



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LÚCIA DE FÁTIMA ALVES GOMES

**CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PASTEURIZAÇÃO DA
SEIVA DO DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis*)**

BELÉM - PARÁ
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LÚCIA DE FÁTIMA ALVES GOMES

**CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PASTEURIZAÇÃO DA
SEIVA DO DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Nadia Cristina Fernandes
Corrêa

BELÉM - PARÁ
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Gomes, Lúcia de Fátima Alves, 1983-
Caracterização e otimização da pasteurização da
seiva do dendezeiro (*elaeis guineensis*) / Lúcia de
Fátima Alves Gomes. - 2016.

Orientadora: Nadia Cristina Fernandes
Corrêa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Belém, 2016.

1. Tecnologia de alimentos- Conservação. 2.
Cinética enzimática. 3. Pasteurização. 4.
Planejamento experimental. 5. Dendê. I. Título.

CDD 22. ed. 664.028

LÚCIA DE FÁTIMA ALVES GOMES

**CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PASTEURIZAÇÃO DA
SEIVA DO DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data da Avaliação: ____/____/____

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nadia Cristina Fernandes Corrêa
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientadora)

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro)

Profa. Dra. Vanessa Albres Botelho da Cunha
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Externo)

Profa. Dra. Alessandra dos Santos Lopes
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Suplente)

DEDICATÓRIA

A Deus por abençoar e iluminar meu caminho
sempre.

Aos meus pais Maria Gomes e Luiz Gomes pelo
apoio e amor incondicional em todas as etapas na
minha vida.

Ao João Fernando por seu amor e cumplicidade
durante a execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida, minha fortaleza, meu refúgio nos momentos mais difíceis, meu amigo nos momentos bons e alegres da minha existência.

À minha mãe, Maria de Fátima Alves Gomes, por seu apoio e amor incondicional, por sempre acreditar nos meus sonhos e projetos e não medir esforços para me ajudar a alcançá-los, por ser minha base e essência.

Ao meu pai, Luiz Gonzaga Pinheiro Gomes, por seu amor e apoio durante todas as etapas da minha vida.

À minha irmã Luciana Gomes pelo amor, carinho e amizade que sentimos uma pela outra.

Ao meu irmão Fábio Gomes pelo carinho e torcida pela minha vitória.

A minha sobrinha Juliana Gomes que enche meu coração de amor e afeto todos os dias.

Ao meu companheiro de vida e de laboratório João Fernando Costa, pela convivência e aprendizado de todos os dias, por compartilhar comigo os momentos bons, e principalmente, os ruins. Que tenhamos sempre essa cumplicidade e respeito um pelo outro, e claro por seu amor.

A professora Nadia Corrêa, por sua orientação neste trabalho, mais principalmente, por todos os seus conselhos, advertências, confiança e apoio.

Ao Professor Luiz França, pela confiança, sugestões e incentivo durante a realização deste trabalho.

À minha banca examinadora professora Vanessa Albres pelas sugestões durante o desenvolvimento desta pesquisa e professor Jesus Souza pelo auxílio experimental de parte deste trabalho.

Aos colegas da grande família LAOS Jardson, Renan, Orildo, Rafael, Brenda, Milena, Ramon, Dilene, Sara, Adriano e Samir pela convivência diária, amizade e momentos de descontração.

A Orquídea Vasconcelos por me dar a oportunidade de conhecê-la melhor e presenciar uma pessoa sempre disposta a ajudar ao próximo.

Aos colegas que passaram pelo LAOS Daniela, Rômulo e Ewerson pela convivência, amizade e troca de conhecimentos.

Aos Colegas do CVACBA Risaldo, Welber, Saulo pela recepção e disposição em ajudar, em especial, ao Wesley pelo auxílio na parte experimental e incentivo.

A Empresa Biopalma-Vale pelo fornecimento da matéria-prima e concessão de parte da bolsa de mestrado.

Ao Hamilton, pela atenção dada quando da coleta e transporte da matéria-prima na Biopalma e pela disposição em esclarecer as minhas dúvidas.

Ao programa PPGCTA-UFPA e corpo docente.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a construção deste sonho.

RESUMO

O crescimento da agroindústria do óleo de dendê tem levado a estudos da utilização de novos co-produtos gerados durante a vida útil da planta, como exemplo, o aproveitamento do estipe do dendezeiro. Diante disso, objetivou-se caracterizar física, físico-quimicamente e microbiologicamente a seiva presente no estipe do dendezeiro, além do estudo do processo de pasteurização visando à inativação da peroxidase. A seiva apresentou quantidades relevantes de açúcar total e açúcar redutor e sem contaminação microbiológica. Apresentou ainda polifenóis totais, sendo 46% em flavanóis, e capacidade antioxidante. A atividade da enzima peroxidase foi determinada após estabelecimento de protocolo experimental, sendo calculados para ambos os substratos peróxido de hidrogênio e *p*-fenilenodiamina os valores de k_m e $V_{máx}$. Após os ensaios de pasteurização verificou-se a redução de um ciclo logarítmico na atividade da peroxidase, para o binômio 80°C, 7,5 minutos e pH 3,32. A análise estatística mostrou que a temperatura linear apresentou maior efeito na redução da atividade da peroxidase, seguido pelo pH e interação temperatura versus pH, sendo o primeiro efeito negativo e os outros dois efeitos positivos. O modelo obtido foi significativo a 95% de confiança e apresentou falta de ajuste não significativa, sendo útil para fins preditivos. A cinética de inativação mostrou que os modelos Primeira ordem e Isoenzimas distintas apresentaram bom ajuste aos dados experimentais com valores de R^2 acima de 0,91, χ^2 menor que 0,052 e Erro padrão menor que 0,023.

Palavras-chave: Seiva, planejamento experimental, cinética, peroxidase.

ABSTRACT

Due to increase of palm oil production many studies appeared, for example the use of the stipe of oil palm, in order to utilize the new co-products generated by agricultural industries during the lifetime of the plant. Therefore, this study aimed the physicochemical and microbiological characterization of the sap obtained from the stem of the palm oil, and the study of its pasteurization process in order to evaluate the peroxidase inactivation. The sap showed high amounts of total sugar and reducing sugar, besides no microbiological contamination. It also showed total polyphenol, 46% in flavanols, and antioxidant capacity. The peroxidase enzyme activity has been determined after the experimental protocol establishment, were calculated the values of k_m and V_{max} for hydrogen peroxide and *p*-phenylenediamine. After the pasteurization tests it was found a logarithmic cycle reduction in the peroxidase activity, for the binomial 80 ° C 7.5 minutes and pH 3.32. Statistical analysis showed that the linear temperature was the variable that had the greatest effect in reducing peroxidase activity, followed by pH and the interaction of temperature versus pH, the first effect is negative and the other two are positive. The obtaneid model was significant at 95% confidence and showed a non significant "lack of fit", being useful for predictive purpose. The inactivation kinetics showed that the first order and different isoenzymes models reveals good fit to the experimental data with R^2 value over 0.91, X^2 less than 0.052 and standard error less than 0.023.

Keywords: Sap; experimental design; kinetic; peroxidase.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fotografia do dendezeiro (<i>Elaeis guineensis</i>)	16
Figura 2 Tecido do parênquia (A) e Feixes vasculares (B)	17
Figura 3 Estrutura química de diferentes classes de polifenóis	22
Figura 4 Esquema de obtenção da fração central e redução de tamanho	33
Figura 5 Redução do estipe do dendezeiro (A) e acondicionamento da seiva (B) ...	34
Figura 6 Evolução da atividade da peroxidase em função do pH	47
Figura 7 Curva de Michaelis-Menten da peroxidase da seiva para o substrato <i>p</i> -pda	48
Figura 8 Linearização de Lineweaver-Burk obtida a partir da curva de Michaelis-Menten da atividade enzimática da POD da seiva para o substrato <i>p</i> -pda	48
Figura 9 Evolução da atividade da peroxidase da seiva para o H ₂ O ₂	49
Figura 10 Linearização de Lineweaver-Burk obtida a partir da curva de Michaelis-Menten da atividade enzimática da POD da seiva para o substrato H ₂ O ₂	50
Figura 11 Evolução da atividade da peroxidase da seiva em função da concentração da enzima	51
Figura 12 Superfície de resposta e curva de nível para a atividade da POD relacionando a temperatura e pH para um intervalo de tempo de 7,5 minutos	56
Figura 13 Superfície de resposta e curva de nível para a atividade da POD relacionando tempo e temperatura para pH igual a 5,0	57
Figura 14 Superfície de resposta e curva de nível para a atividade da POD relacionando pH e tempo em temperatura de 80°C	58
Figura 15 Cinética de inativação da POD da seiva, ajuste do modelo Primeira-ordem e a correlação entre os valores experimentais e preditos	61
Figura 16 Cinética de inativação da POD da seiva, ajuste do modelo Isoenzimas distintas e a correlação entre os valores experimentais e preditos	62
APÊNDICE A CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCAR REDUTOR	71
APÊNDICE B CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCAR TOTAL	72
ANEXO A CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA POLIFENÓIS TOTAIS	73

ANEXO B CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE CATEQUINA PARA FLAVONOIDES TOTAIS.....	74
ANEXO C 1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TROLOX <i>VERSUS</i> A CURVA DE DECAIMENTO DA FLUORESCÊNCIA 2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO EM TROLOX PARA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Teores de açúcares presente na seiva em diferentes regiões do estipe do dendezeiro.....	19
Tabela 2 Comparação entre o estipe de dendezeiro e a cana-de-açúcar para a produção de bioetanol.....	21
Tabela 3 Planejamento experimental da pasteurização da seiva	42
Tabela 4 Característica física e físico-química da seiva	44
Tabela 5 Determinações dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante da seiva.....	52
Tabela 6 Atividade da POD na seiva após a pasteurização	53
Tabela 7 Efeito estimado, erro puro, coeficiente (t) e significância estatística de cada fator para a atividade da peroxidase na seiva	54
Tabela 8 Análise de variância do modelo ajustado para a atividade da POD.....	55
Tabela 9 Atividade enzimática da POD da seiva em função do tempo e temperatura de pasteurização	59
Tabela 10 Coeficiente de determinação, valores de X^2 e Erro padrão dos ajustes dos modelos aos dados experimentais	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO GERAL	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 ASPECTO GERAL DO DENDEZEIRO	16
3.1.1 Estipe do dendezeiro	17
3.1.2 Seiva como fonte de açúcares	18
3.1.3 Potencialidades da seiva	20
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	21
3.3 ENZIMAS TERMORRESISTENTES	24
3.3.1 Polifenoloxidase	25
3.3.2 Peroxidase	26
3.4 TRATAMENTO TÉRMICO.....	27
3.4.1 Pasteurização	28
3.4.2 Esterilização	28
3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	29
3.6 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 COLETA DA MATÉRIA-PRIMA	33
4.2 OBTENÇÃO DA SEIVA	33
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA SEIVA	34
4.3.1 Umidade	34
4.3.2 Cinzas	34
4.3.3 Açúcares Redutores	35
4.3.4 Açúcares Totais	35
4.3.5 Potencial Hidrogeniônico (pH)	35
4.3.6 Sólidos Solúveis	35
4.3.7 Massa Específica	36
4.3.8 Análise Microbiológica	36
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	36

4.4.1 Polifenoloxidase	36
4.4.2 Peroxidase	36
4.4.2.1 Investigação do protocolo experimental da POD	36
4.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	38
4.5.1 Preparo do extrato de seiva	38
4.5.2 Determinação de polifenóis totais	38
4.5.3 Quantificação de flavanóis totais	39
4.5.4 Quantificação de flavonóis totais	39
4.5.5 Determinação de taninos condensados ou proantocianidinas	39
4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	40
4.7 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO	41
4.7.1 Tratamento térmico das amostras	41
4.7.2 Determinação dos parâmetros do estudo	41
4.8 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PEROXIDASE NA SEIVA	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA SEIVA.....	44
5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
5.2.1 Polifenoloxidase	46
5.2.2 Peroxidase	46
5.3 COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PRESENTE NA SEIVA.....	52
5.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO SOBRE A INATIVAÇÃO DA PEROXIDASE	52
5.5 MODELAGEM DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DA PEROXIDASE NA SEIVA ...	58
6 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICES	71
ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

O dendezeiro ou *palm oil* é a oleaginosa mais cultivada no mundo. Esta cultura destaca-se por apresentar características de plantio consideradas boas devido a sua adaptação fácil e baixa exigência quanto à adição em nutrientes, frutificando o ano inteiro. Este produz frutos em cachos de onde se extrai o óleo de dendê e da amêndoa do fruto o óleo de palmiste.

Do processamento do dendê geram-se diversos resíduos entre eles a torta, resultante da prensagem da polpa do fruto, os cachos vazios e as cascas das amêndoas, estes materiais podem ser queimados em caldeiras para a produção de energia. Durante o replantio da cultura, necessária para a manutenção da produtividade dos frutos, se produz como resíduos os troncos (estipe da palmeira) e as folhas, muitas vezes estes são deixados no meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento causando um grande impacto ambiental.

A exploração comercial da cultura ocorre em média 25 anos, sendo necessária a substituição dos dendezeiros antigos por plantas novas. A palmeira então é cortada e descartada no local de plantio ou simplesmente queimada. No entanto, pode-se realizar o aproveitamento do material lignocelulósico na produção de biomassa, ou ainda, etanol de segunda geração, parte deste pode também ser transformada em material compensado.

A seiva, proveniente do estipe prensado, é fonte de açúcares simples, vitaminas e minerais, pesquisas recentes apontam a versatilidade desta matéria-prima na produção de etanol, destacando-se a vantagem da utilização direta no processo fermentativo, sem necessidade de hidrólise. Além da produção de ácido láctico muito utilizado na indústria alimentícia, e na síntese de gás hidrogênio, entre outras finalidades.

Entretanto, a seiva por suas características, possui a desvantagem de ser facilmente degradada tanto pela ação de microrganismos quanto pelo escurecimento enzimático que pode ser promovido por enzimas como as polifenoloxidasas e peroxidases. Logo, tratamentos no sentido de manutenção das propriedades da seiva devem ser aplicados com a finalidade de aumentar vida útil desta.

Uma forma de preservação de matérias-primas e alimentos quanto à proliferação de microrganismos e alterações enzimáticas consiste na aplicação de calor, tratamentos como branqueamento, pasteurização e esterilização comercial são muito empregados, pois promove a redução de carga microbiana e inativação da atividade enzimática.

Neste sentido, o trabalho visa agregar às pesquisas recentes informações quanto à característica físico-química da seiva, bem como avaliar a melhor condição de pasteurização desta quanto a inativação da atividade da enzima peroxidase.

2 OBJETIVO GERAL

Conhecer as características física e físico-química da seiva do estipe do dendezeiro, e estudar as condições de sua pasteurização visando à inativação da enzima peroxidase.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar física, físico-química e microbiologicamente a seiva do estipe do dendezeiro;
- Identificar a presença das enzimas polifenoloxidase (POF) e peroxidase (POD) e de compostos fenólicos na seiva;
- Estabelecer um protocolo experimental para a quantificação da atividade da POD;
- Determinar a capacidade antioxidante da seiva;
- Determinar o binômio tempo-temperatura do processo de pasteurização da seiva;
- Avaliar a cinética de inativação da POD.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTO GERAL DO DENDEZEIRO

O dendezeiro (Figura 1) é uma monocotiledônea que possui em sua estrutura anatômica feixes vasculares e células do parênquima, diferindo em sua composição no conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina da madeira dura. No período de replantio da espécie a palmeira apresenta de 7 a 13 metros de altura e 45 a 65 cm de diâmetro, medido a 1,5 m do solo (SULAIMAN et al., 2012).



Figura 1 Fotografia do dendezeiro (*Elaeis guineensis*).

Fonte: Do autor (2016).

De rápida expansão o dendezeiro tornou-se a oleaginosa mais plantada no mundo. A espécie tem um ciclo de vida econômico próximo de 25 anos, iniciando a produção de frutos a partir de 2,5 a 3 anos de plantio. Após o período de exploração comercial ocorre o replantio devido à diminuição de produtividade dos frutos e consequentemente de óleo. Dentre os maiores produtores desta cultura destacam-se a Malásia e Indonésia. A Malásia possuía em torno de 120 mil hectares de área para replantio anual entre os anos de 2006 a 2010. A Indonésia 450 mil hectares de áreas plantadas previstas para replantação anual durante os próximos 25 anos (YAMADA et al., 2010; CHIN et al., 2011; MURATA et al., 2013).

No Brasil o Estado do Pará responde pela maior produção de óleo de palma, concentrando mais de 80% de área plantada. O dendezeiro possui grande produtividade, 4 a 5 toneladas de óleo por hectare, proveniente da polpa do fruto com base em uma taxa de extração em torno de 20 a 22% sobre a produção de cachos de fruto fresco, além do óleo de palmiste, extraído da amêndoa que corresponde a 2% (BABICZ, 2009; RAMALHO FILHO et al., 2010).

Do processo de extração dos óleos de palma e palmiste gera-se uma biomassa residual próxima de 39% correspondente a cachos vazios (22%), fibras (12%) e casca das amêndoas (5%). No entanto, do processo de extração pode-se aproveitar 100% destes resíduos, denominado “perda zero” quando a biomassa residual produzida (folhas, estipes, cachos vazios, fibras e cascas) é utilizada como combustível em caldeiras de cogeração (FAVARO, 2011).

3.1.1 Estipe do dendezeiro

O estipe é composto, basicamente, por quatro secções: córtex, região periférica, central e feixes vasculares. O córtex é a zona mais estreita com 1,5 a 3,5 cm de largura, composto em grande parte por tecido do parênquima (Figura 2-A) e cordões fibrosos. A periferia corresponde a 20% do estipe, formada por camadas estreitas de parênquima e muitos feixes vasculares (Figura 2-B), fornece a força mecânica à planta (SULAIMAN et al., 2012).



Figura 2 Tecido do parênquima (A) e Feixes vasculares (B).

Fonte: Yukata (2007).

A região central corresponde a cerca de 80% da planta, constituída por feixes vasculares ligeiramente maiores e distribuídos de maneira dispersa no tecido paraquimentoso. Finalmente, os feixes vasculares são compostos por bainha fibrosa, células do floema, xilema e do parênquima (SULAIMAN et al., 2012).

O estipe do dendezeiro consiste em uma biomassa importante como fonte de açúcares e material lignocelulósico. Estudos vêm sendo realizados no sentido de aproveitar esse resíduo gerado durante o replantio. Por suas propriedades físicas estes não são apropriados para transformação em madeira serrada, devido à alta umidade 70 a 80% da biomassa total. No entanto, um pequeno percentual é transformado em material compensado, a grande maioria dos estipes são descartados ou queimados no local da plantação. A fração central, porção macia, pouco se tem investigado quanto à seiva que apresenta grande quantidade de açúcares, especialmente glicose (KOSUGI et al., 2010; NOPARAT; PRASERTSAN; THONG, 2012; MURATA et al., 2013; NORHAZIMAH; FAIZAL, 2014).

Os estipes derrubados representam um dos recursos de biomassa mais importantes da Malásia e Indonésia. Uma alternativa de aproveitamento deste resíduo consiste na produção de bioetanol, tanto da seiva quanto do material lignocelulósico, que representa cerca de 30% em peso seco do estipe sem a casca, ou ainda, a produção de ácido lático e bioplástico (KOSUGI et al., 2010; PRAWITWONG et al., 2012).

3.1.2 Seiva como fonte de açúcares

A seiva obtida do estipe possui quantidade significativa de açúcares simples tais como glicose, frutose e sacarose, devido a esta disponibilidade, o material torna-se interessante seja em processos fermentativos, pois elimina a etapa da hidrólise para a obtenção de monômeros e produção de etanol, seja na obtenção de monômeros isolados. A Tabela 1 ilustra a quantidade total de açúcares presente em diferentes partes do estipe do dendezeiro.

Segundo Yamada et al. (2010) a quantidade em açúcar total contida na seiva difere dependendo da fração retirada no estipe, verificaram que as frações centrais do vegetal foram as que apresentaram maior concentração 117,2 g/L (1,25 m acima do

ponto central do estipe) e 101,7 g/L (1,25 m abaixo do centro do estipe), a fração retirada do topo foi a que apresentou menor valor médio de açúcar total.

Tabela 1 Teores de açúcares presente na seiva em diferentes regiões do estipe do dendezeiro

Pesquisa	Partes do vegetal		
Yamada et al. (2010)	101,2 g/L (base)	109,45* g/L (intermediária)	85,2 g/L (topo)
Kosugi et al. (2010)	98,1 g/L (interna)	60,5 g/L (centro)	20,1 g/L (periférica)
Zahari et al. (2012)	76,16 g/L (base)	76,04 g/L (intermediária)	74,04 g/L (topo)

*Valor médio das frações centrais do estipe

De acordo com Kosugi et al. (2010) um gradiente crescente da quantidade de açúcares foi encontrado no estipe, em direção radial da periferia para o centro. Na porção interna do estipe a concentração de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol e ácido láctico, glicose, sacarose, frutose e galactose foi de 96,7 g/L. Observaram, ainda, diferentes concentrações de açúcar nas três regiões estudadas (interna, central e periférica do estipe). A seiva contida na região interna apresentou 198,3 µg/g de aminoácidos totais, sendo serina (45,3 µg/g), alanina (38,8 µg/g), ácido glutâmico (33,9 µg/g) e ácido aspártico (17,3 µg/g) como aminoácidos majoritários.

Zahari et al. (2012) avaliando a seiva do estipe do dendezeiro como fonte de açúcar renovável encontrou um valor médio de açúcar total de 76,09 g/L. A glicose foi o açúcar em maior quantidade 53,95 g/L, correspondendo a 70% do total, seguido por sacarose 20,46% e frutose 1,68%. Verificou-se também a presença de aminoácidos 174,1 µg/g, destes serina (110,0 µg/g), prolina (27,1 µg/g) e ácido glutâmico (22,7 µg/g) como componentes majoritários.

3.1.3 Potencialidades da seiva

A seiva pode ser considerada um material de grande versatilidade na transformação em produtos de maior valor agregado tanto com finalidades alimentícias quanto na indústria de biocombustíveis.

Segundo Eze e Ogan (1988) a bebida alcoólica fermentada obtida da seiva da palma ou dendezeiro (família Palmae) denominada “vinho de palma” é uma bebida refrescante consumida por pessoas em partes da África, Ásia e América do Sul. Esta bebida apresenta um aspecto leitoso e floculento devido à grande concentração de leveduras. Pode ser utilizada em dietas como fonte de vitaminas do complexo B e vitamina C.

Tradicionalmente, se produz o “vinho de palma” a partir do açúcar obtido da seiva perfurando-se a inflorescência de diversas espécies de palmeiras, entre estas, *Arenga pinnata*, *Borassus flabellifer*, coqueiro (*Cocos nucifera*), *Nypa fruticans* e o dendezeiro (*Elaeis guineensis*) (YAMADA et al., 2010).

Umerie (2000) utilizando as seivas obtidas das espécies de palmeiras *Raphia hookeri* e *E. guineensis* a partir da inflorescência, produziu e caracterizou caramelos. Concluiu que as seivas estudadas são adequadas à produção de caramelo usado domesticamente ou industrialmente promovendo corpo, cor e aroma em alimentos, ou ainda, como incremento na quantidade de vitaminas em produtos de confeitaria.

Por suas características peculiares tais como presença de aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais e vitaminas, além dos açúcares presentes. A seiva torna-se um ótimo meio para a fermentação e produção de etanol utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*, e a produção de ácido lático pela bactéria homolática *Lactobacillus lactis* (CHOOKLIN, KAEWSICHAN, KAEWSRICHAN, 2011).

Yamada et al. (2010) realizou uma comparação entre a seiva de palma obtida do estipe com a cana-de-açúcar para a produção de bioetanol. Segundos os autores o possível rendimento em etanol foi calculado a partir de estipes antigos de dendezeiro, aproximadamente $9 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ com a cana-de-açúcar excedente (Tabela 2).

Tabela 2 Comparação entre o estipe de dendezeiro e a cana-de-açúcar para a produção de bioetanol

	Cana-de-açúcar	Estipe de palma*
Concentração de açúcar fermentável (%)	14,5	12,8
Conteúdo de umidade (%)	70	68
Conteúdo de Açúcar (g/kg)	102	87
Produção por área cana/tronco (t.ha ⁻¹)	77,6	154-168 (136-148 palmas por ha ⁻¹)
Possível rendimento em etanol (m ³ .ha ⁻¹)	6,5	8,7-9,4

Fonte: Yamada et al., (2009). * após 60 dias.

Norhazimah e Faizal (2014) observaram a possibilidade da utilização da seiva de palma para a produção de bioetanol utilizando diversas cepas de leveduras e bactérias, além da influência da temperatura e agitação durante o processo fermentativo.

Kosugi et al. (2010) avaliaram a utilização da seiva de palma na produção de bioetanol e ácido láctico e constataram que, particularmente, a seiva obtida do centro do estipe é uma boa matéria-prima para a produção destes. Afirmam ainda, que se levando em consideração a derrubada de dezenas de milhões de estipes, anualmente, na Malásia e Indonésia, aquela pode ser considerada uma fonte renovável, promissora e importante para a obtenção destes produtos.

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Fitoquímicos são componentes químicos bioativos não nutricionais presentes em frutos, vegetais e grãos integrais, sendo relacionado as propriedades benéficas destas. Estima-se que em alimentos integrais possuam entre 5.000 a 25.000 fitoquímicos (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

Conforme Li et al. (2012) os compostos fenólicos são o maior grupo fitoquímico presente em vegetais, frutos e grãos. Estes são encontrados nos tecidos das plantas, possuem diversas funções como atrativos para polinizadores (pigmentos)

ou defensivo químico contra infecções e injúrias, provocadas por microrganismos e insetos, respectivamente.

Os compostos fenólicos incluem fenóis simples, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides, biflavonóides e proantocianidinas. Os flavonóides são as moléculas com maior atividade antioxidante. Estes são subdivididos em diversas famílias em flavonóis, flavanóis, flavonas, flavanonas, antocianinas, chalconas, etc. (Figura 3). Sendo os flavonóis, flavanóis e antocianinas os compostos predominantes nos vegetais (SILVA et al., 2007).

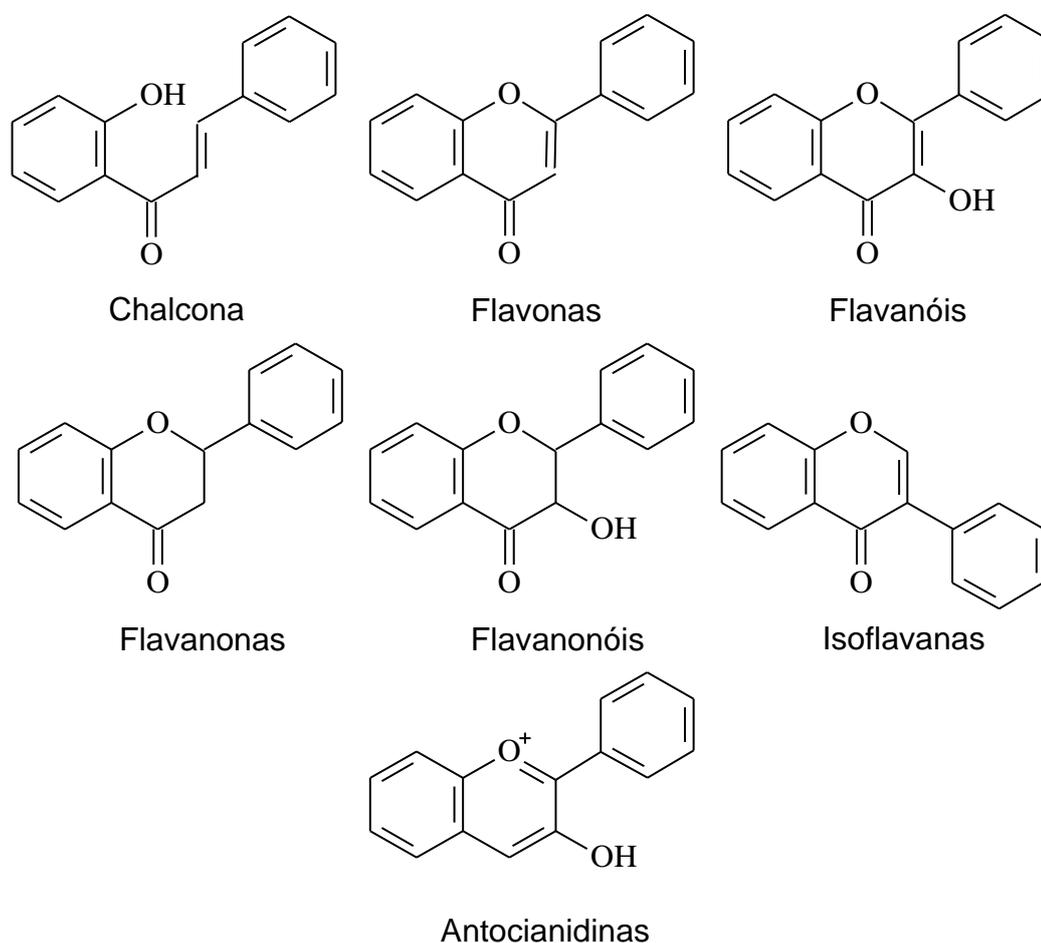


Figura 3 Estrutura química de diferentes classes de polifenóis.

Fonte: Adaptado de Damodaran, Parkin e Fennema (2010).

Os flavonóides pertencem a um grupo de compostos fenólicos distribuídos em plantas medicinais, sucos de frutas, e bebidas entre estas chá, vinho tinto e café. Estes compostos apresentam alta capacidade antioxidante e atividade anticancerígena, são

determinados pela presença do número de grupamentos hidroxila em determinadas posições, e a uma ligação dupla na posição C2-C3 (MONAGO-MARAÑA et al., 2016).

A estrutura base de um flavonóide apresenta 15 átomos de carbono, arrançados em dois anéis de seis carbonos (A e B) conectados através de um anel heterocíclico com três átomos de carbono (C) formando a representação C₆-C₃-C₆. Compreendem desde ácidos fenólicos e flavonóides a estruturas complexas altamente polimerizadas, os taninos. Este último dividido em dois grupos os taninos hidrolisáveis e os condensados ou proantocianidinas (ROCHA et al., 2011; WANG, CHEN, WU, 2011).

Os ácidos fenólicos (não-flavonóides) e os flavonóides são componentes fenólicos bastante comuns apresentando-se, normalmente, como conjugados solúveis (glicosídeos) e formas insolúveis. Naturalmente, os ácidos fenólicos ocorrem, principalmente, nas formas insolúveis, enquanto que os flavonóides como os glicosídeos possuem uma ou mais moléculas de açúcar ligados por um grupo hidroxílico formando O-glicosídeos ou associados a ligações carbono-carbono, formando C-glicosídeos (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

Os flavonóides constituem o maior e mais importante componente metabólito produzido pelos vegetais sendo associado a atividade antioxidante e outras propriedades promotoras à saúde. Entre as funções biológicas referidas a este grupo estão atividades antiviral, antibacteriana, vasodilatador, anticancerígena entre outras (WANG, CHEN, WU, 2011).

O comportamento ecológico desta família figura desde atrativo para polinizadores por suas cores intensas (flavonas e antocianinas) até defesa contra alguns insetos pela ação adstringente dos flavanóis e outros flavonóis, ou ainda, proteção de células vegetais através do sequestro de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, atividade antioxidante (GONÇALVES, 2008).

D'el-Rei e Medeiros (2011) afirmam que as moléculas da subclasse flavanóis são os flavonóides que se destacam no chocolate e cacau, incluindo as formas monoméricas de epicatequina e catequina, e o oligômeros procianidinas.

Os taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular presentes em muitas frutas, provocam precipitação de proteínas incluindo as salivares. Característica fundamental na proteção contra patógenos e herbívoros que se alimentam destes vegetais. Este grupo encontra-se dividido de acordo com sua

estrutura química em taninos hidrolisáveis e condensados (proantocianidinas). O primeiro grupo possui uma molécula de glicose ou um álcool poliédrico formando um núcleo central, ambos esterificado com ácido gálico ou elágico, tornando-os assim hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. As proantocianidinas são formadas por moléculas de flavonóides em estruturas oligoméricas ou poliméricas. As unidades monoméricas que formam os taninos condensados são os flavanóis e os flavan-3,4-dióis, pois estes monômeros possuem a capacidade de sofrerem reações de polimerização (RESENDE, 2007; SCOTTI et al., 2007; ROCHA et al., 2011).

Compostos fenólicos naturais tem sido sugerido como conservantes na formulação de alimentos por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, um exemplo, é o ácido ferúlico, antioxidante presente na lista de aditivos permitido pela Food and Drug Administration (FDA). Outras alternativas de aplicação destes fitoquímicos vai de cosméticos, a produtos nutracêuticos e farmacêuticos (ACOSTA ESTRADA et al., 2014).

3.3 ENZIMAS TERMORRESISTENTES

As enzimas de deterioração podem ser enzimas oriundas do tecido vegetal ou enzimas produzidas por microrganismos. As enzimas consideradas mais indesejáveis podem agrupar-se em três grupos:

- Enzimas pouco específicas, provocam modificações ao mesmo tempo, na cor, aroma e outras características;
- Enzimas que provocam alterações específicas na formação de odor ou sabor, lípases, proteases, amilases, etc;
- Enzimas cuja atividade leva mais especificamente a alteração da cor, polifenoloxidasas, clorofilases, lipoxidases, entre outros (ROGEZ, 2000).

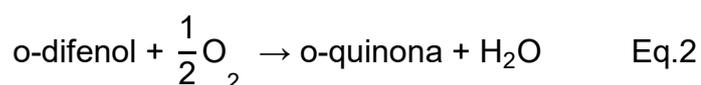
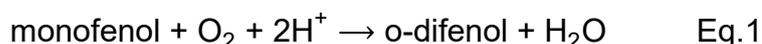
As reações enzimáticas são importantes em alimentos, delas depende a formação de compostos altamente desejáveis, bem como pode apresentar consequências indesejáveis. Essas reações ocorrem tanto no alimento natural quanto durante seu processamento (LUÍZ, HIRATA, CLEMENTE, 2007).

As polifenoloxidasas e peroxidases são enzimas responsáveis pelo escurecimento de frutos, vegetais e seus derivados, logo a atividade dessas enzimas pode ser utilizada como controle durante a obtenção de produtos processados (FREITAS et al., 2008).

3.3.1 Polifenoloxidase

O escurecimento que ocorre na grande parte de frutos e vegetais é ocasionado por reações catalisadas pela enzima polifenoloxidase (PFO). As ações dessas enzimas promovem a diminuição da qualidade nutritiva e alteração de sabor em frutas e vegetais *in natura*, além de perda econômica (LUÍZ, HIRATA, CLEMENTE, 2007).

A PFO é bastante difundida na natureza, principalmente, nos vegetais. No entanto, pode estar presente em fungos e em certos órgãos animais. Esta catalisa duas reações bem distintas e em cadeia: a hidroxilação dos monofenóis em *o*-difenois (Equação 1) e a oxidação de monofenol ou de *o*-difenois em *o*-quinonas (Equação 2), ambas ocorrem na presença de oxigênio (ROGEZ, 2000).



Na primeira reação ocorre uma hidroxilação, sendo classificada como atividade de monofenol monoxigenase (EC 1.14.18.1), enquanto a segunda reação classifica-se como atividade de 1,2-benzenediol: oxigênio oxirredutase (EC 1.10.3.1) (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

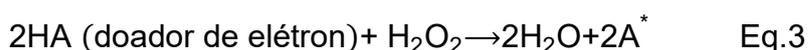
Zhang e Shao (2015) descrevem a enzima POF como a principal responsável pelo escurecimento enzimático de frutos e vegetais, esta reação catalisa a oxidação de polifenóis a *o*-quinonas na presença da molécula de oxigênio, e as *o*-quinonas polimerizam os pigmentos marrom, vermelho e preto.

Damodaram, Parkin e Fennema (2010) afirmam que as polifenoloxidasas em frutas e hortaliças exibem pHs ótimos no intervalo entre 4,0 a 7,0, sendo que alguns

substratos podem influenciar o pH ótimo. A faixa de temperatura ótima dessa enzima varia entre 30 a 50°C. No entanto, a estabilidade térmica é alta 55 a 80°C dependendo da fonte. Logo durante o processamento térmico, ocorre a possibilidade de ativação da PFO.

3.3.2 Peroxidase

A peroxidase (EC 1.11.1.7) é uma oxirredutase encontrada em plantas, animais e microrganismos, sendo as peroxidases das plantas as mais relevantes na bioquímica de alimentos. As funções fisiológicas das peroxidases incluem a formação e degradação da lignina, fornecimento de defesa contra pestes e patógenos, e remoção de peróxido (H₂O₂) celular (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010). A equação geral da reação de peroxidação encontra-se descrita na Equação 3.



A enzima peroxidase (POD) catalisa um grande número de reações oxidativas em vegetais utilizando peróxido como substrato, ou em alguns casos, oxigênio como aceptor de hidrogênio. Nos vegetais, a enzima induz a mudanças negativas de sabor durante a estocagem. É considerada a enzima vegetal mais estável ao calor (FREITAS et al., 2008).

Segundo Zhang e Shao (2015) a POD promove escurecimento enzimático, através da redução de difenóis, além da função de produção de lignina. A atividade da enzima é limitada pela ausência de compostos elétrons como radicais superóxidos, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, vários estudos associam o envolvimento desta no escurecimento de diversas frutas e vegetais.

De acordo com Fontan et al. (2012) esta enzima possui atividade máxima em temperatura de 35°C e pH 5,5, apresenta termorresistência, logo utilizada como indicador biológico de tratamento térmico. A atividade desta enzima presente em diversas fontes botânicas vem sendo pesquisada visando o entendimento de sua cinética e mecanismo de ação.

A atividade enzimática de uma enzima é quantificada, em condições de ensaios predefinidos, por sua velocidade de reação. De modo geral, observa-se no início da reação uma velocidade constante, aumento linear de formação do produto

em função do tempo, após determinado período a velocidade de reação diminui. A diminuição da velocidade pode ocorrer por diversos fatores como redução da concentração de substrato, inativação parcial da enzima no decorrer da reação, inibição por formação de produto e deslocamento de equilíbrio (reação reversível). A atividade enzimática deve ser quantificada durante a fase linear para evitar interferência dos fatores descritos (NABECHIMA, 2010).

Shalini et al. (2008) afirmam que o objetivo da modelagem matemática de inativação em alimentos processados com o uso de calor avalia os diferentes efeitos do tratamento térmico em relação a atividade residual da enzima. Pesquisas experimentais mostram que a inativação térmica de enzima peroxidase não tem seguido uma cinética de primeira ordem. Considerando a presença de isoenzimas no início do processo de inativação térmica, os modelos cinéticos descritos na literatura demonstram diferentes mecanismos de inativação como primeira ordem, reações consecutivas, e reações em paralelo.

3.4 TRATAMENTO TÉRMICO

O tratamento térmico de alimentos pode ser realizado no alimento já embalado ou não. Quando o tratamento do produto ocorre dentro da embalagem, ambos são tratados simultaneamente, logo o alimento não sofre contato com o ambiente após o processamento. Nos alimentos processados fora da embalagem, em trocadores de calor, o acondicionamento do produto deve ser realizado em embalagem já tratada e em ambiente apropriado. O primeiro processo é mais seguro, pois apresenta menor probabilidade de contaminação, no entanto, resultam em maior gradiente de reações (inativação microbiana ou enzimática, perda de nutrientes e reações físico-químicas) e gasto energético (AUGUSTO, 2009).

Fellows (2006) define tratamento térmico como uma operação unitária onde o alimento é submetido a aquecimento até uma dada temperatura por um intervalo de tempo determinado com o intuito de promover inativação microbiana e/ou enzimática.

Tratamentos que empregam o uso de calor visam à destruição de microrganismos patogênicos, deterioradores e inativação de enzimas, prevenindo a deterioração e manutenção de inocuidade do alimento. Os melhores tratamentos promovem a destruição de microrganismos patogênicos e deterioradores e a

inativação de enzimas sem provocar modificações indesejáveis nas características sensoriais da matéria-prima submetida ao tratamento (ROJA JUNIOR, 2008).

3.4.1 Pasteurização

A pasteurização é um tratamento térmico controlado que utiliza temperaturas menores que 100°C seguida por um resfriamento do alimento após determinado tempo de aquecimento. O tratamento visa à redução da carga microbiana, inativação de enzimas e eliminação de água, de maneira a manter as características sensoriais do produto, este tratamento pode ser realizado com o alimento já embalado e sob pressão atmosférica (SILVA, 2013; BARROS et al., 2015).

Tradicionalmente, o processo caracteriza-se por um aquecimento do alimento na faixa de temperatura entre 63 a 75°C, por um período de tempo variável de 15 a 30 segundos, seguido por um rápido resfriamento abaixo de 5°C. Apesar de empregar calor para reduzir a carga microbiana, após a pasteurização o alimento não está estéril, logo outros tratamentos devem ser empregados para garantir a preservação do produto como fermentação, refrigeração, congelamento, manutenção de condições anaeróbicas, diminuição da atividade de água, etc. (CARDOSO et al., 2010; SILVA, 2013).

O estudo do processo de pasteurização de alimentos consiste na seleção de parâmetros (físico-químicos, nutricionais e sensoriais), do ajuste do binômio tempo/temperatura (ideal para cada produto) e avaliação da qualidade deste, quando armazenada em condições de temperatura controlada. A atividade da enzima POD, atuante em determinados alimentos, pode ser utilizada para avaliar a eficiência em tratamentos térmicos pelo fato desta enzima ser altamente termorresistente (TEIXEIRA; NEVES; PENA, 2006, BASTOS et al., 2008).

3.4.2 Esterilização

A esterilização objetiva eliminar todas as formas de microrganismos em objetos e materiais, vírus, bactérias, fungos, protozoários e esporos, e a inativação de enzimas que causam alterações indesejáveis ao produto a um nível de segurança aceitável. Os microrganismos sobreviventes não são capazes de se desenvolver

durante a conservação do produto, mantendo as características dos alimentos à temperatura ambiente (PENA; MACHOSHVILI, 1997; CARDOSO, 2007).

A operação de esterilização é realizada com equipamento autoclave nas condições de 121°C, por aproximadamente, 14 minutos. Esse tempo pode ser aumentado dependendo da quantidade adicionada no equipamento, quanto mais cheia maior o tempo de esterilização. Existem diversos tipos de autoclave, enchimento horizontal, vertical, e com diferentes capacidades. Outros fatores devem ser considerados quando da otimização de processamento térmico entre eles: retenção de nutrientes, inativação enzimática e destruição de microrganismos, sem desconsiderar fatores econômicos de produtividade e custo (ROJA JUNIOR, 2008).

De acordo com Cardoso (2007) o processo de esterilização de alimentos líquidos é mais comumente realizado em trocadores de calor de placas, injeção de vapor, infusão de líquidos no vapor, aquecimento por fricção e filtração estéril. Os processos citados anteriormente são aplicados em produtos líquidos livres de partículas. Os produtos líquidos particulados passam por processamento térmico mais complexo, pois não apresentam uniformidade na distribuição de calor.

O tratamento térmico que visa à inativação enzimática consiste em uma das soluções encontradas pela indústria alimentícia na conservação de produtos, em seu período de elaboração e durante o armazenamento (SANTOS, 2009).

3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Segundo Ribeiro (2005) um bom planejamento consiste em construir um experimento de forma que este seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que buscamos. É fundamental definir claramente o objetivo que se quer alcançar com os experimentos, para assim determinar o tipo de planejamento que será executado. Quando se deseja realizar uma triagem dos dados, aconselha-se iniciar a execução de um planejamento fatorial fracionário. Este tipo de planejamento é mais econômico e pode ser utilizado para estudar mais de 20 fatores experimentais paralelamente. O planejamento fatorial completo avalia quantitativamente a influência das variáveis sobre resposta de interesse, assim como as possíveis interações. Quando se busca otimizar o sistema, maximizar ou minimizar alguma resposta utiliza-se a metodologia de superfície de resposta.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em uma ferramenta eficiente de otimização baseada na variação simultânea de diversos fatores (variáveis independentes), previamente selecionados por sua influência nas propriedades do processo, variáveis dependentes ou respostas. Para isso, faz uso de técnicas matemática e estatísticas, os resultados experimentais indicam a combinação de níveis dos fatores dentro de uma região ótima (GRIZZOTTO et al., 2005).

3.6 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

Segundo Murasaki (2005) as reações enzimáticas em alimentos, ocorrem normalmente, a uma taxa que é limitada pela concentração da enzima presente. Geralmente, a inativação térmica de enzimas segue uma cinética de primeira ordem Equações 4 e 5.

$$r = -\frac{dA}{dt} = kA \quad \text{Eq.4}$$

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \quad \text{Eq.5}$$

Onde: A_0 é a atividade inicial da enzima, no tempo zero, A é a atividade da enzima após o tratamento térmico no período de tempo t , k é a constante de velocidade de 1ª ordem e r é a taxa de reação.

Conforme Klein (2014) a cinética de equação de primeira ordem descrita na Equação 5 é muito utilizada para descrever a inativação térmica de diversas enzimas. Os parâmetros dessa modelagem podem ser obtidos através da Equação de Arrhenius que descreve a relação entre a constante de inativação térmica (k) e a temperatura (Equação 6).

$$\ln(k) = \ln(C) - \frac{E_a}{RT} \quad \text{Eq.6}$$

Onde: C é a constante de Arrhenius, E_a é a energia de ativação, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta.

Desvios dessa cinética são descritas por diversos pesquisadores. Modelos têm sido propostos para elucidar as inativações não lineares, entre os modelos abordados neste estudo estão Isoenzimas distintas, 2 (duas) Frações, Conversão Fracionária e Multicomponente de 1ª (primeira) ordem.

Segundo Nabechima (2010) na área Ciência e Tecnologia de Alimentos comumente utilizam-se as reações de 1ª ordem para determinar o tempo de destruição térmica ou redução decimal (D). Entretanto, as cinéticas apresentam um comportamento mais complexo, resultado de reações consecutivas ou paralelas de isoenzimas (formas multimoleculares distintas para uma mesma enzima), inibidores, ou outros componentes dos alimentos. As Equações 7, 8, 9 e 10 são algumas equações cinéticas não lineares utilizadas para descrever o processo de degradação térmica de enzimas em alimentos.

A Equação 7 denominada “Isoenzimas distintas” (LUDIKHUYZE et al., 1999) é considerada um modelo paralelo que leva em consideração que a enzima é uma mistura de pelo menos duas formas ativas de enzimas com diferentes sensibilidades.

$$\frac{A}{A_0} = A_L \exp(-k_L t) + A_R \exp(-k_R t) \quad \text{Eq.7}$$

Em que: A_L é a fração menos resistente, A_R é a fração mais resistente, k_L é a constante de inativação da fração menos resistente, k_R é a constante de inativação da fração mais resistente.

A Equação 8 chamada “Duas Frações” (CHEN e WU, 1998) também é considerada um modelo paralelo, esta equação possui um coeficiente α que representa a atividade da fração menos resistente da enzima em relação a atividade total.

$$\frac{A}{A_0} = \alpha \exp(-k_L t) + (1-\alpha) \exp(-k_R t) \quad \text{Eq.8}$$

Onde: k_L é a constante de inativação da fração menos resistente, k_R é a constante de inativação da fração mais resistente.

A Equação 9 denominada de “Conversão Fracionária” (RIZVI E TONG, 1997) é mais um modelo paralelo que propõe a presença de isoformas ou isoenzimas, considera a atividade da enzima diferente de zero após o tratamento térmico, devido a presença de uma isoforma muito termorresistente.

$$\frac{A}{A_0} = A_r + (A_0 - A_r) \exp(-kt) \quad \text{Eq.9}$$

Em que: A_r é a atividade enzimática residual referente à fração extremamente resistente.

A Equação 10 chamada de “Multicomponente de 1ª ordem” (FUJIKAWA E ITOH, 1996) consiste da soma da cinética de seus componentes, cada uma seguindo uma cinética de inativação de 1ª ordem durante o tratamento térmico.

$$\frac{A}{A_0} = \frac{[\exp(-k_1t) + r \exp(-k_2t)]}{(1 + r)} \quad \text{Eq.10}$$

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DA MATÉRIA-PRIMA

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) da variação Delix Ghana com aproximadamente, 7 anos de idade foi cedida pela empresa Biopalma S/A, localização 2° 13' 38" S e 48° 51' 47" W. A palmeira possuía 2,71 m de perímetro e 2,18 m de altura, coletou-se na área I-22. Retirou-se, aproximadamente, 1 metro da região central da palmeira, descartando a porção periférica. Os blocos formados desta região foram então transportados para o Laboratório de Operações de Separação (LAOS/ITEC/UFGA), sendo o material lavado em água corrente e mantido em temperatura de congelamento no mesmo dia de coleta (Figura 4).

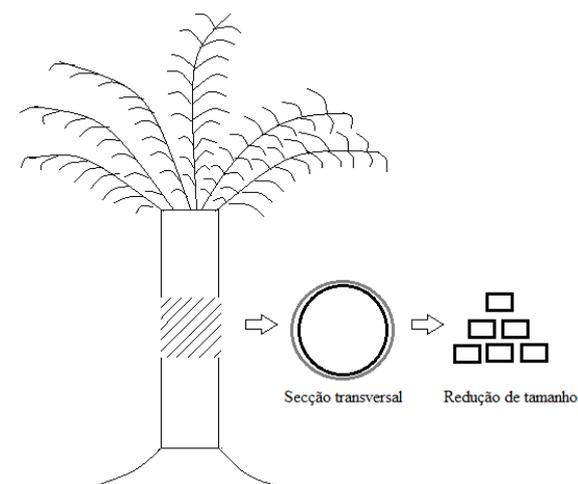


Figura 4 Esquema de obtenção da fração central e redução de tamanho.

Fonte: Do autor (2016).

4.2 OBTENÇÃO DA SEIVA

Os blocos do estipe foram reduzidos de tamanho para facilitar a extração da seiva (Figura 5A), de forma manual com auxílio de lâminas em aço inoxidável, em seguida, armazenado em sacos de polietileno e mantido em freezer até a operação de prensagem.

A extração da seiva foi realizada com auxílio de prensa hidráulica de bancada (SIWA FMB) com capacidade de 1L e pressão máxima de 15 toneladas/cm². Posteriormente, a seiva foi centrifugada (Marca Sigma Modelo 6-15H) a 3000 rpm por

15 minutos e o sobrenadante acondicionado em embalagens de polietileno de alta densidade com capacidade para 200 mL (Figura 5B).



Figura 5 Redução do estipe do dendezeiro (A) e acondicionamento da seiva (B).

Fonte: Do autor (2016).

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA SEIVA

A caracterização física, físico-química e microbiológica da seiva foi realizada através das seguintes análises:

4.3.1 Umidade

Determinada por secagem em estufa de circulação de ar (Marca Quimis, modelo Q-314 M 122) com areia tratada a 105°C, até peso constante conforme método 31.1.02 da AOAC (1997).

4.3.2 Cinzas

Determinada por método gravimétrico, incineração da amostra em forno mufla a 550°C até massa constante, de acordo com o método 938.08 da AOAC (1997).

4.3.3 Açúcares Redutores

Conforme metodologia descrita por Moura (2007) com preparo do reagente ácido dinitrossalicílico (DNS), reação deste com a amostra em banho-maria em temperatura de ebulição por 5 minutos, seguida por resfriamento e leitura em espectrofotômetro marca Thermo Scientific a 540 nm. A calibração foi realizada com curva padrão de glicose, a partir da solução mãe de concentração 1 g/L. Foram realizadas diluições nas concentrações entre 0,1 a 0,9 g/L de glicose (Apêndice A).

4.3.4 Açúcares Totais

Metodologia determinada por Dubois et al. (1956) com a utilização de solução de fenol e ácido sulfúrico concentrado. Foram transferidos para tubos de ensaios, alíquotas de 800 µL de amostra convenientemente diluída (900 vezes), 400 µL de solução de fenol a 5% e 2000 µL de ácido sulfúrico concentrado, em seguida os tubos foram homogeneizados e deixados para esfriar por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro Thermo Scientific a 490 nm. Os resultados foram calculados através de curva de calibração com solução de glicose padrão nas concentrações de 10 a 60 µL/mL de solução (Apêndice B).

4.3.5 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Leitura direta em potenciômetro (Marca pH meter, modelo W3B) previamente calibrado com os tampões pH 4,0 e 7,0 a 20°C, de acordo com o método 981.12 AOAC (1997).

4.3.6 Sólidos Solúveis

Leitura direta da amostra homogeneizada a 20°C em refratômetro ABBE de bancada marca Quimis, modelo Q7678, conforme método 932.12 AOAC (1997).

4.3.7 Massa Específica

Leitura direta da seiva homogeneizada em densímetro digital marca Anton PAAR modelo DMA 35.

4.3.8 Análise Microbiológica

As análises de bolores e leveduras foram realizadas através de diluições das amostras até 10^{-3} e, posteriormente, incubadas por 7 dias a 25°C de acordo com método descrito por Silva et al., (2007).

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.4.1 Polifenoloxidase

A determinação da atividade enzimática da PFO foi realizada por metodologia adaptada por Rogez (2000) para açaí. Consistiu na mistura reacional de 50 µL de extrato bruto de seiva, 350 µL de substrato catecol na concentração 70 mM em 2600 µL de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0). A leitura do extrato bruto de seiva (item 4.5.1) foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Pharmacia Biotech 2000, modelo 08-2106) a um comprimento de onda de 407 nm a cada 20 segundos no intervalo de 6 minutos de reação. O branco foi realizado através da mistura de 2650 µL de solução tampão e 350 µL de catecol.

4.4.2 Peroxidase

4.4.2.1 Investigação do protocolo experimental da POD

A investigação da atividade da peroxidase na seiva foi feita de acordo com o procedimento descrito a seguir, conforme Rogez (2000).

- Determinação do pH ótimo

A determinação do melhor pH para a atividade da peroxidase foi realizado em sistema tamponado na faixa de pH 4,0 a 6,0 variando-se os tampões em 0,5 (4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0). Inicialmente, os substratos *p*-fenilenodiamina (*p*-pda) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como a enzima (seiva) foram diluídos em água ultrapura. Posteriormente, realizaram-se os testes com os diferentes tampões adicionados à mistura reacional na cubeta em temperatura de 25°C, medindo-se em espectrofotômetro UV/Visível (Pharmacia Biotech 2000, modelo 08-2106) em comprimento de onda de 515 nm.

- Determinação da melhor concentração da *p*-fenilenodiamina

Preparou-se com este substrato uma solução padrão a 2% diluindo-se o *p*-pda em solução tampão fosfato de sódio a 0,05 M e pH 5,5. A partir desta solução foram realizadas várias diluições com concentrações entre 0,61 a 9,24 mM na cubeta. Mantendo-se a concentração de H_2O_2 inicial em 15 mM. Determinou-se a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante de Michaelis-Mentem (k_m) plotando-se os gráficos da concentração de *p*-pda em função da atividade enzimática, expressa em unidade de absorbância por minuto (UA/min) e, posterior linearização de Lineweaver-Burk.

- Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

O H_2O_2 é utilizado como um substrato oxidante do *p*-pda promovendo a formação de um composto colorido, que posteriormente, é quantificado. Para determinação da concentração de peróxido, preparou-se uma solução a 15 mM. A partir da solução mãe, realizaram-se diluições variando a concentração de peróxido entre 0,25 a 1,14 mM do substrato na mistura reacional. Posteriormente, determinou-se a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante de Michaelis-Mentem (k_m) pela construção dos gráficos da concentração de H_2O_2 em função da atividade enzimática (UA/min) e, posterior linearização de Lineweaver-Burk.

- Determinação da concentração ótima de enzima (seiva)

Realizou-se a diluição da enzima em 30 vezes com solução tampão de fosfato a 0,05 M e pH 5,5, e posterior filtração. A solução diluída apresentava uma concentração de enzima inicial de 3,33% promovendo a partir de então, diversas diluições variando-se as concentrações entre 0,027 a 0,222% na mistura reacional.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

4.5.1 Preparo do extrato de seiva

Para a determinação dos compostos fenólicos da seiva, uma solução contendo acetona, água destilada e ácido acético na proporção 70:29,5:0,5 (v:v:v), foi adicionada a seiva na razão de 1:1, e em seguida, centrifugada a 8000 rpm, a 4°C, durante 20 minutos (COUNET et al., 2004). Após, o sobrenadante (extrato de seiva) foi recolhido em recipiente de vidro âmbar e saturado com gás nitrogênio, mantido sob temperatura de refrigeração até o momento das análises.

4.5.2 Determinação de polifenóis totais

A quantificação dos polifenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). A mistura reacional continha 500 µL de extrato de seiva, 250 µL de solução Folin-Ciocalteu a 1N e 1250 µL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5%. A mistura reagiu em cubetas de polimetilmetacrilato (PMMA) por 30 minutos à temperatura ambiente (25°C) e protegida de luz direta. Decorrido o tempo de reação realizou-se as leituras em espectrofotômetro (Spectro Vision) a um comprimento de onda de 750 nm. Realizou-se uma amostra branco com a mistura de todos os reagentes e o uso de água destilada em substituição ao extrato. Os resultados foram expressos em mg equivalente ácido gálico/L (ANEXO A).

4.5.3 Quantificação de flavanóis totais

A quantificação de flavanóis totais foi realizada pela reação de condensação do *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) com a molécula de flavanol (DELCOUR et al., 1985; MCMURROUGH; BAERT, 1994). Realizou-se uma solução de ácido clorídrico-metanol na proporção 1:3, e posteriormente, adicionou-se a esta solução o DMACA de forma a obter uma concentração final de 0,5 mg/mL. A mistura reacional consistiu de 400 µL de extrato de seiva com 2000 µL de solução DMACA em cubetas de PMMA protegidas da luz, a mistura reagiu durante 10 minutos, realizando a leitura em espectrofotômetro (Spectro Vision) a um comprimento de onda de 640 nm contra um branco, mistura dos reagentes com água destilada em substituição do extrato. Os valores foram expressos em mg de catequina/L de extrato de seiva (ANEXO B).

4.5.4 Quantificação de flavonóis totais

Os flavonóis totais foram quantificados através da reação deste grupo de compostos com uma solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio (CHANG et al., 2002). A mistura reacional consistiu em 1000 µL de extrato de seiva e 1000 µL de solução metanólica, a reação ocorreu durante 10 minutos, protegidos da luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectro Vision) a um comprimento de onda de 430 nm contra um branco, metanol em substituição ao extrato de seiva. Sendo os resultados expressos em mg de equivalente quercetina/L.

4.5.5 Determinação de taninos condensados ou proantocianidinas

A quantificação de proantocianidinas foi realizada pelo método do butanol-ácido clorídrico (HCl) conforme Julkunen-Tiitto (1985). Realizou-se um preparo de solução de butanol:HCl na proporção de 95,5:0,5 mL. Posteriormente, adicionou-se a tubos de ensaio com tampas protegidos da luz, 200 µL de extrato de seiva em 4000 µL de solução butanol:HCl. A mistura reacional foi aquecida em banho orbital (Marca Lucadema) à temperatura de 90°C por 2 horas, em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Spectro Vision) a um comprimento de onda de 550 nm contra um branco, mistura dos reagentes não submetidos ao aquecimento.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da capacidade antioxidante do extrato de seiva foi avaliada conforme o protocolo do método de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) adaptado de Ou et al. (2001) e modificado de Huang et al. (2002) utilizando Fluorímetro Microplate Fluorescent Reader, BIO-TEK Instruments, Inc. USA e software Gean 5.

Inicialmente, preparou-se a solução tampão fosfato a 75 mM e pH 7,4 sendo esta utilizada no preparo das demais soluções da análise. Em seguida, preparou-se a solução estoque de fluoresceína dissolvendo 16,7 mg de fluoresceína de sódio completando-se com 100 mL de tampão podendo esta ser armazenada por até 4 meses. Posteriormente, preparou-se a solução estoque de Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) pesando 2,6 mg do reagente completando-se em 100 mL de tampão (armazenar por até 4 meses).

No dia da análise realizou-se o preparo das soluções de trabalho. A solução de fluoresceína foi obtida transferindo-se 39,8 mL de tampão em vidro âmbar, seguida por 200 μ L de fluoresceína previamente diluída (40 μ L da solução mãe de fluoresceína em 3160 μ L de tampão). Finalmente, preparou-se a solução de APPH (2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride) pesando-se 414 mg de AAPH em 10 mL de tampão, sendo mantida refrigerada até o momento da utilização.

O preparo do ensaio foi feito utilizando-se uma microplaca com 96 poços, onde 25 μ L do extrato de seiva, convenientemente diluído em tampão foi homogeneizado em 150 μ L da solução trabalho de fluoresceína, incubando-se a mistura por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, injetou-se 25 μ L de AAPH. O decaimento da fluorescência no extrato foi medido por minuto durante 50 minutos nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 520 nm (emissão). O branco da análise foi realizado com 25 μ L de tampão substituindo o extrato de seiva.

Realizou-se, ainda, a construção da curva de calibração da análise a partir da solução trolox a 1 mM, sendo feitas diluições da solução estoque nas concentrações 1, 2, 4 e 8 μ M (ANEXO C). A capacidade antioxidante foi quantificada baseada no cálculo da área formada abaixo da curva, sendo expressa em μ mol equivalente trolox por g de amostra em base seca (ETrolox/g bs.).

4.7 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO

4.7.1 Tratamento térmico das amostras

Para a realização da pasteurização das amostras de seiva os binômios tempo x temperatura foram pré-determinados através de ensaios preliminares de inativação da POD com intervalos de tempo menores. Foram adicionados a tubos de ensaios 50 mL de seiva com ajuste prévio de pH, os tubos foram então levados a um banho termostático para aquecimento, o intervalo de temperatura utilizado foi de 63 a 97°C em diferentes tempos 3,3 a 11,7 minutos seguindo um planejamento experimental. O monitoramento do binômio foi realizado com auxílio de termômetro e cronômetro digital. Finalmente, após a pasteurização os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo e mantidos em temperatura de refrigeração ~10°C até a determinação da atividade da POD.

4.7.2 Determinação dos parâmetros do estudo

A pasteurização da seiva seguiu um delineamento experimental 2^3 avaliando-se os efeitos das variáveis independentes: tempo, temperatura e pH em função da variável dependente, atividade da POD. Foram realizados 17 (dezessete) ensaios experimentais, 8 (oito) ensaios lineares, 6 (seis) axiais e 3 (três) ensaios no ponto central, de acordo com a Tabela 3. A atividade da POD foi feita de acordo com o protocolo experimental otimizado para seiva descrito no item 4.4.2.1.

Tabela 3 Planejamento experimental da pasteurização da seiva

Ensaio	Variável codificada			Variável real		
	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	pH
1	-1	-1	-1	70,0	5,0	4,00
2	-1	-1	+1	70,0	5,0	6,00
3	-1	+1	-1	70,0	10,0	4,00
4	-1	+1	+1	70,0	10,0	6,00
5	+1	-1	-1	90,0	5,0	4,00
6	+1	-1	+1	90,0	5,0	6,00
7	+1	+1	-1	90,0	10,0	4,00
8	+1	+1	+1	90,0	10,0	6,00
9	-1,68	0	0	63,2	7,5	5,00
10	+1,68	0	0	96,8	7,5	5,00
11	0	-1,68	0	80,0	3,3	5,00
12	0	1,68	0	80,0	11,7	5,00
13	0	0	-1,68	80,0	7,5	3,32
14	0	0	+1,68	80,0	7,5	6,68
15	0	0	0	80,0	7,5	5,00
16	0	0	0	80,0	7,5	5,00
17	0	0	0	80,0	7,5	5,00

Os resultados experimentais da atividade da peroxidase foram tratados através do software STATISTICA 7, sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste F.

4.8 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PEROXIDASE NA SEIVA

As cinéticas de inativação térmica da POD foram realizadas na temperatura de 70°C nos tempos de tratamento térmico de 2,5, 5, 10 e 15 minutos, na temperatura de 80°C nos tempos de 1,7, 3,3, 5 e 7,5 minutos, e na temperatura de 90°C nos tempos de 0,5, 1, 3 e 5 minutos. Os binômios utilizados na cinética de inativação foram baseados em testes preliminares e no planejamento experimental de pasteurização da seiva, foi mantido o valor de pH 4,0 em todos os ensaios. Realizou-se a construção das curvas plotando-se a relação entre atividade residual da enzima pela atividade inicial (A/A_0) em função do tempo.

A modelagem aos dados experimentais foi realizada com auxílio do software STATISTICA 7 (STATSOFT) com modelos propostos na literatura para a inativação térmica da peroxidase através de cinéticas de primeira ordem linear e não lineares descritos no item 3.6.

Verificou-se o melhor ajuste dos modelos aos dados experimentais através da análise de X^2 e Erro padrão conforme descrito nas equações 11 e 12.

$$X^2 = \frac{\sum(\alpha_{\text{observado}} - \alpha_{\text{predito}})^2}{(n-p)} \quad \text{Eq.11}$$

$$\text{Erro padrão} = \frac{\sum(\alpha_{\text{observado}} - \alpha_{\text{predito}})^2}{\sqrt{n}} \quad \text{Eq.12}$$

Onde: n é o número de observações, p o número de parâmetros do modelo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA SEIVA

Os resultados da caracterização física e físico-química da seiva bruta são apresentados na Tabela 4. Observa-se que o valor de umidade é semelhante ao descrito por Chooklin, Kaewsichan e Kaewisrichan (2011) e Umerie (2000), ambos para a seiva de dendezeiros originários da Tailândia e Nigéria, respectivamente. No entanto, sabe-se que para valores de umidade acima de 90% a contaminação por microrganismo é favorecida, sendo necessário o emprego de métodos de conservação combinados visando o aumento do tempo de preservação do produto.

Tabela 4 Característica física e físico-química da seiva

Parâmetro	Seiva bruta	Chooklin et al. (2011)	Umerie (2000)*	Outros
Umidade (%)	94,27±0,03	97,06	93,33	-
Açúcar Total (g/L)	39,86 ± 1,81	19,17	-	76,09 ¹
Açúcar Redutor (g/L)	5,59 ± 0,20	-	8,42	-
Sólidos solúveis (°Brix)	7,13 ± 0,05	3,4	-	-
Cinzas (%)	0,85 ± 0,005	-	-	0,25 ²
pH	3,94 ± 0,005	7,49	4,5	5,0 ³
Massa específica (g/cm ³)	1,02 ± 0,00	-	1,06	1,07 ³

Fonte: ¹Zahari et al. (2011), ²Ikegwu, Okafor, Ochiogu (2014) para seiva da inflorescência, ³Kosugi et al. (2010).

* Seiva obtida da base foliar da palmeira *E.guineensis*.

Nota-se uma grande variação quanto ao teor de açúcar total na seiva do estipe, o conteúdo verificado neste está compreendido entre as pesquisas citadas. Ambas as seivas retiradas do estipe de regiões geográficas distintas. Essas diferenças na concentração podem ocorrer sendo consideradas esperadas, visto que, o conteúdo da seiva depende de diversos fatores como adubação do vegetal, condições edafoclimáticas da região, idade da planta, etc.

O teor de açúcar redutor em glicose apesar de inferior ao encontrado por Umerie (2000), já era esperado, visto que, as seivas foram obtidas de diferentes partes da palmeira, no escrito do autor, este realizou a coleta da base da inflorescência por 12 horas e promoveu um tratamento térmico a 60°C por 10 minutos, ressaltando que a aplicação de calor pode ter influenciado no aumento do teor de açúcar redutor pela hidrólise dos carboidratos.

O teor de sólidos solúveis foi superior ao encontrado por Chooklin, Kaewsichan e Kaewisrichan (2011) obtida da seiva do estipe na porção interna, valor já esperado, pois o parâmetro está diretamente relacionado a concentração de componentes solúveis na seiva, incluindo carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, neste caso, diretamente relacionado a concentração de açúcares. Lagacé et al. (2015) encontraram para a seiva de bordo combinados em 5 períodos um valor médio de 2,03 °Brix, já na pesquisa de Bazinet et al. (2007) observaram para a seiva de bordo um teor de sólidos solúveis de 6,6 °Brix.

O teor de cinzas difere do descrito por Ikegwu, Okafor e Ochiogu (2014) para a seiva obtida da inflorescência da *E.guineensis* da Nigéria. Enfatizando que os constituintes na seiva dependem de vários fatores como origem da palmeira, adubação do solo, e condições climáticas da região, além de se observar diferenças na composição desta dependendo da parte em que se realiza a coleta, estipe ou inflorescência. Bazinet et al., (2007) verificaram para o xarope de bordo a 67,5 °Brix um teor de cinzas de 0,83% na amostra controle, observaram, ainda, uma redução deste parâmetro após a desmineralização por osmose reversa iguais a 0,69% (desmineralização a 12,5%) e 0,51% (25% de desmineralização).

Nota-se a distinção entre os valores de pH nos escritos citados, valores esses, podem ser dependentes da acidez do solo e das características da adubação da planta. A seiva, ora em estudo, apresentou pH abaixo de 4,5. Oliveira et al. (2007) e Andrade et al. (2008) determinaram valores de pH igual a 5,28 e 3,98 para o caldo de cana puro *in natura* e armazenado por 24 dias entre 22 e 25°C, respectivamente. Segundo Forsythe (2013) o valor de pH da seiva pode ser considerado um produto de média acidez por estar compreendido na faixa de pH entre 3,7 a 4,5. No entanto, este parâmetro isolado, não garante segurança contra contaminação microbológica e também total inatividade enzimática, levando a necessidade do emprego de outras

formas de conservação combinadas para promover um maior tempo de conservação da seiva.

O resultado microbiológico encontrado para seiva bruta, previamente extraída e congelada, quanto à contagem de bolores e leveduras mostrou-se satisfatório apresentando uma contagem total de <1 UFC/mL na menor diluição 10^{-1} . Segundo Silva (2002) a presença destes microrganismos em índice elevado nos alimentos pode fornecer indícios de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Neste caso, a seiva apresenta uma qualidade satisfatória quanto à contaminação microbiológica, fato este pode ter ocorrido pela característica intrínseca da seiva, pH baixo, além do estipe ser mantido em temperatura de congelamento (-18°C).

5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Durante a caracterização físico-química da seiva, observou-se que ocorria o seu escurecimento, fato este que levou a investigação das principais enzimas que promovem este fenômeno, as polifenoloxidasas e peroxidases.

5.2.1 Polifenoloxidase

Os resultados experimentais mostraram que a enzima polifenoloxidase não estava presente na seiva, o que reforçou a investigação da atividade da enzima peroxidase e o protocolo experimental de análise.

5.2.2 Peroxidase

A determinação de presença da atividade peroxidase na seiva resultou no protocolo experimental a seguir:

- Evolução da atividade enzimática da peroxidase em função do pH

A Figura 6 apresenta a evolução da atividade da enzima peroxidase em função do pH do tampão à temperatura ambiente 25°C . Nota-se um aumento da atividade da POD de pH 4,0 a 5,5 onde apresentou um pico máximo, decrescendo novamente a partir de pH 6,0. Verifica-se, ainda que abaixo de pH 4,0 a atividade

enzimática é reduzida, ou seja, abaixo de 0,02 UA/min. É provável que haja uma inibição total da POD, resultado que pode ser interessante para conservação da seiva, pois trata-se de mais uma forma de tratamento que combinada à pasteurização pode estender o tempo de conservação do produto.

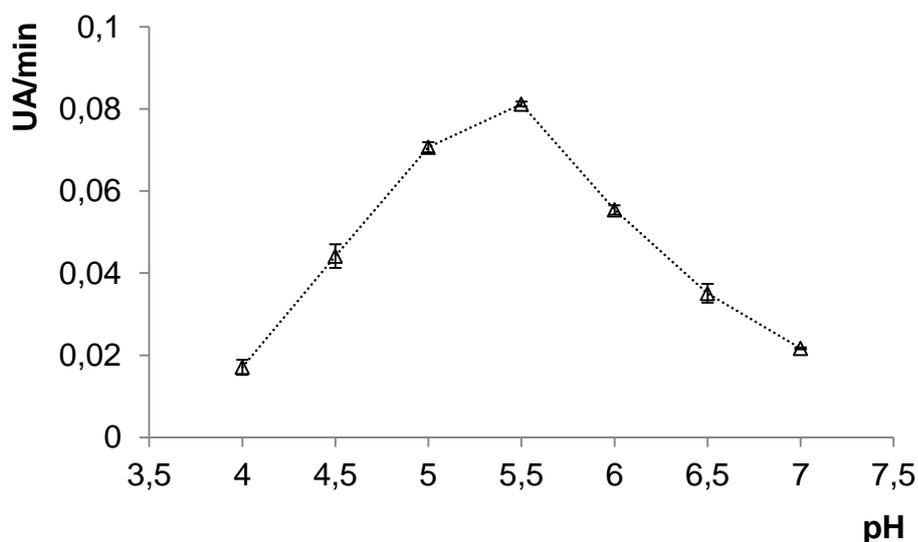


Figura 6 Evolução da atividade da peroxidase em função do pH.

Fontan et al. (2012) afirma que a enzima peroxidase presente na água de coco apresenta uma atividade máxima em pH 5,5 a 35°C, logo por ser resistente ao calor, esta pode ser considerada como um indicador biológico de tratamento térmico.

Forteza et al. (2009) trabalhando com uvas de mesa variedade Crimson Seedless realizou a extração das enzimas peroxidase e polifenoloxidase da matéria-prima, determinando a atividade enzimática de ambas a 25°C.

- Evolução da atividade enzimática em função da concentração do *p*-pda

A Figura 7 apresenta a curva de Michaelis-Menten para atividade da peroxidase da seiva e a Figura 8 a linearização de Lineweaver-Burck. Nota-se que a atividade enzimática cresce rapidamente nas menores concentrações de substrato, a partir de 5 mM a atividade pouco se altera apesar do aumento da concentração de substrato, indicando a saturação da enzima pelo substrato.

O comportamento da curva de concentração do substrato em função da atividade da enzima permitiu selecionar a concentração de trabalho do substrato *p*-pda para a determinação da atividade da POD na seiva de 4,62 mM.

A linearização da curva de *p*-pda apresentou bom coeficiente de correlação comprovada pelo valor de R^2 igual a 0,9894. Os valores de k_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados 1,38 mM e 0,11 UA/min.

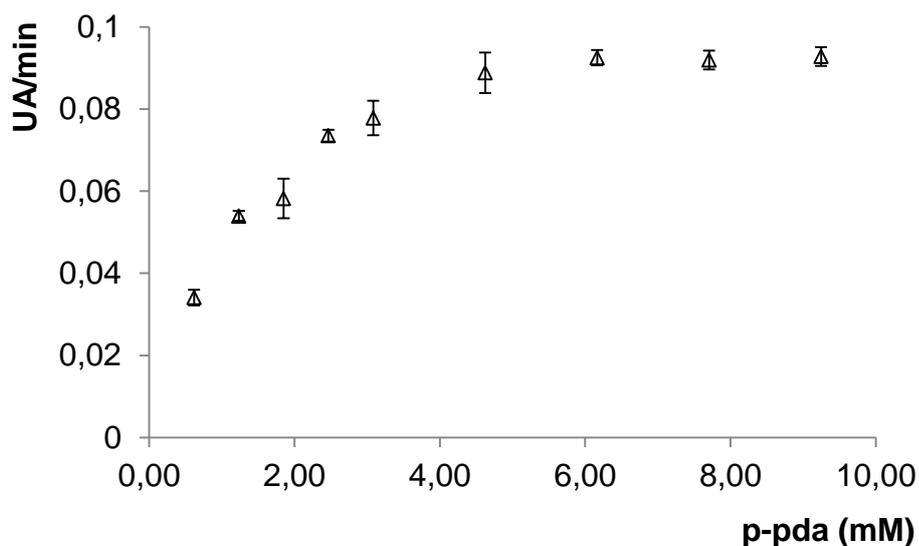


Figura 7 Curva de Michaelis-Menten da peroxidase da seiva para o substrato *p*-pda.

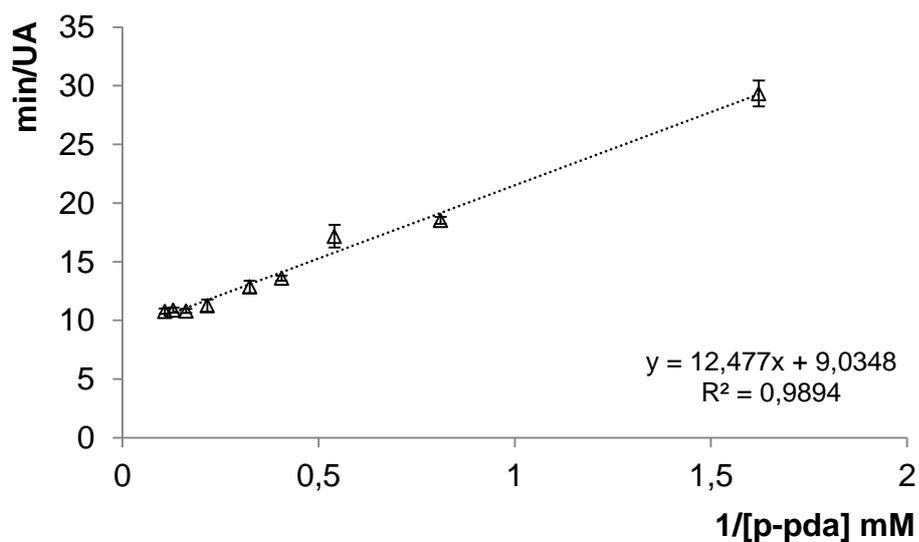


Figura 8 Linearização de Lineweaver-Burk obtida a partir da curva de Michaelis-Menten da atividade enzimática da POD da seiva para o substrato *p*-pda.

- Evolução da atividade enzimática em função da concentração do H_2O_2

A Figura 9 mostra a evolução da atividade enzimática da POD em função da concentração do peróxido de hidrogênio. Observando o comportamento da curva verifica-se que esta apresentou um aumento de atividade quando se aumentou a concentração de H_2O_2 até aproximadamente 1,0 mM quando inicia a diminuição da atividade pelo aumento do substrato.

A linearização de Lineweaver-Burk (Figura 10) para a curva de atividade da POD versus H_2O_2 mostrou uma boa correlação dos dados ($R^2=0,9963$). Os valores calculados de k_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram 1,24 mM e 0,25 UA/min.

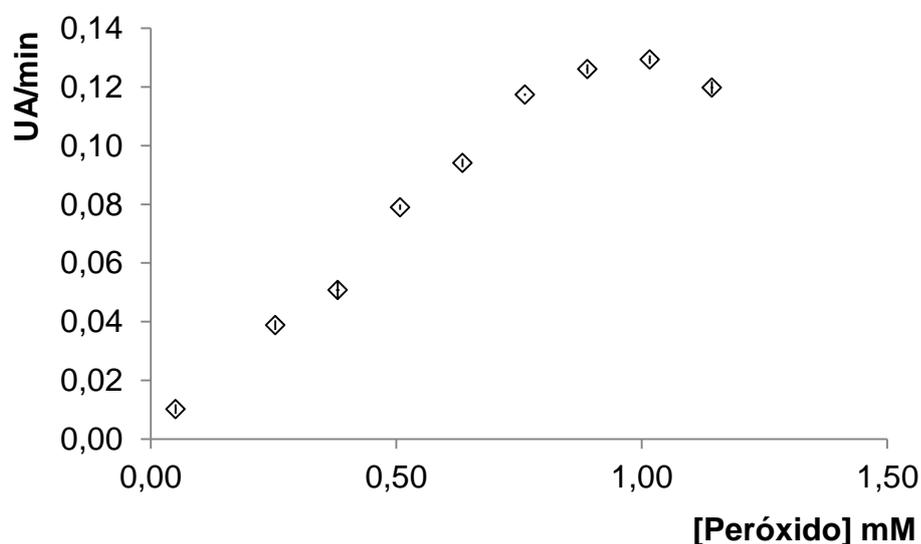


Figura 9 Evolução da atividade da peroxidase da seiva para o H_2O_2 .

Observando-se o comportamento da curva de atividade da POD em função da concentração de H_2O_2 selecionou-se trabalhar com a concentração de 0,83 mM. Apesar de, ainda se observar o crescimento da atividade da POD acima de 0,8 mM Lück (1965) ressalta que a concentração de H_2O_2 não deve ultrapassar 1,0 mM, pois concentrações superiores promovem a inibição da enzima por excesso de substrato.

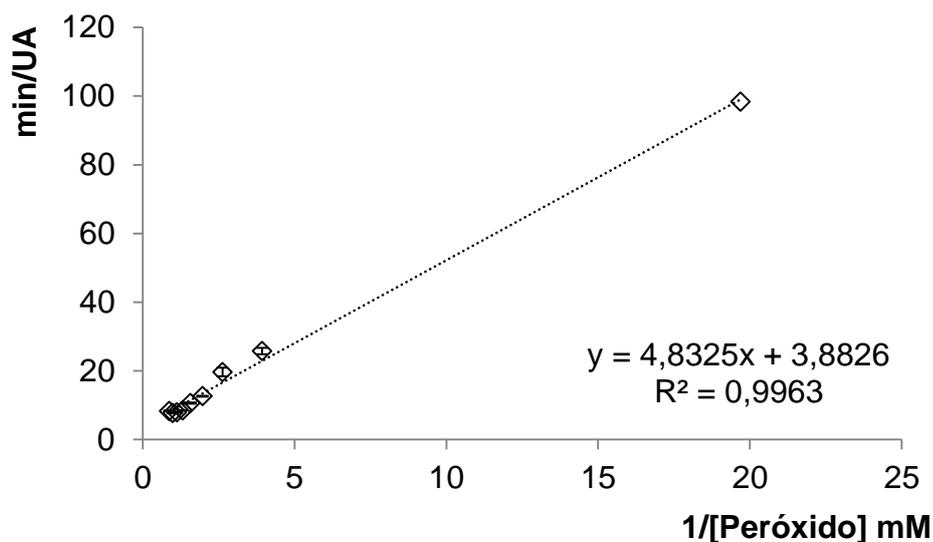


Figura 10 Linearização de Lineweaver-Burk obtida a partir da curva de Michaelis-Menten da atividade enzimática da POD da seiva para o substrato H_2O_2 .

- Evolução da atividade enzimática em função da concentração de enzima

A Figura 11 apresenta o comportamento da atividade da peroxidase em relação à concentração de enzima na mistura reacional. A curva apresentou um ótimo coeficiente de correlação ($R^2=0,9974$). Selecionou-se a concentração de 0,111% de enzima na mistura reacional. A seleção da concentração da enzima deve levar em consideração a faixa de precisão do espectrofotômetro (0,100 a 1,000 unidades de absorbância - UA). Portanto, a concentração escolhida encontra-se dentro do intervalo de confiança correspondendo à medida final de absorbância de 0,760.

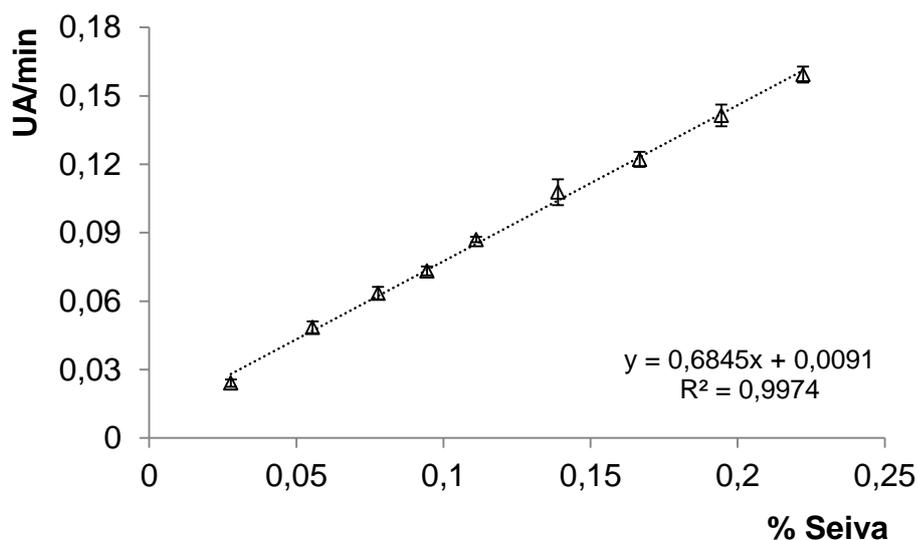


Figura 11 Evolução da atividade da peroxidase da seiva em função da concentração da enzima.

Finalmente, após a verificação das condições ótimas da enzima isoladamente, realizou-se ensaios para a determinação da melhor condição que permite a atividade máxima da enzima sem ultrapassar o limite de detecção confiável do espectrofotômetro (0,100 a 1,000 UA). Logo, determinou-se para o protocolo experimental as seguintes condições:

- 150 μ L de enzima diluída (3,33%) e filtrada;
- 125 μ L de solução de H_2O_2 a 15 mM;
- 75 μ L de solução *p*-pda a 2%
- 2650 μ L de tampão fosfato a 0,05 M e pH 5,5.

Realizou-se a cinética da atividade enzimática por leitura da mistura reacional em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ C$) em espectrofotômetro a cada 20 segundos durante um período de tempo de 6 minutos a um comprimento de onda de 515 nm contra um branco (mistura dos substratos com 2800 μ L de solução tampão). Todas as determinações realizadas na otimização da atividade da peroxidase da seiva foram efetuadas em triplicata.

5.3 COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PRESENTE NA SEIVA

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados médios obtidos nas determinações dos polifenóis totais, flavanóis totais, flavonóis totais e proantocianidinas e, da capacidade antioxidante da seiva.

Tabela 5 Determinações dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante da seiva

Parâmetro	Valor
Polifenóis totais (mg EAG / L seiva)	39,20 ± 0,68
Flavanóis totais (mg EC/ L seiva)	18,04 ± 0,28
Flavonóis totais	nd*
Proantocianidinas	nd*
Capacidade antioxidante ($\mu\text{moles ET/g}$ de seiva b.s.)	66,13 ± 1,27

*nd: Não detectado.

O teor de polifenóis totais encontrado para a seiva do dendezeiro foi de 39,20 mg EAG/L de seiva. Os flavanóis totais encontrados (18,04 mg EC/L seiva) que é uma classe de monômeros dos polifenóis correspondem a 46,02% dos polifenóis totais quantificados. Os flavonóis totais, os taninos condensáveis ou proantocianidinas não foram detectados na seiva.

A capacidade antioxidante da seiva de dendezeiro encontrada neste estudo foi próxima ao determinado por Gonçalves (2008) para o fruto bacuri (82 $\mu\text{Mol trolox/g}$ amostra seca). O mesmo autor verificou para outros frutos e polpa como a de umbu (42 $\mu\text{Mol trolox/g}$ amostra seca) e bacuri (119 $\mu\text{Mol trolox/g}$ amostra seca). A capacidade antioxidante pode variar em diferentes matrizes alimentares devido a diferenças na composição.

5.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO SOBRE A INATIVAÇÃO DA PEROXIDASE

A atividade da peroxidase da seiva sem aplicação da pasteurização resultou em 22,72 UA/min/mL e os valores da atividade para a seiva pasteurizada estão apresentados na Tabela 6. Observa-se que os ensaios 1 e 13, foram os que

apresentaram, respectivamente, a menor (10%) e maior redução (92%) da atividade da POD.

Tabela 6 Atividade da POD na seiva após a pasteurização

Ensaio	Variáveis independentes			Resposta
	T (°C)	t (min)	pH	POD (UA/min/mL)
1	70,0	5,0	4,00	20,398
2	70,0	5,0	6,00	20,226
3	70,0	10,0	4,00	19,849
4	70,0	10,0	6,00	18,673
5	90,0	5,0	4,00	2,891
6	90,0	5,0	6,00	13,152
7	90,0	10,0	4,00	3,659
8	90,0	10,0	6,00	14,852
9	63,2	7,5	5,00	18,492
10	96,8	7,5	5,00	9,075
11	80,0	3,3	5,00	17,475
12	80,0	11,7	5,00	13,399
13	80,0	7,5	3,32	1,713
14	80,0	7,5	6,68	13,686
15 (C)	80,0	7,5	5,00	13,133
16 (C)	80,0	7,5	5,00	17,179
17 (C)	80,0	7,5	5,00	14,782

A análise estatística aplicada aos dados experimentais da atividade da POD foi feita pelo erro puro e o resultado está apresentado na Tabela 7. Os efeitos lineares de Temperatura e pH, e a interação T x pH que estão destacados em negrito não foram significativos ao nível de confiança de 95%.

Tabela 7 Efeito estimado, erro puro, coeficiente (t) e significância estatística de cada fator para a atividade da peroxidase na seiva

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	t	Significância (p)
Média/Interações	14,8932	1,1720	12,7069	0,00613
Temperatura (L)	-8,8549	1,1014	-8,0393	0,01512
Temperatura (Q)	0,0429	1,2134	0,0353	0,97498
Tempo (L)	-0,9500	1,1014	-0,8625	0,47931
Tempo (Q)	1,2146	1,2134	1,0009	0,42227
pH (L)	5,8955	1,1014	5,3524	0,03317
pH (Q)	-4,2684	1,2134	-3,5176	0,07217
Temperatura x tempo	1,1428	1,4384	0,7945	0,51020
Temperatura x pH	5,7006	1,4384	3,9629	0,05817
Tempo x pH	-0,0182	1,4384	-0,0126	0,99102

O efeito estimado mostra o quanto cada fator influencia na resposta. O valor t indica a grandeza da variável em função do seu desvio. Logo, quanto maior o valor de t, maior a probabilidade da variável ser estatisticamente significativa. O valor do coeficiente p corresponde ao nível de significância da variável independente sobre a variável dependente (RIBEIRO, 2005). Neste escrito considera-se que para valores $p \leq 0,05$ a variável é estatisticamente significativa.

Nota-se na Tabela 7 um efeito negativo na temperatura (L) indicando que quando se passa de 63,2 a 98,7 °C a atividade da peroxidase diminui. Resultado esperado, pois o aumento de temperatura influencia a desnaturação de proteínas, perda da conformação original, logo a enzima por ser uma proteína perde a capacidade de realizar as suas funções.

O pH linear mostrou um efeito positivo, ou seja, quando passou de 3,32 para 6,68 favoreceu o aumento da atividade da peroxidase. O aumento do valor de pH favorece a atividade da enzima por aproximar-se do seu pH ótimo. Sugere-se ainda, que valores muito baixos de pH promove a desestabilização da enzima que perde sua função, e conseqüentemente, a diminuição da atividade.

Observa-se, ainda, na Tabela 7 que as variáveis estatisticamente significativas, temperatura (L), pH (L) e a interação Temperatura x pH apresentaram valores de coeficiente $p \leq 0,05$.

Considerando somente os efeitos significativos para a atividade da POD realizou-se a eliminação dos parâmetros com efeitos não significativos, seguida pela análise de variância (ANOVA) com o intuito de avaliar a significância da regressão e da falta de ajuste a um intervalo de confiança de 95% (Tabela 8).

Tabela 8 Análise de variância do modelo ajustado para a atividade da POD

<i>Fonte de variação</i>	SQ	GL	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado} (p≤0,05)	F_c/F_t	R²
Regressão	518,346	4	129,586	23,24	3,26	7,129	0,88
Resíduo	66,910	12	5,575				
Falta de ajuste	58,633	10	5,863	1,416	19,4	0,073	
Erro puro	8,277	2	4,138				
Total	585,256	16					

SQ: soma quadrática, GL: grau de liberdade, MQ: média quadrática.

Conforme Barros Neto et al. (2001) uma regressão apesar de ser significativa do ponto de vista do teste F, pode não ser preditiva por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. Box e Wetz (1973) sugerem que para uma regressão ser significativamente estatística e válida para fins preditivos, o valor de F calculado para a regressão deve ser de quatro a cinco vezes maior que o F tabelado. Com base no valor do coeficiente de regressão gera-se um modelo codificado proposto para representar a atividade residual da peroxidase na seiva descrito na Equação 13.

$$\text{POD} \left(\frac{\text{UA}}{\text{min.}} \right) = 14,89 - 4,42T + 2,94\text{pH} + 2,85T.\text{pH} \quad \text{Eq.13}$$

Onde: T é a temperatura (°C) e pH o potencial hidrogeniônico.

Analisando a relação $F_{\text{calculado}}$ sobre F_{tabelado} (F_c/F_t) verifica-se que esta apresentou um valor igual a 7,12, logo de acordo com Box e Wetz (1973) o modelo descrito na Equação 13 é significativo a um nível de confiança de 95%. Nota-se também que a falta de ajuste na Tabela 8 por ser não significativa este modelo

também pode ser utilizado para fins preditivos. O coeficiente de correlação (R^2) encontrado neste estudo foi de 0,88, ou seja, o modelo codificado proposto que representa a atividade enzimática residual do POD na seiva consegue explicar mais de 88% dos dados observados.

A Figura 12 apresenta a superfície de resposta e curva de nível relacionando os fatores pH e temperatura, em um intervalo de tempo de 7,5 minutos. Nota-se que os menores valores de atividade da enzima ocorrem na faixa de temperatura próxima a 82°C até 96,8°C quando o pH se encontra compreendido entre 3,32 a 4,0. A superfície de resposta demonstra, ainda a alta resistência à inativação da enzima quando o pH se encontra na faixa próxima do pH ótimo da POD entre 5,0 a 6,68 esta ainda é elevada mesmo na faixa de temperatura estudada.

A Figura 13 mostra a superfície de resposta e curva de nível para a atividade da POD relacionando-se o tempo e temperatura para um valor de pH igual a 5,0. Observa-se que pelo fato do pH estar próximo ao valor ótimo para a atividade da POD na seiva, verifica-se que a redução desta se torna mais evidente na faixa de temperatura entre 80 a 96,8°C independente do intervalo de tempo avaliado. Logo, neste valor de pH a temperatura apresenta maior influência na redução da atividade.

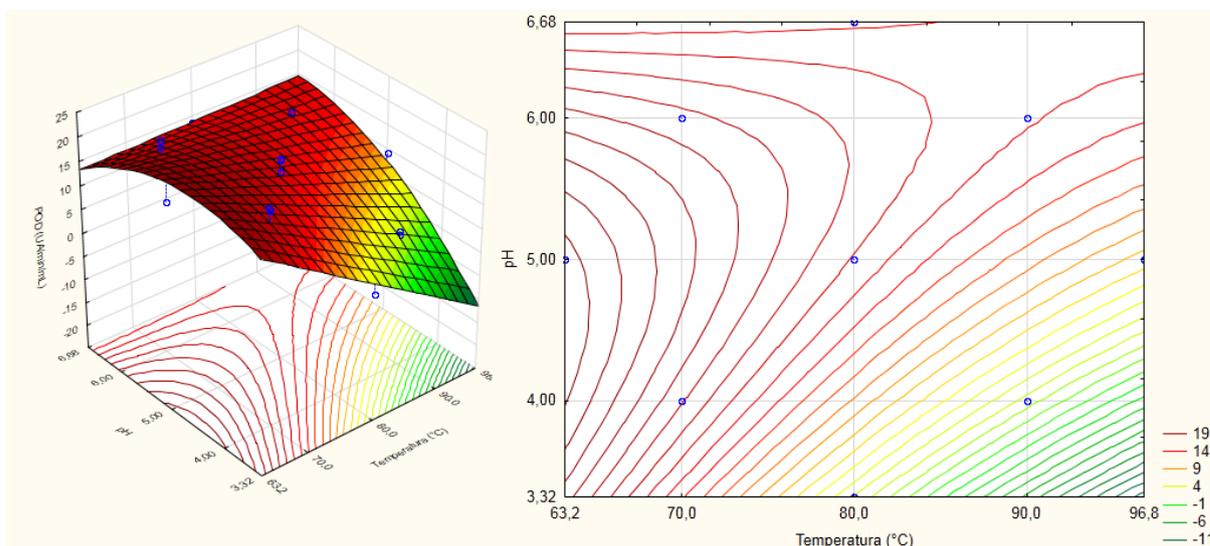


Figura 12 Superfície de resposta e curva de nível para a atividade da POD relacionando a temperatura e pH para um intervalo de tempo de 7,5 minutos.

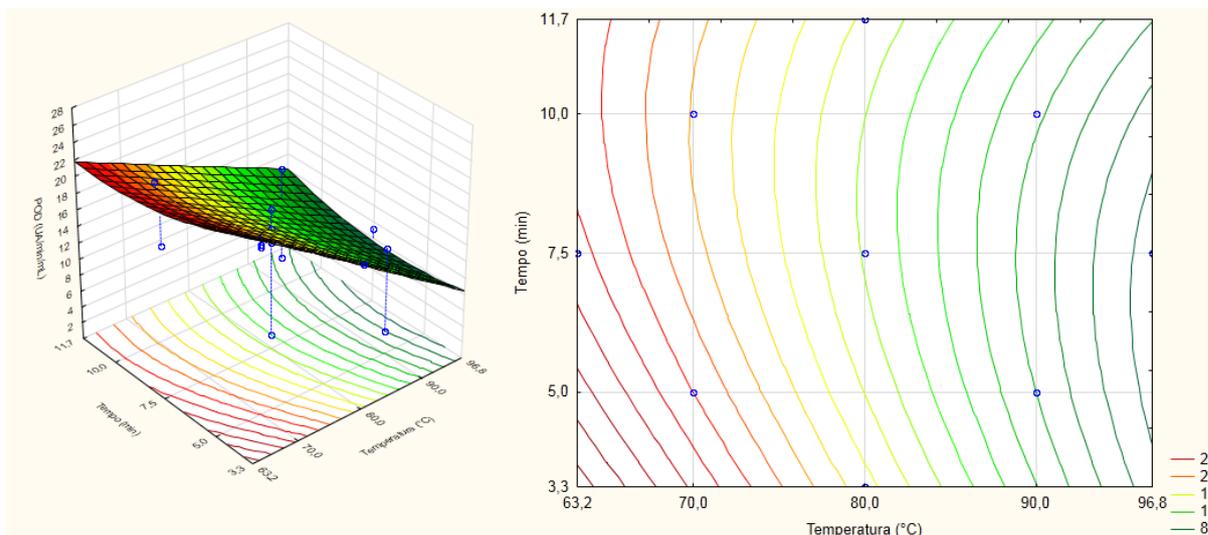


Figura 13 Superfície de resposta e curva de nível para a atividade da POD relacionando tempo e temperatura para pH igual a 5,0.

A Figura 14 mostra a superfície de resposta e curva de nível dos fatores pH e tempo, na temperatura de 80°C. Novamente, se observa que a faixa de tempo estudado não influenciou na diminuição da atividade da enzima, neste caso, o pH é o fator responsável pela diminuição desta atividade evidenciada na faixa compreendida entre 3,32 a 4,0 nesta temperatura.

Valores extremos de pH, normalmente, desnaturam as proteínas, provocando a inativação das enzimas. A perda da capacidade de peroxidases com a acidificação do meio de reação pode ser atribuída a alteração na conformação original desta, que pode ser reversível, pelo desligamento do grupo heme, ou irreversível que pode ser atingida na condição de pH 2,4 e 25 °C. Ressalta ainda, que mudanças na interação entre o grupamento heme e a proteína podem promover desde perda de estabilidade até mudança de conformação de um estado desnaturado reversível para o irreversível, sendo uma função do pH e temperatura (KAMIKURA, 2006).

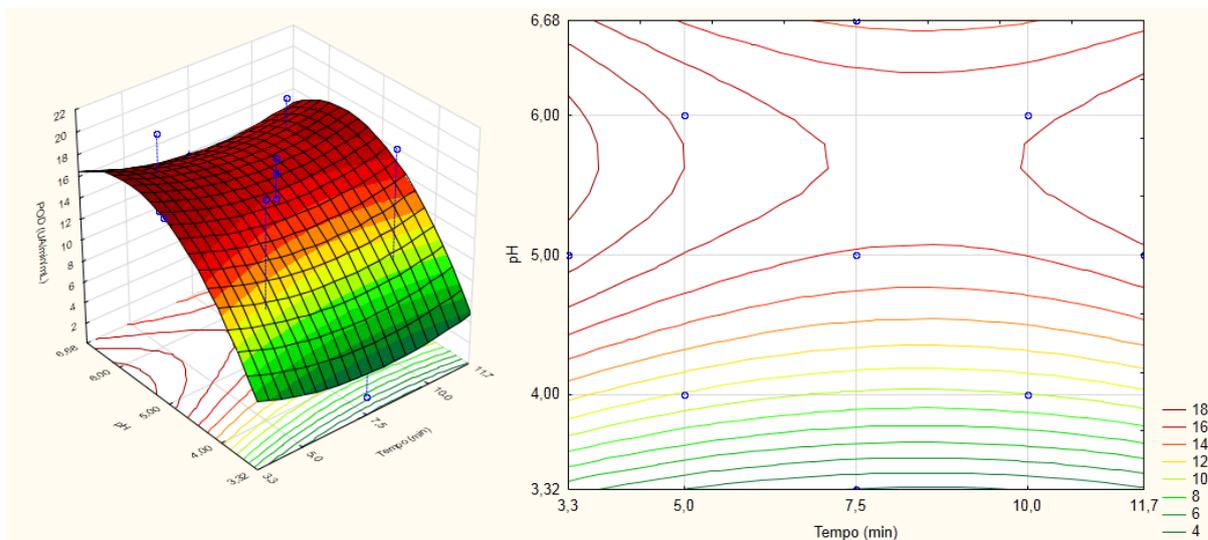


Figura 14 Superfície de resposta e curva de nível para a atividade da POD relacionando pH e tempo em temperatura de 80°C.

Realizou-se após a seleção da melhor condição de tratamento térmico, que ocorreu no ensaio 13 (80°C, 7,5 minutos e pH 3,32) a repetição da pasteurização na mesma condição, em quintuplicada para avaliar se esta é reprodutiva. Neste caso, o valor foi reprodutivo e igual a $2,03 \pm 0,26$ UA/min/mL que corresponde à atividade residual de 8,16%, ou seja, redução de um ciclo logarítmico (> 90%).

5.5 MODELAGEM DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DA PEROXIDASE NA SEIVA

A Tabela 9 mostra os binômios utilizados no tratamento térmico de pasteurização da seiva com respectivos valores de atividade residual da peroxidase após cada ensaio. Os binômios foram selecionados tomando-se por base os ensaios preliminares e os ensaios realizados no planejamento experimental de inativação da POD (Item 5.4). A obtenção das cinéticas de inativação da enzima foi construída a partir da relação da atividade residual (A) pela atividade inicial (A_0) da seiva em função do tempo de processamento.

Diante dos resultados demonstrados na Tabela 9, verifica-se que na temperatura de 70°C a atividade residual da peroxidase na seiva ainda é bastante intensa permanecendo acima de 89% nos binômios estudados. Com a elevação da temperatura observa-se uma maior redução da atividade da peroxidase variando de 68% a 47% nos binômios realizados a 80°C. No binômio 90°C e 3 minutos verifica-se

o maior percentual de redução, atingindo 13% de atividade residual da enzima (redução de 87%).

Tabela 9 Atividade enzimática da POD da seiva em função do tempo e temperatura de pasteurização

T = 70 °C		T = 80 °C		T = 90 °C	
t (minutos)	Atividade (UA/min.)	t (minutos)	Atividade (UA/min.)	t (minutos)	Atividade (UA/min.)
0,0	0,112	0,0	0,112	0,0	0,112
2,5	0,108	1,7	0,077	0,5	0,031
5,0	0,109	3,3	0,063	1,0	0,019
10,0	0,105	5,0	0,057	3,0	0,015
15,0	0,100	7,5	0,053	5,0	0,019

Os resultados acima demonstram a grande resistência da peroxidase na seiva, necessitando do emprego de altas temperaturas, em meio ácido (4,0) para alcançar gradientes maiores de inativação desta enzima. Ressalta-se que nenhum ensaio promoveu a redução de 90% (um ciclo logarítmico) na atividade da enzima com os binômios empregados na pasteurização (Tabela 9).

Os modelos empíricos testados para a inativação enzimática da POD na seiva foram Primeira ordem linear, Duas Frações, Isoenzimas distintas, Conversão Fracionária e Multicomponente, não lineares. Os modelos que melhor se ajustaram aos dados experimentais foram os que apresentaram coeficiente de determinação acima de 0,91, valores de X^2 e Erro padrão menores que 0,053 e 0,023, respectivamente, além dos modelos que não apresentaram parâmetros cinéticos estimados negativos.

A Tabela 10 apresenta os coeficientes de determinação de todos os modelos testados nota-se que os modelos, Primeira-ordem e Isoenzimas distintas foram os que melhor se ajustaram aos dados experimentais, pois apresentaram valores de R^2 próximo à unidade, além de baixos valores para X^2 e Erro padrão, nas três temperaturas estudadas.

Tabela 10 Coeficiente de determinação, valores de X^2 e Erro padrão dos ajustes dos modelos aos dados experimentais

Modelo	R ²	X ²	Erro padrão	Observações
	[70; 80; 90°C]	[70; 80; 90 °C]	[70; 80; 90°C]	
Primeira-Ordem	[0,964; 0,915; 0,949]	[1,16E-04; 7,42E-03; 1,13E-02]	[2,07E-04; 1,32E-02; 2,23E-02]	Aceito
Duas Frações	[0,964; 0,999; 0,949]	[2,27E-04; 2,93E-06; 2,64E-02]	[2,03E-04; 2,62E-06; 2,23E-02]	Rejeitado; Parâmetro estimado negativo
Isoenzimas Distintas	[0,966; 0,935; 0,949]	[4,40E-04; 2,28E-02; 5,27E-02]	[1,96E-04; 1,02E-02; 2,35E-02]	Aceito
Multicomponente 1ª Ordem	[0,964; 0,999; 0,949]	[2,32E-04; 2,93E-06; 2,64E-02]	[2,07E-04; 2,62E-06; 2,36E-02]	Rejeitado; Parâmetro estimado negativo
Conversão Fracionária	[0,967; 0,999; 0,999]	[2,12E-04; 9,29E-06; 3,19E-04]	[1,89E-04; 8,39E-06; 2,85E-04]	Rejeitado; Parâmetro estimado negativo

Os modelos Duas frações, Multicomponente 1ª ordem e Conversão fracionária apesar de mostrarem bons ajustes aos dados experimentais, apresentando em algumas cinéticas até coeficientes muito próximos à unidade ($R^2 = 0,999$) foram rejeitados pelo critério físico, ou seja, apresentou pelo menos um parâmetro cinético negativo em pelo menos uma das cinéticas de inativação da POD testadas naquele modelo. Shalini et al.; (2008) e San't Anna et al., (2010) afirmam que valores negativos de parâmetros cinéticos estimados a uma dada temperatura é um critério físico para rejeição de modelos.

O comportamento das curvas observadas após o ajuste aos dados experimentais sugere que na seiva existem pelo menos duas frações de enzima

peroxidase (isoenzimas) com resistências térmicas distintas, sendo uma fração considerada termolábil e outra fração termorresistente. Tribess (2003) observou comportamento semelhante quando trabalhou com a inativação da enzima pectinesterase em sucos de laranja sugerindo pelo menos duas formas de enzimas presentes no suco.

Soysal e Söylemez (2005) avaliando a atividade residual da peroxidase em cenouras após tratamento térmico observaram na curva de 75°C a presença de duas isoformas de peroxidase uma fração termolábil e uma fração termoestável ajustando os dados experimentais a um modelo bifásico de primeira ordem.

As Figuras 15 e 16 apresentam as curvas da cinética de inativação da POD na seiva, onde os dados experimentais foram ajustados ao modelo Primeira-ordem e Isoenzimas distintas, respectivamente.

Na Figura 15, se observa a distribuição dos pontos experimentais ao longo do modelo Primeira-ordem testado em cada cinética. Verifica-se que com o aumento de temperatura as cinéticas tendem a perder a característica linear deste modelo (80°C e 90°C), comportamento mostrado pela rápida inativação nos primeiros minutos, tornando o gradiente de inativação mais lento com o passar do tempo. Sugere-se então que nos primeiros minutos de tratamento térmico ocorre a inativação da fração termolábil da POD, claramente observado na cinética de 90°C, e após este tempo a inativação da fração termorresistente da enzima. Nota-se através da correlação dos valores preditos pelos observados que o modelo selecionado confirma o bom ajuste aos dados experimentais.

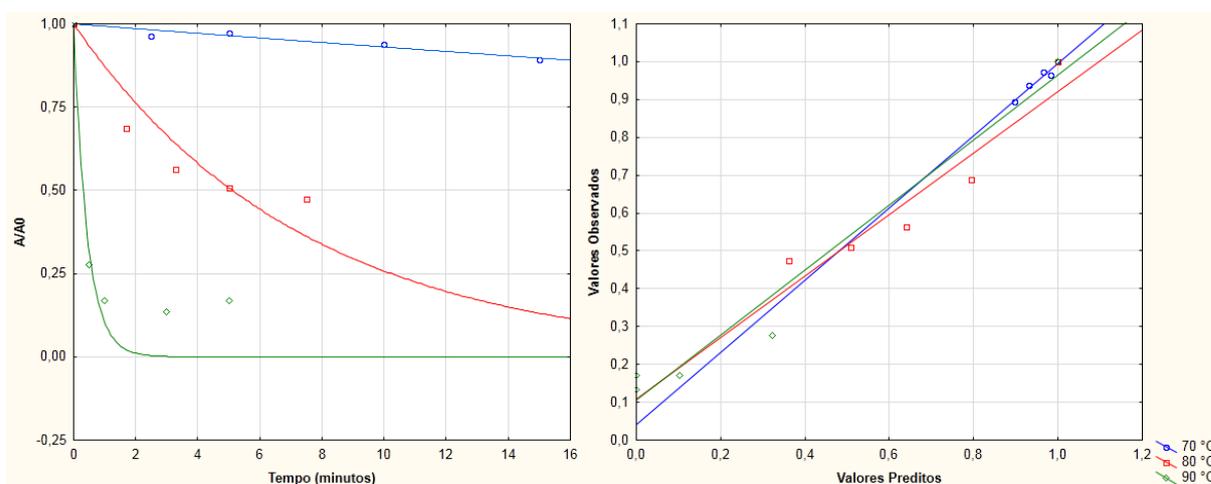


Figura 15 Cinética de inativação da POD da seiva, ajuste do modelo Primeira-ordem e a correlação entre os valores experimentais e preditos.

Murasaki (2005) observou que as isotermas de inativação térmica da peroxidase e polifenoloxidase presentes na água de coco verde apresentam um desvio de cinética de primeira ordem em temperaturas acima de 80°C, sugerindo a presença de isoenzimas, com frações termorresistentes e termolábeis. Afirma, ainda, que quanto maior for a estabilidade dessas isoenzimas em relação à temperatura, menos linear se configura a curva de inativação térmica. Comportamento semelhante verificado neste escrito.

A Figura 16 apresenta o comportamento cinético de inativação da POD nas temperaturas estudadas, onde se verifica o ajuste do modelo Isoenzimas distintas. Nota-se que a distribuição dos pontos ao longo do modelo em cada temperatura é muito similar ao modelo primeira-ordem, verificado pela linearidade da cinética a 70°C que pode estar relacionada com a baixa redução da atividade nesta temperatura, ocasionada pela inativação da fração termolábil. As cinéticas a 80°C e 90°C apresentam uma queda mais acentuada na inativação da enzima na temperatura de 90°C.

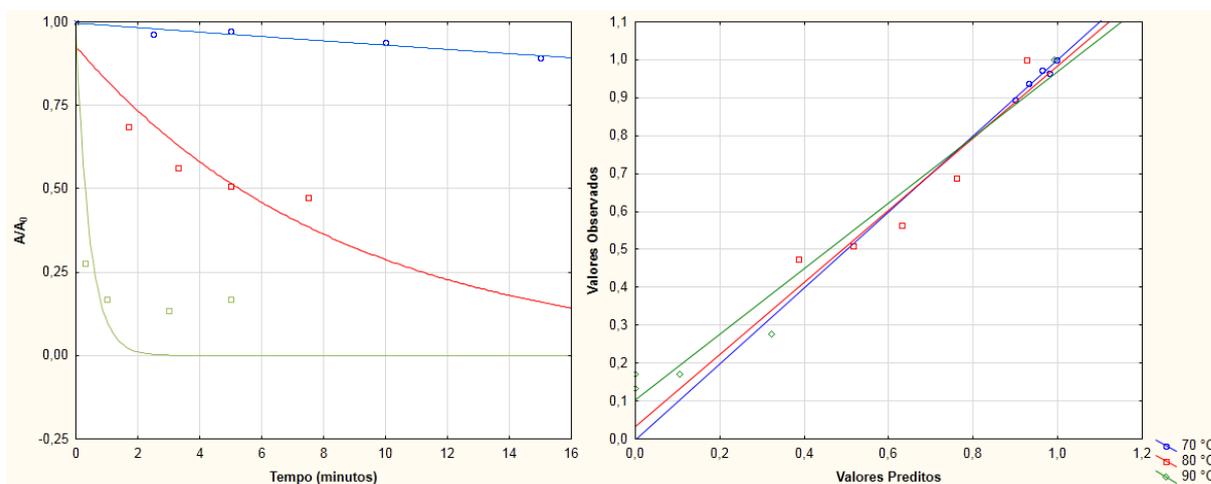


Figura 16 Cinética de inativação da POD da seiva, ajuste do modelo Isoenzimas distintas e a correlação entre os valores experimentais e preditos.

A correlação dos valores observados pelos preditos ratifica o bom ajuste do modelo Isoenzimas distintas aos dados experimentais, assim como os coeficientes de correlação R^2 , X^2 e Erro padrão que foram muito próximos nos dois modelos testados.

6 CONCLUSÕES

A caracterização físico-química da seiva apresentou boa quantidade de açúcar total, aproximadamente 40 g/L, e açúcar redutor 5,5 g/L. A avaliação microbiológica de bolores e leveduras mostrou resultado satisfatório na seiva bruta.

A presença de polifenoloxidase, taninos condensáveis e flavonóis não foram detectados na seiva. Verificou-se a presença de polifenóis totais, sendo 46% desse total em flavanóis. Esta apresentou, ainda, capacidade antioxidante.

Estabeleceu-se um protocolo experimental para a quantificação da peroxidase na seiva. A linearização de Lineweaver-Burck a partir das curvas de Michaelis-Menten para os substratos *p*-pda e H₂O₂ permitiu obter os valores de k_m e V_{max} da peroxidase da seiva.

A melhor condição de tratamento térmico se obteve a 80°C, 7,5 minutos e pH 3,32, onde conseguiu a redução de um ciclo logarítmico na atividade residual da peroxidase da seiva.

O modelo que descreve a inativação da POD, gerado a partir das superfícies de resposta e curvas de nível mostram que este é significativo a 95% de confiança, além da falta de ajuste ser não significativa, logo pode ser utilizado para fins preditivos, $F_{calculado}$ é sete vezes maior que o $F_{tabelado}$.

A cinética de inativação da peroxidase na seiva mostra a partir do ajuste dos modelos aos dados experimentais que os modelos Primeira-ordem e Isoenzimas distintas foram os que melhor descrevem o comportamento de inativação da peroxidase na seiva, pois apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,90 e valores de X^2 e Erro padrão menores que 0,052 e 0,023, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-ESTRADA, B. A. et al. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p.46-55, 2014.

ANDRADE, S. R. R.; PORTO, E.; SPOTO, M. H. F. Avaliação da qualidade do caldo extraído de toletes de cana-de-açúcar minimamente processada, armazenados sob diferentes temperaturas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. n.28 supl. p.51-55, 2008.

AOAC. Association of official analytical chemists. **Official methods of analysis**. 16. ed., 3.rev., Washington, 1997. 1141p.

AUGUSTO, P. E. D. **Modelamento matemático da transferência de calor durante o tratamento térmico de alimentos líquidos embalados**. 2009. 253 p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática de óleo de palma**. 2009. 92 p. Dissertação (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

BARROS, E. C. M., et al. Efeitos da pasteurização sobre características físico-químicas, microbiológicas e teor de antocianinas da polpa de juçará (*Euterpe edulis Martius*). **Revista Teccen**, v. 6, n. 1, p. 01-32, 2015.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora UNICAMP, 2001. 401 p.

BASTOS, C. T. R. M., et al. Estudo da eficiência da pasteurização da polpa de taperebá (*Spondias mombin*). **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 123-131, 2008.

BAZINET, L. et al. Partial demineralization of maple sap by electro dialysis: impact on syrup sensory and physicochemical characteristics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.87, p.1691-1698, 2007.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function**. University of Wisconsin. Technical Report, n.9, 1973.

CARDOSO, C. F. **Avaliação da esterilização de filme de polietileno com peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta**. 2007. 127 p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CARDOSO, M. H. W. M., et al. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da estabilidade. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 30, n. 2, p. 439-446, 2010.

COUNET, C., et al. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6243-6249, 2004.

CHANG, C. C., et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.10, p.178-182, 2002.

CHEN, C. S.; WU, M. C. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. **Journal of Food Science**, v.63, n.5, p.747-750, 1998.

CHIN, K. L. H'NG, P. S.; WONG, L. J.; PARIDAH, M. T. Production of glucose from oil palm trunk and sawdust of rubberwood and mixed hardwood. **Applied Energy**, v. 88, p. 4222-4228, 2011.

CHOOKLIN, S.; KAEWSICHAN, L.; KAEWSRICHAN. Potential utilization of sap from oil palm (*Elaeis guineensis*) for lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Journal of sustainable energy & environment**, v. 2, p.99-104, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DELCOUR, J. A.; VAREBEKE, D.; JANSSENS, D. E. A new colourimetric assay for flavanoids in pilsner beers. **Journal of Institute of Brewing**, v.91, p.37-40, 1985.

D'EL-REI, J.; MEDEIROS, F. Chocolate e os benefícios cardiovasculares. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UFRJ**. Ano 10, jul.-set. 2011.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, 1956.

EZE, M. O.; OGAN, A. U. Sugar of the unfermented SAP and the wine from the oil palm, *Elaeis guineensis*, tree. **Plant Foods for Human nutrition**, v.38, n.2, p.121-126, 1988.

FAVARO, F. T. **Desenvolvimento sustentável na Amazônia: uma nova abordagem do dendê como aproveitamento da biomassa residual para a geração de energia**. 2011, 159 p. Dissertação (Mestrado em Energia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia de processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

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

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos Alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 607 p.

FORTEA, M. I., et al. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). **Food Chemistry**, v.113, p.1008-1014. 2009.

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

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

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. 2008. 88 p. Dissertação (Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GRIZZOTO, R. K. et al. Otimização via metodologia de superfície de respostas dos parâmetros tecnológicos para a produção de frutas estruturada e desidratada a partir de polpa concentrada de mamão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.25, n.1, p.158-164, jan.-mar. 2005.

HUANG, D., et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.16, p.4437–4444. 2002.

IKEGWU T. M; OKAFOR G. I; OCHIUGU I. S. Effect of Preservation Methods of Oil Palm Sap (*Elaeis guineensis*) on the Reproductive Indices of Male Wistar Rats. **Journal of Medicinal Food**, v.17, n.12, p.1368-1374, 2014.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, p.213-217, 1985.

KAMIKURA, G. K. F. **Isolamento, purificação e caracterização da peroxidase de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**. 2006. 114 p. Dissertação (Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

KLEIN, M. P. **Hidrólise da lactose e síntese de galactooligossacarídeos utilizando β -galactosidase imobilizada em suporte à base de quitosana**. 2014. 186 p. Tese (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

KOSUGI, A., et al. Ethanol and lactic acid production using sap squeezed from old oil palm trunks felled for replanting. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 322-325, 2010.

LAGACÉ, L., et al. Biochemical composition of maple sap and relationships among constituents. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.41, p.129-136, 2015.

LI, H., et al. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. **Food Chemistry**, v.130, n.4, p.928-936, 2012.

LUCK, H. Peroxidase. In BERGMAYER, H. U. **Methods in Enzyme Analysis**. Germany: Verlag-Chemie, Weinheim/Bergstrasse, 1965.

LUDI KHUYZE, L.; OOMS, V.; WEEMAES, C.; HENDRICKX, M. Kinetic study the irreversible thermal and a pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. Cv. italica). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.5, p.1794-1800, 1999.

LUÍZ, R. C.; HIRATA, T. A. M. CLEMENTE, E. Cinética de inativação da polifenoloxidase e peroxidase de abacate (*Persea americana* MILL.). **Ciência agrotécnica**, v. 31, n.6, p.1766-1773, 2007.

MCMURROUGH, I; BAERT, T. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. **Journal of the Institute Brewing**. v.100, p.409-416, 1994.

MONAGO-MARAÑA, O. et al. Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. **Food Chemistry**. v.196, p.1058-1065, 2016.

MOURA, C. L. A. Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos. **Documentos 108. ISSN 1677-1915**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 17 p.

MURASAKI, N. C. **Cinética de inativação térmica da peroxidase e polifenoloxidase presentes na água de coco verde por processo térmico contínuo**. 2005. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MURATA, Y. et al. Development of sap compressing systems from oil palm trunk. **Biomass and bioenergy**, v. 51, p. 8-16, 2013.

NABECHIMA, G. H. “**Inativação térmica das enzimas polifenoloxidase e peroxidase em forno esteira e efeitos sobre a cor da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**”. 2010. 179 p. Dissertação (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

NOPARAT, P. PRASERTSAN, P. O-THONG, S. Potential for using enriched cultures and thermotolerant bacterial isolates for production of biohydrogen from oil palm sap and microbial community analysis. **International journal of hydrogen energy**, v. 37, n.21, p.16412-16420, 2012.

NORHAZIMAH, A. H.; FAIZAL, C. K. M. Bioconversion of oil palm trunks sap to bioethanol by different strains and co-cultures at different temperatures. **Journal of medical and bioengineering**, v. 3, n. 4, 2014.

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

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4619–4626, 2001.

PENA, T. C. V.; MACHOSHVILI, I. A. Esterilização térmica. Conceitos básicos da cinética de morte microbiana. **Revista farmácia bioquímica**. (supl. 1): 1-5, 1997.

PRAWITWONG, P., et al. Efficient ethanol production from separated parenchyma and vascular bundle of oil palm trunk. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 37-42, 2012.

RAMALHO FILHO, A., et al. A. **Zoneamento agroecológico, produção e manejo da cultura de palma de óleo na Amazônia**. Rio de Janeiro: Embrapa solos, 2010. 216 p.

RIBEIRO, S. C. A. **Estudo do processo de desidratação osmótica e secagem de filés de mapará (*Hypophthalmus edentatus*)**. 2005. 288 p. Tese (Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

RIZVI, A. F.; TONG, C. H. A critical review – Fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. **Journal of Food Science**, v.62, n.1, p.1-7, 1997.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.33, n.4, p.1215-1221, 2011.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, composição e melhoramento da conservação, Belém-PA, Brasil**. Belém: Editora Universidade Federal do Pará, 2000. 315 p.

ROJA JUNIOR, N. P. **Avaliação de embalagens flexíveis esterilizáveis e alimentos de pronto consumo para equipagens de aeronaves e para uso terrestre**. 2008, 117 p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

SAN'T ANNA, V., et al. Kinetic modeling of the thermal inactivation of bacteriocin-like inhibitory substance P34. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.58, n.5, p.3147-3152, 2010.

SANTOS, I. R. C. **Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)**. 2009, 120 p. Dissertação (Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. São Paulo, 2009.

SCOTTI, L., et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso de cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, n.2, p.153-166, 2007.

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

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate**. 2002. 87 p. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2002.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**. v.101, p.1012-1018, 2007.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, P. P. M. **Conservação de polpa de juçara (*Euterpe edulis*) submetida à radiação gama, pasteurização, liofilização e atomização**. 2013, 259 p. Tese (Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

SOYSAL, C.; SÖYLEMEZ, Z. A. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. **Journal of Food Engineering**, v.68, n.3, p.349-356, 2005.

SULAIMAN, O., et al. The potential of oil palm trunk biomass as an alternative source for compressed Wood. “Compressed oil palm trunk”. **BioResources**. n.7, v.2, p.2688-2706, 2012.

TEIXEIRA, C. K. B.; NEVES, E. C. A.; PENA, R. S. Estudo da pasteurização da polpa de graviola. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara. v. 17, n. 3, p.251-257, 2006.

TRIBESS, T. B. **Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado**. 2003. 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

UMERIE, S. C. Caramel production from saps of American oil palm (*Elaeis guineensis*) and wine palm (*Raphia hookeri*) trees. **Bioresource Technology**. v.75, n.2, p.167-169, 2000.

WANG, Y.; CHEN, S.; YU, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v.91, n.4, p.949-956, 2011.

YAMADA, H. et al. Old oil palm trunk: A promising source of sugars for bioethanol production. **Biomass and bioenergy**, v. 34, n.11, p. 1608-1613, 2010.

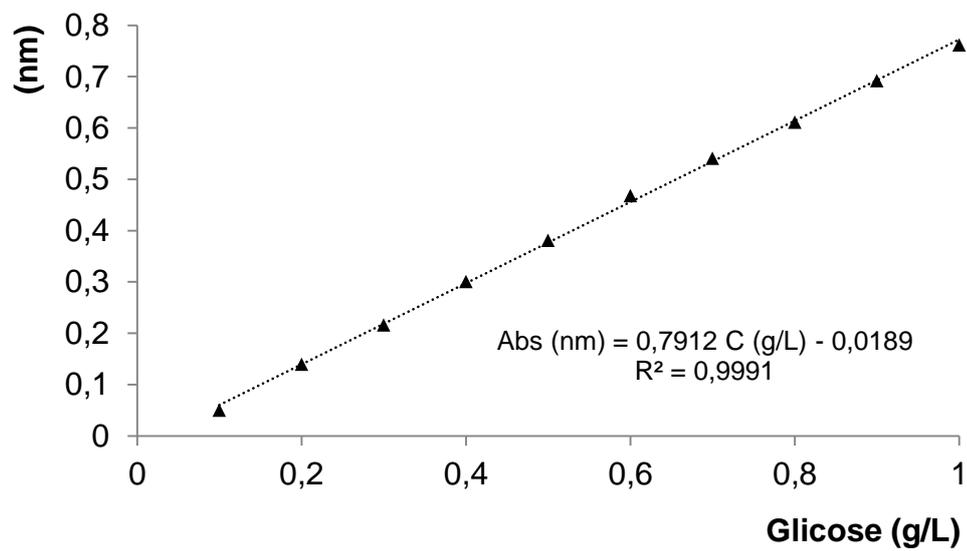
YUKATA, M. Old oil palm trunk as promising feedstock for biofuel and bioplastics (2007). Disponível em: < [http://www.unep.or.jp/ietc/SPC/news-mar10/0304_1130_OldOilPalmTrunksAsPromisingFeedstockForBiofuel&Bioplastics\(JIRCAS\).pdf](http://www.unep.or.jp/ietc/SPC/news-mar10/0304_1130_OldOilPalmTrunksAsPromisingFeedstockForBiofuel&Bioplastics(JIRCAS).pdf) >. Acesso em: 12/08/2015.

ZAHARI, M. A. K. M., et al. Renewable sugars from oil palm frond juice as an alternative novel fermentation feedstock for value-added products. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 566-571, 2012.

ZHANG, X.; SHAO, X. Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in browning of loquat fruit. **Czech Journal of Food Sciences**, v.33, n.2, p.109-117, 2015.

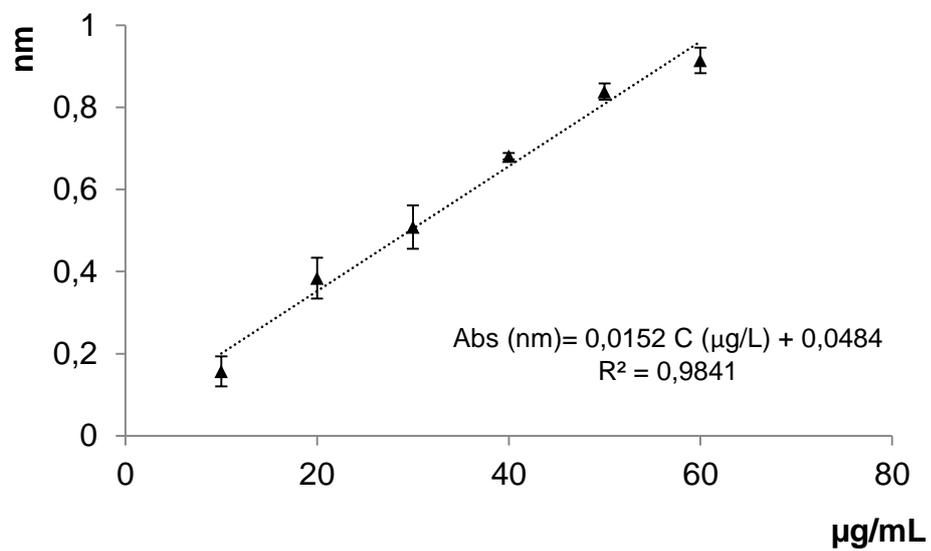
APÊNDICES

APÊNDICE A CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCAR REDUTOR



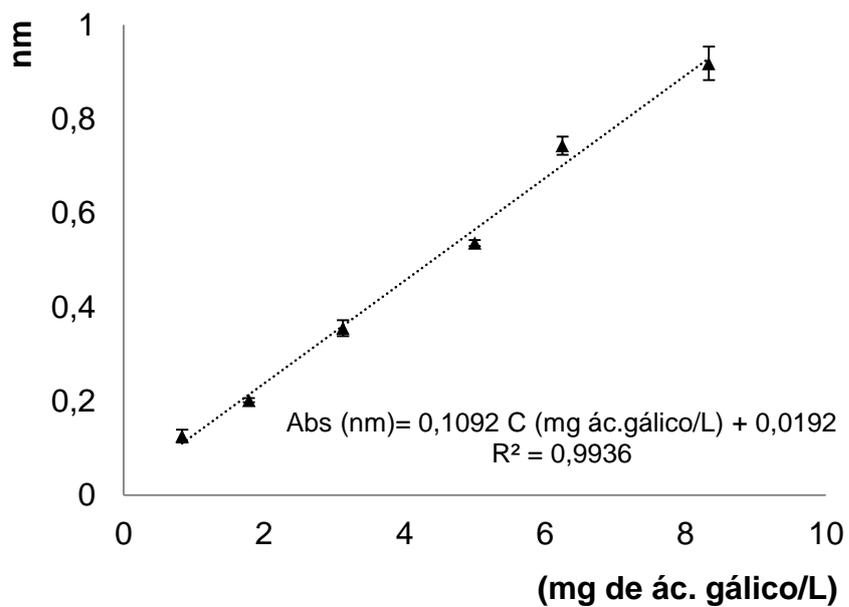
Fonte: Do autor (2016).

APÊNDICE B CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE GLICOSE PARA AÇÚCAR TOTAL



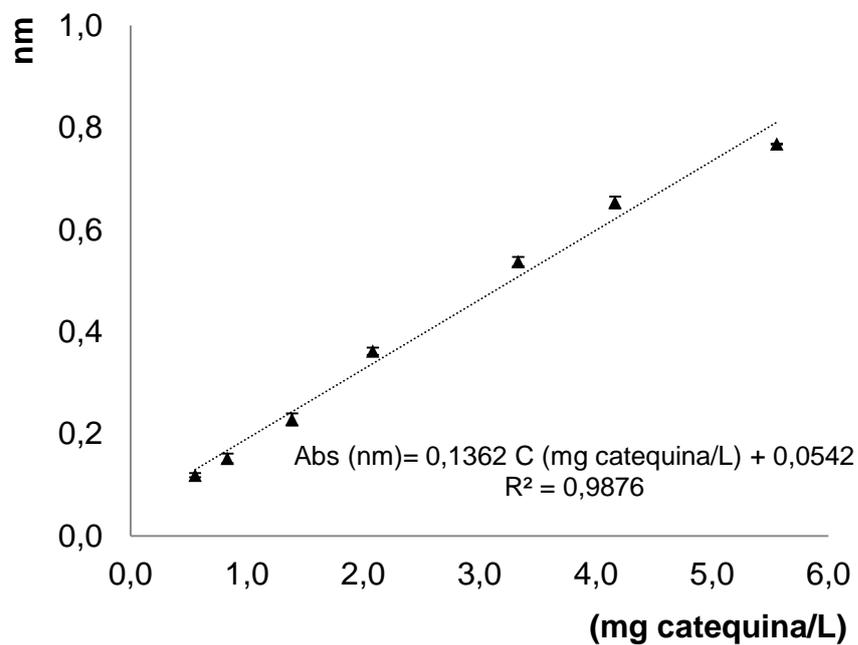
Fonte: Do autor (2016).

ANEXOS

ANEXO A CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA
POLIFENÓIS TOTAIS

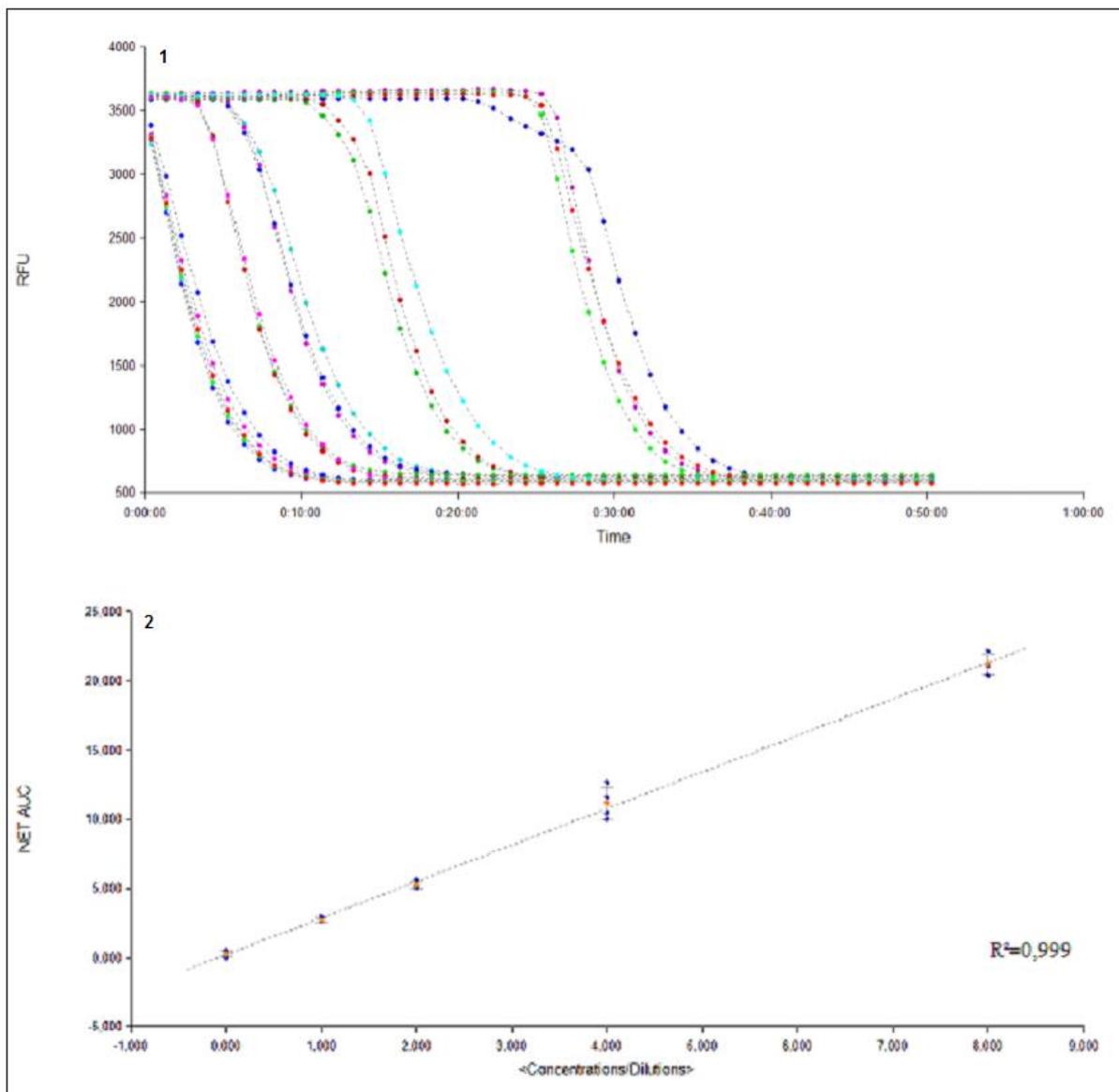
Fonte: Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA) – UFPA (2016).

ANEXO B CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE CATEQUINA PARA FLAVONOIDES TOTAIS



Fonte: CVACBA-UFPA (2016).

ANEXO C 1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TROLOX *VERSUS* A CURVA DE DECAIMENTO DA FLUORESCÊNCIA 2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO EM TROLOX PARA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE



Fonte: CVACBA-UFPA (2016).