



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA



# Influência do Aquecimento Ôhmico na Cinética de Inativação da Peroxidase no Suco de Mirtilo

*Autor: Ana Cláudia Dietz*

*Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lígia Damasceno Ferreira Marczak*

*M.Sc. Júlia Ribeiro Sarkis*

*M. Sc. Voltaire Sant'Anna*

Porto Alegre, dezembro de 11

## Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Símbolos	vii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Mirtilo	3
2.2 Aquecimento Ôhmico	5
2.3 Peroxidase	9
2.4 Modelos Cinéticos	11
3 Materiais e Métodos	14
3.1 Caracterização do Suco de Mirtilo	14
3.2 Determinação da Cinética de Inativação Enzimática	17
3.2.1 Elaboração do Suco	17
3.2.2 Aquecimento Ôhmico e Coleta de Amostras	17
3.2.2.1 Sistema de Aquecimento Ôhmico	17
3.2.2.2 Aquecimento Ôhmico do Suco de Mirtilo e Coleta das Amostras	19
3.2.3 Análise de Atividade Enzimática	20
4 Resultados	21
4.1 Caracterização do Suco de Mirtilo	21
4.2 Cinética de inativação da Peroxidase	22
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	32
6 Referências	34

---

## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores, Júlia, Lígia e Voltaire por terem me ajudado e apoiado ao longo da elaboração deste trabalho.

Aos meus pais, Liane e Cláudio, pelo amor e apoio incondicional em qualquer momento da minha vida.

Às amigas feitas ao longo destes cinco anos de graduação, que toraram meu dias mais felizes.

Ao meu namorado, Marcelo, pelo companheirismo nas tardes de sábado e domingo escrevendo TCC.

## Resumo

O consumo do mirtilo vem se intensificando nos últimos tempos, principalmente por ser rico em antocianinas, compostos fenólicos de alto poder antioxidante, que podem ser capazes de atuar na prevenção de inúmeras doenças. O aquecimento ôhmico é uma forma menos agressiva de tratamento térmico, em relação ao processamento convencional, pois proporciona um aquecimento rápido e uniforme do alimento, potencialmente preservando propriedades nutricionais e sensoriais desejáveis no produto final. O aquecimento ôhmico se baseia na passagem de corrente alternada através do alimento, que atua como uma espécie de resistência, transformando energia elétrica em térmica. Dentre as enzimas responsáveis pela redução da vida de prateleira de alimentos, pode-se destacar a peroxidase (POD), responsável por modificações na cor, na textura e no sabor das frutas. É também uma das enzimas mais termorresistentes existente nos alimentos, sendo dessa maneira, sua eliminação um indicativo de que as outras espécies tenham sido inativadas também. O objetivo deste trabalho foi determinar um modelo cinético que possa descrever o comportamento da atividade da peroxidase no suco de mirtilo ao longo do aquecimento ôhmico, quando mantido à temperatura constante. O comportamento foi testado em três temperaturas distintas (55, 65 e 75 °C). O experimento se deu em um aparato experimental que consiste em uma fonte de energia, um sistema de aquisição de dados e uma célula ôhmica; já, a análise de atividade enzimática se deu via espectrofotometria, pelo monitoramento de uma reação catalisada pela presença da peroxidase contra o-dianisidina. Com o estudo desenvolvido foi possível verificar que o melhor modelo preditivo para esta inativação, na faixa de temperatura trabalhada, foi o modelo de Weibull. A taxa de degradação da enzima foi de  $0,7342 \text{ min}^{-0,3638}$  para o processamento a 55°C e  $0,8074 \text{ min}^{-0,4376}$  para 65°C. Para o processamento ocorrendo a 75°C, observa-se uma rápida inativação da enzima, sendo que em um minuto de processamento isotérmico nenhuma atividade foi verificada. Com isso, o aquecimento ôhmico se mostrou uma importante ferramenta para o processamento térmico de suco de mirtilo, rapidamente inativando peroxidase em temperatura de 75°C.

Palavras-chave: mirtilo, aquecimento ôhmico, peroxidase, cinética de inativação enzimática.

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Mirtilo. Fonte: Antunes, Trevisan e Gonçalves (2004).....	03
Figura 2.2: Sistema de aquecimento ôhmico esquematizado. Fonte: Ruan et al.(2002)...	05
Figura 2.3: Configurações do processo de aquecimento ôhmico. Fonte: Goullieux e Pain (2005).....	09
Figura 3.1: Célula ôhmica utilizada para determinar a condutividade elétrica do suco de mirtilo.....	16
Figura 3.2: interface gráfica do software utilizado para monitoramento e registro de dados.....	18
Figura 3.3: (a) célula ôhmica; (b) eletrodos e termopares.....	19
Figura 4.1: Condutividade elétrica do suco de mirtilo em função da temperatura.....	22
Figura 4.2: Atividade enzimática residual da peroxidase ao longo do aquecimento ôhmico procedido a 55, 65 e 75°C.....	23
Figura 4.3: Inativação térmica da peroxidase a 55°C: ajuste ao modelo de distribuição de Weibull.....	27
Figura 4.4: Comportamento dos valores previstos pelo modelo versus os dados experimentais para a temperatura de 55°C.....	27
Figura 4.5: Inativação térmica da peroxidase a 65°C: ajuste ao modelo de distribuição de Weibull.....	28
Figura 4.6: Comportamento dos valores previstos pelo modelo versus os dados experimentais para a temperatura de 65°C.....	28

## **Lista de Tabelas**

Tabela 2.1: Equações cinéticas usadas para analisar a inativação da peroxidase.....	11
Tabela 4.1: Valores médios para teor de sólidos totais, sólidos solúveis e pH.....	21
Tabela 4.2: Resultados de atividade residual ao longo do tempo de processamento.....	22
Tabela 4.3: Desempenho dos modelos selecionados para descrever a inativação da peroxidase no suco de mirtilo.....	25
Tabela 4.4: Coeficientes da função de distribuição de Weibull.....	29

## Lista de Símbolos

$A$  área ( $m^2$ )

$A$  atividade enzimática no tempo (u.a.e.)

$\alpha$  fração de atividade do grupo de isoenzimas termolábeis em relação ao total de atividade enzimática

$A_0$  atividade enzimática inicial (u.a.e)

$A_L$  atividade enzimática residual da fração termolábil

$A_R$  atividade enzimática residual da fração termorresistente

$b$  taxa de inativação enzimática ( $s^{-n}$ )

$I$  intensidade de corrente (A)

$k$  constante de taxa de reação de primeira-ordem ( $s^{-1}$ )

$k_1$  constante de taxa de reação de primeira-ordem para a fração termolábil ( $s^{-1}$ )

$k_2$  constante de taxa de reação de primeira-ordem para a fração termorresistente ( $s^{-1}$ )

$k_L$  constante de taxa de reação de primeira-ordem para a fração termolábil ( $s^{-1}$ )

$k_R$  constante de taxa de reação de primeira-ordem para a fração termorresistente ( $s^{-1}$ )

$k_r$  constante de taxa de reação de primeira-ordem para a fração termorresistente ( $s^{-1}$ )

$L$  comprimento (m)

$m$  número de observações

$m_{as}$  massa de amostra seca (kg)

$m_{au}$  massa de amostra úmida (kg)

$n$  fator de forma (Equação 2.9)

$n$  ordem de reação (Equação 2.8)

$\rho$  número de parâmetros medidos

$Q$  taxa de calor gerado ( $J s^{-1}$ )

$r$  fração de atividade do grupo de isoenzimas termorresistentes em relação ao total de atividade enzimática

$R$  resistência elétrica ( $\Omega$ )

$s$  atividade enzimática no tempo (u.a.e.)

$s_0$  atividade enzimática inicial (u.a.e.)

$t$  tempo (s)

$V$  tensão (V)

$x_w$  umidade (%)

$\alpha_{medido}$  valores de atividade residual experimental

$\alpha_{previsto}$  valores de atividade residual previstos pelo modelo

$\sigma$  condutividade elétrica ( $S\ m^{-1}$ )

$\chi^2$  chi-quadrado

## 1 Introdução

A cultura do mirtilo no Brasil é recente mas vem tomando espaço, principalmente, para atender ao mercado externo. O consumo do mirtilo tem se intensificado em grande parte pelos seus aspectos nutricionais, já que possui um alto teor de antocianinas, que são compostos fenólicos de alto poder antioxidante.

A fim de promover a transformação dos frutos *in natura* em produtos armazenáveis, que possam ser consumidos em longo prazo, é necessário que o mirtilo passe por algum tipo de processamento, sendo o processamento térmico o mais comum e importante dentro da indústria alimentícia. Porém, altas temperaturas envolvidas nos tratamentos térmicos convencionais, que utilizam vapor ou água como meios de aquecimento, além de destruir microorganismos prejudiciais e inativar enzimas, podem provocar também a degradação indesejada de vitaminas e nutrientes presentes nas frutas; é exatamente por conta destas considerações, que há pouco tempo o processamento térmico via aquecimento ôhmico vem chamando a atenção, pois, como esta tecnologia proporciona aquecimento rápido e uniforme aos alimentos, há possibilidade de maior preservação das propriedades nutricionais e organolépticas que se deseja manter.

Dentre as enzimas que se deseja inativar nos alimentos, encontra-se a peroxidase (POD), um complexo de enzimas oxirredutoras, responsáveis por uma série de modificações nas frutas, como perda de coloração, sabor, textura e nutrientes. A peroxidase possui alta estabilidade térmica sendo, portanto, muito utilizada para determinação dos níveis de qualidade de um processo. A sua inativação pelo calor pode ser um indício de que os demais tipos de enzimas estejam inativadas.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil de degradação de peroxidase em suco de mirtilo durante aquecimento térmico via tratamento ôhmico. Como objetivos específicos, avaliou-se estatisticamente qual modelo cinético presente na literatura melhor prevê a degradação da enzima no suco e estimaram-se os parâmetros cinéticos de

processo com base no melhor modelo. Além disto, a fim de realizar a caracterização do suco trabalhado, foi realizada a determinação de algumas propriedades físico-químicas do suco de mirtilo (pH, teor sólidos solúveis e totais) e também a determinação do comportamento da sua condutividade elétrica, propriedade física muito importante ao se processar um alimento via aquecimento ôhmico.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Mirtilo

O mirtilo pertence à família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e ao gênero *Vaccinium*; é um fruto nativo da América do Norte principalmente dos Estados Unidos e do Canadá, onde é chamado de “*blueberry*”. O fruto, apresentado na Figura 2.1, apresenta sabor exótico, bom valor econômico e possui propriedades medicinais, sendo mencionado como fonte de longevidade, já que possui um alto teor de antocianinas. Esses compostos estão contidos nos pigmentos hidrosolúveis de cor azul-púrpura do mirtilo. As antocianinas são compostos fenólicos com alto potencial antioxidante, sendo esse potencial relacionado a efeitos benéficos para a saúde humana no tratamento e prevenção de diversas doenças (Santos *et al.*, 2007; Fachinello, 2008). Esta substância favorece a síntese do colágeno e dos muco-polisacáridos, principais componentes da estrutura do tecido conetivo, oferecendo enormes benefícios à pele, aos vasos sanguíneos, aos casos de varizes, hemorróidas problemas circulatórios, transtornos cardíacos, feridas externas e internas, edema, artrites e artroses (Madail e Santos, 2004).



**Figura 2.1:** Mirtilo. Fonte: Antunes, Trevisan e Gonçalves (2004).

Segundo Galleta e Ballington (1996), os mirtilos comercialmente cultivados podem ser classificados em cinco tipos:

- *Highbush* (arbusto alto): plantas de 2 ou mais metros de altura que necessitam de frio hibernal (650 a 800 horas de frio).
- *Halfhight* (arbusto de médio porte): plantas de 0,5 a 1m de altura e que não exigem tanto frio quanto as do grupo anterior.
- *Southern* (arbusto de porte alto): é originário do sul dos Estados Unidos - também é conhecido como *highbush* que necessita menos frio.
- *Rabbiteye*: plantas de 2 a 4 m de altura. São mais vigorosas, apresentam maior produtividade, tolerância ao calor e à seca.
- *Lowbush* (arbusto de pequeno porte): plantas com menos de 0,5 m de altura.

O mirtilo pode ser comercializado *in natura* e também pode ser processado como polpa para iogurtes, polpas, doces, sorvetes e geléias, ou ser congelado e comercializado desta forma (Raseira, 2004).

Durante o armazenamento dos frutos ocorrem alterações já que estes continuam vivos; essas alterações diminuem sua qualidade os direcionando para o envelhecimento e conseqüente morte. As alterações sofridas pelas frutas são agrupadas em: processos físicos (transpiração, perda de água através dos tecidos), processos químicos e bioquímicos (respiração celular), ação de microorganismos e enzimas, fatores pós colheita, fatores do pomar (grau de maturação, colheita, pré-resfriamento), armazenamento (ambiente, refrigerado, em atmosfera controlada ou em atmosfera controlada) (Coutinho e Cantilano, 2004).

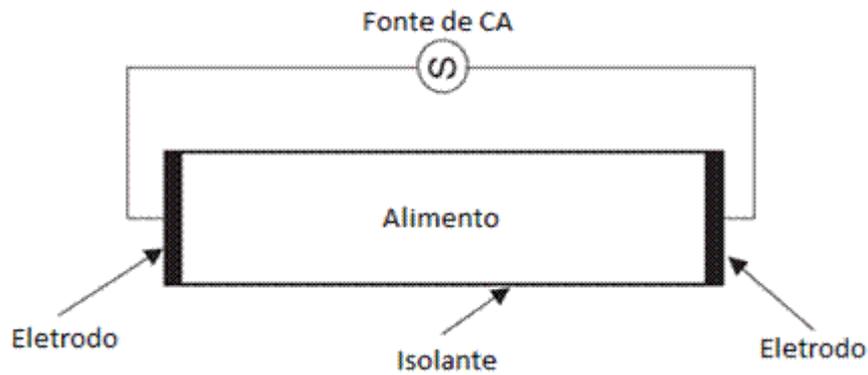
Devido aos seus efeitos benéficos à saúde, e também por atrair consumidores tanto no mercado interno, quanto no externo, o mirtilo alcança valores econômico expressivos no mercado, representando uma boa possibilidade de cultivo para regiões que ainda não possuem tradição nesta cultura, como é o caso da América do sul. Nos últimos anos a produção e o cultivo de mirtilo tiveram aumentos expressivos, segundo a Organização Mundial de Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO) (Madail e Santos, 2004).

O interesse crescente do mercado norte-americano, europeu e asiático tem pressionado produtores tradicionais a aumentarem sua produção e tem motivado novos empreendedores, como o Chile, a Argentina e recentemente o Brasil, no qual a cultura do mirtilo foi introduzida pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS). Em 2002, os Estados Unidos foram responsáveis por 50% da produção mundial, o Canadá por 33%, o continente europeu por 16% e o restante do mundo é responsável por 1%. Mesmo com a maior produção, os EUA não são auto-suficientes o ano inteiro na produção de mirtilos, apenas nos meses de maio, junho e julho (período de safra), necessitando importar o produto na entressafra (Madail e Santos, 2004).

## **2.2 Aquecimento Ôhmico**

Segundo Sastry e Barack (2000), o aquecimento ôhmico é definido como um processo no qual corrente alternada passa através de um produto com a finalidade de aquecê-lo. A passagem de corrente elétrica alternada (CA) em um alimento transforma energia elétrica em energia térmica, promovendo assim um aumento de temperatura no interior do produto. Como a maioria dos alimentos que necessitam processamento térmico possuem constituintes iônicos (sais e ácidos), é possível a passagem de corrente elétrica pelos mesmos (Palaniappan e Sastry, 1991).

Este método de tratamento térmico também pode ser chamado de aquecimento Joule, aquecimento eletrocondutivo, aquecimento por resistência, aquecimento por resistência direta, ou ainda, aquecimento elétrico direto. Para promover o aquecimento, uma tensão é aplicada sobre os eletrodos que estão nas extremidades do alimento a ser aquecido, como é mostrado na Figura 2.2.



**Figura 2.2:** Sistema de aquecimento ôhmico esquematizado. Fonte: Ruan et al.(2002).

O aquecimento ôhmico permite um aumento rápido na temperatura dos sólidos presentes, pois gera calor diretamente nos alimentos, o que nos tratamentos convencionais ocorre de uma forma mais lenta, por se tratar de uma transferência basicamente condutiva (Goullieux e Pain, 2005). Os tratamentos convencionais utilizam água ou vapor como meio de troca térmica com o alimento. Nestes tratamentos, transferência de calor para os sólidos dissolvidos depende principalmente da interface sólido líquido, pois não há geração de calor no interior do alimento. No aquecimento ôhmico, a geração de calor é uma espécie de força motriz para que ocorra a transferência de calor (Nicolai, Verboven e Scheerlinck, 2001).

Palaniappan e Sastry (1991) descreveram resumidamente a formulação matemática do aquecimento ôhmico. Considerando que o alimento é aquecido internamente por atuar como uma resistência elétrica, o princípio básico que rege a geração de calor é dado pela Equação 2.1:

$$Q = I \cdot R^2 \quad (2.1)$$

onde  $Q$  é a taxa de calor gerado [W],  $I$  é a intensidade da corrente elétrica através da amostra [A] e  $R$  é a resistência elétrica da amostra [ $\Omega$ ]. A resistência elétrica da amostra é inversamente proporcional a sua condutividade elétrica e pode ser expressa por:

$$R = \frac{L}{A \cdot \sigma} \quad (2.2)$$

onde  $L$  [m] é o espaço entre os eletrodos ou o comprimento da amostra,  $A$  é a área dos eletrodos ou da seção transversal da amostra [ $m^2$ ] e  $\sigma$  é a condutividade elétrica do produto a ser aquecido [ $S.m^{-1}$ ].

As Equações 2.1 e 2.2 mostram que a quantidade de calor gerada está relacionada com a corrente induzida pela fonte de tensão e também com a condutividade elétrica do material (Sastry e Li, 1996 apud Icier e Ilicali, 2005). A taxa de aquecimento é proporcional à condutividade elétrica e ao quadrado da força de campo elétrico e, desta forma ela pode ser controlada pelo distanciamento entre os eletrodos e também pela tensão aplicada ao produto (Lima *et al.*, 1999; Lewis e Heppell, 2000).

O processamento térmico por meio do aquecimento ôhmico permite que os alimentos se aqueçam de forma rápida - em questão de minutos ou até segundos (Sastry, 2005 apud Knirsch *et al.*, 2010). Outro aspecto muito favorável é que o aquecimento ôhmico permite que as partículas sólidas suspensas no alimento se aqueçam a uma taxa semelhante ao líquido, tornando possível o processamento UHT (*Ultra High Temperature*) e HTST (*High Temperature Short Time*) (Imai *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2003; Tucker, 2004).

Como todo o processo, o aquecimento ôhmico também possui parâmetros críticos, tais como a condutividade elétrica, a temperatura e a taxa de aquecimento. A condutividade elétrica é dependente de diversos fatores, tais como temperatura, constituintes iônicos, viscosidade e microestrutura do material e força do campo, entre outros (Sastry e Palaniappan, 1992). Dentre as possíveis aplicações para o aquecimento ôhmico pode-se citar o seu uso em branqueamento, evaporação, desidratação, fermentação e extração (FDA, 2001).

Os tratamentos térmicos aplicados aos alimentos causam uma série de modificações organolépticas e nutricionais, sendo que algumas destas modificações são desejadas e outras não; nesse último caso, essas modificações devem ser minimizadas. Uma série de fatores tais como: características do alimento *in natura*, condições de operação e tipo de produto desejado influenciam na escolha da tecnologia de processamento e no grau de modificação associado a esta tecnologia. Por isso, estes

fatores devem ser levados em conta na escolha da tecnologia. A melhor alternativa alia as características desejadas com o menor custo e tempo de processamento (Sarkis, 2010).

Dentre todas as técnicas utilizadas no processamento de alimentos na indústria, o tratamento térmico é o de maior importância e o mais utilizado para conservação, cozimento e inativação enzimática. As altas temperaturas utilizadas em tratamentos térmicos convencionais levam à inativação de enzimas e à eliminação de micro-organismos patogênicos; porém, também causam perdas de vitaminas e minerais, provocando alterações no sabor, aroma, textura e aparência do produto. Por conta disto, a indústria vem voltando suas atenções para o aquecimento ôhmico, já que este se apresenta como uma forma menos agressiva de tratamento térmico, devido a sua rapidez e uniformidade, e é aplicável a alimentos bombeáveis de processamento contínuo (Ramaswamy e Chen, 2002).

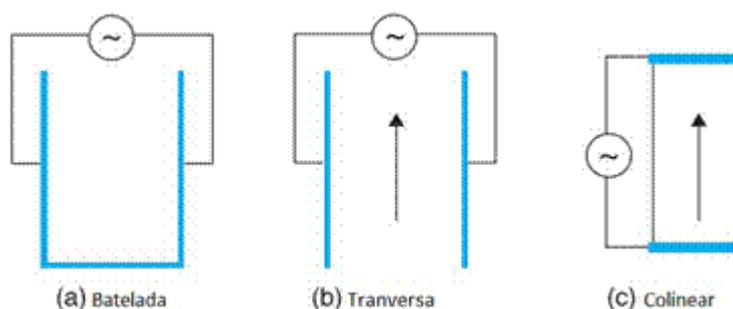
Os tratamentos convencionais apresentam outro problema, sendo este referente à não uniformidade da temperatura no alimento; as partes em contato com a superfície de aquecimento aquecem em excesso e podem acabar queimando se ficarem em contato o tempo suficiente até que as partes mais frias alcancem as temperaturas necessárias. A principal vantagem do aquecimento ôhmico está relacionada exatamente a este ponto, uma vez que ele aquece de forma rápida e uniforme os alimentos (Castro *et al.*, 2003).

Uma das principais características e vantagens do aquecimento ôhmico é o aquecimento volumétrico de alimentos por meio da geração interna de calor e, desta forma, possíveis partículas sólidas existentes no meio podem chegar à mesma temperatura - ou até alcançar temperaturas superiores às do líquido, reduzindo a queima do produto, evitando danos mecânicos e reduzindo as perdas de vitaminas e nutrientes. Além disso, outras vantagens são: alta eficiência, uma vez que cerca de 90% da energia elétrica é convertida em calor (Ghnimi *et al.*, 2008), facilidade no controle do processo (ligar ou desligar a fonte de energia do sistema), menos agressivo para o meio ambiente (não usa água e nem vapor, o que gera grande gasto energético e geração de efluentes) (Ruan *et al.*, 2002; Ghnimi *et al.*, 2008). E ainda, se os alimentos submetidos ao aquecimento ôhmico forem combinados com embalagens assépticas, estes podem ser comercializados à temperatura ambiente (Soojin e Sastry, 2005).

Segundo Goullieux e Pain (2005), o aquecimento ôhmico pode ser realizado com três tipos diferentes de configuração:

- Batelada: processo é realizado de forma descontínua. Esse tipo de configuração também é conhecida como aquecedor estático, e é amplamente utilizada para validações de modelos envolvendo o comportamento de diferentes amostras, ajuste e determinação de parâmetros elétricos e simulações de processos industriais como pasteurização e esterilização. Esse tipo de aquecedor permite a determinação dos parâmetros fundamentais para o aquecimento, como a condutividade elétrica da amostra, o tempo de aquecimento e a homogeneidade durante o processo, sendo uma boa ferramenta para aplicação em escala de laboratório (Goullieux e Pain, 2005).
- Transversal: no qual o fluxo do produto é paralelo aos eletrodos e perpendicular ao campo elétrico.
- Colinear: fluxo do alimento é realizado de um eletrodo para o outro, paralelamente ao campo elétrico.

A Figura 2.3 mostra, de forma esquemática, os três modos de operação do sistema de aquecimento ôhmico.



**Figura 2.3:** Configurações do processo de aquecimento ôhmico. Fonte: Goullieux e Pain (2005).

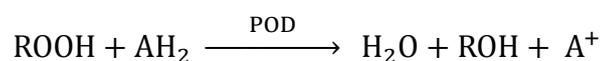
## 2.3 Peroxidase

As peroxidases (POD) são enzimas pertencentes ao grupo das oxirredutases. Essas enzimas são responsáveis pela deterioração oxidativa de muitos vegetais durante o armazenamento e estão envolvidas em diversas reações biológicas, como: reações de

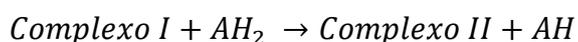
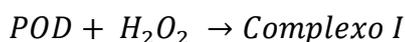
oxidação, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, estresse fisiológico, oxidação de fenóis, infecções nos vegetais, regulação da alongação de células e outras. O estudo desse grupo de enzimas tem sido de grande importância para a tecnologia de alimentos, uma vez que a continuidade da atividade enzimática pode ocasionar mudanças na cor, variações de aroma, alterações no teor de vitaminas e mudanças na textura (Freitas *et al.*, 2008; Gaspar *et al.*, 1982; Kao, 2003; Campos *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2007).

A partir da redução de peróxido de hidrogênio ou de peróxidos orgânicos, a peroxidase é capaz de catalisar a oxidação de um grande número de substratos doadores de hidrogênio (aminas aromáticas primária, secundárias e terciárias, fenóis, antocianinas, lignina, vitamina C, clorofila, entre outros) (Haard e Tobin, 1971; Burnette, 1977; Lopez serrano e Barceló, 1996; Chamarro e Molina, 1989).

O mecanismo da reação geral da peroxidase é mostrado a seguir:



onde ROOH é o aceptor de hidrogênio e o AH<sub>2</sub> é o doador de hidrogênio. Esse mecanismo de reação pode ser esquematizado como:



Uma característica marcante das peroxidases é a sua termoestabilidade, sendo que em muitas áreas da tecnologia de alimentos é considerada como referência para o controle de eficiência do processamento térmico. (Mütfügil, 1985). Esta é uma das razões pela qual ela é empregada para se determinar a efetividade do processo de branqueamento (processo que visa provocar a inativação enzimática de frutas e vegetais, para prevenir sua perda de qualidade na estocagem) (Khan e Robinson, 1993a). Sua fácil detecção é outro motivo pelo qual é utilizada para esta finalidade.

Segundo Lamukanra e Watson (2000) muitas alterações de sabor podem estar ligadas à atividade de peroxidase. Já foi até constatado, através de dados empíricos, a ocorrência de *off-flavors* relacionados à atividade residual de peroxidase em alimentos processados (Burnette, 1977; Cano et al, 1998; Khan e Robinson, 1993; Mütfügil, 1985; Valderram e Clemente, 2004). Além dos efeitos no sabor, foi sugerido que a peroxidase possa alterar a textura de alguns tipos de frutas por meio da síntese de lignina e da capacidade de catalisar a ligação entre as moléculas de ácido ferrúlico (substituintes na cadeia da pectina) (Adams, 1997). Segundo Forsyth et al. (1999), a lignificação ocorrida pela habilidade que a peroxidase possui de oxidar inúmeros compostos fenólicos, entre eles a clorofila, é um indicativo de que esta enzima também está relacionada com a descoloração de tecidos de frutas e vegetais (Onsa et al., 2004). Considerando todas essas modificações decorrentes nos alimentos pela presença da peroxidase, estudos envolvendo sua inativação são muito importantes.

## 2.4 Modelos Cinéticos

Os modelos cinéticos comumente são usados para descrever o comportamento de um composto alvo ao longo do processo de inativação. A Tabela 2.1 apresenta vários modelos disponíveis na literatura para descrever a inativação térmica de enzimas. Nas equações,  $A$  representa a atividade enzimática no tempo  $t$ ,  $A_0$  é a atividade enzimática inicial e  $k$  é a constante de taxa de degradação a uma dada temperatura (Shalini *et al.*, 2008).

Tabela 2.1: Equações cinéticas usadas para analisar a inativação da peroxidase.

Nº Equação	Modelo	Equação
(2.3)	Primeira-ordem	$\ln \frac{A}{A_0} = -kt$
(2.4)	Isoenzimas distintas	$\frac{A}{A_0} = A_L \exp(-k_L t) + A_R \exp(-k_R t)$
(2.5)	Duas-frações	$\frac{A}{A_0} = a \times \exp(-k_L \times t) + (1 - a) \times \exp(-k_R \times t)$
(2.6)	Multi-componente primeira-ordem	$\frac{A}{A_0} = \{\exp(-k_1 t) + r \exp(-k_2 t)\} / (1 + r)$
(2.7)	<i>n</i> ésima ordem	$\frac{A}{A_0} = \{A_0^{1-n} + (n - 1) kt\}^{1/(n-1)}$
(2.8)	Conversão fracionária	$\frac{A}{A_0} = A_r + (A_0 - A_r) \exp(-kt)$
(2.9)	Distribuição de Weibull	$s = s_0 \exp(-bt^n)$

Os seguintes processos podem estar envolvidos na desnaturação térmica da POD: dissociação do grupo prostético da haloenzima (enzimas que possuem em sua composição outras substâncias, além de aminoácidos), mudança na conformação da apoenzima (parte referente aos aminoácidos das haloenzimas) e modificação ou destruição do grupo prostético (Vámos Vigyázó, 1981).

Lencki, Arul e Neufeld (1992a, 1992b) afirmaram que, quando um aparente comportamento de primeira-ordem é observado durante a inativação enzimática, a taxa na qual um dos fenômenos acontece determina a taxa de inativação e, quando as taxas de vários fenômenos envolvidos são semelhantes, há não linearidade nos processos de inativação. O conceito de que curvas de inativação térmica são a forma cumulativa de distribuição cronológica dos eventos de degradação, tem sido apoiada por vários pesquisadores. Estas curvas representam o espectro de resistência à inativação térmica das enzimas. A curva de atividade térmica residual ( $A/A_0 \times t$ ), por sua vez, independentemente dos mecanismos biofísicos específicos que realmente causam a inativação das enzimas, indica o total efeito destrutivo do calor sobre as enzimas afetadas (Shalini *et al.*, 2008).

A seguir são apresentados alguns modelos cinéticos e sua relação com o comportamento enzimático.

- Primeira-ordem (Eq. (2.3)): tem sido usada para descrever a inativação térmica de enzimas em geral. Supõe que o rompimento de uma simples ligação ou estrutura é suficiente para desativar a enzima (Ludikhuyze, *et al.*, 1999). Considerando a complexidade e a diferente variedade de fenômenos envolvidos em uma inativação, esta explicação parece muito simples (Ladero *et al.*, 2006).

- Modelo de distintas Isoenzimas (Eq. (2.4)): esse modelo sugere que a inativação enzimática é descrita pela soma de dois decaimentos exponenciais, um referente à enzimas termolábeis e outro referente à enzimas termoestáveis. Nesta equação,  $A_L$  e  $A_R$  são as atividades residuais e  $k_L$  e  $k_R$  são as constantes de taxa de reação de primeira-ordem para as frações termolábeis e termorresistentes, respectivamente (Ludikhuyze *et al.*, 1999).

- Duas Frações (Eq. (2.5)): modelo proposto por Chen e Wu (1998) que apresenta como hipótese o fato de que a amostra de extrato vegetal possui variadas isoenzimas que podem ser separadas em dois grupos, um com resistência térmica superior ao outro e ambos inativados termicamente seguindo uma cinética de primeira-ordem. O coeficiente  $a$  representa a atividade da fração de isoenzimas termolábeis em relação à atividade enzimática total. Este modelo é equivalente ao modelo anterior na parte que se refere à descrição enzimática, havendo apenas diferenças nos parâmetros constantes adotados.

- Multi-componente primeira-ordem (Eq. (2.6)): as características deste modelo foram discutidas por Fujikawa e Itoh (1996) em simulações cumulativas e, a partir disto, descreveram o método de estimativa dos parâmetros de inativação.

- Ordem  $n$  (Eq. (2.7)): considera que a inativação é de ordem variável, não fixando um valor inteiro (Shalini, *et al.*, 2008).

- Conversão fracionada (Eq. (2.8)): refere-se a uma conversão de primeira ordem e considera a atividade enzimática diferente de zero após um prolongado tempo de aquecimento por causa da presença de uma fração de enzimas extremamente resistente ao calor.  $A_r$  é a atividade enzimática residual referente à fração extremamente resistente (Rizvi e Tong, 1997).

- Distribuição de Weibull (Eq. (2.9)): o padrão de distribuição de Weibull se baseia na suposição de que, sob as condições examinadas, a taxa momentânea de sensibilidade térmica para o calor, é somente um fator transiente da intensidade do aquecimento e da atividade residual, mas não da taxa com que a atividade residual foi alcançada (Peleg e Pechina, 2000).

### 3 Materiais e Métodos

Esta seção está dividida em duas partes, a primeira delas tem por objetivo descrever como foi realizada a determinação de algumas propriedades físicas e físico-químicas próprias do suco utilizado. A segunda etapa, por sua vez, destina-se à descrição detalhada de todas as etapas experimentais envolvidas na determinação da cinética de inativação enzimática do suco de mirtilo, quando este é submetido ao aquecimento ôhmico.

#### 3.1 Caracterização do Suco de Mirtilo

As propriedades físico-químicas do mirtilo analisadas foram: teor de sólidos solúveis (°Brix), pH e umidade.

O teor de açúcares foi determinado utilizando refratômetro analógico portátil (*Carl Zeiss*, modelo 32-G, Estados Unidos), de acordo com o método da AOAC 932.12 (AOAC, 2000a), e o pH foi determinado utilizando pHmetro (*Tecnal*, modelo TEC-3MP, Brasil), também de acordo com a AOAC, método 981.12 (AOAC, 2000c).

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com a metodologia 934.06 (AOAC, 2000b). Este método consiste em pesar, em balança analítica, com precisão de 0,0001 g (*BOSH*, modelo SAE 200, Alemanha), 5 g de amostra em cápsula de alumínio contendo bastão de vidro e 10 g de areia. É necessário utilizar a areia devido ao alto teor de açúcares dos frutos. Em altas temperaturas, o açúcar carameliza, criando uma crosta superficial que impede a saída de água do alimento. A areia evita a formação desta crosta e forma poros, facilitando a retirada de água do alimento (AOAC, 2000b). Após a pesagem, com o auxílio do bastão de vidro, a amostra é misturada à areia e colocada em estufa a vácuo (*Tecnal*, modelo TE-395, Brasil) a 80 °C por 8 h. No final deste

período, a amostra é resfriada e novamente pesada. A umidade é calculada através da diferença de massa antes e após a secagem da água, utilizando a Equação 3.1 e o resultado é obtido em porcentagem. O teor total de sólidos é calculado diminuindo-se de 100 o valor obtido na Equação 3.1. Todas as análises de umidade contidas neste trabalho foram realizadas em triplicata.

$$x^w = \frac{m_{au} - m_{as}}{m_{au}} \times 100 \quad (3.1)$$

onde,  $x^w$  é a umidade em base úmida em porcentagem,  $m_{au}$  é a massa de amostra úmida e  $m_{as}$  é a massa de amostra seca.

Além destas propriedades físico-químicas, foi determinada também a condutividade elétrica do suco de mirtilo, uma propriedade física de suma importância quando se deseja submeter algum alimento ao aquecimento ôhmico, já que esta propriedade é um indicativo se a o alimento em questão pode conduzir bem as correntes elétrica e ser aquecido com certa facilidade ou não (Goullieux e Pain 2005).

A condutividade elétrica ( $\sigma$ ) é habilidade que o material possui de conduzir corrente elétrica. Sendo a corrente (I) e a tensão (V) monitoradas pelo sistema e conhecendo as dimensões do equipamento, pode-se aplicar a Equação 3.2 e o resultado será o valor da condutividade elétrica (Goullieux e Pain 2005).

$$\sigma = \frac{L}{A \cdot V/I} = \frac{L}{A \cdot R} \quad (3.2)$$

onde  $L$  e  $A$  são o comprimento e a área da célula, respectivamente; e  $R$  a resistência do alimento submetido ao aquecimento ôhmico.

A condutividade elétrica do suco de mirtilo foi determinada através do aquecimento ôhmico. Foi empregada uma parte do aparato experimental usado na determinação da cinética de inativação enzimática; apenas a célula ôhmica foi trocada por outra, mais adequada para esta finalidade, uma vez que seus eletrodos permanecem

numa posição fixa ao longo do experimento. A fotografia da célula ôhmica empregada está mostrada na Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Célula ôhmica utilizada para determinar a condutividade elétrica do suco de mirtilo.

Esta célula possui 3 cm de diâmetro e 3,8 cm de comprimento. Os eletrodos, que possuem o mesmo diâmetro da célula, estão nas extremidades da mesma. Estes eletrodos foram ligados a barras de cobre, para que então estas possam ser conectadas ao sistema de fornecimento de energia. A célula ôhmica possui ainda duas aberturas na sua parte superior, para que possam ser introduzidos os medidores de temperatura (termopares do tipo Pt 100). Uma destas aberturas é maior que a outra, para os casos de transbordamento. No experimento só foi usado um termopar, e este foi introduzido na abertura lateral.

Primeiramente, foi colocado suco de mirtilo na célula ôhmica de forma que todo o interior da célula fosse preenchido. A célula preenchida com o suco foi posicionada sobre uma mesa agitadora, o termopar foi introduzido na abertura superior e as barras de cobre foram conectadas à fonte de energia. O suco foi, então, submetido ao aquecimento ôhmico, a fonte de tensão foi ligada em 150V e esta tensão foi mantida constante ao longo de todo o experimento. O software conectado ao sistema de aquecimento ôhmico, calculou a condutividade elétrica do suco de mirtilo ao longo do tempo com base na equação 3.2. A tensão e a corrente, necessárias para a determinação da condutividade elétrica, foram monitoradas pelos medidores e as dimensões da célula ôhmica foram inseridas no programa.

## 3.2 Determinação da Cinética de Inativação Enzimática

O experimento que envolve a determinação da cinética de inativação da peroxidase no suco de mirtilo foi dividido em três etapas: elaboração do suco, aquecimento ôhmico e coleta de amostras e análise via espectrofotometria de luz visível para verificar a atividade enzimática de cada amostra.

### 3.2.1 Elaboração do Suco

Os mirtilos utilizados no experimento são da espécie *Vaccinium corymbosum* e fazem parte do grupo *highbush*. Os frutos foram adquiridos congelados da empresa *Italbraz* (Vacaria, RS, Brasil) e pertenciam ao mesmo lote. Para preparo do suco, os mirtilos, que estavam em embalagens distintas, foram primeiramente, homogeneizados e posteriormente triturados em um liquidificador por tempo suficiente para que não houvesse mais pedaços visíveis da fruta.

Após passar pela etapa de trituração, as porções foram homogeneizadas e, em seguida, centrifugadas durante 20 minutos, sob uma rotação de 6000 rpm a 4°C.

Depois da etapa de centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um copo de béquer, no qual todo o suco foi homogeneizado. Em seguida, o suco foi repassado para tubos Falcon limpos e, então, congelado até o uso.

### 3.2.2 Aquecimento Ôhmico e Coleta de Amostras

#### 3.2.2.1. Sistema de Aquecimento Ôhmico

O aparato experimental utilizado é composto por um sistema de fornecimento de energia, um sistema de aquisição de dados e uma célula ôhmica. A seguir, cada sistema será descrito separadamente.

O sistema de fornecimento de energia é formado por um estabilizador (*Forceline*, modelo EV 1000 T/2-2, Brasil), um variador de tensão, que pode ser ajustado em tensões entre 0 e 240 V (*Sociedade Técnica Paulista LTDA*, modelo Varivolt, Brasil) e um disjuntor (*Siemens*, Brasil). O estabilizador foi conectado à rede local, utilizando corrente alternada com frequência de 60 Hz.

O sistema de aquisição de dados permite o monitoramento e registro de valores relativos à corrente elétrica, tensão e temperatura em função do tempo. Os dados foram coletados utilizando um módulo de aquisição e registro (*Novus*, modelo Field logger, Brasil). Foi utilizado um programa para monitoramento e registro das variáveis. A Figura 3.2, mostra a interface gráfica do programa.

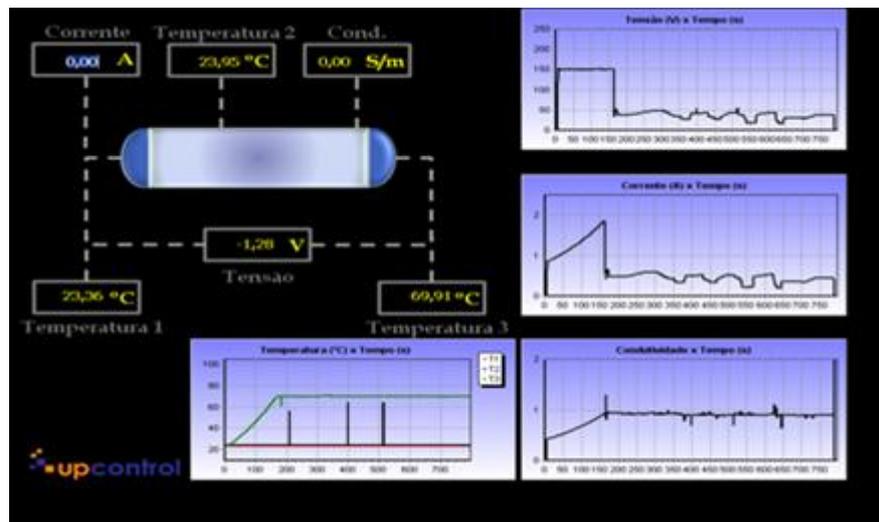
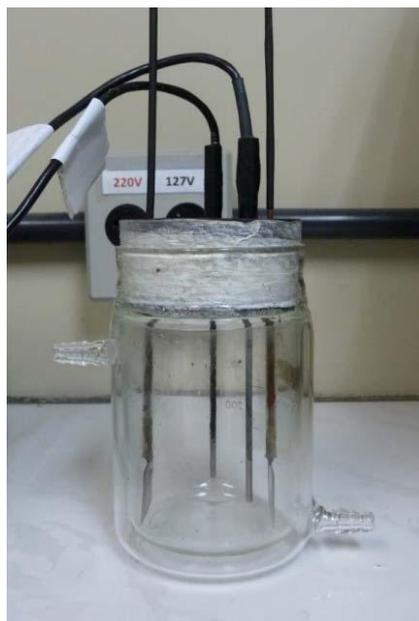


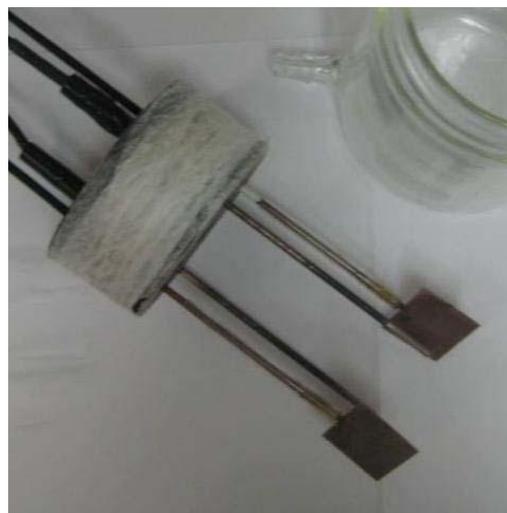
Figura 3.2: interface gráfica do software utilizado para monitoramento e registro de dados.

Para monitoramento da temperatura, foram utilizados medidores de temperatura do tipo Pt-100 (*Novus*, Brasil), previamente calibrados, com haste de aço inoxidável revestida com uma liga de níquel-fósforo a fim de evitar reações de corrosão. Para o monitoramento da tensão, foi utilizado um transdutor de Tensão CA (*Yokogawa*, modelo 2374A-T13-VRX/AN, Taiwan), cujo sinal de entrada varia de 0 a 240 V. A corrente elétrica foi monitorada através de um transdutor de corrente CA, (*Yokogawa*, modelo 2374A-T13-ALS/NA, Taiwan) com sinal de entrada de 0 a 5 A. Estes equipamentos já haviam sido previamente calibrados através da utilização de um multímetro (*Wavetek Meterman*, modelo 25XT, Taiwan) e um termômetro de mercúrio.

A célula ôhmica utilizada possui diâmetro de 8 cm e altura de 13,5 cm. Os eletrodos, cujas dimensões são de 3x2,5 cm, possuem formato retangular e são feitos de platina. Estes eletrodos estão ligados a hastes de cobre e estas, por sua vez, são conectadas ao sistema de fornecimento de energia. Nesta célula, tanto os medidores de temperatura, quanto os eletrodos são inseridos na parte superior. A Figura 3.3 mostra fotografias da célula ôhmica, dos eletrodos de platina e dos medidores de temperatura.



(a)



(b)

**Figura 3.3:** (a) célula ôhmica; (b) eletrodos e termopares

#### 3.2.2.2. Aquecimento Ôhmico do Suco de Mirtilo e Coleta das Amostras

Inicialmente, foram descongelados 150 mL de suco de mirtilo, após degelo, o suco foi acondicionado na célula ôhmica, de modo a cobrir totalmente os eletrodos de platina, o que é fundamental na determinação da condutividade elétrica. Posteriormente, a célula foi colocada sobre um agitador magnético (*Instrulab*, modelo ARE, Brasil) a fim de se obter uniformidade do produto ao longo das análises. Feito isto, foi aplicada uma tensão de 150 V, e esse valor foi mantido constante até que a temperatura de trabalho fosse alcançada. Quando alcançada esta temperatura, a tensão foi diminuída e manipulada de forma a manter-se constante a temperatura para a qual se desejava determinar o modelo cinético de inativação enzimática. No mesmo instante em que a temperatura requerida foi alcançada, coletou-se uma amostra de aproximadamente 1 mL do suco sob

aquecimento. Outras amostras foram coletadas nos instantes 1, 2, 3, 5, 7,5 e 10 min. Além destas coletas, foi feita a amostragem do suco *in natura*. Após a coleta, as amostras foram mantidas a -40°C até o momento da análise. O experimento foi feito em duplicata para cada temperatura de trabalho, sendo que as temperaturas escolhidas foram de 55, 65 e 75°C.

### 3.2.3 Análise de Atividade Enzimática

A análise de atividade enzimática foi feita via espectrofotometria, em comprimento de onda de 460 nm (Clemente, 1998). A análise realizada indica quantitativamente a atividade de peroxidase presente nas amostras e esta é determinada através do método de redução de o-dianisidina a o-quinona. Esta reação só ocorre na presença da peroxidase, que age como catalisador (Clemente, 1998).

Em uma cubeta, alíquotas de 200 µL de extrato enzimático (suco de mirtilo *in natura* ou submetido ao aquecimento ôhmico) foram misturadas a 2,7 mL de peróxido de hidrogênio 0,1%, o qual foi preparado em solução tampão fosfato de sódio (100 mM e pH 6,0). A seguir, 100 µL de o-dianisidina 1% (em metanol) foi adicionado ao sistema e o aumento da absorbância do sistema a 460 nm foi monitorado a cada 10 segundos por 5 minutos. Uma unidade de atividade de enzimática (u.a.e.) foi definida como o correspondente à variação de 0,001 unidades de absorbância por minuto/mL de amostra. Todas as amostras foram lidas em triplicatas.

A atividade enzimática residual foi determinada pela variação de absorbância por minuto ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ), nas condições de ensaio. Para calcular  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  foi usada regressão linear, sendo que somente a parte linear da curva de absorção foi considerada (Shalini, *et al.*, 2008). A atividade enzimática residual, que é a razão entre a atividade residual em um determinado tempo e a atividade enzimática no tempo zero é dada por:

$$\text{Atividade enzimática residual } \left(\frac{A}{A_0}\right) (\%) = \frac{s}{s_0} \times 100,$$

onde  $s$  e  $s_0$  são a atividade enzimática após tratamento térmico por tempo  $t$  e a atividade enzimática inicial.

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterização do Suco de Mirtilo

Os resultados para as propriedades físico-químicas analisadas do suco de mirtilo estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Valores médios para teor de sólidos totais, sólidos solúveis e pH.

Propriedade	Valor (*)
Teor de sólidos totais (%)	11,07 ± 0,06
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	11,0 ± 0,0
pH à 25°C	3,64 ± 0,01

(\*) Valores médios ± desvio padrão de n repetições (n = 3).

Esses valores podem variar com o estágio de maturação, fertilidade do solo, clima, entre outros, sendo o teor de sólidos solúveis um índice de maturidade de algumas frutas Coutinho e Flores (2004). Com os valores obtidos, percebe-se que quase a totalidade dos sólidos do suco em questão são solúveis, provavelmente porque a etapa de centrifugação envolvida na preparação do suco foi eficiente na remoção dos sólidos suspensos.

A Figura 4.1 mostra o comportamento da condutividade elétrica do suco de mirtilo ao longo do aquecimento ôhmico, no qual ocorre o aumento de temperatura. Verifica-se claramente uma relação linear positiva entre temperatura e condutividade elétrica. Quando a temperatura do suco aumenta, simultaneamente ocorre o aumento da condutividade elétrica, porque esta propriedade depende, entre outros fatores, do movimento dos íons presentes no suco. Com o aumento da temperatura, a energia interna do sistema cresce e os íons se movimentam mais, aumentando, desta forma, a condutividade elétrica (Palaniappan e Sastry, 1991).

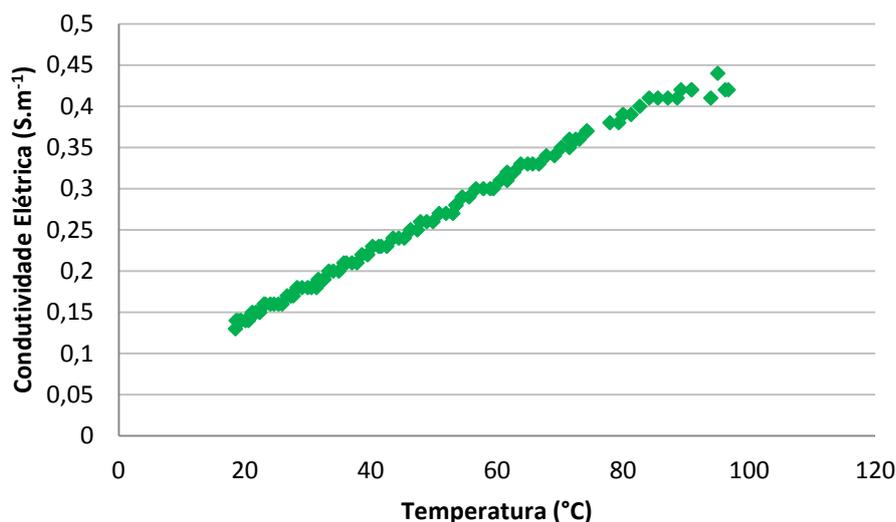


Figura 4.1: Condutividade elétrica do suco de mirtilo em função da temperatura.

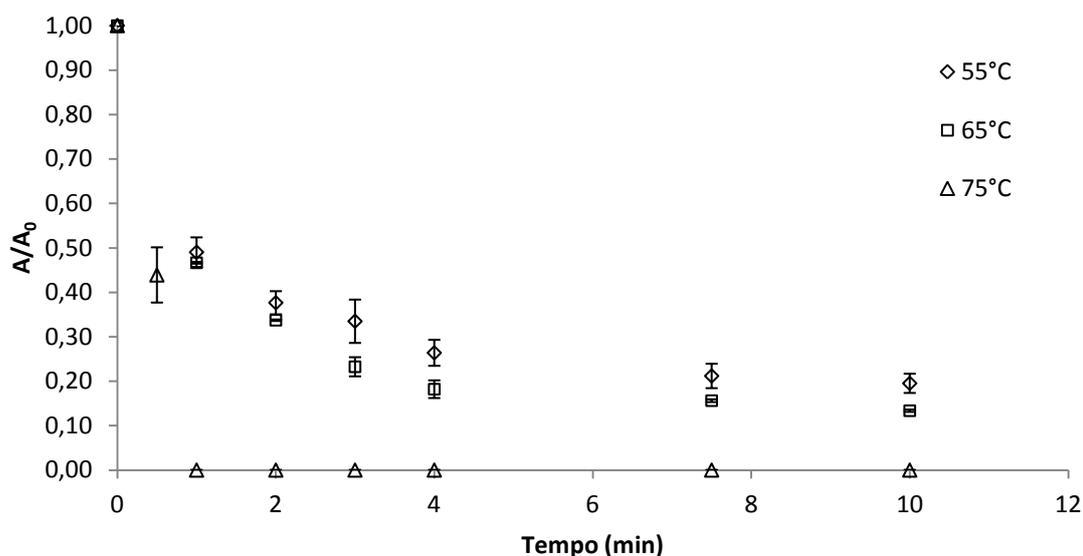
#### 4.2 Cinética de inativação da Peroxidase

Os valores de inativação obtidos para cada ponto da curva estão mostrados na Tabela 4.2. Os pontos são resultados da média de triplicatas de dois experimentos independentes. A média utilizada para representar o ponto na curva sempre respeitou um erro máximo de 5% entre os valores obtidos. Para a elaboração das curvas, foi considerada como atividade inicial a atividade enzimática do suco no instante em que este atingiu a temperatura de trabalho.

Tabela 4.2: Resultados de atividade residual ao longo do tempo de processamento.

Tempo (min)	55°C		65°C		75°C	
	A/A <sub>0</sub>		A/A <sub>0</sub>		A/A <sub>0</sub>	
0	1,00	± 0,00	1,00	± 0,00	1,00	± 0,00
0,5					0,40	± 0,06
1	0,49	± 0,03	0,47	± 0,00	0,00	± 0,00
2	0,38	± 0,03	0,34	± 0,00	0,00	± 0,00
3	0,33	± 0,05	0,23	± 0,02	0,00	± 0,00
4	0,26	± 0,03	0,18	± 0,02	0,00	± 0,00
7,5	0,21	± 0,03	0,16	± 0,00	0,00	± 0,00
10	0,20	± 0,03	0,13	± 0,00	0,00	± 0,00

A Figura 4.2 mostra o comportamento da atividade enzimática residual média da peroxidase no suco de mirtilo ao longo do aquecimento ôhmico, quando este foi efetuado em processo isotérmico à temperatura de 55, 65 e 75°C. A análise deste gráfico mostra que os resultados obtidos foram coerentes, pois com o aumento da temperatura de trabalho houve um aumento na velocidade da taxa de inativação da peroxidase.



**Figura 4.2:** Atividade enzimática residual da peroxidase ao longo do aquecimento ôhmico procedido a 55, 65 e 75°C.

A média das curvas referentes às temperaturas de 55 e 65°C foram utilizadas para modelar a inativação enzimática da peroxidase no suco de mirtilo nesta faixa de temperaturas. A curva de 75°C não pôde ser utilizada para este fim, pois a esta temperatura a peroxidase apresentou uma inativação muito rápida e, assim sendo, não se obtiveram pontos suficientes para realização da modelagem (símbolos em forma de triângulos)

O objetivo inicial deste trabalho incluía a obtenção de mais uma curva de inativação (a 70°C), mas devido a problemas experimentais ocorridos ao longo da pesquisa, o suco preparado não foi suficiente para a execução de mais experimentos. No preparo de um novo lote de suco, foi observado que o novo lote não possuía atividade enzimática semelhante ao anterior, cuja atividade enzimática média era de 545,62 u.a.e. Dessa forma, não poderia ser feito um comparativo com os resultados já obtidos. Foram feitos outros dois lotes de suco, sendo que um deles apresentou atividade enzimática

inferior (metade do valor) ao do lote utilizado neste trabalho e o outro lote possuía uma atividade muito superior. Estas variações, que impediram a construção da curva de inativação a 70°C, podem ser explicadas pelas diferenças entre as safras. Esta curva seria utilizada na determinação de parâmetros termodinâmicos do processo, como a energia de ativação.

Foram testados alguns modelos de degradação enzimática encontrados na literatura, apresentados na Tabela 2.1, com os valores das curvas de 55 e 65°C. Os parâmetros cinéticos dos modelos foram obtidos através de regressão não linear pelo método de *Quasi-Newton* (STATISTICA 7.0, Statsoft, Tulsa, OK, USA). Para comparação dos modelos obtidos por regressão não-linear, os seguintes critérios estatísticos foram considerados: coeficiente de correlação ( $R^2$ ), chi-quadrado ( $\chi^2$ ) e erro padrão de médias (S.E.M.). Estes critérios têm sido usados com sucesso para comparar modelos cinéticos de inativação (Sant'Anna *et al.*, 2010; Schokker e van Boekel, 1997; Corradini e Peleg, 1997).

O cálculo de  $\chi^2$  é feito pela equação:

$$\chi^2 = \frac{\sum (\alpha_{medido} - \alpha_{previsto})^2}{(m-p)} \quad (4.1)$$

S.E.M. é definido como:

$$S.E.M. = \frac{\sum (\alpha_{medido} - \alpha_{previsto})^2}{\sqrt{m}} \quad (4.2)$$

onde  $m$  é o número de observações,  $p$  o número de parâmetros,  $\alpha_{medido}$  e  $\alpha_{previsto}$  são os valores obtidos para a atividade residual da peroxidase experimentalmente e pela aplicação do modelo adequado, respectivamente.

A estimativa de parâmetros cinéticos negativos a uma dada temperatura é um critério físico para se rejeitar o modelo. O modelo com o menor valor para  $\chi^2$  e S.E.M. e mais alto  $R^2$  é a melhor escolha do ponto de vista estatístico (Shalini *et al.*, 2008; Sant'Anna *et al.*, 2010). Os resultados dos critérios estatísticos para os modelos cinéticos testados são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Desempenho dos modelos selecionados para descrever a inativação da peroxidase no suco de mirtilo.

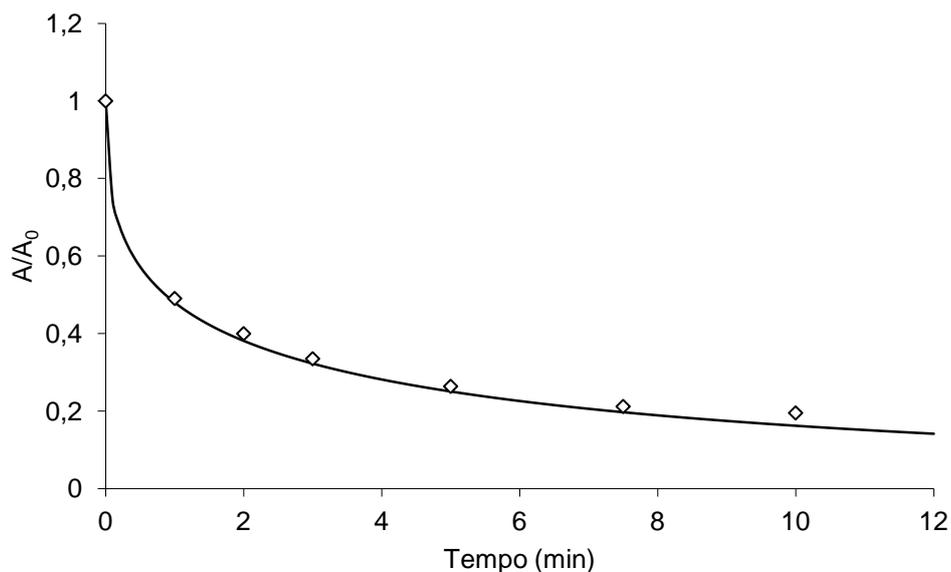
Modelo (Eq.)	$R^2$ [55°C;65°C]	$\chi^2$ [55°C;65°C]	S.E.M. [55°C;65°C]
Primeira-ordem	[0,87157; 0,94170]	[0,01875; 0,01061]	[0,04253; 0,02405]
Duas-frações	[0,99946; 0,99886]	[0,00013; 0,00032]	[0,00019; 0,00049]
Multicomponente	[0,99946; 0,99886]	[0,00013; 0,00032]	[0,00019; 0,00049]
Conversão fracionada	[0,99146; 0,99695]	[0,00199; 0,00094]	[0,00301; 0,00142]
Distribuição de Weibull	[0,99953; 0,99746]	[0,00009; 0,00057]	[0,00017; 0,00108]

O modelo cinético de inativação de primeira-ordem foi testado para verificar sua aplicabilidade aos dados de inativação térmica da peroxidase. No entanto, este modelo não resultou em bons valores de  $R^2$  para as duas temperaturas de trabalho. Isso se deve ao fato da peroxidase ser uma isoenzima, apresentando um complexo de enzimas; o complexo de redutases que compõe a peroxidase não apresenta um comportamento único de degradação e, sim, diferentes perfis de resistência térmica (Shalini *et al.*, 2008). Em função deste fato, foram testados os modelos duas-frações e multicomponente, e ambos os modelos resultaram em valores iguais para  $R^2$  (0,99946 e 0,99886),  $\chi^2$  (0,00013 e 0,00032) e S.E.M (0,00019 e 0,0049), sendo, portanto, considerados bons modelos para descrever este processo de inativação. O modelo cinético de ordem  $n$  mostrou o pior comportamento dentre todos os modelos testados, não chegando a gerar nem mesmo um valor para  $R^2$  e produzindo valores altos para  $\chi^2$  e S.E.M., sendo descartado já num primeiro momento. O modelo de conversão fracionada também foi testado, mas valores obtidos apresentaram qualidade inferior aos de duas frações e multicomponente, sendo também eliminado. A distribuição de Weibull, por sua vez, também apresentou valores muito bons para  $R^2$  (0,99953 e 0,99746),  $\chi^2$  (0,00009 e 0,00057) e S.E.M. (0,00017 e 0,00108), constituindo dessa forma um ótimo modelo para explicar a inativação da peroxidase na faixa de temperaturas testadas.

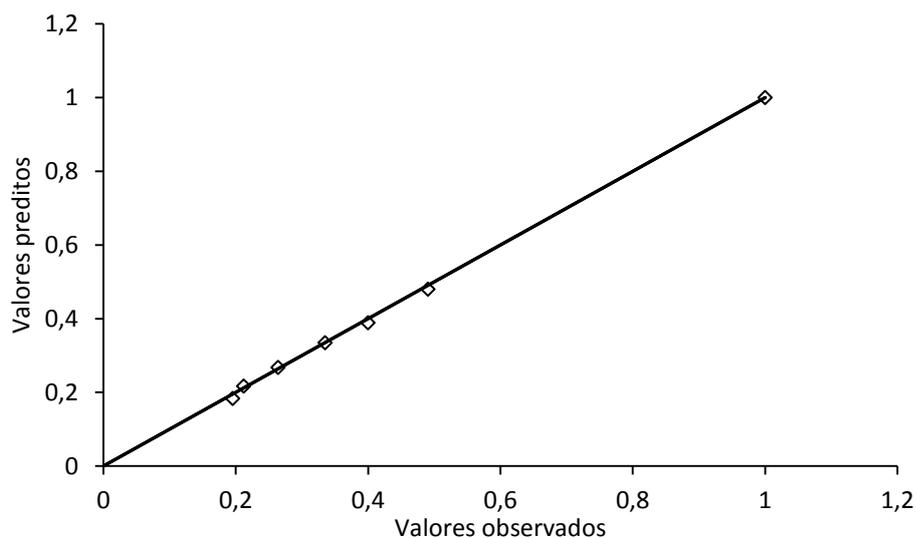
A seleção de um modelo depende da finalidade do estudo. Quando o objetivo da modelagem é elucidar os mecanismos de inativação, todos os modelos que são estatisticamente aceitáveis podem ser usados (Schokker e van Boekel, 1997); foi o caso de três dos modelos testados - de duas-frações, multicomponente e distribuição de Weibull - que defendem a existência de uma fração termolábil e outra termorresistente na peroxidase, com algumas diferenças sutis na sua forma de degradação.

A modelagem matemática da cinética de inativação térmica de enzimas pode ser utilizada para prever a atividade residual após um tratamento térmico e para elucidar o mecanismo da inativação. Quando o propósito é a modelagem preditiva, como é o caso deste estudo, é recomendável escolher o modelo no qual o menor número de parâmetros são estimados, pois este é o modelo mais fácil de ser usado. Além disso, este modelo é o mais estável, porque os parâmetros são os menos correlacionados. Outro aspecto que deve ser levado em conta é que o modelo com o menor número parâmetros tem o maior número de graus de liberdade, fato que pode ser importante quando o número de medições é pequeno (Schokker e van Boekel, 1997). No presente estudo, o modelo estatisticamente aceitável com o menor número de parâmetros é o modelo de distribuição de Weibull.

A Figura 4.3 mostra os valores de atividade enzimática experimental plotada versus o tempo, para a temperatura de 55°C, sendo que a curva cheia é a representação do modelo de distribuição de Weibull. A Figura 4.4 mostra a paridade dos dados observados e preditos. A análise destas figuras mostra que o modelo se aplica satisfatoriamente à inativação enzimática da peroxidase.

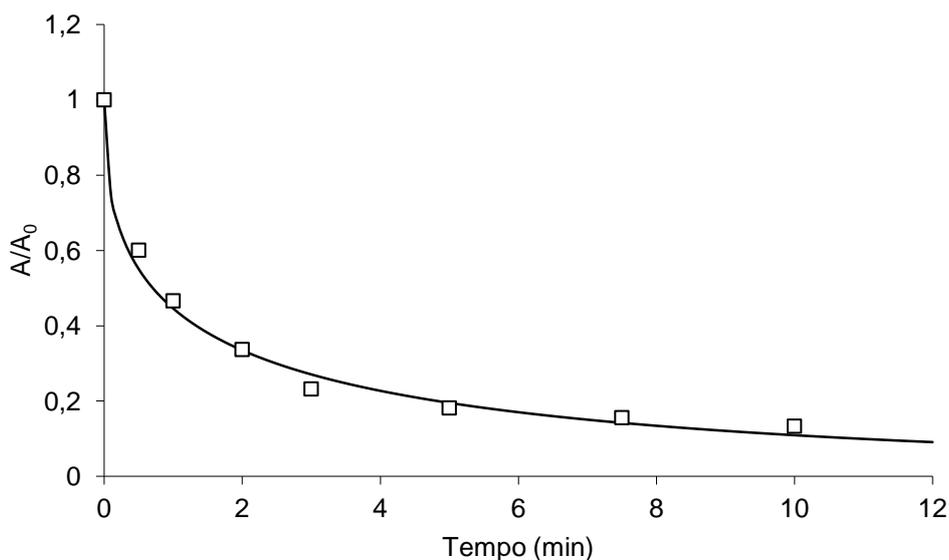


**Figura 4.3:** Inativação térmica da peroxidase a 55°C: ajuste ao modelo de distribuição de Weibull.

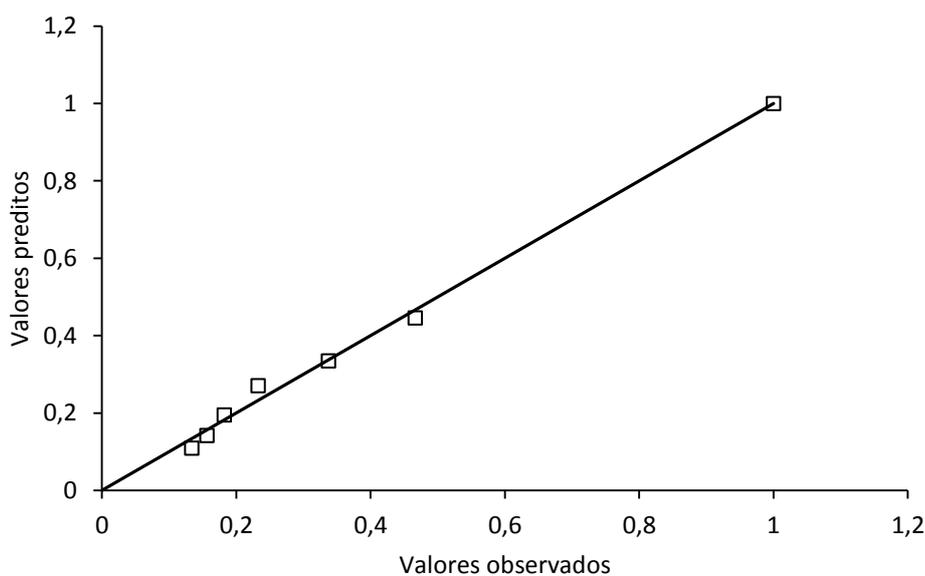


**Figura 4.4:** Comportamento dos valores previstos pelo modelo versus os dados experimentais para a temperatura de 55°C.

A Figura 4.5 mostra os valores de atividade enzimática experimental versus o tempo, para a temperatura de 65°C, com a curva cheia representando o modelo de distribuição de Weibull. A Figura 4.6 mostra a paridade dos dados observados e previstos. Da mesma forma que para a temperatura de 55°C, a análise das Figuras 4.5 e 4.6 mostra que o modelo se aplica satisfatoriamente à inativação enzimática da peroxidase.



**Figura 4.5:** Inativação térmica da peroxidase a 65°C: ajuste ao modelo de distribuição de Weibull.



**Figura 4.6:** Comportamento dos valores previstos pelo modelo versus os dados experimentais para a temperatura de 65°C.

A distribuição de Weibull, que sugere uma degradação contínua da enzima, enquanto os outros modelos sugerem uma descontinuidade da curva, é caracterizada por dois parâmetros,  $b$  e  $n$ , cujos valores obtidos são apresentados na Tabela 4.4. O parâmetro  $b$  representa a taxa de inativação: quanto maior o seu valor, mais rápida é a degradação da enzima, o que está de acordo com os valores obtidos, uma vez que o valor de  $b$  a 65°C é maior do que o seu valor a 55°C.  $n$ , por sua vez, é o chamado fator de forma: quando  $n < 1$ , como é o caso deste estudo, a curva que mostra a atividade residual

possui uma concavidade para cima, indicando o que autores chamam de efeito de rabo "*tailing phenomena*". Isso indica que existe uma fração resistente (e outra lábil) no composto de análise, o que também está de acordo com a teoria, uma vez que a peroxidase é uma isoenzima, composta por várias enzimas, umas mais termorresistentes do que outras, que apresentam a capacidade de reduzir o-dianisidina em o-quinona.

Tabela 4.4: Coeficientes da função de distribuição de Weibull.

<b>Temperatura</b>	<b>b</b>	<b>n</b>
<b>55°C</b>	0,734	0,363
<b>65°C</b>	0,807	0,437

Shalini *et al.* (2008) , ao trabalhar com a inativação da peroxidase em folhas de menta submetidas ao tratamento térmico convencional, também verificou que o processo de degradação da enzima seguia a distribuição de Weibull. Este estudo foi capaz de modelar a inativação da peroxidase numa faixa de temperatura mais abrangente, que variou de 70 a 100°C. Na temperatura de 70°C foi obtido parâmetro  $n < 1$ , mas para as demais temperaturas  $n$  foi maior que um, mostrando uma diferença no formato da curva de atividade residual obtida. Com isto, a curva possui uma concavidade para baixo.

Resultados distintos foram encontrados por Içier *et al.* (2008) ao avaliar a influência do aquecimento ôhmico na inativação da polifenoloxidase no suco de uva, que por sua vez, seguiu o modelo cinético de primeira-ordem. Essa avaliação se deu mediante a aplicação de três gradientes de tensão (20, 30 e 40 V/cm) nos aquecimentos e a adoção de quatro temperaturas de trabalho, 60, 70, 80 e 90°C. Um resultado interessante que também foi mostrado neste estudo é o fato de que a temperatura crítica de inativação da polifenoloxidase a 40V/cm foi mais baixa que a 20 e 30 V/cm.

A cinética de primeira-ordem também foi observada por Içier *et al.* (2006) ao trabalhar com a inativação de peroxidase em purê de ervilha quando submetido ao tratamento térmico. Nesse estudo foi realizado o processamento térmico por aquecimento ôhmico, onde foram variadas as tensões de trabalho (20-50 V/cm) e também foi utilizado o tratamento térmico convencional, para verificar qual seria mais efetivo na inativação enzimática. Com essa comparação foi possível constatar que o aquecimento ôhmico foi mais efetivo, inativando a peroxidase em menos tempo. As

amostras foram aquecidas de 30 a 100°C e mantidas a esta temperatura para alcançar o grau de branqueamento adequado. Foi possível verificar a diminuição da temperatura de inativação com o aumento do gradiente de tensão aplicado e também, como no trabalho citado anteriormente, foi verificada uma diminuição da temperatura de inativação com o aumento do gradiente de tensão aplicado.

Jakób *et al.* (2010) investigaram a inativação de diversas enzimas presentes no leite e em sucos de frutas e vegetais ao submeter esses alimentos ao aquecimento ôhmico usando variadas temperaturas de trabalho. Os mecanismos de inativação da fosfatase alcalina, da pectina metilesterase e da peroxidase foram determinados para cada material alimentício. Além disto, essas inativações foram comparadas com as do aquecimento convencional. Os modelos cinéticos se mantiveram iguais para ambas as formas de processamento, sendo verificadas mudanças apenas nos parâmetros dos modelos. Citando-se especificamente a peroxidase, ela seguiu uma inativação de dois passos quando analisada no brócolis, indicando a existência de uma fração lábil e outra resistente. Mais uma vez as enzimas foram inativadas mais rapidamente quando submetidas ao aquecimento ôhmico ao invés do convencional.

Mais um estudo a ser referenciado é o estudo comparativo entre a cinética de inativação enzimática sob aquecimento ôhmico e convencional desenvolvido por Castro *et al.* (2004). As enzimas testadas foram a polifenoloxidase, lipoxigenase, pectinase, fosfatase alcalina e a  $\beta$ -galactosidase. Todas as enzimas seguiram o modelo de inativação de primeira-ordem para os dois tipos de tratamento térmico, mas apenas a polifenoloxidase e a lipoxigenase foram afetadas pela ação do campo elétrico, tendo seu tempo de inativação diminuído quando submetidas ao aquecimento ôhmico. Para as demais enzimas as diferenças não foram notáveis.

Esses estudos deixam evidente a vantagem existente do aquecimento ôhmico sobre o aquecimento convencional na inativação enzimática, mostrando um grande potencial para a aplicação desta forma de processamento térmico. O mecanismo de ação da tensão aplicada sobre as enzimas ainda não foi elucidado, entretanto, os resultados da literatura demonstram que, com o aumento da tensão, esse mecanismo se intensifica.



## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho teve como objetivo determinar o melhor modelo cinético para descrever o comportamento da enzima peroxidase no suco de mirtilo, quando este é submetido ao aquecimento ôhmico a uma temperatura constante. Este modelo cinético é válido para a faixa de temperaturas trabalhadas.

O suco analisado apresentou pH igual a 3,64 e um teor de sólidos solúveis de 11,0 °Brix, valor muito semelhante ao obtido para os sólidos totais, dando um indicativo de que todos os sólidos presentes possivelmente são solúveis.

Na análise via espectrofotometria, foi possível quantificar a atividade enzimática das amostras submetidas ao aquecimento ôhmico e, a partir disto, foi verificado, como já era esperado, uma aceleração na inativação da peroxidase com o aumento da temperatura de trabalho. As temperaturas de 55 e 65°C geraram as curvas de inativação utilizadas para determinar o modelo cinético de inativação da enzima em questão. O modelo de distribuição de Weibull, que descreve uma degradação contínua da enzima, ocorrendo primeiramente inativação da parte menos resistente ao calor, sendo sucedida pela parte mais temorro resistente, foi selecionado como o modelo preditivo mais adequado para esta inativação. Este modelo se mostrou o mais satisfatório dentre os testados, mediante a adoção de alguns critérios estatísticos e por possuir apenas dois parâmetros cinéticos. Para o coeficiente de correlação,  $R^2$ , os valores obtidos foram de 0,99953 para 55°C e de 0,99743 para 65°C, e além disto, foram obtidos baixos valores para  $\chi^2$  (0,00009 e 0,00057) e S.E.M. (0,00017 e 0,00108).

O modelo de Weibull possui dois parâmetros,  $b$  e  $n$ . O parâmetro  $b$  resultou nos valores de 0,734 (55°C) e 0,807 (65°C). Quanto maior este valor, mais rápida é a degradação do composto, o que está de acordo com os resultados, uma vez que a peroxidase foi inativada mais rapidamente a 65°C do que a 55°C. Os valores obtidos para  $n$ , fator de forma, são menores que 1, mostrando a existência de uma concavidade para

cima na curva que representa a atividade residual. Isto indica a existência de uma fração mais resistente e outra lábil, o que faz sentido já que a peroxidase é uma isoenzima.

Os resultados da análise enzimática obtidos para a temperatura de 75 °C não puderam ser utilizados na modelagem da cinética de degradação, pois nesta temperatura as enzimas inativaram rapidamente, não havendo pontos suficientes para sua modelagem. Problemas com sazonalidade de lotes de mirtilo não permitiram que se avaliasse o efeito do aquecimento ôhmico sobre a enzima em uma faixa de temperatura mais ampla. Com isso, o aquecimento ôhmico se mostrou eficiente para a pasteurização do suco de mirtilo, inativando rapidamente a enzima peroxidase quando se realizou um tratamento isotérmico a 75°C. Mais estudos são necessários para a adequada utilização do aquecimento ôhmico em larga escala na indústria de alimentos visando a pasteurização de suco de frutas.

Como sugestão para trabalhos futuros propõe-se a determinação de mais uma curva de inativação para que seja possível calcular alguns parâmetros termodinâmicos deste processo. Além disto, propor um modelo cinético que seja válido para uma faixa maior de temperaturas, ampliando sua aplicabilidade. Outro aspecto que poderia vir a ser acrescentado é a comparação entre a cinética de inativação da peroxidase quando o suco é submetido ao aquecimento convencional e quando é submetido ao aquecimento ôhmico. Finalmente destaca-se a possibilidade de se averiguar a possível influência da tensão sobre a inativação enzimática, submetendo o suco a diversas tensões de aquecimento, para que dessa forma seja possível verificar se realmente a temperatura crítica de inativação é influenciada pela corrente elétrica do meio.

## 6 Referências

ADAMS, J.B. Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation. **Food Chemistry**, v. 60, nº 2, p.201-206, 1997.

AOAC. **Official method 932.12**. Gaithersburg, Estados Unidos. 2000a.

AOAC. **Official method 934.06**. Gaithersburg, Estados Unidos. 2000b.

AOAC. **Official method 981.12**. Gaithersburg, Estados Unidos. 2000c.

BURNETTE, F.S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. **Journal of Food Science**, v. 42, p1-6, 1977.

CAMPOS, A. D. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesq. agropec. bras.**, v. 39, p. 637-643, 2004.

CANO, M.P., LOBO, M.G. e DE ANCOS, B. Peroxidase and polyphenol oxidase in long term frozen stored papaya slices. Differences among hermaphrodite and female papaya fruits. **Journal of Food Science and Agriculture**, v. 76, p. 135-141, 1998.

CANTILIANO, R. F. F. e COUTINHO, E. F. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Conservação pós-colheita, p.53, 2004.

CASTRO, I., TEIXEIRA, J. A., SALENGKE, S., SASTRY, S. K. e VICENTE, A. A. The influence of field strength, sugar and solid content on electrical conductivity of strawberry products. **Journal of Food Process Engineering**, v.26, n.1, p.17-29, 2003.

CHAMARRO, J. e MOLINA, I. Oxidation of indoleacetic acid by an apparently homogeneous peroxidase from the flavedo of Washington Navel oranges (*Citrus sinensis*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 13, p. 361-375, 1989.

CHEN, C. S. E WU, M. C. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. **Journal of Food Science**, 63(5), 747–750, 1998.

CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges, **Phytochemistry**, v. 49, nº 1, p. 29-36, 1998.

CORRADINI, M. G. e PELEG, M. A model of non-isothermal degradation of nutrients, pigments and enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84(3), 217–226, 2004.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.286-576, 2008.

FDA. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies - ohmic and inductive heating: 9 p., 2000.

FORSYTH, J. L., OWUSU APENTEN, R. K. e ROBINSON, D.S. The thermo stability of purified isoperoxidases from Brassica oleracea VAR. gemmifera. **Food Chemistry**, v. 65, p. 99-109, 1999.

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

FUJIKAWA, H., e ITOH, T. Characteristics of a multicomponent firstorder model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 263–271, 1996.

GALLETTA, G.J. e BALLINGTON, J.R. Blueberry, cranberries, and lingonberries In: JANICK, J.; MOORE, J.N.[Ed]. **Fruit Breeding**. New York: John Wiley & Sons, p. 1-108, 1996.

GASPAR, T.H., PENEL, C.L., THORPE, T. e GREPPIN, H. **Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève: Université de Genève, Centre de Botanique, Genève, 313p., 1982.

GHNIMI, S., FLACH-MALASPINA, N., DRESCH, M., DELAPLACE, G. e MAINGONNAT, J. F. Design and performance evaluation of an ohmic heating unit for thermal processing of highly viscous liquids. **Chemical Engineering Research and Design**, v.86, n.6, p.626-632, 2008.

GOULLIEUX, A. e PAIN, J.-P. Ohmic heating. In: D.-W. Sun (Ed.). **Emerging technologies for food processing**. Italy: Elsevier Academic Press, 2005. Ohmic heating, p.549.

IÇIER, F. e ILICALI, C. The use of tylose as a food analog in ohmic heating studies. **Journal of Food Engineering**, v.69, n.1, p.67-77, 2005.

IÇIER, F., YILDIZ, H. e BAYSAL, T. Peroxidase inactivation and colour changes during ohmic blanching of pea puree. **Journal of Food Engineering**, v.74, n.3, p.424-429, 2006.

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

IMAI, T., UEMURA, K., ISHIDA, N., YOSHIZAKI, S. e NOGUCHI, A. Ohmic heating of japanese white radish raphanus sativus l. **International Journal of Food Science & Technology**, v.30, n.4, p.461-472, 1995.

JAKÓB, A., BRYJAK, J., WÓJTOWICZ, H., ILLEOVÁ, V., ANNUS, J. e POLAKOVIC, M. Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating. **Food Chemistry**, p. 369-376, 2010.

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.

KHAN, A. A. e ROBINSON, D.S. The thermo stability of purified mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 47, p. 53-59, 1993.

KIM, H. J., CHOI, I. M., YANG, T. C. S., TAUB, I. A., TEMPEST, P., SKUDDER, P. J., TUCKER, G. e PARROTT, D. L. Validation of ohmic heating for quality enhancement of food products. **Food Technology**, v.50, p.253-261, 1996.

KNIRSCH, M. C., ALVES DOS SANTOS, C., MARTINS DE OLIVEIRA SOARES VICENTE, A. A. e VESSONI PENNA, T. C. Ohmic heating - a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, n.9, p.436-441, 2010.

LAMIKANRA, O. e WATSON, M. A. Cantaloupe melon peroxidase: characterization and effects of additives on activity. **Nahrung**, v. 44, p. 168-172, 2000.

LENCKI, W. R., ARUL, J., e NEUFELD, R. J. Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation and decomposition on enzyme inactivation kinetics. I. First-order behavior. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p.1421–1426, 1992a.

LENCKI, W. R., ARUL, J., e NEUFELD, R. J. Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation and decomposition on enzyme inactivation kinetics. II. Biphasic and grace period behavior. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 1427–1434, 1992b.

LEWIS, M. e HEPPELL, N. **Continuous thermal processing of foods: Pasteurization and uht sterilization**. Maryland: Aspen Publishers, Inc. 465 p., 2000.

LIMA, M., HESKITT, B. F., BURIANEK, L. L., NOKES, S. E. e SASTRY, S. K. Ascorbic acid degradation kinetics during conventional and ohmic heating. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.23, n.5, p.421-443, 1999.

LOPEZ-SERRANO, M. e BARCELÓ, A. R. Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries, **Food Chemistry** v. 55, nº 2, p. 133-137, 1996.

LUDIKHUYZE, L., OOMS, V., WEEMAES, C. e HENDRICKX, M. Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. Cv. *Italica*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p.1794–1800, 1999.

MACIEL, H. P. F., GOUVEA, C. M. C. P. e PASTORE, G. M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 221-225, 2007.

MADAIL, J. C. M. e SANTOS, A. M. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Aspectos Econômicos, p.61, 2004.

MÜFTÜGİL, N. The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 877-880, 1985.

NICOLAÏ, B. M., VERBOVEN, P. e SCHEERLINCK, N. Modelling and simulation of thermal processes. In: P. Richardson (Ed.). **Thermal technologies in food processing**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. Modelling and simulation of thermal processes, p.294, 2001.

ONSA, G. H., SAARI, N., SELAMAT, J. e BAKAR, J. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from Metroxylon sagu. **Food Chemistry**, v. 85, p. 365-376, 2004.

PALANIAPPAN, S. e SASTRY, S. K. Electrical conductivity of selected juices: Influences of temperature, solids content, applied voltage, and particle size. **Journal of Food Process Engineering**, v.14, n.4, p.247-260, 1991.

PELEG, M., e PENCHINA, C. M. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 159–172, 2000.

RAMASWAMY, H. S. e CHEN, C. R. Maximising the quality of thermally processed fruits and vegetables. In: W. Jongen (Ed.). **Fruit and vegetable processing**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. Maximising the quality of thermally processed fruits and vegetables, p.206-248, 2002.

RASEIRA, M. C. B. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. Classificação botânica, descrição da planta, melhoramento genético e cultivares, p.13.

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

RUAN, R., YE, X., CHEN, P., DOONA, C. J. e TAUB, I. Ohmic heating. In: C. J. K. Henry e C. Chapman (Ed.). **The nutrition handbook for food processors**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. Ohmic heating, p.407-422, 2002.

SANT'ANNA, V., DAROIT, D. J. e BRANDELLI. Kinetic Stability Modelling of Keratinolytic Protease P45: Influence of Temperature and Metal Ions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3147-3152, 2010.

SANTOS, A. M., UENO, B., JUNIOR, C. R., FREIRE, C. J. S., GONÇALVES, E. D., COUTINHO, E. F., HERTER, F. G., MADAIL, J. C. M., PEREIRA, J. F. M., ANTUNES, L. E. C., WREGE, M. S., RASEIRA, M. C. B., RISTOW, N. C., TREVISAN, R. e CANTILLANO, R. F. F. Sistema de produção do mirtilo: Embrapa Clima Temperado, 2007.

SARKIS, J. R. **Construção de um Sistema de Aquecimento Ôhmico e sua Aplicação no Tratamento Térmico de Polpa de Mirtilo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 160 p., 2010.

SASTRY, S. K. e BARACH, J. T. Ohmic and inductive heating. **Journal of Food Science, Supplement**, v.65, n.4, p.42-46, 2000.

SASTRY, S. K. e PALANIAPPAN, S. Ohmic heating of liquid-particle mixtures. **Food Technology**, v.46, p.64-67, 1992.

SCHOKKER, E. P. e VAN BOEKEL, M. A. J. S. Kinetic Modeling of Enzyme Inactivation: Kinetics of Heat Inactivation at 90-110 °C of Extracellular Proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.4740–4747, 1997.

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

SOOJIN, J. e SASTRY, S. K. Modeling and optimization of ohmic heating of foods inside a flexible package. **Journal of Food Process Engineering**, v.28, n.4, p.417-436, 2005.

TUCKER, G. S. Food waste management and value-added products. **Journal of Food Science**, v.69, n.3, p.CRH102-CRH104, 2004.

VÁMOS VIGYÁZÓ, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.15, n.1, p.49–127, 1981.

VALDERRAMA, P., CLEMENTE, E. Isolation and thermo stability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji, **Food Chemistry** v. 87, p. 601-606, 2004.