmetros cinéticos obtidos para tratamento por termosonicao à 90%/5 min (UI=0,640 W/mL) e tratamento térmico equivalente.

Parâmetros	PPO		POD	
	TT	TS	TT	TS
<b>D<sub>70°C</sub></b>	35,96	2,56	35,68	0,89
<b>z<sub>TT</sub></b>	23.064,00	25,41	40.986,00	26,67
<b>z<sub>TS</sub></b>	-	6,60	-	20,43
<b>Ln (A/A<sub>0</sub>)</b>	-0,11	0,03	-0,59	-0,12
<b>D<sub>TS</sub> / D<sub>TT</sub></b>		0,07		0,03
<b>EQM</b>	0,01	0,01	0,10	0,01

Fonte: Do autor (2019).

Pode ser observado que em condioes menos intensas de processamento por termosonicao, como a de 50%/15min (UI=0,450 W/mL), a estimaco da cinética de degradao é muito imprecisa. Entretanto, em condioes termosônicas mais intensas, ou seja, os tratamentos 90%/5 min (0,640 W / mL) e 70%/10 min (0,645 W / mL), a estimativa tem uma preciso maior e resultou em uma reduo superior a 50% da atividade de PPO e POD.

Com relao aos parâmetros cinéticos obtidos, pode-se verificar que em todos os tratamentos realizados os valores de D e z das enzimas PPO e POD se mostraram consideravelmente inferiores no processo por termosonicao quando comparado ao tratamento térmico convencional semelhante (TABELAS 6 – 8). Por exemplo, no tratamento 90%/5 min (UI=0,640 W/mL), o valor z da enzima POD é 1537 vezes maior no tratamento térmico em detrimento do termosônico e no tratamento 50%/15min (UI=0,450 W/mL) o valor D<sub>70°C</sub> da enzima PPO é 5245 vezes maior no tratamento térmico quando comparado à termosonicao.

Este comportamento pode ser visualmente confirmado pelos gráficos de inativao das enzimas durante o tempo de tratamento por termosonicao e tratamento térmico equivalente (GRÁFICOS 15 – 17). De maneira geral, este estudo cinético confirma o que já havia sido verificado anteriormente, demonstrando que de fato o ultrassom em combinao com a temperatura aumenta a taxa de inativao enzimática / reduz resistênci enzimática, reduzindo dessa forma, a rigorosidade do tratamento térmico, contribuindo potencialmente para a obteno de um produto de maior qualidade sensorial e/ou nutricional.

A partir dos parâmetros de resistênci térmica pode-se verificar ainda que a enzima PPO se mostrou mais resistente ao calor e menos ao ultrassom em relao à POD, requerendo dessa forma um tratamento mais rigoroso. Campos et al. (1996), assim como Gonçalves et al. (2015) e Ribeiro et al. (2017) também apontaram a maior termorresistênci da polifenoloxidase ao processamento da água de coco. Estudos cinéticos so importantes ainda para se definir qual

deve ser o microrganismo ou enzima alvo indicadora da eficiência do tratamento de conservação. No caso da água de coco, está claro que não é necessário avaliar com as duas enzimas e sim somente a PPO.

Como discutido em alguns trabalhos, a obtenção dos parâmetros de inativação térmica através de uma análise dinâmica é mais realista do que pela análise convencional, já que considera o perfil de aquecimento variável do tratamento e não uma condição isotérmica estabelecida, conferindo maior precisão ao estudo. Almeida (2012) citou a enorme dificuldade existente na manutenção de temperatura constante durante um tratamento, confirmando a redução da confiabilidade do estudo cinético realizado de maneira convencional em processos não isotérmicos. Cattani et al. (2016) também contestaram a veracidade dos parâmetros obtidos por estudos convencionais, uma vez que não são capazes de prever condições verdadeiras, sugerindo que a realização de estudos cinéticos em condições realistas é indispensável para a otimização de processos mais confiáveis.

A diferença na precisão dos parâmetros cinéticos de inativação encontrados por estudos estáticos e cinéticos é discutida por alguns autores. Cattani et al. (2016), na estimativa dos parâmetros de inativação cinética para esporos de *Bacillus sporothermodurans*, observaram que o erro relativo para o valor D foi 30% menor no estudo cinético em comparação com o estático, além de requerer menos dados e menos testes para sua determinação, concluindo que os parâmetros de inativação estimados sob condições não isotérmicas fornecem estimativas exatas e precisas com menos dados totais. Por outro lado, Huang et al. (2013) não verificaram diferenças significativas na precisão dos parâmetros obtidos para *Listeria monocytogenes* em carnes de frango, entretanto, enquanto o experimento estático necessitou de cerca de 15 tratamentos com pelo menos 6 pontos de amostragem, foi necessário apenas um aquecimento linear para determinação dos parâmetros, ressaltando essa como grande vantagem do estudo dinâmico. Dolan, Valdramidis e Mishra (2013), ao avaliarem diferentes modelos para estimativa de parâmetros de inativação microbiana dinâmica também observaram que, em situações não-isotérmicas, os parâmetros podem ser estimados com exatidão e precisão com um mínimo de experimentos.

É importante salientar que a realização de um estudo cinético dinâmico da inativação das enzimas PPO e POD na água de coco pelo processo de termossonicação, em comparação com o tratamento térmico convencional, é inédita. Além disso, ainda são muito escassos os estudos sobre o estudo dinâmico da cinética de inativação térmica, sobretudo para o processo

de termossonicação, o que acaba inviabilizando a discussão mais profunda e comparação dos dados obtidos nesse trabalho com a literatura. Estudo desta natureza, além de permitir a comparação entre tratamentos e confirmação do efeito sinérgico do ultrassom com a temperatura, possibilita de maneira mais realística a obtenção mais confiável de parâmetros cinéticos  $D$  e  $z$  imprescindíveis para a definição dos parâmetros do processo.

Por fim, vale ressaltar que originalmente o objetivo era que fossem estudados apenas os tratamentos: 50% - 15 min; 70% - 10 min; 90% - 5 min, entretanto, verificou-se que o estudo cinético de tratamentos de menor intensidade são mais imprecisos, estimulando a realização de outros dois (90% - 10 min e 100% - 5 min) cujo os dados ainda estão sendo avaliados.

## 6 CONCLUSÃO

O estudo cinético dinâmico comprova o efeito sinérgico do ultrassom com a temperatura na inativação enzimática das enzimas PPO e POD na água de coco, uma vez que os parâmetros cinéticos de inativação ( $D$  e  $z$ ) são menores para esse método. Isso sugere a possibilidade da redução de tempos de processamento e conseqüentemente diminuição da rigorosidade dos tratamentos térmicos convencionais, responsável por danos nas características sensoriais e nutricionais desejáveis da bebida, potencializando a utilização do método como tecnologia alternativa de processamento. A determinação dos parâmetros através de um estudo dinâmico é imprescindível para a otimização de processos mais confiáveis, já que considera condições reais de aquecimento do produto, diferente da condição isotérmica estabelecida no estudo estático, além de permitir a realização de um número menor de experimentos, reduzindo os custos do estudo. A originalidade do estudo realizado e a escassez de estudos similares na literatura estimula o aprofundamento do tema e enaltece a relevância do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ABIR. **Inovação na indústria amplia acesso a água de coco**. Disponível em: <<https://abir.org.br/inovacao-na-industria-amplia-acesso-a-agua-de-coco/>>. Acesso em: 13 set. 2019.
- ALMEIDA, F. D. L. **Emprego de tecnologias emergentes no processamento de suco de laranja adicionado de fruto-oligosacarídeos e suco prebiótico de laranja produzido via síntese enzimática**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2015.
- ALMEIDA, S. **Validação do Processo de Esterilização de Refeições Prontas a Comer Enlatadas**. [s.l.] Instituto Politécnico de Leiria, 2012.
- ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. DE O. **Água-de-Coco**. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, v. 24, p. 32, 2001.
- AWUA, A. K.; DOE, E. D.; AGYARE, R. Exploring the influence of sterilisation and storage on some physicochemical properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 451, p. 1–9, 2011.
- BERK, Z. Ionizing Irradiation and Other Non-thermal Preservation Processes. **Food Process Engineering and Technology**, p. 533–544, 2009.
- BRAINER, M. S. C. P. Produção de coco: o nordeste é destaque nacional. **Caderno Setorial ETENE**, v. 3, n. 61, p. 1–25, 2018.
- BRASIL. DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 2009a.
- BRASIL. Instrução normativa nº 27, de 22 de julho de 2009. **MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 2009b.
- CAMPOS, C. F. et al. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n. 6, p. 487–500, 1996.
- CAO, X. et al. The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 169–178, 2018.
- CARVALHO, J. M. DE et al. **Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento**. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, p. 437–452, 2006.
- CATTANI, F. et al. One-step global parameter estimation of kinetic inactivation parameters for *Bacillus sporothermodurans* spores under static and dynamic thermal processes. **Food Research International**, v. 89, p. 614–619, 2016.

CAVALCANTE, L. V. A nova geografia da produção de coco no Brasil. **Anais do XI Encontro Nacional da Anpege**, p. 2709–2720, 2015.

CHEMAT, F. et al. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, n. April, p. 357–377, 2017.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.

CHOURIO, A. M. et al. Inactivation of peroxidase and polyphenoloxidase in coconut water using pressure-assisted thermal processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 49, p. 41–50, 2018.

CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 1, p. 8–15, 2006.

CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. Modelling kinetics of watercress (*Nasturtium officinale*) colour changes due to heat and thermosonication treatments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 244–252, 2007.

DOLAN, K. D.; VALDRAMIDIS, V. P.; MISHRA, D. K. Parameter estimation for dynamic microbial inactivation: Which model, which precision? **Food Control**, v. 29, n. 2, p. 401–408, 2013.

FONTAN, R. DA C. I. et al. Cinética de inativação da peroxidase em água de coco. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 249–258, 2012.

FRANCO, A. P. et al. Dielectric properties of green coconut water relevant to microwave processing: Effect of temperature and field frequency. **Journal of Food Engineering**, v. 155, p. 69–78, 2015.

FREITAS, A. A. DE et al. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 172–177, 2008.

FROEHLICH, Â. Água de Coco: Aspectos Nutricionais, Microbiológicos e de Conservação. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 1, p. 175, 2015.

GONÇALVES, B. et al. Efeito da Cinética de Ativação Térmica das Enzimas Peroxidase e Polifenoloxidase da Água de Coco. **Scientia Vitae**, v. 2, n. 7, p. 13–19, 2015.

HUANG, H. W. et al. Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. **Food Control**, v. 72, n. 12, p. 1–8, 2017.

- HUANG, L. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 3, p. 380–387, 2009.
- HUANG, L. Determination of thermal inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in chicken meats by isothermal and dynamic methods. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 484–488, 2013.
- MAGALHÃES, M. P. et al. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 72–77, 2005.
- MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI, M. O Efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251–256, 2000.
- MATSUI, K. N. Inativação das enzimas presentes na água de coco verde (*Cocos nucifera* L.) por processo térmico através de microondas. p. 123, 2006.
- MATSUI, K. N. et al. Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 2, p. 169–176, 2008.
- MENEZES, M. **Aproveitamento da polpa de coco verde para produção de gelado comestível**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2018.
- NASCIMENTO, K. DE O. DO; SILVA, C. P. DA; BARBOSA, M. I. M. J. Alta pressão hidrostática: tecnologia empregada no processamento de alimentos Kamila. **Acta Tecnológica**, v. 8, n. 1, p. 63–70, 2013.
- NIEMIRA, B. A.; GAO, M. **Irradiation of Fluid Foods**. 1. ed. Wyndmoor: Elsevier Inc., 2012.
- NOVAES, S. F. DE et al. Influência Das Novas Tecnologias De Conservação Sobre Os Alimentos De Origem Animal. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v. 19, p. 1–12, 2012.
- PANIWNYK, L. Emerging Technologies for Food Processing. In: **Emerging Technologies for Food Processing**. 2. ed. Coventry, UK: Elsevier Ltd, 2014. p. 271–291.
- PASSOS, F. J. V. PROCESSAMENTO TÉRMICO DE ALIMENTOS. p. 1–41, 2006.
- PRADES, A. et al. Coconut water preservation and processing: A review. **Fruits**, v. 67, n. 3, p. 157–171, 2012.
- RIBEIRO, M. DE M. et al. Synergistic effect of thermosonication to reduce enzymatic activity in coconut water. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 404–410, 2017.

ROSA, M. DE F.; ABREU, F. A. P. Água-de-coco: métodos de conservação. **Embrapa - CNPAT / SEBRAE/CE**, v. 37, n. 0, p. 40, 2000.

SCHUINA, G. L. **Utilização de Ultrassom na Conservação de Suco de Laranja: Efeito Sobre Características Físico-Químicas, Enzimáticas, Microbiológicas e Sensoriais**. Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. Optimum reference temperature for reparameterization of the Arrhenius equation. Part 1: Problems involving one kinetic constant. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 10, p. 2750–2764, 2007.

SIMPSON, R.; ABAKAROV, A. Optimal scheduling of canned food plants including simultaneous sterilization. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 53–59, 2009.

SULAIMAN, A. et al. Thermo-sonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 133–140, 2015.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S. **Ultrassom na indústria de alimentos: aplicações no processamento e conservação**. 1<sup>o</sup> ed. Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.