

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**EFEITO DO CAMPO ELÉTRICO NA INATIVAÇÃO DE ENZIMAS DO CALDO DE CANA DURANTE
AQUECIMENTO ÔHMICO**

- Tese de Doutorado -

Bethania Brochier

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**EFEITO DO CAMPO ELÉTRICO NA INATIVAÇÃO DE ENZIMAS DO CALDO DE CANA DURANTE
AQUECIMENTO ÔHMICO**

Bethania Brochier

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia.

Área de concentração: Fenômenos de Transporte e Operações Unitárias.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Giovana Domeneghini Mercali

Porto Alegre

2018

Dedico este trabalho
ao meu amor Vinícius
e à nossa Luiza.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Ligia e Giovana, orientadoras deste trabalho, pelos seus conhecimentos, atenção, boa vontade e confiança durante a realização deste trabalho;

Ao meu marido por todo o amor e apoio durante esta etapa de doutorado;

À minha família e amigos que compreenderam minha ausência, sempre me incentivando;

Aos colegas do LATEPA e ao grupo de Fenômenos de Transporte e Operações Unitárias pelo convívio e amizade nesses anos;

À pesquisadora Naira Poerner Rodrigues pela colaboração e sugestões;

Aos bolsistas que me auxiliaram na seguinte ordem cronológica: Laura, Angélica, Rafaela, Bruno, Andressa e Giorgio;

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Engenharia Química pela ajuda e atenção prestada;

Ao Departamento de Engenharia Química pela estrutura física dos laboratórios disponibilizada;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a CAPES pelo suporte e financiamento;

E a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese de doutorado *Efeito do campo elétrico na inativação de enzimas do caldo de cana durante aquecimento ôhmico*, elaborada por Bethania Brochier, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Helen Treichel

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Prof. Dra. Júlia Ribeiro Sarkis

Resumo

Em razão do Brasil ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, e diante do grande potencial mercadológico dos sucos de frutas industrializados, o consumo de caldo de cana poderia ser melhor explorado. Para tanto, é necessária a melhora da qualidade higiênico-sanitária do produto e a aplicação de um processamento adequado que permita aumentar a vida útil do mesmo. O aquecimento ôhmico (AO) é uma tecnologia emergente que pode ser utilizada para pasteurizar o caldo de cana, mantendo suas características nutricionais e sensoriais, uma vez que apresenta maior taxa de aquecimento em relação ao aquecimento convencional. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do AO na inativação enzimática da peroxidase (POD), enzima responsável pelo escurecimento enzimático, na degradação de cor e na estabilidade de compostos fenólicos. Inicialmente, foram avaliados os tratamentos térmicos, convencional e ôhmico, em diferentes temperaturas (60, 70, 75 e 80 °C), mantendo o mesmo histórico de temperatura/tempo para uma possível inferência sobre os efeitos elétricos da tecnologia de aquecimento ôhmico. Nas temperaturas testadas, o campo elétrico moderado (MEF) promoveu ativação da POD a 60 °C e uma maior inativação a 80 °C, quando comparado com a tecnologia convencional; em ambas as temperaturas, após 12 minutos de tratamento, foi possível observar efeitos não térmicos uma vez que houve diferença significativa entre os tratamentos térmicos ôhmico e convencional. Por outro lado, nos tratamentos a 70 e 75 °C não houve diferença significativa entre os dois tipos de tratamento térmico. Para todas as condições de temperatura testada, não houve diferença na degradação de compostos fenólicos totais e flavonoides entre os tipos de tratamento térmico. Em uma segunda etapa do trabalho, avaliou-se a influência da frequência (10, 60, 1.000, 10.000 e 100.000 Hz), do gradiente de tensão (3,9 e 20,5 V/cm) e da forma de onda (senoidal, quadrada, triangular e pulsada) do MEF a 75 °C na inativação enzimática e na estabilidade dos compostos fenólicos. Similarmente, não foi observado efeito adicional não térmico na inativação enzimática, indicando que o MEF não alterou a configuração estrutural da POD nas condições trabalhadas; tampouco houve variação no teor de compostos fenólicos. A luminosidade do caldo não foi alterada durante a fase isotérmica, porém nas 3 condições experimentais de 10 Hz de frequência, 20,5 V/cm de tensão e onda quadrada foram observadas alterações de cor no caldo após 25 minutos de tratamento. Avaliando os mesmos parâmetros, porém a 60 e a 80 °C, verificou-se ativação (principalmente a 10 Hz) e maior inativação (principalmente a 10 kHz) da POD, respectivamente. Novamente, a cor do suco foi modificada usando baixa frequência (possivelmente devido a reações eletroquímicas) e diferentes formas de onda. Na última etapa do trabalho, diferentes frações de caldo de cana (líquido, sólido e concentrado) foram tratadas termicamente (com e sem MEF) para investigar o efeito de diferentes componentes da amostra na inativação da peroxidase. Além disso, soluções comerciais de peroxidase com e sem a adição de sacarose também foram avaliadas durante o aquecimento ôhmico e convencional. Observou-se que as amostras tratadas ohmicamente apresentaram maior inativação enzimática do que aquelas tratadas por aquecimento convencional. Além disso, a presença de açúcar promoveu um efeito protetor na estabilidade da enzima, retardando sua desnaturação. Frente ao exposto, pode-se concluir que o campo elétrico moderado apresenta um efeito adicional não térmico na ativação e inativação da enzima que pode ser explorado em diversos processos enzimáticos da indústria de alimentos. Para o caldo de cana, a tecnologia de aquecimento ôhmico pode ser aplicada como alternativa para pasteurização, evitando-

se o uso de baixas frequências e onda quadrática, sem comprometer a composição fenólica nem o aspecto visual (cor) da bebida.

Palavras-chave: aquecimento ôhmico, campo elétrico moderado, efeito não-térmico, caldo de cana, peroxidase

Abstract

The consumption of sugarcane juice could be better exploited in Brazil because the country is the world's largest producer of sugarcane and presents a great market potential for processed fruit juices. For this, it is necessary to increase its shelf life by improving the hygienic-sanitary quality of the product and by application of appropriate processing conditions. Ohmic heating (OH) is an emerging technology that can be used to pasteurize the cane juice, maintaining its nutritional and sensorial characteristics, since it presents higher heating rates when compared to the conventional heating. This study aimed to evaluate the influence of OH on peroxidase (POD) enzymatic inactivation (enzyme responsible for enzymatic browning), on color changes and on the degradation of phenolic compounds. Initially, conventional (CH) and OH treatments were evaluated at different temperatures (60, 70, 75 and 80 °C). Both technologies were applied with the same temperature profile, allowing inferences about the electrical effects of the OH technology. The moderate electric field promoted an activation effect on POD activity at 60 °C (close to the optimum temperature of the enzyme) and an extra inactivation effect at 80 °C after 12 minutes of treatment. For these two temperatures, it was possible to observe non-thermal effects since there was a significant difference between the CH and OH thermal treatments. On the other hand, for treatments at 70 and 75 °C, there were no significant differences between the two types of thermal treatments. Moreover, for all temperatures, no differences in the degradation of total phenolic and flavonoids compounds between OH and CH treatments were observed. In the second stage of the study, the influence of the frequency (10, 60, 10³, 10⁴ and 10⁵ Hz), voltage gradient (3.9 e 20.5 V/cm) and the waveform (sinusoidal, square, triangular and pulsed) of the moderate electric field (MEF) at 75 °C on POD inactivation and stability of the phenolic compounds was evaluated. Similarly, no additional non-thermal effect on enzymatic inactivation was observed, indicating that MEF did not alter the structural configuration of POD under the analyzed conditions; moreover, there were no variation in the phenolic compounds content. The luminosity of the juice was not altered during the isothermal phase, however, with the use of the 3 experimental conditions, 10 Hz, 20.5 V/cm and square wave, color changes were observed in the beverage after 25 minutes of treatment. The same evaluation was performed for temperatures of 60 and 80 °C; results showed MEF effect on POD activation (mostly at 10 Hz) and inactivation (mainly at 10 kHz), respectively. Again, the juice color was modified using low frequency (possibly due to electrochemical reactions) and different waveforms. In the last part of the study, different fractions of cane juice (liquid, solid and concentrate) were thermally treated (with and without MEF) to investigate the effect of different components of the sample on inactivation of peroxidase. In addition, commercial solutions of peroxidase with and without the addition of sucrose were also evaluated during CH and OH. It was observed that the ohmically treated samples showed greater enzymatic inactivation than those treated by conventional heating. Furthermore, the presence of sugar promoted a protective effect on the stability of the enzyme, delaying its denaturation. Overall, results demonstrated that MEF showed an additional effect on POD activation and inactivation which can be used in many enzymatic processes of food industry. For sugar cane juice, the OH technology can be applied as an alternative for pasteurization, avoiding low frequencies and square waveform, without compromising the phenolic composition and the visual appearance (color) of the beverage.

Keywords: ohmic heating, moderate electric field, non-thermal effect, sugarcane juice, peroxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Cana-de-açúcar em diversas fases de desenvolvimento.....	7
Figura 3.2 – Estrutura geral dos flavonoides identificados na cana-de-açúcar.	17
Figura 3.3 – Estrutura química da quercetina.....	19
Figura 3.4 – Reação catalisada pela POD.	23
Figura 3.5 – Reação de escurecimento enzimático catalisada pela PPO.	24
Figura 3.6 – Esquema de agregação de proteínas, resultando em inativação.	25
Figura 3.7 – Esquema de troca tiol-dissulfeto intermolecular.	26
Figura 3.8 – Movimentos moleculares simulados de PME em resposta a campos elétricos alternados.	34
Figura 3.9 – Principais formas de onda.	37
Figura 3.10 – Gráfico-história de uma onda senoidal.	38
Figura 3.11 – Decomposição harmônica de onda quadrada.	38
Figura 4.1 – Diagrama esquemático do sistema I de aquecimento ôhmico.	48
Figura 4.2 – Diagrama esquemático do sistema II de aquecimento ôhmico.	49
Figura 4.3 – Evolução da temperatura durante os experimentos via aquecimento convencional e ôhmico do caldo de cana.	50
Figura 4.4 – Evolução da temperatura durante os aquecimentos convencional e ôhmico do caldo de cana a diferentes frequências.....	52
Figura 4.5 – Evolução da temperatura durante os aquecimentos convencional e ôhmico do caldo de cana com diferentes formas de onda.	53
Figura 4.6 – Evolução da temperatura do caldo de cana durante os experimentos com diferentes tensões a 75 °C.....	54
Figura 4.7 – Estrutura básica de um flavonoide (a) e esquema representativo da complexação de flavonoides com o íon Al ³⁺ (b).	61
Fig. 1 – Temperature profile of sugarcane juice during conventional (grey lines) and ohmic (black lines) heating experiments.....	71
Fig. 2 – POD residual activity over time for sugarcane juice during conventional (empty symbols) and ohmic (filled symbols) heating at 60 °C (diamond), 70 °C (triangle), 75 °C (circle) and 80 °C (square). 75	75
Fig. 3 – Experimental and predicted POD residual activity values for sugarcane juice: conventional (empty symbols) and ohmic (filled symbols) heating at 70 °C (triangle) and 80 °C (square).	78
Fig. 4 – Parity between experimental and predicted data values for sugarcane juice: conventional (empty symbols) and ohmic (filled symbols) heating at 70 °C (triangle), 75 °C (circle) and 80 °C (square).	79

Fig. 1 – Schematic diagram of the ohmic heating setup	90
Fig. 2 – Flowchart of the experiments.....	90
Fig. 3 – Temperature profile of sugarcane juice during conventional and ohmic heating experiments with frequencies varying from 10 to 10 ⁵ Hz.	92
Fig. 4 – Experimental and predicted POD residual activity values for sugarcane juice during conventional and ohmic heating: different electric field frequencies (a and b), (c) waveforms and (d) voltage gradients.	94
Fig. 5 – Residual content of total phenolic compounds of sugarcane juice after conventional and ohmic heating with different waveforms.....	99
Fig. 6 – Absorbance spectrum of the fresh sample and samples treated for 0 and 25 min at 3.9 and 20.5 V/cm.	102
Fig. 1. Flowchart of the experiments.....	109
Fig. 2. Temperature profile of sugarcane juice during conventional and ohmic heating experiments with frequencies varying from 10 to 10 ⁵ Hz.	110
Fig. 3. Experimental POD residual activity values for sugarcane juice during CH and OH at 60 °C: different (a) electric field frequencies, and (b) voltage gradients.....	114
Fig. 4. Experimental (points) and predicted (lines) POD residual activity values for sugarcane juice during CH and OH at 80 °C: different (a) electric field frequencies, (b) waveforms and (c) voltage gradients.....	115
Fig. 1. Temperature profile of concentrated fraction during OH and CH.	127
Fig. 2. Zymogram of the POD sugarcane juice.....	129
Fig. 3. Experimental and predicted POD residual activity for the liquid, solid and concentrated fractions during OH and CH.....	130
Fig. 4. Experimental and predicted POD residual activity values for the HRP solution with and without sucrose during conventional and ohmic heating	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição do caldo de cana.	9
Tabela 3.2 – Classificação de diferentes compostos fenólicos.	13
Tabela 3.3 – Grupos de flavonoides.	15
Tabela 3.4 – Estrutura dos flavonoides (Figura 3.2) identificados no caldo de cana-de-açúcar.....	17
Tabela 3.5 – Mecanismo de oxidação de flavonóis.....	20
Tabela 3.6 – Modelos cinéticos de inativação enzimática.	29
Tabela 4.1 – Binômios de tensão e temperatura do banho frio para manutenção de 75 °C.	54
Tabela 5.1 – Caracterização do caldo de cana <i>in natura</i>	65
Table 1 – Kinetic equations used to predict enzymatic inactivation.....	73
Table 2 – Fresh sugarcane juice characterization.	74
Table 3 – Statistical parameters of the kinetic models describing POD inactivation during ohmic and conventional heating (70-80 °C).....	77
Table 4 – Coefficients of Weibull model.	79
Table 5 – Residual phenolic content after treatments.	82
Table 1 – Fresh sugarcane juice characterization.	93
Table 2 – Coefficients of the Weibull distribution model.	95
Table 3 – CIELAB parameters for sugarcane juice treated with different voltage gradients.....	101
Table 1 – Fresh sugarcane juice characterization.	108
Table 3 – CIELAB a^* parameter for sugarcane juice treated by CH and OH at 60 °C.....	118
Table 4 – CIELAB a^* and b^* parameters for sugarcane juice treated by CH and OH at 80 °C.	119
Table 1 – Fresh sugarcane juice characterization.	125
Table 2 – Coefficients of the Weibull distribution model.	131
Table 3 – Coefficients of the Weibull distribution model for experiments conducted with comercial peroxidase solutions.	134

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>A</i>	atividade enzimática
A_0	atividade enzimática inicial
A/A_0	atividade enzimática residual
a^*	parâmetro de cor, entre o verde e o vermelho
AO	aquecimento ôhmico
b^*	parâmetro de cor, entre o azul e o amarelo
<i>C</i>	concentração mássica
<i>CH</i>	<i>conventional heating</i>
χ^2	chi-quadrado
<i>EC</i>	<i>Enzyme Commission</i>
ΔE^*	diferença total de cor
<i>k</i>	constante da taxa de degradação
L^*	parâmetro de cor, luminosidade
MEF	<i>moderate electric field</i>
MHS	movimento harmônico simples
<i>n</i>	número de observações
OH	<i>ohmic heating</i>
PG	poligalacturonase
PME	pectina metilesterase
POD	peroxidase
PPO	polifenoloxidase
R^2	coeficiente de determinação
REM _Q	raiz do erro médio quadrático
RM	Reação de Maillard
RMSE	root mean square error
rpm	rotação por minuto
σ	condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
<i>t</i>	tempo (s) ou (min)
<i>T</i>	temperatura (°C) ou (K)

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2 – OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
Capítulo 3 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Cana-de-açúcar.....	6
3.1.1 Cultura	6
3.1.2 Histórico e aspectos econômicos	7
3.2 Caldo de cana	8
3.3 Cor	11
3.4 Compostos fenólicos	12
3.4.1 Flavonoides.....	15
3.4.2 Composição fenólica da cana-de-açúcar	16
3.4.3 Mecanismos de degradação de compostos fenólicos.....	18
3.5 Enzimas endógenas	21
3.5.1 Peroxidase	22
3.5.2 Polifenoloxidase.....	23
3.5.3 Inativação enzimática	24
3.6 Modelos cinéticos de inativação enzimática.....	28
3.7 Aquecimento ôhmico	31
3.7.1 Frequência do campo elétrico moderado	33
3.7.2 Forma de onda.....	37
3.7.3 Efeito do AO sobre as enzimas	39
3.7.4 Efeito sobre compostos bioativos	43
Capítulo 4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Preparo das amostras.....	45
4.1.1 Centrifugação.....	46
4.1.2 Concentração do caldo de cana.....	46
4.1.3 Enzima comercial.....	46
4.2 Análises físico-químicas.....	47
4.3 Tratamento térmico via de aquecimento ôhmico e convencional	47

4.3.1	Estudo do efeito da temperatura	49
4.3.2	Estudo do efeito da frequência do MEF	51
4.3.3	Estudo da influência da forma da onda do MEF	52
4.3.4	Estudo do efeito do gradiente de tensão	53
4.3.5	Estudo com o caldo de cana fracionado e concentrado e com enzima comercial	55
4.4	Análise da atividade enzimática	55
4.4.1	Peroxidase (POD)	56
4.4.2	Polifenoxidase (PPO)	57
4.4.3	Pectinametilesterase (PME)	57
4.4.4	Pectinase total	58
4.5	Zimograma	59
4.6	Compostos fenólicos totais	59
4.7	Flavonoides totais	60
4.8	Antocianinas monoméricas totais	62
4.9	Análise de cor	63
4.10	Análise estatística	63
Capítulo 5 – RESULTADOS		65
5.1	Caracterização das amostras	65
5.2	Artigo 1	68
5.2.1	Introduction	68
5.2.2	Materials and methods	70
5.2.3	Results	74
5.2.4	Conclusion	83
5.3	Artigo 2	87
5.3.1	Introduction	87
5.3.2	Materials and methods	89
5.3.3	Results and discussion	93
5.3.4	Conclusion	102
5.4	Artigo 3	106
5.4.1	Introduction	106
5.4.2	Materials and methods	108
5.4.3	Results and discussion	112
5.4.4	Conclusion	119
5.5	Artigo 4	123

5.5.1	Introduction	123
5.5.2	Materials and methods.....	125
5.5.3	Results and discussion	128
5.5.4	Conclusion	135
Capítulo 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DESTE TRABALHO.....		139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		142

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil é o maior produtor do vegetal, com produção estimada em, aproximadamente, 625,96 milhões de toneladas cultivadas em quase 9 milhões de hectares na safra de 2018/19. Esse feito coloca o país na liderança mundial em tecnologia de produção de etanol e açúcar, além do aproveitamento de subprodutos e resíduos, como o bagaço, a torta de filtro, o melaço e a vinhaça, utilizados para cogeração de energia elétrica, fabricação de ração animal e fertilizante para as lavouras (CONAB, 2018).

O caldo de cana, obtido através da moagem da cana-de-açúcar, é popular em muitos países por ser uma bebida doce e barata; porém, sabe-se que a comercialização do caldo destinado ao consumo humano é praticada, predominantemente, no mercado informal, o que acaba dificultando o acesso a estatísticas acerca de seu consumo. Segundo Oliveira *et al.* (2007), o caldo de cana é caracterizado como uma bebida energética, não alcoólica, de gosto doce e agradável, opaca, de baixa acidez, com coloração que varia de parda a verde escura, composição variável em função da variedade, idade e sanidade da cana, solo, condições climáticas e práticas agrícolas. Quanto à sua composição nutricional, contém vitaminas (principalmente B6 e C), minerais (Ca, Fe, P, Mg, Mn, K e Zn) (UNICAMP, 2011) e compostos fenólicos, principalmente, ácidos fenólicos e flavonoides (Payet *et al.*, 2006). Os polifenóis são metabólitos secundários constituintes de um dos grupos de fitoquímicos que ocorrem mais amplamente na natureza. Estes compostos têm funções fisiológicas e morfológicas consideráveis em plantas. Além disso, os polifenóis exibem muitas propriedades biológicas, tais como anti-inflamatória, antialérgica, antibacteriana, antimicrobiana, cardioprotetora e antioxidante (Havsteen, 2002).

O processamento e a comercialização do caldo de cana são limitados devido a sua rápida deterioração (YUSOF; SHIAN; OSMAN, 2000), uma vez que o caldo é considerado um ótimo substrato para o desenvolvimento de um amplo espectro microbiano por conter nutrientes orgânicos e

inorgânicos, apresentar alta atividade de água e baixa acidez (Gallo e Canhos, 1991). Após 24 horas da extração, mesmo armazenado sob refrigeração, o caldo de cana *in natura* apresenta sedimentação e sinais de alteração em suas características sensoriais (deterioração de sabor e de aparência), principalmente devido à fermentação e ao escurecimento enzimático. Esse último contribui significativamente para alterações de cor, que se iniciam logo após a sua extração (Qudsieh *et al.*, 2002; Yusof *et al.*, 2000).

A ação de enzimas naturalmente presentes no caldo de cana, como a polifenoloxidase (PPO) e a peroxidase (POD), promove alterações indesejáveis na cor, na textura, no sabor, no aroma e na composição nutricional. A POD é uma enzima naturalmente presente em vegetais, com elevada resistência térmica, sendo, portanto, usada em testes padrões de determinação de parâmetros de pasteurização (Jakób *et al.*, 2010). A PPO é uma enzima oxidoredutase que, na presença de oxigênio, catalisa a oxidação de compostos *o*-fenólicos em *o*-quinonas, que são posteriormente polimerizados em pigmentos escuros (Van Loey, Verachtert e Hendrickx, 2001).

O desenvolvimento de tratamentos ou procedimentos eficazes para manter a qualidade microbiológica, nutricional e sensorial do caldo de cana permitiria uma comercialização mais ampla do produto (Mao, Xu e Que, 2007). Uma tecnologia emergente na indústria alimentícia é o aquecimento ôhmico; trata-se de um processo que consiste na passagem de corrente elétrica alternada através de um alimento com a finalidade principal de aquecimento através da geração interna de energia. Devido à sua inerente resistência elétrica, o alimento transforma energia elétrica em térmica, promovendo, assim, um aumento de temperatura em seu interior (Resnick, 1996; Sastry, 2008). Essa tecnologia mostra-se favorável em relação aos processos convencionais na indústria, pois permite a manutenção da qualidade nutricional e sensorial e pode possibilitar maior eficiência e rapidez em relação aos processos comumente realizados (Castro *et al.*, 2004; Sastry, 2008). Esta característica faz com que o aquecimento ôhmico seja um tratamento adequado particularmente para caldo de cana, uma vez que ele contém componentes de sabor e aroma sensíveis que são facilmente destruídos em tempos de tratamento mais longos (Saxena, Makroo e Srivastava, 2016). Além disso, respostas acerca do efeito do campo elétrico moderado sobre a atividade enzimática e na estabilidade de compostos bioativos ainda são pouco conhecidas, portanto, uma motivação adicional para a realização dessa pesquisa foi investigar os efeitos não-térmicos do aquecimento ôhmico no processo de inativação de enzimas.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do aquecimento ôhmico na inativação enzimática de POD e de PPO. Além disso, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação dessa tecnologia em aspectos nutricionais e sensoriais do caldo de cana, através do estudo da degradação de compostos fenólicos totais e de flavonoides e da estabilidade da cor.

O presente trabalho está estruturado da forma descrita a seguir. No Capítulo 2 são apresentados, detalhadamente, os objetivos deste trabalho. O Capítulo 3 apresenta uma revisão da literatura sobre o caldo de cana, sua composição fenólica, as enzimas nativas POD e PPO e os modelos cinéticos usados para descrever a inativação enzimática. Além disso, são abordados os fundamentos teóricos relativos à tecnologia de aquecimento ôhmico e às variáveis que influenciam nesse processo. O Capítulo 4 aborda detalhadamente os materiais e métodos utilizados nos ensaios e nas determinações analíticas realizadas. O Capítulo 5 apresenta os resultados obtidos na forma de quatro artigos científicos: o primeiro constituiu em avaliar a inativação enzimática e a degradação de compostos fenólicos em diferentes temperaturas; o segundo abordou o estudo de diferentes frequências, gradientes de tensão e formas de onda do campo elétrico moderado. No artigo 3, foi feito um estudo mais aprofundado para um melhor entendimento dos efeitos do campo elétrico moderado na ativação e inativação enzimática. No último artigo, foi estudada a influência do AO sobre a POD de algumas frações do caldo de cana (líquida, sólida e concentrada), além de testes com a enzima comercial, na presença ou não de sacarose. Além disso, neste capítulo são discutidos alguns resultados referentes a um trabalho que avaliou a regeneração da POD em amostras tratadas e armazenadas sob refrigeração. Por fim, o Capítulo 6 apresenta as considerações finais e as sugestões para a continuidade deste trabalho.

Capítulo 2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a aplicação de aquecimento ôhmico (AO) como uma tecnologia alternativa à pasteurização convencional de caldo de cana, através da avaliação da inativação enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase, da estabilidade dos compostos fenólicos totais e da alteração do atributo sensorial de cor.

2.2 Objetivos específicos

O presente trabalho tem como objetivos específicos:

- avaliar a cinética de inativação enzimática e definir o modelo que melhor descreve os dados experimentais para usá-lo para a comparação entre os tratamentos;
- estudar os efeitos não térmicos da tecnologia de aquecimento ôhmico, através da comparação com ensaios utilizando as tecnologias convencionais de pasteurização;
- testar diferentes temperaturas, frequências, tensões e formas de onda para compreender os efeitos das diferentes variáveis de processo nas características de qualidade do caldo de cana;
- avaliar a degradação de compostos fenólicos e alterações de cor nas diferentes condições testadas;
- investigar o efeito protetor do açúcar na inativação da POD, avaliando o comportamento de diferentes frações do caldo de cana durante a aplicação do aquecimento ôhmico;

- estudar o comportamento da POD comercial na presença e na ausência de açúcar durante a aplicação do aquecimento ôhmico.

- propor uma tecnologia para a conservação do caldo de cana, determinando as condições ideais de pasteurização com o uso da tecnologia de aquecimento ôhmico.

Capítulo 3 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são abordados aspectos relacionados à cana-de-açúcar e ao caldo de cana, com referência à nutrição, composição e quesitos de qualidade. Também serão apresentadas informações sobre as enzimas endógenas do caldo de cana, informações sobre sua inativação, incluindo os modelos cinéticos aplicados. Na sequência, é apresentada uma revisão sobre a tecnologia de aquecimento ôhmico e suas variáveis.

3.1 Cana-de-açúcar

3.1.1 Cultura

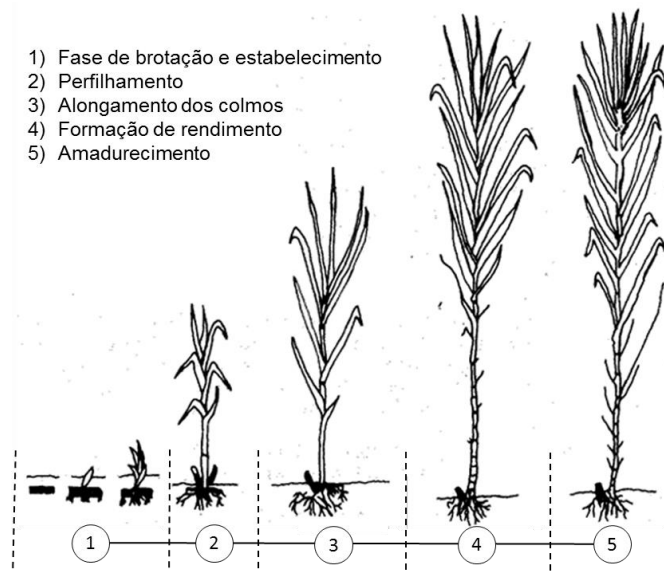
A cana-de-açúcar (*Saccharum*) é uma planta tropical pertencente à família das gramíneas ou poáceas, juntamente com os gêneros *Zea* e *Sorghum*. A cana-de-açúcar moderna, assim denominada por alguns pesquisadores, é considerada um híbrido complexo entre duas ou mais espécies do gênero *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule* e *S. robustum*) (Chen e Chou, 1993). No Brasil, a espécie mais plantada é a *Saccharum officinarum*, por apresentar baixo conteúdo de fibras e alto teor de sacarose (Fagundes, 2010). A cultura da cana-de-açúcar ocorre predominantemente em regiões de clima tropical e subtropical, dentro de uma latitude de 35° ao norte e ao sul da linha do equador (FAO, 2016).

A planta é uma gramínea perene, que se perfilha* na base, produzindo múltiplos caules, possui de três a quatro metros de altura e cerca de cinco centímetros de diâmetro (Meade e Chen, 1977). De forma geral, a cana é constituída de um sistema radicular, onde se encontra a parte morfológica de interesse comercial: os colmos – onde a sacarose é predominantemente estocada. Além disso, possui folhas dispostas ao redor da cana, nos nódulos intercolmos e também na parte superior da planta, onde se localiza a gema apical (palmito) (Mantelatto, 2005).

*Perfilhos são ramos laterais que se desenvolvem a partir das gemas axilares dos nós que se localizam abaixo da superfície do solo. Os perfilhos, morfológicamente idênticos ao colmo principal, são capazes de formar seu próprio sistema radicular, nós, entrenós, folhas, espigas e pendão.

A Figura 3.1 apresenta um desenho da planta durante seu desenvolvimento. A cultura floresce sob uma temporada de crescimento longa e quente, com alta incidência de radiação e umidade adequada, seguida de um período de maturação e colheita seco, ensolarado e mais frio. A temperatura ótima para a germinação do caule é de 32 a 38 °C. Um crescimento ótimo é alcançado com as temperaturas diárias médias entre 22 e 30 °C. A temperatura mínima de crescimento ativo é de aproximadamente 20 °C. Para a maturação, são desejáveis temperaturas relativamente mais baixas, no intervalo de 20 a 10 °C, em que ocorre a redução da taxa de crescimento vegetativo e o enriquecimento de sacarose na cana (FAO, 2016).

Figura 3.1 – Cana-de-açúcar em diversas fases de desenvolvimento.



Fonte: Kuyper (1952) apud FAO (2016).

3.1.2 Histórico e aspectos econômicos

A cana-de-açúcar tem importância desde os primórdios na história do país, acompanhando o descobrimento do Brasil desde o período colonial. Dessa forma, a cultura tem um papel respeitável na economia brasileira, dando início a um dos mais bem sucedidos negócios da história do país com produtos advindos do setor (Carvalho *et al.*, 2013).

A cana é originária da região leste da Indonésia (na Nova Guiné) e, ao longo de muitos séculos, disseminou-se para várias ilhas do sul do Oceano Pacífico, Indochina, Arquipélago da Malásia e Bengala, aparecendo como planta produtora de açúcar na Índia tropical. Os Persas foram os primeiros a desenvolver técnicas de produção do açúcar, estabelecendo as “rotas do açúcar” entre os países asiáticos e africanos (Delgado-Andrade *et al.*, 2010).

No Brasil, a cana-de-açúcar foi introduzida na Capitania de São Vicente em São Paulo, por Martin Affonso de Souza no ano de 1530. As principais regiões de cultivo em ordem decrescente de produção são Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Sul, permitindo duas safras ao ano e, conseqüentemente, produção de açúcar e etanol para os mercados interno e externo (Carvalho *et al.*, 2013; CONAB, 2018). Atualmente, o país é o maior produtor mundial do vegetal (representando 41% da produção de 2016), seguido por Índia (18%), China (6%) e Tailândia (5%) (FAO, 2018).

No Rio Grande do Sul, a cana-de-açúcar foi introduzida no litoral norte, onde hoje é a região de Santo Antônio da Patrulha, através da colonização basicamente açoriana durante o século XVIII. Cabe destacar que a cana e seus derivados impulsionaram a economia daquele povoado; os primeiros engenhos foram criados por volta de 1800 (Prefeitura Municipal Santo Antônio da Patrulha, 2016).

A cana-de-açúcar é uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais devido à grande contribuição socioeconômica que sua exploração representa em razão de armazenar grande quantidade de sacarose (Stupiello, 1987). Além disso, a cultura da cana-de-açúcar é de grande versatilidade, sendo utilizada desde a forma mais simples, como ração animal, até a mais nobre, como o açúcar. Na cana, nada se perde: do caldo se obtém o açúcar, a cachaça, o álcool, a rapadura e outros; do bagaço, o papel, a ração, o adubo ou o combustível; das folhas, a cobertura morta ou ração animal. Assim, a agroindústria da cana-de-açúcar direciona-se a integrar os sistemas de produção alimentar, não alimentar e energético, envolvendo atividades agrícolas e industriais (Vasconcelos, 2002).

3.2 Caldo de cana

Além de produzir açúcar, álcool combustível, cachaça e servir para alimentação animal, a cana-de-açúcar pode ainda ser utilizada para a produção de garapa ou caldo de cana (Braz, 2003). O caldo é obtido por um processo físico de separação do bagaço, através da moagem em moendas elétricas ou manuais. Na sequência, o produto é coado em peneiras metálicas e imediatamente servido com gelo, podendo ser consumido puro ou adicionado de suco de frutas ácidas. O produto é normalmente comercializado por vendedores ambulantes, denominados garapeiros, em vias públicas, parques, praças e feiras (Soccol, Schwab e Kataoka, 1990; Lubatti, 1999; Prati, Moretti e Cardello, 2005).

O caldo de cana é uma bebida energética, não alcoólica, nutritiva, muito apreciada no Brasil,

principalmente nos períodos mais quentes do ano devido às suas características de refrescância e sabor doce (Soccol *et al.*, 1990; Lubatti, 1999). A bebida é caracterizada como um líquido viscoso, opaco, de coloração que varia de parda a verde escura (Oliveira *et al.*, 2007).

A composição da cana-de-açúcar varia de acordo com o clima, tipo de solo, irrigação, fertilizantes, insetos, controle de doenças, variedades e o período de colheita (Meade e Chen, 1977). Segundo Stupiello (1987), o caldo de cana é constituído basicamente por água (80%) e sólidos totais dissolvidos (20%). Dos sólidos totais, destacam-se os açúcares – sacarose (17%), glicose (0,4%) e frutose (0,2%); outros compostos orgânicos, tais como substâncias nitrogenadas, gorduras, ceras, pectinas, ácidos orgânicos e matérias corantes; e a matéria inorgânica, representada pelas cinzas. Segundo Marques *et al.* (2008), os sais inorgânicos compreendem SiO₂, K₂O, CaO, MgO, entre outros. A Tabela 3.1 apresenta a composição do caldo de cana de acordo com a tabela brasileira de composição de alimentos (UNICAMP, 2011).

Tabela 3.1 – Composição do caldo de cana.

Nutriente	Teor	Nutriente	Teor	Nutriente	Teor
Umidade	81,7 %	Cálcio	9 mg/100 g	Cobre	0,01 mg/100 g
Energia	65 kcal - 273 kJ	Magnésio	12 mg/100 g	Zinco	0,1 mg/100 g
Proteína	traços	Manganês	0,21 mg/100 g	Tiamina	traços
Lipídeos	traços	Fósforo	5 mg/100 g	Riboflavina	traços
Carboidrato	18,2 g/100 g	Ferro	0,8 mg/100 g	Piridoxina	0,03 mg/100 g
Fibra Alimentar	0,1 g/100 g	Sódio	traços	Niacina	traços
Cinzas	0,1 g/100 g	Potássio	18 mg/100 g	Vitamina C	2,8 mg/100 g

Fonte: UNICAMP (2011).

Apesar de sua rica composição, o processamento e a comercialização do caldo de cana são limitados devido à sua rápida deterioração (Yusof, Shian e Osman, 2000), uma vez que o produto é considerado um ótimo substrato para o desenvolvimento de um amplo espectro microbiano por conter nutrientes orgânicos e inorgânicos, por apresentar alta atividade de água e pH de 5,0 a 5,5 (Gallo e Canhos, 1991). Os microrganismos mais importantes, presentes no caldo de cana, são essencialmente oriundos do solo e do ambiente atmosférico, destacando-se as leveduras e os fungos filamentosos e as bactérias lácticas e esporuladas (Oliveira *et al.*, 2007); salienta-se que, quando se trata da venda informal do caldo, a contaminação também pode ocorrer devido às más condições de higiene da moenda e de utensílios utilizados na extração e ao servir o caldo.

Em razão de o Brasil ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e diante do grande potencial mercadológico dos sucos de frutas industrializados, o consumo de caldo de cana poderia ser melhor explorado. Para tanto, é necessária a melhora da qualidade higiênico-sanitária do produto e a aplicação de um processamento adequado que permita aumentar a vida-de-prateleira do mesmo. Isso permitiria que o caldo de cana pudesse ser comercializado e embalado, pronto para o consumo, facilitando sua utilização em redes de alimentação (Oliveira *et al.*, 2007). Após 24 horas da extração, mesmo armazenado sob refrigeração, o caldo de cana *in natura* apresenta sedimentação e sinais de alteração em suas características sensoriais (deterioração de sabor e de aparência), principalmente devido à fermentação e ao escurecimento enzimático. Esse último contribui significativamente para alterações de cor do caldo de cana, que se inicia logo após a sua extração (Kort, 1979; Qudsieh *et al.*, 2002; Yusof *et al.*, 2000).

Mao *et al.* (2007) estudaram as mudanças físico-químicas no caldo de cana armazenado a 10 °C. Os resultados demonstraram que o branqueamento dos caules antes da extração do caldo preveniu efetivamente o escurecimento enzimático e reduziu as atividades da PPO e da invertase (enzima que catalisa a hidrólise da sacarose). A adição de ácido ascórbico retardou o aumento de açúcares redutores, assim como da acidez titulável, da viscosidade e a contagem total de microrganismos, e preveniu o escurecimento enzimático do caldo *in natura*, que apresentou atividades enzimáticas reduzidas durante o armazenamento. Os pesquisadores concluíram que a adição de 0,1% de ácido ascórbico foi mais eficiente do que o branqueamento dos caules da cana, possibilitando a manutenção da qualidade do produto *in natura* por até cinco dias a 10 °C.

Há diversas referências sobre o uso de preservativos naturais no caldo de cana, como a adição de limão, gengibre (Kaavya *et al.*, 2018; Ramachandran *et al.*, 2017) e polpa de maracujá (acidificação do caldo) (Kunitake *et al.*, 2014). Estes são usados, principalmente, por serem mais acessíveis, mais nutritivos e não causarem riscos à saúde (Kaavya *et al.*, 2018). Alguns resultados demonstraram boa estabilidade da bebida refrigerada por até uma semana, após tratamento térmico a 72 °C por 15 s, com adição de 3 mL de suco de limão e de 0,6 mL de gengibre, que agiram como realçadores de cor e de sabor (Ramachandran *et al.* 2017).

Tratamentos térmicos convencionais conferem um sabor de melado ao caldo, afetando adversamente seu sabor característico. Chauhan, Tyagi e Balyan (2002) realizaram estudos de preservação do caldo de cana para se obter uma bebida pronta para consumo, com boa aceitação sensorial. A pasteurização do caldo de cana a 70 °C durante 10 minutos, seguida da adição de agentes de conservação (ácido cítrico - 40 mg/100 mL, ácido ascórbico - 40 mg/100 mL, e metabisulfito de potássio - 150 ppm), conferiu ao produto, acondicionado em garrafas previamente esterilizadas, estabilidade de 90 dias sob refrigeração. Trabalhos realizados por Bhupinder, Sharma e

Harinder (1991) mostraram que o tratamento térmico (80 °C / 10 minutos), seguido da adição de 140 mg/L de metabissulfito de potássio, 3% de suco de limão e 1% de extrato de gengibre, conferiu uma estabilidade de 24 semanas (168 dias) ao produto engarrafado e um bom índice de aceitação entre provadores.

A tecnologia de aquecimento ôhmico, melhor descrita na sequência deste trabalho, tem sido pesquisada na Índia, segundo produtor mundial de cana-de-açúcar. O grupo de pesquisa de Saxena *et al.* (2016) tem trabalhos avaliando a inativação de PPO e estabilidade da cor do caldo com os tratamentos convencional e ôhmico. Outro grupo de pesquisa indiano (Abhilasha e Pal, 2018) pesquisou o efeito do aquecimento ôhmico na carga microbiana e na inativação da PPO, com resultados positivos para a tecnologia.

Outras tecnologias emergentes também têm sido estudadas para evitar o escurecimento e demais injúrias ao caldo de cana. Sreedevi, Jayachandran e Rao (2018) trataram o caldo de cana extraído sob pressão (300 a 600 MPa), acompanhado de temperaturas (30 a 60 °C), para tempos de tratamento de 10 a 25 minutos. O processo de alta pressão hidrostática (HHP) reduziu o índice de escurecimento do caldo de cana em até 22%. A perda máxima de ácido ascórbico após HHP a 600 MPa / 60 °C / 25 min foi relatada como sendo 25% do nível inicial. Nas mesmas condições, os fenólicos totais foram retidos nas amostras de caldo tratado, enquanto que a atividade antioxidante reduziu em 10%. Também foi observada a destruição total de mesófilos aeróbios e bolores e leveduras a 600 MPa a 30 °C por um tempo de tratamento de 20 min.

O caldo de cana pôde ser armazenado por 14 dias quando tratado com campo elétrico pulsado (PEF) sob condições de processamento de 20 kV/cm, 150 pulsos, na presença de limão e gengibre. Não houve mudanças significativas no conteúdo de nutrientes e contaminantes microbianos do caldo tratado sob a condição de armazenamento de 4 °C (Kayalvizhi *et al.*, 2016). Os autores relataram que o processamento de PEF aumentou significativamente a segurança microbiológica e a estabilidade do caldo de cana, reduzindo as mudanças desfavoráveis e mantendo os atributos nutricionais e sensoriais da bebida.

3.3 Cor

Dentre os principais pigmentos da cana-de-açúcar que aparecem no caldo, destacam-se as clorofilas (pigmentos fotossintéticos verdes), caroteno (amarelo), xantofilas (amarelo) e os flavonoides (flavonas, flavonois, chalconas, catequinas e antocianinas) (Mersad *et al.*, 2003; Rupa e

Asokan, 2008). De acordo com Iaderoza e Draetta (1991), a coloração amarelada do caldo de cana está ligada à degradação da clorofila. O meio ácido faz com que a tonalidade verde se torne amarela, pois a interação da clorofila com ácido resulta na perda do magnésio das clorofilas, sendo substituído por um próton fornecido pelos ácidos. Em frutas e hortaliças ocorre a mudança do verde para marrom.

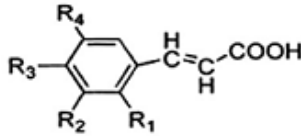
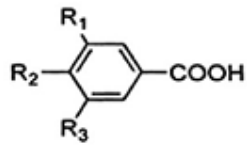
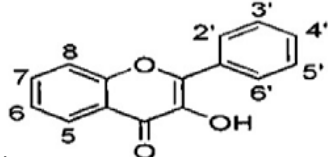
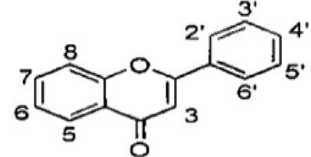
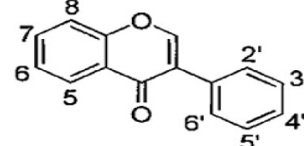
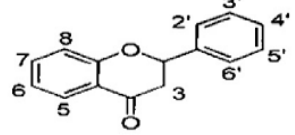
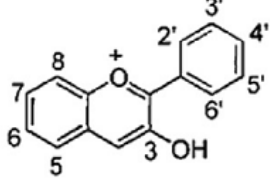
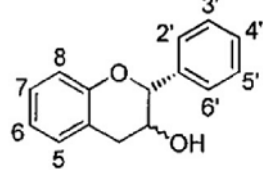
A coloração do caldo de cana pode sofrer alterações logo após sua extração. O escurecimento está ligado à reação de Maillard, que ocorre entre açúcares redutores e aminoácidos presentes na cana, formando pigmentos escuros, as melanoidinas. Outra reação que causa o escurecimento do produto é a ação de enzimas, polifenoloxidase e peroxidase, que oxidam compostos fenólicos presentes no caldo; a polifenoloxidase é a enzima que apresenta maior atividade enzimática na garapa, sendo a peroxidase pouco ativa (Suzart *et al.*, 2007). Além disso, a coloração do caldo de cana pode ser influenciada pela oxidação de seus componentes, especialmente da clorofila e polifenóis (Prati, Moretti e Cardello, 2005).

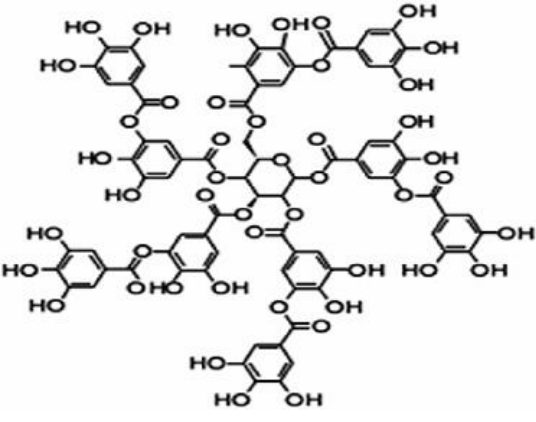
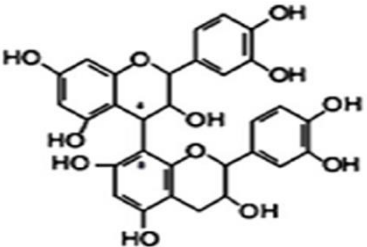
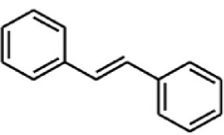
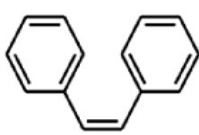
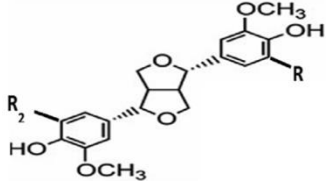
Segundo Kort (1979), acredita-se que pelo menos quatro mecanismos diferentes contribuem para a formação de cor durante a produção de açúcar mascavo: (1) reação de Maillard; (2) reações de degradação e de condensação térmica de açúcares (caramelização); (3) reações de degradação alcalina e de condensação de açúcares redutores; e (4) reações oxidativas de compostos fenólicos. Os três primeiros são reações não enzimáticas, enquanto que a oxidação de compostos fenólicos em quinonas, quimicamente mais reativas, é enzimática. Esses mecanismos podem também ser observados durante o tratamento térmico do caldo de cana.

3.4 Compostos fenólicos

De acordo com Duarte-Almeida *et al.* (2011), os pigmentos presentes no caldo de cana são, principalmente, compostos fenólicos. Esses compostos, também conhecidos como polifenóis, são definidos como estruturas que possuem um ou mais grupos hidroxila ligado(s) a um anel aromático; esta classe inclui moléculas simples, tais como os ácidos fenólicos; compostos com massa molar intermediária, como os flavonoides; e os polímeros de cadeia longa e de elevada massa molar, como taninos condensados e hidrolisados (Braga *et al.*, 2015; Dey *et al.*, 2016). Na Tabela 3.2, são mostrados os principais grupos de compostos fenólicos, incluindo também estilbenos e lignanas (Dey *et al.*, 2016).

Tabela 3.2 – Classificação de diferentes compostos fenólicos.

Tipo de composto fenólico e suas diferentes estruturas	
Ácidos fenólicos	
<p>Ácidos cinâmicos</p>  <ul style="list-style-type: none"> - ácido ferúlico R₁=R₂=H, R₃=OH, R₄=OCH₃ - ácido <i>p</i>-cumárico R₁=R₂=R₄=H, R₃=OH - ácido <i>o</i>-cumárico R₂=R₃=R₄=H, R₁=OH - ácido cafeico R₁=R₂=H, R₃=R₄=OH - ácido sinápico R₁=H, R₃=OH, R₂=R₄=OCH₃ 	<p>Ácidos benzoicos</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Ácido gálico R₁=R₂=R₃=OH - Ácido protocatecuico R₁=H, R₂=R₃=OH - Ácido vanílico R₁=H, R₂=OH, R₃=OCH₃ - Ácido siríngico R₂=OH, R₁=R₃=OCH₃
Flavonoides	
<p>Flavonois</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Fisetina 7=3'=4'=OH - Kaempferol 5=7=4'=OH - Morina 5=7=2'=4'=OH - Herbacetina 5=7=8=4'=OH - Quercetina 5=7=3'=4'=OH - Robinetina 7=3'=4'=5'=OH - Isoramnetina 5=7=4'=OH, 3'=OCH₃ - Miricetina 5=7=3'=4'=5'=OH - Gossipetina 6=7=8=3'=4'=OH 	<p>Flavonas</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Apigenina 5=7=4'=OH - Luteolina 5=7=3'=4'=OH - Diosmetina 5=7=3'=OH, 4'=OCH₃ - Tricina 5=7=4'=OH, 3'=5'=OCH₃ - Sinensetina 5=6=7=3'=4'=OCH₃ - Tangeretina 5=6=7=8=4'=OCH₃ - Nobiletina 5=6=7=8=3'=4'=OCH₃ - Vitexina 5=7=4'=OH, 8 = glicose - Isovitexina 5=7=4'=OH, 6 = glicose
<p>Isoflavonas</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Daidzeína 7=4'=OH - Genisteína 5=7=4'=OH 	<p>Flavanonas</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Naringenina 5=7=4'=OH - Isosakuranetina 5=7=OH, 4'=OCH₃ - Eriodictiol 5=7=3'=4'=OH - Hesperitina 5=7=3'=OH, 4'=OCH₃ <p>Glicosídeos de Flavanonas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prunina naringenina 7-glicosídeo - Naringina naringenina 7-neohesperidosídeo - Narirutina naringenina 7-rutinosídeo - Hesperidina hesperitina 7-rutinosídeo
<p>Antocianidinas</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Pelargonidina 5=7=4'=OH - Cianidina 5=7=3'=4'=OH - Peonidina 5=7=4'=OH, 3'=OCH₃ - Delphinidina 5=7=3'=4'=5'=OH - Petunidina 5=7=4'=5'=OH, 3'=OCH₃ - Malvidina 5=7=4'=OH, 3'=5'=OCH₃ 	<p>Flavonois</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Catequina (2R, 3S) 5=7=3'=4'=OH - Epicatequina (2R, 3R) 5=7=3'=4'=OH - Epigallocatequina (2R, 3R) 5=7=3'=4'=5'=OH - Galato de epicatequina (2R, 3R) 5=7=3'=4'=OH, 3-ácido gálico éster - Galato de epigallocatequina (2R, 3R) 5=7=3'=4'=5'=OH, 3-ácido gálico éster

Taninos	
Taninos hidrolisáveis 	Tanino condensado - Proantocianidina 
Estilbenos	
(<i>E</i>)-1,2-Difeniletieno/ (<i>E</i>)-Estilbeno/ <i>trans</i> -Estilbeno/ <i>trans</i> -1,2-difeniletieno 	<i>cis</i> -1,2-Difeniletieno/ (<i>Z</i>)-1,2-Difeniletieno/ <i>cis</i> -Estilbeno 
Lignanas	
 <ul style="list-style-type: none"> - Pinoresinol R₁=R₂=H - Siringaresinol R₁=R₂=OCH₃ - Medioresinol R₁=OCH₃, R₂=H 	

Fonte: Dey *et al.*, 2016.

De acordo com Kammerer *et al.* (2014), os polifenóis são caracterizados por uma elevada diversidade estrutural e podem ser subdivididos em dois grupos principais, os compostos flavonoides e os não flavonoides. Os flavonoides compartilham um esqueleto comum de carbono C6-C3-C6, compreendendo flavanonas, flavan-3-óis, flavan-3,4-dióis, flavonas, flavonois, dihidroflavonois bem como chalconas, dihidrochalconas e auronas. Os não flavonoides incluem os ácidos fenólicos, que são divididos em ácidos benzoicos (ou hidroxibenzoicos) e cinâmicos (ou hidroxicinâmicos). Entre eles, os ácidos hidroxibenzoicos mais comumente conhecidos são os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico; já os ácidos hidroxicinâmicos mais conhecidos são os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico (Dey *et al.*, 2016).

Embora não esteja presente na Tabela 3.2, o ácido clorogênico também é um composto fenólico; na verdade, trata-se de um grupo de compostos fenólicos oriundos da reação de esterificação entre ácidos hidroxicinâmicos (*p*-cumárico, cafeico e ferúlico) e ácido quínico; são amplamente encontrados em produtos naturais e exercem ações antioxidantes, citotóxicas, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (Belinati, 2010).

Os polifenóis estão amplamente distribuídos na natureza; nos tecidos de plantas, estão presentes na forma não glicosilada ou como glicosídeos, podendo estar associados com vários ácidos orgânicos e/ou moléculas polimerizadas complexas de elevada massa molar, tais como os taninos. No organismo humano, atuam conferindo importantes propriedades biológicas, tais como antiproliferativa, antidiabética, anticâncer, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante (Dey *et al.*, 2016, Havsteen, 2002), entre outras.

3.4.1 Flavonoides

O termo “flavonoides” é um nome coletivo para pigmentos vegetais, principalmente derivados de benzo- γ -pirona (sinônimo de cromona) (Hässig *et al.*, 1999; Havsteen, 2002). Os flavonoides são compostos por 2 anéis aromáticos ligados por 3 átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (Dey *et al.*, 2016).

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis hidrossolúveis, relativamente estáveis, amplamente distribuídos na natureza (já foram descritos mais de 4200 flavonoides diferentes), principalmente nas Angiospermas; são responsáveis pela coloração das flores, frutos e, em alguns casos, das folhas, conferindo tonalidade branca, amarela (*flavus*), vermelha, azul e violeta (Fonte, 2005). O grupo compreende os compostos especificados na Tabela 3.3, que complementa a tabela anterior (Tabela 3.2).

Tabela 3.3 – Grupos de flavonoides.

Grupo	Descrição	Exemplos
Antocianidinas	hidroxil-4-dihidroflavonois	
Antocianidas	glicosídeos de antocianidinas	
Flavonois	2-fenil-3-hidroxi-cromonas	kaempferol, quercetina
Isoflavonois	3-fenil-2-hidroxi-cromonas	
Flavonas	2-fenil-cromonas	orisina, apigenina, luteolina
Isoflavonas	3-fenil-cromonas	
Flavanonas	2-fenil-3-dihidrocromonas 2-fenil-flavanonas	naringenina, eriodictiol, liquiritina
Isoflavanonas	3-fenil-2-dihidrocromonas	
Flavanois	2-fenil-3-hidro-3-hidroxi-cromonas (catequinas)	
Isoflavanois	2-hidro-2-hidroxi-3-fenil-cromonas	
Flavanas	2-fenil-di-hidro-benzo- γ -piranas	
Isoflavanas	3-fenil-dihidro- γ -benzo-piranas	
Auronas	benzo-furonas	aurensidina, sulfuretina, marinetina
Cumarinas	derivados de benzo- γ -pirona	

Fonte: Havsteen (2002).

As principais funções dos flavonoides nas plantas são proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; ação antioxidante; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos; inibidores de enzimas. Esses compostos estão principalmente localizados nos vacúolos das células epidérmicas de folhas, flores e frutos e também no mesófilo (Fonte, 2005).

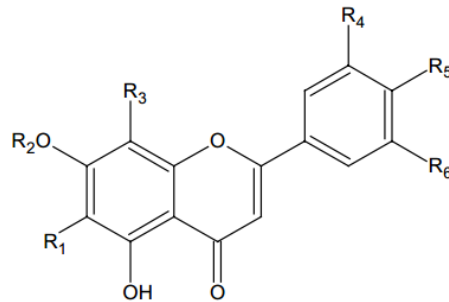
3.4.2 Composição fenólica da cana-de-açúcar

Paton e Duong (1992) relataram a composição fenólica da cana-de-açúcar e de seus produtos; tais compostos são principalmente fenilpropanoides e flavonoides, sendo derivados de naringenina, tricina, apigenina e luteolina os principais representantes de flavonoides (Smith e Paton, 1986; Williams, Harborne e Clifford, 1973). Segundo Duarte-Almeida *et al.* (2011), os compostos fenólicos dos colmos são, predominantemente, ácidos cinâmicos (ácidos cafeico, clorogênico e cumárico) e, em menor quantidade, flavonoides, representado exclusivamente por flavonas (apigenina, luteolina e tricina). Nos perfis fenólicos obtidos pelos autores, foram observadas diferenças entre diferentes colmos de cana e também entre seus derivados (caldo de cana, xarope, melão e açúcar *VHP*). Uma diferença notável é a exclusividade mútua entre os ácidos cafeico e ferúlico; o primeiro está presente apenas nos colmos, enquanto que o segundo foi encontrando somente nos produtos de cana-de-açúcar. Aparentemente, ocorrem processos enzimáticos após a moagem da cana, promovendo a metilação do ácido cafeico dos colmos, dando origem ao ácido ferúlico nos produtos de cana. Outra diferença é a predominância de ácido clorogênico (um fenilpropanoide) nos colmos e de tricina (um flavonoide) nos produtos de cana. Além disso, o flavonoide predominante nos colmos é a luteolina, e nos produtos de cana é a tricina.

Colombo, Lanças e Yariwake (2006) desenvolveram um método de cromatografia líquida em alta performance com detector de arranjo de diodos ultravioleta (HPLC-UV/DAD) para separar e quantificar flavonoides de folhas, bagaço e caldo de cana. Os autores foram motivados pelo fato de os flavonoides da cana consistirem de uma mistura complexa de agliconas (flavonoides na forma livre) e glicosídeos (incluindo glicosídeos de flavonolignanas); o método proposto por eles demonstrou ser adequado para a quantificação dos flavonoides totais. Dentre cerca de 50 compostos, foram identificados como principais flavonoides do caldo de cana: schaftosídeo, isoschaftosídeo, vitexina e 4'-5'-dimetil-luteolina-8-C-glicosídeo, em uma quantidade total de 0,6 mg flavonoides/g de caldo. Dos quatro flavonoides identificados, os dois primeiros representaram os picos majoritários. Por outro lado, Vila (2006) identificou como picos majoritários, além do schaftosídeo e isoschaftosídeo, a diosmetina-8-C-glicosídeo e a tricina-O-glicosídeo. A Figura 3.2 e a

Tabela 3.4 apresentam detalhes das estruturas desses compostos (Colombo *et al.*, 2006; Vila, 2006). Os trabalhos acima citados buscavam classificar o caldo de cana como alimento funcional; todavia, os autores declararam que os estudos devem ser aprofundados.

Figura 3.2 – Estrutura geral dos flavonoides identificados na cana-de-açúcar.



Fonte: Vila (2006).

Tabela 3.4 – Estrutura dos flavonoides (Figura 3.2) identificados no caldo de cana-de-açúcar.

Flavonoide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Schaftosídeo	Glicose	H	Arabinose	H	OH	H
Isoschaftosídeo	Arabinose	H	Glicose	H	OH	H
Vitexina	H	H	Glicose	H	OH	H
4',5'-dimetil-luteolina-8-C-glicosídeo	H	H	Glicose	OH	OCH ₃	OCH ₃
Diosmetina-8-C-glicosídeo	H	H	Glicose	OH	OCH ₃	H

Fonte: Colombo *et al.* (2006) e Vila (2006).

Payet *et al.* (2006) identificaram ainda outros compostos em diversos produtos da cana. Além de ácidos fenólicos, foram procurados catequinas, flavonoides e fenóis simples; catequinas e flavonoides não foram encontrados nos extratos preparados com o uso de acetato de etila e hidróxido de sódio (principalmente) e posterior evaporação em rotaevapor. Especificamente para o caldo de cana, foram identificados os seguintes compostos fenólicos: ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cafeico (representando 3,3% do total), ácido siríngico, vanilina, ácido *p*-cumárico (54,5% do total) e ácido ferúlico (28,0% do total). Além disso, não foi identificado ácido clorogênico no caldo, somente em amostras de melaço; os autores justificaram que isso ocorreu porque o ácido clorogênico está envolvido no processo de escurecimento enzimático do caldo. A soma de todos os compostos representou um teor de 249,2 mg de constituintes polifenólicos/kg de caldo seco. Na análise de fenólicos totais, seguindo o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, os autores encontraram o valor de $5,5 \pm 0,4$ g de equivalente ácido gálico/kg de caldo seco.

Honig (1969) reportou que a cana-de-açúcar possui taninos, que são passados para o caldo

após a extração. O tanino do caldo é um composto fenólico derivado da d-catequina. Qudsieh *et al.* (2002) avaliaram o teor de taninos de cana-de-açúcar em diferentes estágios de maturação e verificaram um declínio contínuo no final das fases de maturidade (após o sétimo mês de plantio). Os colmos da cana imatura apresentaram quantidades relativamente altas de taninos e, mesmo atingindo a maturação, a quantidade de substâncias polifenólicas presentes se manteve elevada.

Feng *et al.* (2015) estudaram a extração de compostos fenólicos da casca da cana-de-açúcar com o objetivo de dar um melhor destino a esse subproduto. Foram identificados três compostos fenólicos principais nas amostras de casca (tratadas por diferentes métodos): ácido gálico, o ácido clorogênico e ácido ferúlico; dentre eles, o ácido gálico apresentou a concentração mais elevada, variando de $74,53 \pm 9,50$ mg/g de amostra (extrato da casca crua em pó) a $125,11 \pm 14,12$ mg/g de amostra (extrato da casca purificada pelo método de extração com solventes, em pó). Abbas *et al.* (2014) analisaram a atividade antioxidante e a composição fenólica das folhas da cana, que normalmente são descartadas ou queimadas após a colheita. De acordo com os autores, a atividade antioxidante observada e a capacidade protetora contra danos ao DNA da cana são devido aos ácidos fenólicos (ácido ferúlico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cumárico e ácido elágico) e flavonoides (quercetrina, isoquercetrina, catequina, epicatequina, rutina e quercetina).

3.4.3 Mecanismos de degradação de compostos fenólicos

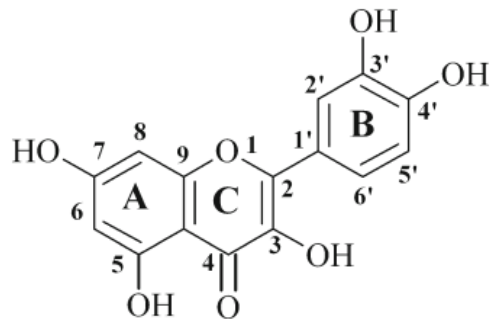
Os fatores que influenciam na estabilidade dos compostos fenólicos são temperatura, pH, presença de oxigênio e enzimas, e a interação com outros componentes do alimento, como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos (Jackman e Smith, 1992). Ferreira (2011) também comprovou a influência da luz na oxidação de flavonoides.

No caso das antocianinas, a instabilidade é atribuída à presença do grupo hidroxila na posição C-3 (Clifford, 2000); ausente na posição C-3 das flavonas, grupo flavonoide majoritário no caldo de cana. Segundo Lin *et al.* (2003), a presença de um grupo metoxi (OCH_3) no anel A ou B do flavonoide parece proteger sua estrutura de uma degradação por bactérias.

A presença de oxigênio e luz (fotooxidação) pode ocasionar a degradação de compostos fenólicos. Segundo Barnes, Foss e Schug (2013), a degradação oxidativa da quercetina (tipo de flavonol) pode estar associada à sua estrutura química, apresentada na Figura 3.3. O anel B contém uma estrutura *o*-dihidroxi, que permite a doação de próton e a neutralização de um radical livre. A combinação da dupla ligação localizada entre C2 e C3, o grupo hidroxila no C3 e o grupo cetona no C4 do anel C proporciona o deslocamento do elétron e a estabilização do radical. Estruturas adicionais do tipo catecol podem ser formadas entre o grupo hidroxila no C5 e o grupo cetona no C4,

e entre o grupo hidroxila no C3 e o grupo cetona no C4, conferindo ainda mais a capacidade de eliminação de radicais.

Figura 3.3 – Estrutura química da quercetina.



Fonte: Barnes *et al.* (2013).

Além da separação do próton (desprotonação), um mecanismo aceito de degradação oxidativa envolve a abertura do anel C, que conduz à formação de ácidos carboxílicos fenólicos de menor massa molar; os produtos finais mais comuns relatados são o ácido 3,4-hidroxibenzoico (ácido protocatecuico) e o ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (ácido carboxílico floroglucinol) (Barnes *et al.*, 2013). Os autores observaram um aumento desses produtos com o tempo e com aquecimento.

Ferreira (2011) avaliou a estabilidade dos carotenoides e flavonoides durante a estocagem da polpa de pitanga microencapsulada por *spray drying*. Em relação à quercetina, a microencapsulação por *spray drying* reduziu as concentrações iniciais em relação à polpa de pitanga liofilizada. O kaempferol (flavonoide minoritário) foi o que mais degradou durante os 50 dias de exposição à luz e ao oxigênio, com reduções de 47-55% nas microcápsulas e de 72% na polpa liofilizada. A comparação entre análogos da quercetina (apigenina, galangina, kaempferol e rutina) confirmou que grupos hidróxi nas posições 3, 3', e 4' estão envolvidos não somente com sua capacidade antioxidante, mas também com sua fotolabilidade. Portanto, os grupos OH nas posições 5 e 7 não exercem papel crucial no mecanismo fotooxidativo (Dall'Acqua *et al.*, 2012).

A temperatura é outra variável que pode afetar a estabilidade de constituintes fenólicos (antocianinas, flavonóis, catequinas, etc.) e, portanto, afetar características de qualidade do produto alimentício final, como aparência, *flavor* e propriedades promotoras da saúde. Entretanto, a otimização do tratamento térmico pode melhorar a qualidade do produto relacionada ao conteúdo fenólico (Tomás-Barberán e Espín, 2001). Os autores destacam que os hábitos domésticos (cozimento, armazenamento, etc.) são muito importantes na determinação da qualidade do produto

final. Ferver, entretanto, provoca a extração de compostos fenólicos e diminui qualquer propriedade promotora da saúde do vegetal cozido; portanto, procedimentos como o cozimento a vapor ou o uso de tecnologias emergentes que causam menor aquecimento dos alimentos são mais efetivos.

A diminuição do teor de flavonoides atribuível ao processo térmico já tem sido bem documentada (Barnes *et al.*, 2013). A quercetina se degrada em temperatura ambiente em soluções aquosas e é suscetível à oxidação. O aquecimento aumenta a energia cinética, acelerando o processo de degradação oxidativa. Estudos cinéticos realizados por Barnes *et al.* (2013) demonstraram que a taxa de degradação oxidativa pode ser acelerada pelo calor e/ou pela adição de catalisadores metálicos.

O pH também afeta a estabilidade dos polifenóis; a liberação completa de compostos fenólicos ligados é possível por meio de hidrólise ácida ou básica. Entretanto, condições ácidas a quente conduzem à degradação de derivados de ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, cafeico e ácido ferúlico (Dey *et al.*, 2016; Robbins, 2003). De acordo com Duarte Silva *et al.* (2000), a quercetina e a fisetina podem gerar radicais hidroxila em pH 7,4, mas em pH 8,0 uma geração significativa desses radicais pode ser observada.

Estudos têm demonstrado que em valores de pH acima da neutralidade os grupos hidroxila do anel B de flavonóis (exemplo: quercetina, fisetina e miricetina) podem ser desprotonados (Jovanovic *et al.*, 1994). A Tabela 3.5 mostra o mecanismo de oxidação de um flavonol. No passo 1, ocorre a desprotonação, permitindo a auto-oxidação desses compostos com concomitante produção do ânion superóxido e de semiquinonas (passo 2) (Hodnick *et al.*, 1988, Canada *et al.*, 1990). A reação do flavonol desprotonado com oxigênio (passo 2) é lenta. Entretanto, pode ser catalisada por íons metálicos presentes no meio reacional (passos 3 e 4) (Laughton *et al.*, 1989). O ânion superóxido gerado dessa forma pode então propagar a oxidação dos flavonóis (Metodiewa *et al.*, 1999; Cadenas, 1995) como representado no passo 5 (Duarte Silva *et al.*, 2000).

Tabela 3.5 – Mecanismo de oxidação de flavonóis.

Passo	Reação	Legenda
1	$F \leftrightarrow F^- + H^+$	F ⁻ flavonol desprotonado
2	$F^- + O_2 \leftrightarrow F^{\bullet-} + O_2^{\bullet-}$	F ^{•-} semiquinona; O ₂ ^{•-} radical superóxido
3	$F^- + M^{(n+1)+} \rightarrow F^{\bullet-} + M^{(n)+}$	M íon metálico
4	$F^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \leftrightarrow F' + O_2^{\bullet-}$	F' quinona; O ₂ ^{•-} radical superóxido
5	$H^+ + F^- + O_2^{\bullet-} \leftrightarrow F^{\bullet-} + H_2O_2$	

Fonte: adaptado de Duarte Silva *et al.* (2000).

Para que essa auto-oxidação ocorra em pH fisiológico, os flavonóis devem conter um grupo

3-OH no anel C e um grupo 7-OH livre no anel A e um anel B com duas hidroxilas na orto-posição ou três hidroxilas, situação que, provavelmente, afeta seu potencial redox e, conseqüentemente, sua capacidade de auto-oxidação (Hodnick *et al.*, 1988).

A degradação dos compostos fenólicos por enzimas, tópico já previamente citado nesse trabalho, será abordada em detalhes no item a seguir.

3.5 Enzimas endógenas

A atividade enzimática observada em vegetais varia em relação à espécie, cultivar, período do ano, clima, solo, estado de amadurecimento e local de plantio (Lehmkuhl, 2006). A ação de enzimas naturalmente presentes no caldo de cana, como a peroxidase (POD) e a polifenoloxidase (PPO), promove alterações indesejáveis na cor (escurecimento enzimático), na textura, no sabor, no aroma e na composição nutricional. De acordo com Tomás-Barberán e Espín (2001), tais enzimas são relevantes na degradação oxidativa dos compostos fenólicos por estarem envolvidas na produção de polímeros de coloração marrom (melaninas). De acordo com Chakraborty, Rao e Mishra (2015), a ação combinada da POD e da PPO resulta na aceleração da taxa de escurecimento no produto, que é altamente indesejável para o consumidor. Ambas as enzimas são classificadas como oxidorreduções, ou seja, catalisam reações de óxido redução.

Bucheli e Robinson (1994) estudaram a atividade enzimática no escurecimento do caldo de cana, bem como a contribuição relativa de cada uma das enzimas POD e PPO. Os resultados revelaram que o escurecimento do caldo foi menos intenso quando o caldo foi extraído em temperatura elevada (100 °C). A atividade da PPO diminuiu significativamente com o aumento da temperatura de extração; já a POD mostrou uma redução de 50% de sua atividade. Esses pesquisadores também verificaram que o escurecimento enzimático depende do oxigênio disponível no meio, atribuindo o processo de escurecimento em maior parte à ação da PPO.

Normalmente, sucos de fruta *in natura* possuem enzimas pécticas, conhecidas como pectinases. As pectinases fazem parte do grupo das hidrolases (catalisam reações de hidrólise) e possuem número EC iniciando com o número 3. Exemplos de pectinases são a pectinametilesterase (PME – EC 3.1.1.11) e a poligalacturonase (PG – EC 3.2.1.15). A PG é a mais resistente ao tratamento térmico, com atividade ótima em pH 4,5 (Iaderoza e Draetta, 1991). A PME pode existir no caldo e sua inativação é desejada, pois ao desdobrar as pectinas em ácidos pécticos e pectínicos, ocorre alteração da viscosidade e separação de fases do líquido (Prati, 2004). Uma vez que enzimas desse

grupo apresentaram baixa atividade no caldo de cana estudado (detalhes nos capítulos 4 e 6), a revisão referente a elas limita-se a este parágrafo.

3.5.1 Peroxidase

A POD (EC 1.11.1.7) é uma enzima naturalmente presente em vegetais, envolvida em diversas reações, como ligações de polissacarídeos e de monômeros, lignificação, oxidação de fenóis, entre outras (Campos *et al.*, 2004). Araújo (2004) destaca as seguintes funções da enzima nos tecidos vegetais: proteção contra os efeitos tóxicos da H_2O_2 formada durante o metabolismo celular do vegetal; cicatrização de ferimentos; defesa contra patógenos e atuação na degradação de ácidos graxos insaturados, através dos radicais livres gerados pela reação enzimática, com formação de compostos voláteis relacionados ao sabor oxidado.

As peroxidases são glicoproteínas que contêm uma cadeia polipeptídica, uma protoporfirina IX como grupo prostético, três a oito cadeias de carboidratos e dois Ca^{+2} (Yuan e Jiang, 2003). Tratam-se de enzimas contendo o grupo heme, que podem catalisar um grande número de reações em que um peróxido (de fórmula geral ROOH) é reduzido, e um doador de elétrons (como fenóis, aminas aromáticas ou outros) é oxidado. A atividade da POD em vegetais crus e não branqueados é responsável por cores e *flavors* desagradáveis e indesejáveis (*off-colours* e *off-flavours*). As PODs estão presentes nos tecidos das plantas sob a forma de várias isoenzimas (estruturas proteicas com atividades enzimáticas similares que catalisam a mesma reação), que variam na especificidade para o substrato, estabilidade térmica, massa molar, ponto isoelétrico e propriedades imunológicas. A estabilidade térmica dessas enzimas vegetais varia consideravelmente com a fonte e a origem (Jakób *et al.*, 2010; Robinson, 1991; Yuan e Jiang, 2003).

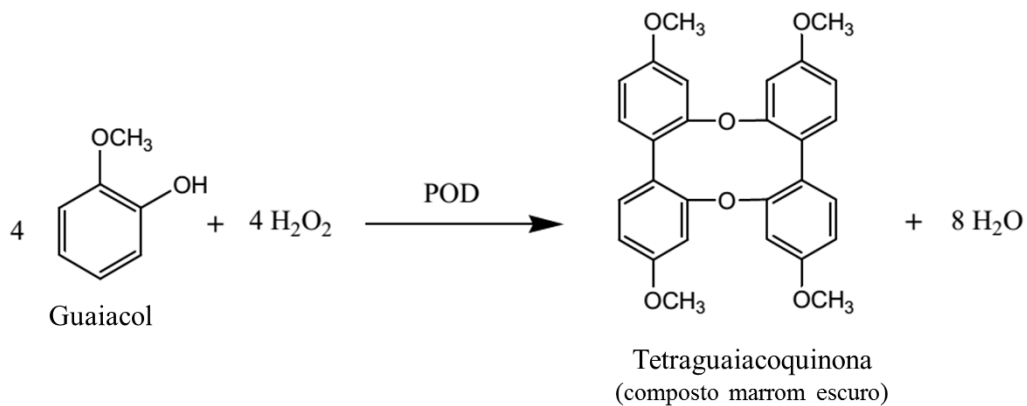
Segundo Tomás-Barberán e Espín (2001), embora as PODs sejam largamente distribuídas no reino vegetal, seu papel no escurecimento enzimático de frutas e vegetais ainda é tema de discussão, pois o nível interno de peróxido de hidrogênio nas plantas é limitante para a atividade da enzima. Entretanto, seu envolvimento em processos lentos, como o escurecimento interno, pode ser possível. Tem sido proposto por Richard-Forget e Gaillard (1997) e por Subramanian *et al.* (1999) que a PPO possa atuar como uma promotora à atividade da POD, devido à geração de peróxido de hidrogênio durante a oxidação de compostos fenólicos.

A principal característica da POD é a termoestabilidade associada à capacidade de se regenerar após sofrer desnaturação térmica. A regeneração ocorre poucas horas após o tratamento térmico quando o alimento é mantido em temperatura ambiente, ou mais lentamente sob congelamento. Além disso, são capazes de manter atividade em baixas temperaturas e atividades de

água (Clerici *et al.*, 2014).

Para avaliar a atividade da POD, utiliza-se como substrato o guaiacol, que reage em presença da POD de acordo com o esquema da Figura 3.4 (Clerici *et al.*, 2014). Além do guaiacol, podem ser usados como doadores de hidrogênio: pirogallol, ABTS [2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)], 4-metoxi- α -naftol e fenol com amino-antipirina (Yuan e Jiang, 2003).

Figura 3.4 – Reação catalisada pela POD.



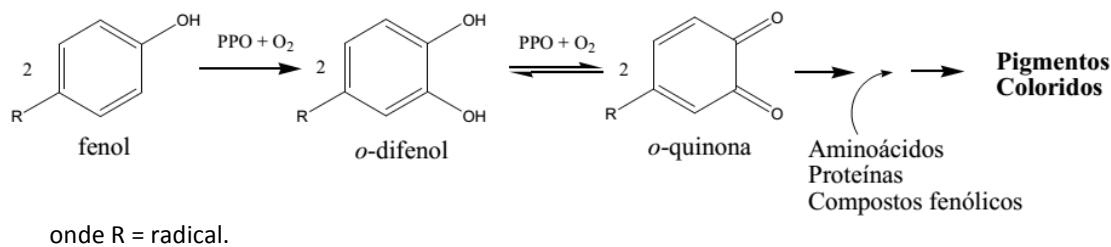
Fonte: Clerici *et al.* (2014).

3.5.2 Polifenoloxidase

A polifenoloxidase (PPO) foi descoberta em 1856 por Schoenbein (Ramirez, Whitaker e Virador, 2003) e, todavia, sua função endógena ainda não é clara, porém acredita-se que o papel das PPO em plantas seja de defesa contra pestes e patógenos (Walker e Ferrar, 1998). Seu sítio ativo consiste em dois centros metálicos de cobre, na forma oxidada Cu(II)-OH-Cu(II). Cada átomo de cobre está coordenado por três átomos de nitrogênio, resíduos de histidina e um grupo hidróxido formando uma ponte entre dois centros metálicos (Lehmkuhl, 2006).

A enzima também é conhecida como tirosinase, catecoloxidase, catecolase, fenolase, *o*-difenoloxidase, monofenoloxidase, cresolase. Os diversos nomes derivam do fato de essa enzima oxidorreductase atuar em dois tipos de substratos (monofenóis e compostos *o*-fenólicos) na presença de oxigênio, conforme demonstrado na Figura 3.5. A classificação de acordo com número EC também leva em consideração os substratos em que ela pode atuar (Ramirez *et al.*, 2003; Van Loey *et al.*, 2003): EC 1.14.18.1 - catalisa a hidroxilação de compostos monofenólicos na *o*-posição; e EC 1.10.3.1 - catalisa a oxidação de compostos *o*-fenólicos em *o*-quinonas, que posteriormente são polimerizadas em pigmentos escuros.

Figura 3.5 – Reação de escurecimento enzimático catalisada pela PPO.



Fonte: Clerici *et al.* (2014).

A PPO é considerada a principal enzima associada à deterioração dos tecidos vegetais, pois com o rompimento destes por danos mecânicos, há a exposição do substrato à enzima, acelerando o escurecimento e, conseqüentemente, a alteração e a perda de qualidade do alimento (Fennema, 1976). Normalmente, a PPO (localizada nos cloroplastos) é separada de seus substratos fenólicos (localizadas no vacúolo), de modo que o escurecimento ocorre apenas quando as células são danificadas e a compartimentação é perdida (Bucheli e Robinson, 1994; Lehmkuhl, 2006).

Portanto, o escurecimento enzimático no caldo de cana é iniciado pela oxidação enzimática dos compostos fenólicos pela PPO, e sua inativação é um dos melhores métodos para melhorar a qualidade sensorial e nutricional do produto (Romano, 2006; Tomás-Barberán e Espín, 2001). O produto intermediário da oxidação é a quinona, que rapidamente se condensa, formando pigmentos escuros insolúveis (melaninas). A ação dessa enzima resulta na formação de pigmentos escuros, frequentemente acompanhados de mudanças indesejáveis na aparência e nas propriedades sensoriais do produto, resultando na diminuição da vida útil e do valor de mercado (Romano, 2006).

3.5.3 Inativação enzimática

As enzimas podem sofrer desnaturação e inativação. Nesse momento, é importante destacar a diferença entre esses dois fenômenos, às vezes erroneamente usados como sinônimos na literatura. Segundo Kushner (1977), a desnaturação é uma alteração conformacional de uma macromolécula biológica que implica em uma perda reversível ou irreversível de sua capacidade de realizar uma determinada função biológica. A conformação de uma proteína é determinada pelo tipo e pela sequência de aminoácidos na sua cadeia peptídica, que se dobra de modo a minimizar a energia livre (Lumry e Eyring, 1954). Já a inativação propriamente dita representa a perda da atividade enzimática de maneira irreversível.

Através da análise de dados publicados referentes ao mecanismo de inativação de proteínas, Mozhaev e Martinek (1982) elencaram sete principais fenômenos que causam a inativação:

agregação; troca tiol/dissulfeto; alterações na estrutura primária (ex: modificação química de grupos funcionais); clivagem de ligações S-S; dissociação do grupo prostético do centro ativo da enzima; dissociação de proteínas oligoméricas em subunidades; e alterações conformacionais na macromolécula. Esses fenômenos serão brevemente descritos a seguir.

Agregação

A inativação envolvendo a formação de agregados geralmente obedece um mecanismo de duas etapas, atribuído a Lumry e Eyring. Neste mecanismo, apresentado na Figura 3.6, a enzima nativa, *N*, reversivelmente se desdobra para uma forma desnaturada, *D*, que ainda pode ser inativada irreversivelmente para uma forma inativa, *I* (Lumry e Eyring, 1954; Mozhaev e Martinek, 1982; Polakovič e Vrabel, 1996; Van Loey *et al.*, 2003).

Figura 3.6 – Esquema de agregação de proteínas, resultando em inativação.



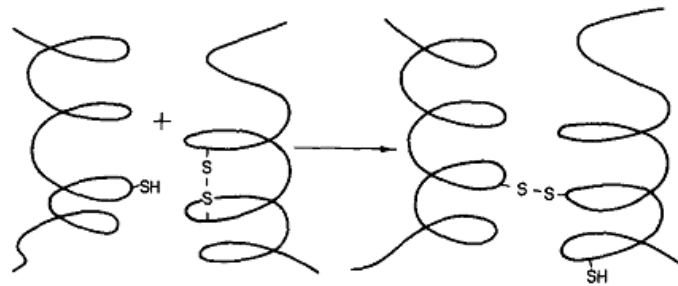
Fonte: adaptado de Mozhaev e Martinek (1982).

A primeira etapa do mecanismo sugerido por Lumry-Eyring envolve regularidades cinéticas que são inerentes às reações monomoleculares e se devem unicamente a uma alteração conformacional ou desnaturação. Em alguns trabalhos, o estado *D* foi caracterizado por métodos físicos e foi demonstrado ser diferente da proteína nativa. Na segunda etapa, as moléculas de proteína com estrutura terciária alterada forma agregados à custa de interações não-covalentes (principalmente interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) (Mozhaev e Martinek, 1982).

Troca tiol-dissulfeto

A Figura 3.7 ilustra o fenômeno de troca tiol-dissulfeto, em que as proteínas podem perder a sua atividade funcional quando grupos SH de diferentes moléculas formam pontes de dissulfeto intermoleculares (Mozhaev e Martinek, 1982)

Figura 3.7 – Esquema de troca tiol-dissulfeto intermolecular.



Fonte: Mozhaev e Martinek (1982).

Alterações na estrutura primária

Uma das causas da inativação irreversível de proteínas é a alteração da sua estrutura primária, como resultado de reações químicas, que podem envolver o rompimento de uma cadeia de polipeptídeo ou modificação de certos grupos funcionais, principalmente como resultado de reações laterais, que muitas vezes são difíceis de prever (Lumry e Eyring, 1954; Mozhaev e Martinek, 1982).

Clivagem de ligações S-S

As proteínas têm geralmente uma ou duas pontes S-S que são mais facilmente quebradas do que outras. Estas pontes têm um papel estrutural muito importante; por exemplo, na molécula de tripsina, elas mantêm a conformação do centro ativo. A redução das pontes S-S pode provocar uma perda de especificidade ou a total inativação da enzima (Mozhaev e Martinek, 1982; Sondack e Light, 1971; Steven e Podrazky, 1978).

Dissociação do grupo prostético do centro ativo da enzima

Há um grande grupo de enzimas que possuem átomos metálicos, aglomerados de metal-enxofre ou grupos prostéticos unidos por ligações não covalentes como parte do centro ativo. Sob condições de desnaturação, a interação da cadeia proteica com o grupo prostético pode se tornar tão fraca que este último se difunde livremente na solução. A dissociação do grupo prostético do centro ativo de uma enzima também pode ser causada por agentes quelantes, que, em ligação com cátions da solução, deslocam o equilíbrio entre os íons metálicos ligados à proteína e íons livres da solução. As enzimas, assim, perdem a capacidade de agir como catalisadores específicos (Mozhaev e Martinek, 1982; Oppenheimer, Green e McKay, 1967). A perda do grupo prostético pode conduzir a alterações estruturais consideráveis e, muitas vezes, à inativação irreversível (Mozhaev e Martinek, 1982).

Dissociação de proteínas oligoméricas em subunidades

A dissociação de proteínas oligoméricas muitas vezes leva a alterações conformacionais nas subunidades, produzindo alterações nas estruturas secundárias e terciárias (Mozhaev e Martinek, 1982).

Alterações conformacionais na macromolécula

O início da degradação térmica de diversos compostos e da maioria das enzimas, geralmente, começa apenas quando certa temperatura é atingida (Corradini e Peleg, 2004). Em altas temperaturas, uma enzima perde suas interações não covalentes “regulares” que suportam a estrutura nativa a temperaturas moderadas e adquire ligações não covalentes “não nativas”. Ao diminuir a temperatura, essas interações não covalentes “irregulares”, embora termodinamicamente instáveis, permanecem por razões puramente cinéticas – a mobilidade molecular das cadeias polipeptídicas deve diminuir. Portanto, a proteína permanece desnaturada, apesar de considerações termodinâmicas, devido à existência de uma conformação metaestável que não permite que a proteína readquirir a forma nativa à baixa temperatura (Mozhaev e Martinek, 1982).

Exemplos de inativação da polifenoloxidase e da peroxidase

A perda de atividade da PPO tem sido relacionada a fenômenos de desdobramento/agregação e clivagem da estrutura proteica após análise de permeação por gel HPLC (Manzocco, Panozzo e Nicoli, 2013). Em relação à POD, Lemos, Oliveira e Saraiva (2000) relataram que sua inativação térmica pode ocorrer pela dissociação do grupo prostético (heme) do haloenzima (sistema enzimático ativo), por alterações conformacionais na apoenzima (parte proteica da enzima) ou por modificação/degradação do grupo prostético.

Outro fator importante é o pH do meio. Como as enzimas são catalisadores biológicos, possuem um pH ótimo ou uma região de pH ótimo no qual sua atividade é máxima; no caso de valores extremos de pH, podem desnaturar tornando-se inativas (Nelson e Cox, 2009). Por exemplo, as enzimas PPOs apresentam a faixa de pH ótimo entre os valores de 5,0 a 7,0 e são inativadas em condições de pH menores que 3,0 (Reis, 2007).

Como a PPO não pertence à classe de enzimas termorresistentes, a exposição por curto período de tempo em temperaturas de 70°C a 90°C (relação tempo/temperatura) é suficiente, na maioria dos casos, para a inativação de suas funções catalíticas. Todavia, diversos problemas aparecem em função do uso do calor, como exemplo frutas e verduras tornam-se cozidas, o que

acarreta em mudanças na textura, na cor e no sabor. A relação tempo/temperatura se torna muito importante para conferir o branqueamento eficiente sem que ocorram grandes alterações sensoriais do alimento; entretanto, o processo de aplicação de calor é um fator que depende da quantidade de enzima e do pH do produto (Araújo, 2004).

A inativação térmica da POD é descrita por uma cinética de primeira ordem composta por duas fases lineares; a primeira consiste de uma rápida inativação (isoenzimas de POD termolábeis), seguida de uma inativação lenta (isoenzimas termoestáveis). O estudo de fatores que afetam tal comportamento não linear é importante para o desenvolvimento de um modelo satisfatório de inativação da POD. Em adição, a regeneração da atividade da POD depois do tratamento térmico, devido à recombinação do grupo heme com a apo-peroxidase, é uma característica comum reportada para algumas hortaliças. Esse processo de reativação é importante, uma vez que o aquecimento entre 90 e 125 °C pode resultar em uma atividade máxima da enzima regenerada após 6 dias a 25 °C, como reportado para a POD de aspargo (Rodrigo *et al.*, 1996; Tomás-Barberán e Espín, 2001). Portanto, longos tempos de tratamento térmico para assegurar a inativação da POD, assim como controlar a atividade enzimática durante o posterior armazenamento, são medidas altamente recomendadas (Tomás-Barberán e Espín, 2001); mas, em contrapartida, há maior degradação de nutrientes dos alimentos, assim como maior gasto energético.

Kunitake (2012) estudou a inativação da PPO de caldo de cana, após pasteurizar convencionalmente a bebida acidificada com 4% de polpa de maracujá nas temperaturas de 85 a 95 °C por 30 s. Devido à termorresistência da POD, a inativação ocorreu somente com a aplicação do binômio mais severo (95 °C / 30 s). Por outro lado, Martins *et al.* (2013) afirmaram que não há necessidade de expor o caldo de cana a um tempo maior do que 80 segundos em banho-maria a 100 °C para que ocorra a inativação enzimática da POD. Os autores concluíram que é viável a obtenção de um produto sem alteração da cor quando for aplicado o tratamento térmico.

3.6 Modelos cinéticos de inativação enzimática

A fim de otimizar os processos térmicos aplicados para a inativação enzimática, é essencial estabelecer o modelo de cinética de inativação das enzimas em questão. A principal informação para a construção da curva cinética de inativação é a atividade enzimática (*A*) medida em diferentes intervalos de tempo; esta é determinada como a taxa de reação da enzima em condições específicas (Polakovič e Vrábel, 1996).

Considerando a possibilidade da presença de isoenzimas no início do processo de inativação, os modelos cinéticos aplicados na literatura estão baseados em diferentes mecanismos: primeira ordem, reações em série e paralelas. A Tabela 3.6 apresenta diversos modelos de inativação térmica enzimática (Chen e Wu, 1998; Rudra Shalini, Shivhare e Basu, 2008; Weemaes *et al.*, 1998).

Tabela 3.6 – Modelos cinéticos de inativação enzimática.

Eq. n°	Modelo	Equação
(3.1)	Primeira ordem	$\ln(A/A_0) = -k.t$
(3.2)	Isoenzimas distintas	$A/A_0 = A_L.exp(-k_L.t) + A_R.exp(-k_R.t)$
(3.3)	Duas frações	$A/A_0 = a.exp(-k_L.t) + (1-a).exp(-k_R.t)$
(3.4)	Multicomponente de 1ª ordem	$A/A_0 = \frac{[exp(-k_1.t) + r.exp(-k_2.t)]}{(1+r)}$
(3.5)	Conversão fracionária	$A/A_0 = A_r + (A_0 - A_r).exp(-k.t)$
(3.6)	Distribuição de Weibull	$A/A_0 = exp(-b.t^n)$
(3.7)	nésima ordem	$A/A_0 = [A_0^{1-n} + (n-1).k.t]^{1/(n-1)}$
(3.8)	Séries	$A/A_0 = \alpha_2 + [1 + (\alpha_1 k_1/k_2 - k_1) - (\alpha_2 k_2/k_2 - k_1)]exp(-k_1.t) - [(\alpha_1 k_1/k_2 - k_1) - (\alpha_2 k_1/k_2 - k_1)]exp(-k_2.t)$
(3.9)	Etapas consecutivas	$A/A_0 = [A_1 - A_2(k_1/k_1 - k_2)]exp(-k_1.t) + A_2(k_1/k_1 - k_2)exp(-k_2.t)$

A representa a atividade enzimática no tempo t , A_0 é a atividade enzimática inicial (no tempo zero) e k é uma constante, a taxa de degradação a uma dada temperatura.

A grande maioria dos autores adota o modelo de primeira ordem para descrever a inativação enzimática, que se baseia no pressuposto de que a ruptura de uma simples ligação ou de uma estrutura é suficiente para inativar a enzima; sabe-se, no entanto, que o processo é muito mais complexo (Corradini e Peleg, 2004; Fujikawa e Itoh, 1996; Ladero, Santos e García-Ochoa, 2006). De acordo com Gardossi *et al.* (2010), a inativação de um biocatalisador, raramente, segue precisamente a cinética de primeira ordem. A inativação enzimática foi apresentada como um mecanismo complexo que consiste em várias etapas unimoleculares consecutivas, conduzindo de uma forma nativa a uma forma final (ativa ou inativa) através de um ou mais intermediários ativos (Augusto *et al.*, 2015; Mozhaev e Martinek, 1982; Polakovič e Vrabel, 1996). Entretanto, sugere-se que, no caso de um processo de inativação aparentemente de primeira ordem, um dos sete fenômenos causadores de inativação enzimática (descritos na seção 3.4.3) tenha predominância sobre os outros. Se várias reações ocorrem em uma taxa similar, espera-se uma cinética de inativação complexa, que não seja de primeira ordem (Van Loey *et al.*, 2003).

É importante notar que, no contexto de inativação enzimática, o conceito de ordem da reação é puramente empírico e não fornece uma informação sobre o mecanismo da reação. Este procedimento fornece um modelo que descreve a cinética de uma reação, mas o modelo não deve,

necessariamente, ser interpretado como representante do mecanismo real da reação (Van Loey *et al.*, 2003).

Para o modelo de isoenzimas distintas, Weemaes *et al.* (1998) sugeriram que a perda de atividade da enzima pode ser descrita pela soma de dois decaimentos exponenciais, um para a enzima termolábil (índice L) e outro para enzima termo-estável (índice R). Van Loey *et al.* (2003) descreveram o modelo como contendo diversas isoenzimas, podendo ser divididas em duas (ou mais) frações com diferentes estabilidades no processamento, ou seja, uma mais termorresistente do que outra, e ambas inativadas de acordo com um modelo cinético de decaimento de primeira ordem. A taxa constante de inativação da fração lábil (valor de k_L), a taxa constante de inativação da fração estável (valor de k_R) e a atividade de ambas as frações podem ser estimadas usando análise de regressão não linear a partir do gráfico da atividade residual em diversos intervalos de tempo (Van Loey *et al.*, 2003).

O modelo de duas frações foi apresentado por Chen e Wu (1998) que hipotetizaram que as amostras de extratos vegetais têm várias isoenzimas que podem ser separadas em dois grupos, um mais termorresistente do que o outro, e ambos inativados termicamente de acordo com a cinética de degradação de primeira ordem. O coeficiente α representa a atividade da fração da isoenzima termolábil em relação à atividade enzimática total.

Segundo Fujikawa e Itoh (1996), o modelo multicomponente (ou multifração) de primeira ordem é expresso como a soma da cinética dos seus componentes. Supõe-se que cada componente segue uma inativação de primeira ordem durante o aquecimento. Este modelo tem sido estudado principalmente para a inativação térmica de enzimas que consistem de isoenzimas com diferentes estabilidades térmicas.

A conversão fracionária se refere a um processo de inativação de primeira ordem que leva em conta a atividade enzimática diferente de zero após aquecimento ou pressurização prolongado(a) devido à presença de uma fração de enzima extremamente resistente ao calor (A_r - atividade quando o sistema alcança o equilíbrio) (Rizvi e Tong, 1997; Rudra Shalini *et al.*, 2008; Van Loey *et al.*, 2003). Isso significa que somente a fração lábil é inativada, enquanto que a atividade da fração estável (A_r) não muda ao longo do tempo; esta atividade diferente de zero pode ou não ser uma função da temperatura e da pressão aplicadas. A taxa constante de inativação (valor de k) e a atividade que permanece após tratamento prolongado (valor de A_r) podem ser estimadas, usando análise de regressão não linear ao se plotar a atividade residual *versus* tempo (Van Loey *et al.*, 2003).

O padrão de distribuição de Weibull é baseado no pressuposto de que, sob as condições examinadas, a taxa momentânea de sensibilidade térmica ao calor depende apenas da intensidade

de aquecimento transiente e da atividade residual, sendo independente da taxa à qual a atividade residual foi atingida (Peleg e Pechina, 2000). A distribuição de Weibull é de fato um modelo estocástico, suficientemente flexível, levando em conta a inativação da enzima em diferentes condições de processamento. Conforme visto na Equação 3.6 da Tabela 3.6, a distribuição de Weibull é caracterizada por dois parâmetros b e n , sugerindo uma degradação contínua da enzima. O valor de n determina a forma da curva de distribuição, enquanto b determina o seu dimensionamento, representando a taxa da reação. Conseqüentemente, b e n são os chamados fatores de escala e de forma, respectivamente (Hutchinson, 2000; Rudra Shalini *et al.*, 2008). Segundo Peleg (2003), valores de n maiores do que 1 indicam que a curva de sobrevivência semi-logarítmica possui concavidade voltada para baixo. Para os valores de n abaixo de 1, a concavidade voltada para cima (fenômeno de cauda, ou *tailing phenomena* em inglês) pode ser inferida como uma indicação da presença de uma fração da enzima extremamente resistente ao calor.

No modelo de n ésima ordem, como o nome já diz, n é a ordem da reação que pode ser variável (Rudra Shalini, Shivhare e Basu, 2008). Nesse caso, a taxa constante de inativação k recebe a unidade $U^{n-1}min^{-1}$ (Chakraborty, Rao e Mishra, 2015). O modelo de séries se baseia numa sequência de duas etapas irreversíveis de primeira ordem: a conversão da enzima nativa (E) para um intermediário (EI) com menor atividade específica; e a conversão subsequente do intermediário para uma forma de enzima inativa (ED) (Henley e Sadana, 1985).

O modelo de duas etapas consecutivas é baseado na reação de duas etapas irreversíveis sucessivas de primeira ordem: uma conversão irreversível da enzima nativa a uma intermediária com atividade específica menor; e a subsequente conversão irreversível da forma intermediária a uma forma inativa da enzima (Augusto *et al.*, 2015; Van Loey *et al.*, 2003). As taxas constantes de inativação k_1 e k_2 e a atividade de ambas as frações podem ser estimadas usando análise de regressão não linear através do gráfico da atividade residual em diferentes intervalos de tempo ao longo do tempo. k_1 e A_1 se referem à primeira etapa, e k_2 e A_2 , à segunda etapa (Van Loey *et al.*, 2003).

3.7 Aquecimento ôhmico

O processamento térmico convencional é comumente usado para a inativação de microrganismos deteriorantes e de enzimas degradantes da qualidade de alimentos. No entanto, o calor pode causar alterações indesejáveis na qualidade sensorial e nutricional de produtos alimentares. Assim, processos de tratamento alternativos ou complementares têm sido investigados

nos últimos anos a fim de controlar as atividades enzimáticas (Samaranayake e Sastry, 2016; Terefe *et al.*, 2015).

Uma tecnologia emergente na indústria alimentícia é o aquecimento ôhmico (AO). Trata-se de um processo que consiste na passagem de corrente elétrica alternada através de um alimento com a finalidade principal de aquecimento através da geração interna de calor. Devido à sua inerente resistência elétrica, o alimento transforma energia elétrica em térmica, promovendo, assim, um aumento de temperatura em seu interior (Resnick, 1996; Sastry, 2008).

Alimentos que contêm água e sais iônicos em abundância são mais adequados para o AO (Palaniappan e Sastry, 1991). A maior parte dos alimentos contém água e constituintes iônicos, tais como ácidos e sais, que conduzem eletricidade, porém apresenta também uma resistência, que gera calor ao se passar uma corrente elétrica. Assim, a resistência elétrica e, conseqüentemente, a condutividade elétrica de um alimento são os fatores mais importantes na determinação da taxa de aquecimento (Fellows, 2006).

A tecnologia mostra-se favorável em relação aos processos convencionais na indústria pois permite a manutenção da qualidade nutricional e sensorial e pode possibilitar, em relação aos processos comumente realizados, maior eficiência e rapidez (Castro *et al.*, 2004; Sastry, 2008). Esta característica faz com que o AO seja um dos tratamentos mais adequados, particularmente, para o caldo de cana, uma vez que o caldo contém componentes de sabor e aroma sensíveis que são facilmente destruídos em tempos de tratamento térmico mais longos (Saxena, Makroo e Srivastava, 2016).

O AO se distingue de outros métodos de aquecimento elétrico pela presença de eletrodos em contato com o alimento, permitindo, assim, o controle da frequência (que é baixa, quando comparada às micro-ondas e radiofrequência) e da forma de onda (embora a mais usada seja a senoidal) do campo elétrico imposto entre os eletrodos (Castro *et al.*, 2004; Pereira, Teixeira e Vicente, 2011; Wang e Sastry, 2002), além da intensidade do campo elétrico aplicado. No AO, o campo elétrico aplicado é moderado (MEF, do inglês *moderate electric field*) pois este é menor do que 1 kV/cm, portanto com grandeza menor do que no campo elétrico pulsado (PEF, do inglês *pulsed electric field*) (Kulshrestha e Sastry, 2010; Sastry, 2008).

O processamento de AO emprega correntes alternadas e tensões consideravelmente mais elevadas do que aquelas normalmente necessárias para reações eletroquímicas (faradaicas). Os eletrodos têm uma reatância capacitiva, que provoca uma queda de tensão inversamente proporcional à frequência do campo elétrico alternado. Além disso, na superfície do eletrodo podem se depositar produtos da reação eletroquímica, formando uma barreira física ao fluxo de corrente.

Portanto, a impedância nos eletrodos tem componentes capacitivos e resistivos, que são dependentes da frequência, da tensão aplicada e de outras condições celulares (Kulshrestha e Sastry, 2010).

A geração de calor (Q) do AO é dada pela equação $Q = \sigma.E^2$, onde σ é a condutividade elétrica da amostra e E é a intensidade do campo elétrico. A partir dessa equação verifica-se que o calor gerado é aumentado pelo aumento da condutividade elétrica e pelo aumento da intensidade do campo elétrico (Lee, Ryu e Kang, 2013). De acordo com Lee *et al.* (2013), o aumento da frequência da corrente alternada não apenas reduz a corrosão dos eletrodos, mas também aumenta a taxa de aquecimento ôhmico das amostras. Por isso, a frequência pode ser um parâmetro chave para um aquecimento rápido, através do aumento da condutividade elétrica da amostra.

3.7.1 Frequência do campo elétrico moderado

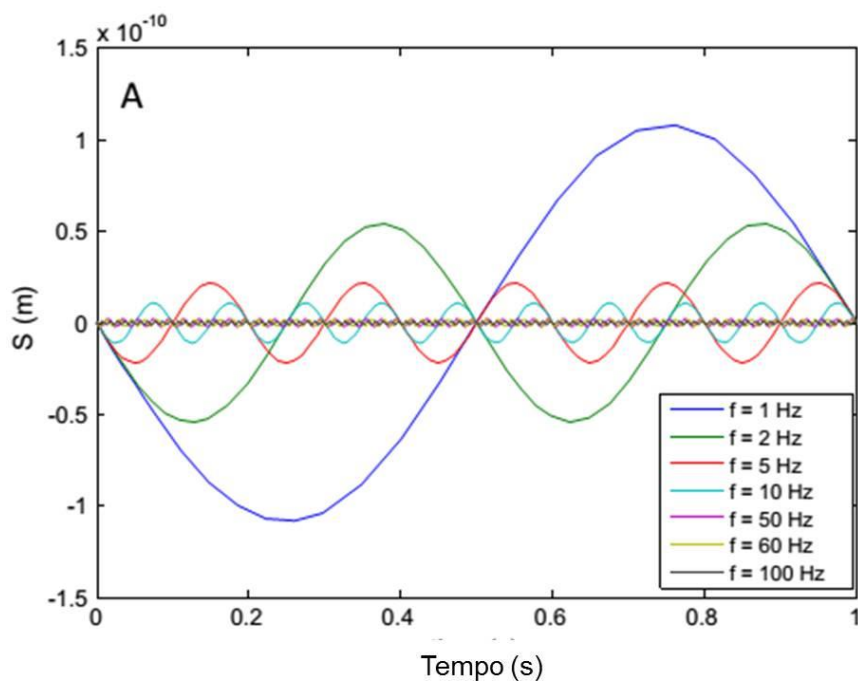
As frequências mais utilizadas no processo de AO tendem a ser aquelas da rede elétrica das fontes de alimentação (50 ou 60 Hz, dependendo do local), porém pode-se trabalhar com uma ampla gama de frequências, desde que não recaia nas faixas associadas às frequências de rádio ou de micro-ondas, sendo limitada apenas pela natureza da aplicação e por sua economia (Sastry, 2008).

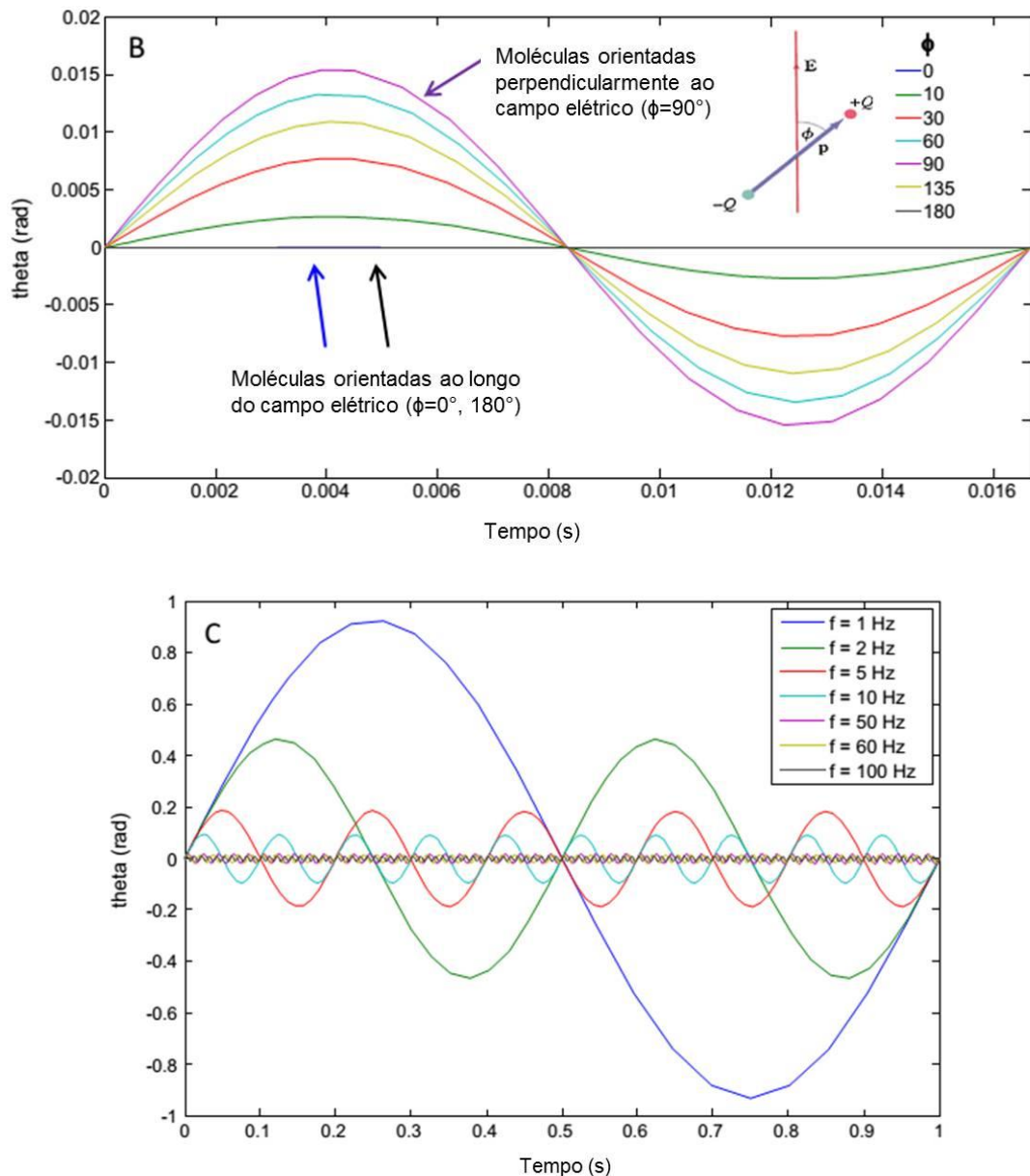
Em dispositivos de AO, o sinal é uma corrente alternada bipolar. Quando um campo elétrico é aplicado a uma amostra, as moléculas da amostra tendem a se alinhar com o campo elétrico oscilante, num processo conhecido como polarização. A polarização eletrônica é o deslocamento dos elétrons dos átomos em relação ao núcleo, e a polarização atômica é o deslocamento do núcleo do átomo dentro das moléculas (Mercali *et al.*, 2014; North, 1972). Quando uma tensão alternada de baixa frequência é utilizada, as moléculas têm tempo suficiente para se mover e rotacionar de acordo com a orientação do campo, e os movimentos de orientação são lentos. No entanto, quando uma tensão alternada de alta frequência é aplicada, os movimentos das moléculas que surgem do processo de polarização se tornam mais rápidos. Dependendo da frequência, os movimentos podem deixar de acontecer, pois as moléculas não têm tempo suficiente para rotar, passando apenas a vibrar. A polarização depende do tempo de relaxamento dos dipolos moleculares, que é, por sua vez, influenciada pela massa molar, pela mobilidade das moléculas e pela temperatura (Heng *et al.*, 2010, Mercali *et al.*, 2014b).

Um melhor entendimento dos movimentos moleculares devido às frequências do campo elétrico pode ser adquirido na visualização da Figura 3.8, que apresenta deslocamentos moleculares simulados para a pectinametilesterase (PME), apresentados no trabalho de Samaranayake e Sastry (2016a). Na Figura 3.8(A), são mostrados os resultados da simulação de movimento translacional da

PME. Verifica-se que os maiores deslocamentos lineares (ou S , como é chamado o eixo y do gráfico) ocorrem nas menores frequências; nas maiores frequências, os deslocamentos se tornam comparativamente muito menores devido à reversão extremamente rápida do campo. Os deslocamentos em frequências mais baixas estão na mesma ordem de grandeza da distância intermolecular da água à pressão atmosférica (cerca de $2,8 \times 10^{-10}$ m). Isto sugere que a exposição das enzimas a campos elétricos de baixa frequência e de baixa intensidade resulta em uma movimentação suficiente para aumentar a probabilidade de colisões adicionais com as moléculas de água presentes no mesmo meio. Em altas frequências, o movimento de translação elétrica parece ser insignificante em comparação com a distância intermolecular, sendo que as principais contribuições das colisões ocorrem devido ao movimento browniano.

Figura 3.8 – Movimentos moleculares simulados de PME em resposta a campos elétricos alternados. (A) Deslocamentos lineares (ao longo do campo elétrico) simulado de 1 a 100 Hz a 1 V/cm (onda senoidal). (B) Deslocamentos angulares (θ) simulados em várias orientações moleculares para o campo elétrico (1 V/cm, onda senoidal a 60 Hz). (C) Deslocamentos angulares simulados de moléculas orientadas perpendicularmente (1-100 Hz, 1 V/cm, onda senoidal).





Fonte: Samaranyake e Sastry (2016a).

A contribuição rotacional do movimento elétrico é mostrada na Figura 3.8(B), onde os ângulos rotacionais foram plotados ao longo de um ciclo para a molécula de PME alinhada com o eixo x em vários ângulos com relação ao campo elétrico. Como esperado, as moléculas que estavam inicialmente alinhadas perpendicularmente ao campo sofreram os maiores torques e, conseqüentemente, deslocamentos angulares, enquanto que aquelas orientadas ao longo do campo não rotacionaram. A influência da frequência é mostrada na Figura 3.8(C), onde novamente é possível verificar que os maiores deslocamentos ocorrem nas menores frequências, corroborando a ideia de maiores possibilidades de colisões moleculares nas menores frequências.

Alguns trabalhos envolvendo a aplicação de diferentes frequências durante o AO já foram

realizados. Exemplos são a inativação enzimática da PME e da PG de homogeneizado de tomate sem casca e sem semente (Samaranayake e Sastry, 2016a, 2016b) e a avaliação da degradação de ácido ascórbico e mudança de cor de polpa de acerola (Mercali *et al.*, 2014a, 2014b). Lee *et al.* (2013) avaliaram a inativação de *Escherichia coli* O157:H7 e de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium de molho de tomate. O molho foi tratado com várias frequências (60 Hz a 20 kHz) e formas de onda (senoidal, quadrada e dente de serra) a uma intensidade do campo elétrico constante de 12,5 V/cm. Em frequências superiores a 1 kHz, não houve corrosão dos eletrodos. As taxas de aquecimento entre as formas de onda não diferiram significativamente ($p > 0,05$) acima de 500 Hz. Com uma frequência de 60 Hz, a onda quadrada produziu uma menor taxa de aquecimento do que a das ondas senoidal e dente de serra. A condutividade elétrica da amostra aumentou com o aumento na frequência. À medida que a frequência aumentou, o tempo de tratamento necessário para reduzir a *E. coli* O157: H7 e *Salmonella enterica serovar Typhimurium* para abaixo do limite de detecção ($1 \log \text{ UFC g}^{-1}$) diminuiu, sem afetar a qualidade do produto. Estes resultados sugerem que o AO pode ser eficazmente utilizado para pasteurizar molho de tomate, e que o efeito da inativação é dependente da frequência e da condutividade elétrica, sem dependência da forma de onda.

Cho, Yi e Chung (2016) também avaliaram o uso de diferentes frequências durante a aplicação de AO na inativação microbiológica de cepas de *Bacillus*. Os autores analisaram propriedades da pasta de pimenta vermelha fermentada com aquecimento condutivo convencional de 70 a 100 °C e com AO aplicando frequências de 40 a 20.000 Hz, de 20 a 60 V, na temperatura de 90-100 °C. A inativação foi maior com o uso de AO (60 Hz e 30 V) do que para aquecimento de condução convencional devido à uniformidade de aquecimento interno dos produtos. A inativação eficaz de células vegetativas de cepas de *Bacillus* durante o AO a 100 °C foi indicada por uma redução de 99,7%, em comparação com o aquecimento convencional a 100 °C durante 8 minutos, produzindo uma redução de 81,9%. Embora o principal efeito para a inativação dos microrganismos pelo AO seja o próprio calor, foram relatados efeitos não térmicos adicionais da eletroporação, nos quais as cargas elétricas podem se acumular e formar poros através das células microbianas. A qualidade da pasta de pimenta vermelha fermentada tratada por AO foi quase a mesma da amostra inicial (sem tratamento) e mais elevada do que a tratada convencionalmente.

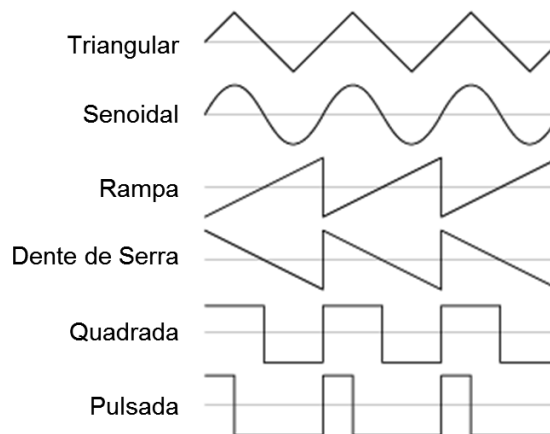
Em relação à eletroporação mencionada no último parágrafo, salienta-se de que se trata de um possível objetivo do AO. A eletroporação, também conhecida como eletropermeabilização ou eletroplasmólise, induz a formação de poros em membranas celulares, aumentando a transferência de massa de componentes para o meio externo, bem como de componentes presentes do meio externo para o interior da célula (Jemai e Vorobiev, 2002; Ksnadi e Sastry, 2012). Acredita-se que durante a eletropermeabilização, os poros sejam formados pela polarização local da membrana

celular quando esta é exposta a um potencial elétrico elevado; e é possível que o efeito de eletroporação seja aumentado com a utilização de menores frequências (Sensoy e Sastry, 2004; Zaid *et al.*, 1999).

3.7.2 Forma de onda

Um sistema elétrico pode oscilar de diversas maneiras (Knight, 2009). A Figura 3.9 mostra algumas das mais importantes formas de onda, entre elas estão triangular, senoidal, rampa, dente de serra, quadrada e a pulsada. Segundo Sastry (2008), não há nenhuma restrição sobre a forma de onda a ser utilizada, apesar de considerações de ordem prática ditarem o uso de onda senoidal ou pulso. De todas as formas, a oscilação senoidal é o mais básico de todos os movimentos oscilatórios. A frequência da onda produzida é igual à frequência da fonte de oscilação; uma fonte de onda que oscila em movimento harmônico simples (MHS) gera uma onda senoidal (Knight, 2009).

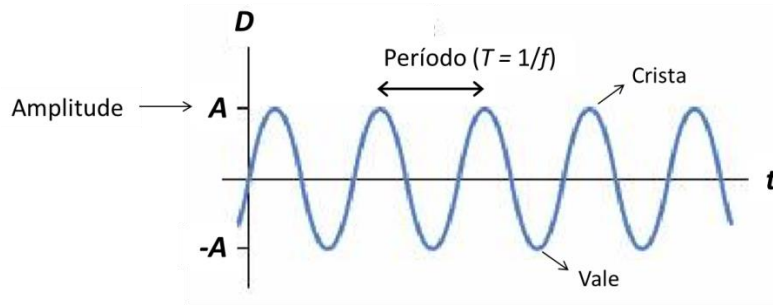
Figura 3.9 – Principais formas de onda.



Fonte: adaptado de Whorld (2016).

A Figura 3.10 apresenta os componentes de uma onda, representados em um gráfico-história de uma onda senoidal em um determinado ponto do espaço. Cada partícula do meio descreve um MHS com frequência f . O período da onda (T), indicado no gráfico, é o intervalo de tempo necessário para completar um ciclo do movimento. O período é inversamente proporcional à frequência. O valor máximo do deslocamento em relação à posição de equilíbrio é chamado de amplitude A do movimento (Knight, 2009); em um campo elétrico, o valor da tensão dividido por dois é igual a $+A$ e seu negativo é igual a $-A$.

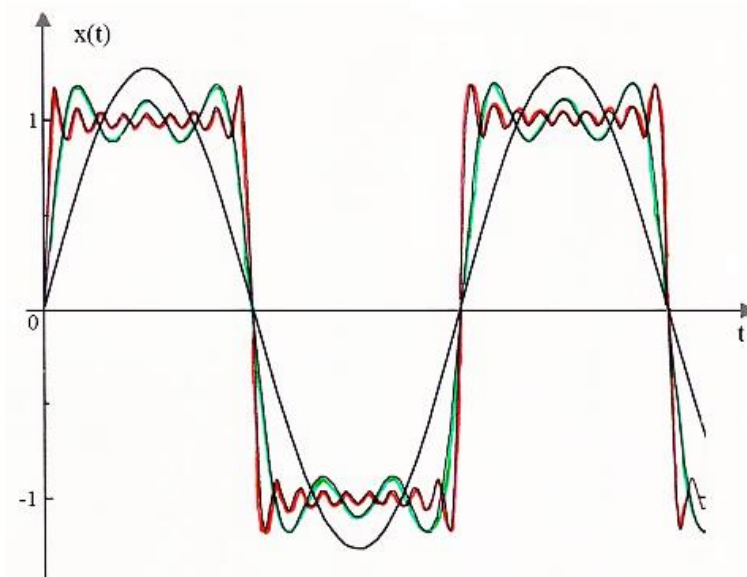
Figura 3.10 – Gráfico-história de uma onda senoidal.



Fonte: Knight (2009).

A Análise de Fourier (também chamada de Análise Harmônica) permite decompor um sinal nas suas componentes de frequência (harmônicas), ou seja, permite a representação de sinais como uma soma (uma combinação linear) de sinais básicos, como senos e co-senos, ou exponenciais complexas (Oppenheim e Willsky, 1997). As ondas quadrada e triangular podem ser decompostas em funções senoidais e cossenoides, respectivamente, através das séries de Fourier (Spiegel, 1981). A Figura 3.11 mostra o sinal periódico de uma onda quadrada, com as componentes harmônicas de primeira, terceira e nona ordens por série de Fourier.

Figura 3.11 – Decomposição harmônica de onda quadrada.



Fonte: Oppenheim e Willsky (1997).

Sensoy e Sastry (2004) investigaram os efeitos da tensão aplicada (200 e 212 V), da

frequência (1, 10 e 100 Hz com onda senoidal a 22 V) e da forma de onda (senoidal, triangular e quadrada a 60 Hz e 22 V) durante o branqueamento ôhmico (70 °C), comparando com convencional (em água fervente) de cogumelo em relação ao encolhimento, consumo de energia e uso de água (são usados cerca de 400 L para cada 60 kg de cogumelos). A frequência e a forma de onda não afetaram a perda de massa durante o branqueamento ôhmico na faixa estudada, entretanto, o branqueamento ôhmico oferece a vantagem de ser capaz de manter um elevado teor de sólidos durante o branqueamento em comparação com o uso de quantidades excessivas de água no branqueamento convencional. Ainda, o AO pode ter potencial para esta aplicação, devido às suas velocidades de aquecimento rápidas e volumétricas, e ao aumento da transferência de massa mesmo a temperaturas relativamente baixas.

3.7.3 Efeito do AO sobre as enzimas

As enzimas possuem cargas líquidas e momentos de dipolo quando em ambiente aquoso e, por isso, movem-se em resposta a um campo elétrico oscilante externo (de fato, as conhecidas técnicas de eletroforese em gel são utilizadas para separar as proteínas, precisamente por este princípio); por isso, é possível que a estrutura conformacional de uma enzima seja alterada por campos externos (Merciali *et al.*, 2014b; Pereira, Teixeira e Vicente, 2011; Samaranayake e Sastry, 2016a).

De acordo com Samaranayake e Sastry (2016a), as enzimas podem estar ligadas ou aprisionadas a segmentos de membrana e outros fragmentos, o que funciona como um isolante elétrico para a enzima, protegendo-a do campo elétrico; as enzimas que flutuam livremente no meio, por sua vez, podem ser altamente sensíveis ao campo elétrico. O mesmo entendimento pode ser realizado em relação ao aquecimento convencional onde segmentos de membrana e demais fragmentos que funcionam como proteção estrutural das enzimas. Samaranayake e Sastry (2016a) ainda afirmam que, ao contrário do quadro existente em um modelo de enzimas puras em solução, quase não existem enzimas livres em matrizes de alimentos reais. Assim, as enzimas respondem de maneira diferente ao campo elétrico quando estão em matrizes alimentícias reais em comparação àquelas em soluções. Além disso, as enzimas podem se ligar quimicamente com o seu substrato; o processamento dado ao alimento (como exemplo, moer a cana-de-açúcar para extrair o caldo) pode liberar as enzimas, que se homogeneízam na amostra e encontram o substrato, facilitando a ocorrência da reação.

Ainda há poucos trabalhos de inativação enzimática utilizando o AO, tampouco informações relativas aos efeitos não térmicos de tratamentos com MEF. De acordo com Castro *et al.* (2004), a

presença de um campo elétrico pode influenciar nas reações bioquímicas através da alteração do espaçamento molecular e do aumento de reações intercadeias. Em trabalho com enzimas de diferentes matrizes, os autores relataram que as cinéticas de inativação da lipoxigenase (LOX) comercial e da PPO de maçã foram significativamente afetadas pelo MEF, reduzindo o tempo necessário para a sua inativação. As inativações da fosfatase alcalina de leite cru, de pectinase comercial e da β -galactosidase oriunda de caldo de fermentação, por sua vez, não foram afetadas pelo MEF. Nos ensaios de inativação da PPO de maçã, especificamente, usaram-se temperaturas de 70 a 95 °C, com uma intensidade de campo elétrico de 20 V/cm. Destaca-se que o aquecimento das amostras, até chegar à temperatura de trabalho, foi obtido com a aplicação de 50 a 90 V/cm. Para os autores, os resultados obtidos encorajam o uso do aquecimento ôhmico para o branqueamento de frutas, devido à possibilidade do uso de um tratamento térmico menos agressivo. Por conseguinte, a destruição térmica de nutrientes (por exemplo, vitaminas e pigmentos) e da textura do fruto (um parâmetro de qualidade) será menor, aumentando assim a qualidade final dos produtos.

Içier, Yildiz e Baysal (2006) reportaram que a enzima POD de purê de ervilha foi inativada em um tempo de processamento mais curto por aquecimento ôhmico em comparação ao aquecimento convencional, quando a amostra foi aquecida com a aplicação de MEF de 20 V/cm, na temperatura de 30 a 100 °C durante 516 segundos (8,6 minutos) e branqueadas por mais um minuto a 100 °C. No mesmo estudo, a POD foi inativada a 50 V/cm após 54 segundos de aquecimento na temperatura de até 100 °C. Já em outro trabalho, Içier, Yildiz e Baysal (2008) estudaram a cinética de inativação enzimática da PPO durante o aquecimento ôhmico de suco de uva. As temperaturas de inativação foram de 60 °C para um campo elétrico de 40 V/cm e de 70 °C para campos elétricos de 20 e 30 V/cm.

Guida *et al.* (2013) alcançaram a inativação total de POD e PPO de cabeças de alcachofra com 360 s e 480 s de branqueamento ôhmico, respectivamente, com tensão de 24 V/cm a 80 °C. Segundo os autores, a inativação enzimática mais rápida das amostras branqueadas ohmicamente pode ser explicada pela maior uniformidade de aquecimento fornecida pelo tratamento ôhmico, quando comparado com o branqueamento convencional a 100 °C. No entanto, salienta-se que, nos três estudos reportados acima, os perfis de temperatura do tratamento convencional e ôhmico não foram igualados e, portanto, não é possível deduzir o efeito do campo elétrico sobre a inativação da enzima.

Jakób *et al.* (2010) investigaram a inativação de fosfatase alcalina, de pectinesterase e de POD por AO em leite, sucos de frutas e sucos de vegetais, respectivamente, em comparação com o aquecimento convencional indireto em água quente. Com o uso de campo elétrico, foi observada uma leve diminuição da estabilidade da enzima pectinesterase em sucos de frutas e da fosfatase

alcalina no leite. Por outro lado, a POD em sucos de vegetais foi mais propensa à desestabilização por AO. Um estudo cinético aprofundado mostrou que a diminuição da estabilidade não foi devida à modificação da estrutura terciária da enzima pelo campo elétrico, mas sim pelo efeito do ambiente modificado devido ao aumento do número de íons e às suas diferentes distribuições ao redor das moléculas da enzima.

Moreno *et al.* (2013) avaliaram a aplicação de aquecimento ôhmico no processo de desidratação osmótica de maçãs, utilizando 13 V/cm e temperaturas de 30 – 50 °C por 90 minutos, obtendo 4 – 5% de atividade residual da PPO; entretanto, a atividade enzimática foi recuperada ao longo do armazenamento (5 e 10 °C) das amostras por 4 semanas. As amostras tratadas a 30 °C apresentaram recuperação de 29% e de 46% da atividade nas temperaturas de armazenamento de 5 e 10 °C, respectivamente. A técnica de desidratação osmótica combinada com aquecimento ôhmico também foi experimentada para avaliar propriedades físicas e estabilizar maçãs microbiologicamente.

Gomes, Sarkis e Marczak (2018) avaliaram os efeitos do branqueamento ôhmico e convencional na cinética de inativação de POD e nas variações de cor da abóbora cabotiá (*Tetsukabuto*). O branqueamento foi conduzido usando uma solução aquosa de NaCl a 0,0068 mol/L (essa concentração foi escolhida para garantir que a condutividade elétrica do sistema fosse adequada para a aplicação de campo elétrico). Os tratamentos foram realizados na temperatura de 80 °C por 4 min; para o AO, foram aplicados 180 ± 1 V nos primeiros 40 s e, então, a tensão foi reduzida para 163 ± 5 V, a fim de manter a temperatura do meio. Para o tratamento convencional, a temperatura do meio foi mantida pela passagem de água aquecida a 83 °C na camisa da célula. Observou-se que o AO promoveu uma redução mais rápida da atividade enzimática: redução de 90% da atividade em 2 min, enquanto que foram necessários 4 min para mesma desnaturação com o branqueamento convencional. Este resultado foi confirmado através de modelagem matemática, pelo modelo de distribuição de Weibull. Os resultados obtidos sugeriram que a presença de um campo elétrico pode influenciar as reações envolvidas na desestabilização enzimática. Verificou-se que ambas as tecnologias não causaram modificações consideráveis na cor das abóboras.

Saxena *et al.* (2016) estudaram o efeito do tratamento de AO na inativação de PPO no caldo de cana sob diferentes intensidades de campo elétrico (24, 32 e 48 V/cm) e tempos de retenção (de 0,25 a 1,25 min) a uma temperatura de 80 ± 2 °C. A condição de processamento de 32 V/cm por 1 min foi a ideal e, portanto, nessa condição foram analisados também acidez titulável, açúcares redutores, ácido ascórbico e carga microbiana para 10 e 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente e sob refrigeração, respectivamente. Durante o armazenamento refrigerado, a acidez e os açúcares redutores permaneceram significativamente inalterados ($p < 0,01$). Por outro lado, a

degradação de ácido ascórbico foi mais pronunciada à temperatura ambiente. Ambos os tratamentos térmicos (AO e convencional) resultaram em reduções microbianas significativas, mas o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* ressurgiu após 5 e 25 dias sob temperatura ambiente e de refrigeração, respectivamente. Destaca-se que o *L. mesenteroides* necessita de sacarose e de açúcares redutores para crescimento e produção de dextrana (substância viscosa e gelatinosa), que é um indicador de deterioração da qualidade do caldo de cana (Barker e Ajongwen, 1991). Não foi detectado o crescimento de bolores e leveduras após o tratamento com AO. O maior grau de inativação da contagem total de placas pelo tratamento ôhmico foi devido ao efeito combinado do calor com a corrente elétrica (Leizeron e Shimoni, 2005). No geral, o uso de AO inibiu a atividade da enzima PPO (atividade residual de $10,1 \pm 0,3\%$ quando aplicados 32 V/cm a 80 ± 2 °C por 1 min), num tempo de processamento mais curto do que o aquecimento convencional, mantendo os atributos potenciais de qualidade do caldo.

Em outro estudo, Saxena *et al.* (2017) avaliaram a inativação de PPO de caldo de cana. A inativação máxima foi de 97,8% em um tempo de retenção de 5 min a 90 °C a 32 V/cm. A tendência para o tempo de redução decimal (valor *D*) para fração lábil e estável sugeriu que a eficiência da inativação da PPO aumenta com a intensidade do campo elétrico e com a temperatura. Verificou-se, também, que as frações lábeis foram mais facilmente inativadas a 60-70 °C, enquanto que as frações estáveis se tornaram suscetíveis à inativação a 80-90 °C.

Bagatini *et al.* (2018) realizaram experimentos de tratamento térmico ôhmico e convencional nas temperaturas de 70 e 80 °C, com a aplicação de dois gradientes de tensão (7,6 e 15,2 V/cm) e sem aplicação de corrente elétrica (aquecimento convencional) por 30 min para avaliação da inativação da POD. Amostras tratadas por 15 e 30 min foram armazenadas refrigeradas (temperatura média de 1,5 °C) em tubos Falcon para acompanhamento por até 14 dias. O tratamento térmico a 70 °C não foi eficiente, com uma inativação de, aproximadamente, 25% para o aquecimento convencional e de 40% para o ôhmico a 15,2 V/cm. Já a 80 °C foi alcançada cerca de 90% de inativação, com valores similares entre os diferentes tratamentos ($p > 0,05$); possivelmente, pois nestas condições, os efeitos térmicos foram superiores aos elétricos, impossibilitando a avaliação da influência da presença do campo elétrico durante o tratamento. No que tange às amostras refrigeradas, o caldo de cana tratado convencionalmente a 80 °C por 30 min, apresentou picos de até 80% de regeneração da POD. Por outro lado, a atividade residual da enzima das amostras tratadas via AO por 30 min, diminuiu com o armazenamento tanto para 7,6 quanto para 15,2 V/cm, demonstrando que os efeitos elétricos da tecnologia de AO que contribuiriam para inativação total da enzima durante o tratamento térmico. Castro *et al.* (2004) declararam que a perda de atividade enzimática pode estar relacionada à perda do grupo prostético metálico causada pelo campo

elétrico, o que está de acordo com os resultados obtidos para a POD do caldo de cana. O resultado obtido por Bagatini *et al.* (2018) demonstra que com essa tecnologia é possível se atingir resultados satisfatórios em relação à regeneração de atividade enzimática da POD, reduzindo modificações sensoriais do produto e aumentando a sua vida de prateleira.

Trabalhos envolvendo testes com diferentes frequências ou tipos de onda do campo elétrico são ainda mais escassos. Recentemente, Samaranayake e Sastry (2016a, b) publicaram dois trabalhos correlacionados, onde diferentes frequências de MEF na inativação da pectinametilesterase (PME) e da poligalacturonase (PG) de homogeneizado de tomates foram avaliadas. No primeiro trabalho, foi verificada a eficácia de frequências de MEF de até 60 Hz, quer para estimular ou para inibir a atividade da PME, e concluiu-se que frequências acima de 60 Hz não tiveram efeito sobre a atividade da enzima a 65 °C no tomate. Segundo os autores, as simulações de movimento molecular sugerem que a eficácia a baixas frequências pode ser devido à amplitude do movimento, com deslocamentos sendo da ordem da distância intermolecular da água. No segundo trabalho, foram estudados de forma mais aprofundada a intensidade do campo elétrico e o efeito da temperatura. Os resultados mostraram um significativo efeito não térmico do campo elétrico na atividade de PME, dependente da intensidade do MEF e da temperatura. Em temperaturas mais baixas, um efeito de ativação foi observado com MEF em comparação aos controles, enquanto que em temperaturas mais elevadas, foi observado um efeito de inativação. A eficácia da inativação enzimática aumentou com o aumento de intensidade de campo. Cálculos de movimentos brownianos e eletroforéticos sugeriram que, na presença de um campo elétrico, as moléculas enzimáticas se comportam como se estivessem a uma temperatura mais elevada do que a real temperatura do meio.

3.7.4 Efeito sobre compostos bioativos

As diferentes variáveis do AO também podem afetar os compostos bioativos presentes nos alimentos. Conforme comentado na seção 3.7.1, quando uma tensão alternada de alta frequência é aplicada, os movimentos das moléculas que surgem do processo de polarização se tornam mais rápidos, e esse efeito da polarização pode aumentar a taxa de degradação de compostos bioativos devido ao maior número de colisões entre as moléculas. Mercali *et al.* (2014a) avaliaram a degradação de vitamina C em polpa de acerola e constatou que, acima de 100 Hz, as taxas de degradação não se alteraram devido à polarização das moléculas. Por outro lado, em frequências mais baixas – principalmente abaixo de 60 Hz – ocorreram reações eletroquímicas, como corrosão dos eletrodos e eletrólise da água, que liberam metais, hidrogênio e oxigênio no meio, podendo causar a oxidação adicional de compostos bioativos e de pigmentos (Barnes *et al.*, 2013, Mercali *et*

al., 2014a). A maior força de colisão, provocada pelo aumento do gradiente de tensão, pode degradar os compostos bioativos. Quanto ao efeito da forma de onda sobre os compostos, este ainda não é claro, mas acredita-se que, devido às diferentes formas de oscilação possíveis, as respostas na degradação dos compostos possam ser diferentes.

Mercali *et al.* (2015) avaliaram a degradação das antocianinas em suco de jabuticaba usando aquecimento ôhmico (4,55 a 3,57 V/cm) e convencional em temperaturas de 70 a 90 °C. Ambas as tecnologias, avaliadas sob a mesma história térmica, apresentaram valores semelhantes para todos os parâmetros cinéticos e termodinâmicos (quando comparados à mesma temperatura), indicando que as antocianinas têm vias de degradação semelhantes durante o aquecimento ôhmico e convencional nas condições testadas. Os autores concluíram que a presença do campo elétrico não afetou o mecanismo e a velocidade de degradação de antocianinas.

Guida *et al.* (2013) mostraram que o teor residual de compostos fenólicos em amostras de alcachofra branqueadas dependeu significativamente da tecnologia de processamento ($p < 0,05$); porém, destaca-se que os autores não igualaram os perfis de aquecimento convencional e ôhmico. Em particular, o tratamento ôhmico causou um aumento de, aproximadamente, 29% da concentração de polifenóis totais comparado com amostras *in natura*. Em contraste, o aquecimento convencional promoveu uma diminuição de cerca de 27% do teor de compostos fenólicos. Os autores relataram que o aumento no conteúdo fenólico total na planta após o AO pode ter sido, em parte, devido à liberação de ácidos fenólicos ligados, bem como a ruptura ou amolecimento de constituintes celulares de plantas, aumentando a acessibilidade dos antioxidantes. Além disso, o cozimento pode causar a quebra de estruturas complexas, liberando compostos fenólicos individuais e/ou produtos da degradação fenólica, que também podem reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu. Também foi relatado que a aplicação de AO com intensidades inferiores a 100 V/cm pode causar alterações na permeabilidade das membranas celulares das plantas, aumentando a extração de carotenoides, flavonoides e polifenóis totais a partir de tecidos de plantas (Kulshrestha e Sastry, 2010; Lebovka, Shynkaryk e Vorobiev, 2007).

Frente ao exposto, este trabalho foi motivado pela grande produção de cana-de-açúcar no Brasil e pequena comercialização do seu caldo, devido à rápida deterioração. Diante da rica composição da bebida e do grande potencial mercadológico dos sucos de frutas industrializados, o consumo de caldo de cana poderia ser melhor explorado se este fosse tratado de maneira adequada, através de um processo capaz de manter suas características sensoriais e nutricionais. O AO é uma tecnologia emergente para o tratamento térmico de alimentos, sendo, neste trabalho, avaliado como uma alternativa para a pasteurização da bebida. Os capítulos a seguir abordam os detalhes da pesquisa realizada.

Capítulo 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta o procedimento para obtenção e caracterização das amostras *in natura* e a metodologia utilizada para o tratamento térmico convencional e ôhmico do caldo de cana. Também são apresentados os métodos para análise da atividade enzimática da POD e da PPO, além de pectinases totais e de PME, zimograma, teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides totais, antocianinas monoméricas totais e análise de cor. Por fim, é apresentada a metodologia da análise estatística realizada.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), localizado no Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da UFRGS. Algumas análises foram realizadas no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS, as mesmas estão especificadas ao longo do texto.

4.1 Preparo das amostras

O caldo de cana foi doado por uma propriedade rural situada em Veranópolis / RS. A cana-de-açúcar de primeiro plantio foi colhida e moída em moenda mecânica. Após extração, o caldo foi prontamente homogeneizado e congelado em sacos plásticos em volumes individuais de 300 mL na primeira etapa do trabalho (cana colhida em junho de 2015) e de 100 mL na segunda etapa (cana colhida em dezembro de 2015). O terceiro lote de cana foi colhido em agosto de 2016 e foi armazenado em sacos de 100 e de 300 mL. O caldo de cana foi descongelado em banho de água imediatamente antes dos experimentos de aquecimento ôhmico e convencional.

Também foram realizados ensaios com frações líquidas e sólidas do caldo de cana (que foram obtidas em processos de centrifugação), com caldo concentrado e com a enzima comercial. Os itens

a seguir descrevem o preparo dessas amostras que, posteriormente, foram tratadas termicamente por AO e CH (aquecimento convencional).

4.1.1 Centrifugação

O caldo *in natura* foi primeiramente centrifugado refrigerado a 1.000 g, para sedimentar núcleos e detritos celulares; posteriormente, o sobrenadante resultante foi centrifugado novamente, mas desta vez a 20.000 g (Hitachi CR21GIII centrífuga refrigerada a alta velocidade) para sedimentar organelas como a mitocôndria (Loewen, 2017). Esse procedimento foi realizado porque a POD é mais concentrada no citoplasma, mitocôndria e parede celular das células vegetais (Toivonen e Brummell, 2008). O sobrenadante (fração líquida) e o sedimento (fração sólida) (ressuspenso em um tampão de fosfato 50 mM e pH 7,0 a 0,8% p/v) foram então tratados por com aquecimento convencional e ôhmico como descrito no item 4.3.6.

4.1.2 Concentração do caldo de cana

O caldo de cana foi concentrado para a remoção das moléculas de açúcar do mesmo. A concentração do caldo foi realizada pelo uso de um filtro de centrífuga de 15 mL da Amicon Ultra (Merck Millipore Ltd., Irlanda), que permite a concentração de proteínas com uma membrana de 50 kDa. Destaca-se que a massa molar da POD do caldo de cana pode ser menor do que o diâmetro de corte da membrana utilizada, entretanto, devido ao entupimento de membranas testadas de menor abertura, acredita-se que a enzima pode estar ligada a açúcares, aumentando sua massa molar. Para isso, o caldo *in natura* (18 °Brix) foi descongelado, centrifugado durante 10 min a 4.757 g a 3 °C, filtrado em papel de filtro qualitativo e depois centrifugado no cartucho de 50 kDa durante 80 minutos a 5.000 g em um rotor de ângulo fixo a 3 °C (centrífuga Sigma, modelo 2-16KL, Alemanha). O caldo concentrado foi diluído (1: 1) em um tampão de fosfato 50 mM a pH 7,0 e novamente foi centrifugado no cartucho nas mesmas condições acima, porém durante 60 min. A amostra concentrada final (9,7 °Brix) foi ressuspensa no tampão (1:15), e, em seguida, este extrato (1,3 °Brix) foi tratado termicamente em triplicata.

4.1.3 Enzima comercial

Experimentos com POD de rábano (HRP = *horseradish peroxidase*) também foram realizados para verificar a ação do aquecimento ôhmico sobre a enzima pura, sem interferentes. A enzima foi adquirida da Calbiochem (RZ = 0,79), e a solução de HRP foi preparada dissolvendo-se 12 mg da

enzima em 1 L de tampão de fosfato 50 mM pH 7,0. Para avaliar o efeito protetor do açúcar sobre a enzima, também foi preparada uma solução de HRP de 12 mg/L com sacarose (com 18 ° Brix, ou seja, o mesmo teor de sólidos solúveis do lote de caldo *in natura* usado nos itens 4.1.1 e 4.1.2). Ambas as soluções de HRP foram tratadas termicamente em triplicata, com e sem a passagem de corrente elétrica.

4.2 Análises físico-químicas

O caldo *in natura* foi caracterizado segundo teor de sólidos solúveis, condutividade elétrica, atividade de água, pH e índice de acidez titulável. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

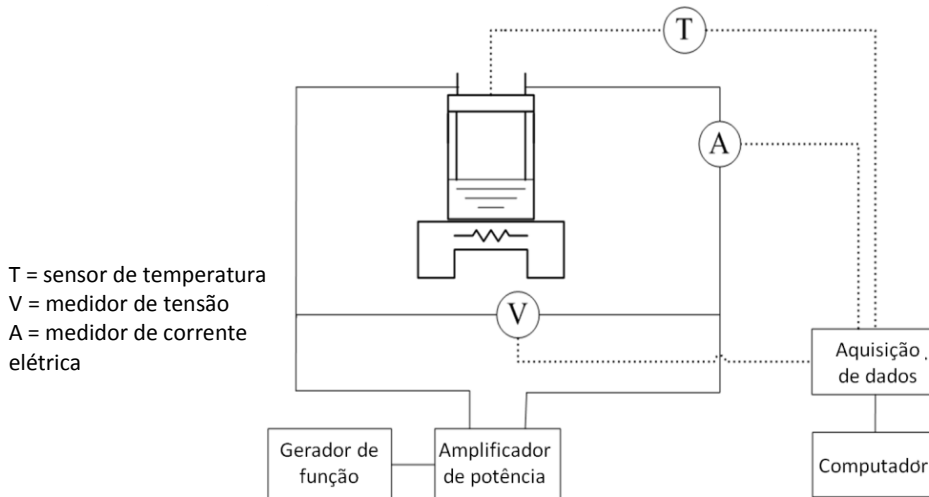
Os sólidos solúveis foram determinados por refratometria (refratômetro portátil modelo SZJ-A) com leitura corrigida para 20 °C, conforme o método n° 932.12 da AOAC (2000). A condutividade elétrica foi medida através de condutivímetro (Digimed, modelo DM-3P, Brasil) com temperatura de referência de 20 °C. A atividade de água foi medida através de leitura direta a 25°C em um higrômetro termoconstante elétrico (Novasina, modelo LabMaster-aw, Suíça) de acordo com o método 978.18 da AOAC (1990). O pH foi determinado com o uso de um pHmetro (Digimed, modelo DM-22, Brasil), de acordo com o método 981.12 da AOAC (2000). O índice de acidez titulável foi determinado através do método de titulometria por volumetria com indicador segundo o método 016/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Também foram realizadas análises de atividade enzimática de POD, de PPO, de PME e de pectinase, compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas monoméricas totais e cor, que são descritas nos subcapítulos de 4.4 a 4.9.

4.3 Tratamento térmico via de aquecimento ôhmico e convencional

Para o tratamento ôhmico, foram utilizados dois equipamentos distintos. Para avaliar variações de temperatura, frequências e formas de onda usou-se o “sistema I”, que consiste de um amplificador de potência (Industrial Test Equipment, modelo 500A, Port Washington, NY, USA), um gerador de função (Tektronix Inc., modelo AFG 3251, Richardson, Tex, USA), um sistema de aquisição de dados (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA), um computador, um agitador magnético e uma célula ôhmica. A Figura 4.1 apresenta um diagrama esquemático do sistema I.

A corrente que fluiu através do circuito do sistema I foi monitorada por um medidor de corrente Pearson (Pearson Electronics Inc., modelo 150, Palo Alto, CA, USA) com uma faixa de trabalho de 40 Hz a 20 MHz. As frequências e as formas de onda amplificadas foram monitoradas por meio de um osciloscópio (Tektronix Inc., modelo TDS 360, Richardson, Tex, USA).

Figura 4.1 – Diagrama esquemático do sistema I de aquecimento ôhmico.

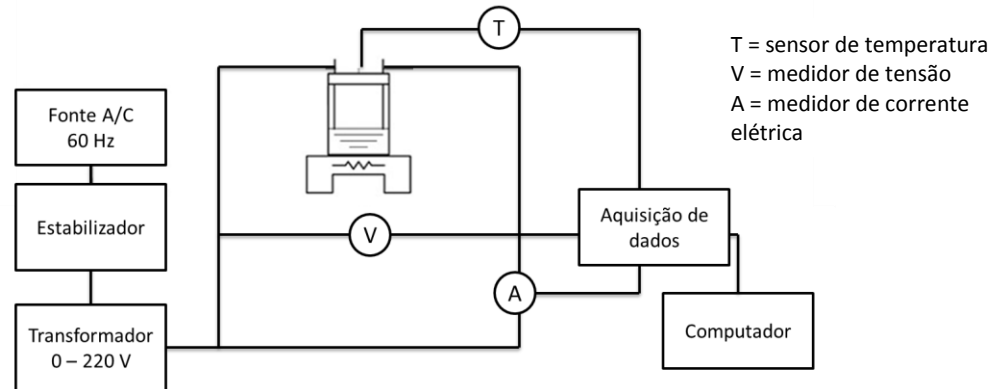


Fonte: Mercali *et al.* (2014a).

O “sistema II” foi utilizado para avaliar variações de tensão. O fornecimento de energia desse sistema consiste de um estabilizador (Forceline, modelo EV 1000 T/2-2, Brasil), um variador de tensão de 0 a 220 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. Também faz parte do sistema, um módulo de aquisição e registro de dados (Novus, modelo Field Logger, Brasil), um computador, um agitador magnético e uma célula ôhmica. A Figura 4.2 apresenta um diagrama esquemático do sistema II.

Para monitoramento da temperatura do sistema II foram utilizados medidores de temperatura do tipo Pt-100 (Novus, Brasil), com haste de aço inoxidável. Para o monitoramento da tensão através das amostras ensaiadas no sistema II, foi utilizado um transdutor de tensão CA (Yokogawa, modelo 2374A-T13-VRX/NA, Taiwan), cujo sinal de entrada varia de 0 a 300 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.

Figura 4.2 – Diagrama esquemático do sistema II de aquecimento ôhmico.



Fonte: Mercali *et al.* (2012).

4.3.1 Estudo do efeito da temperatura

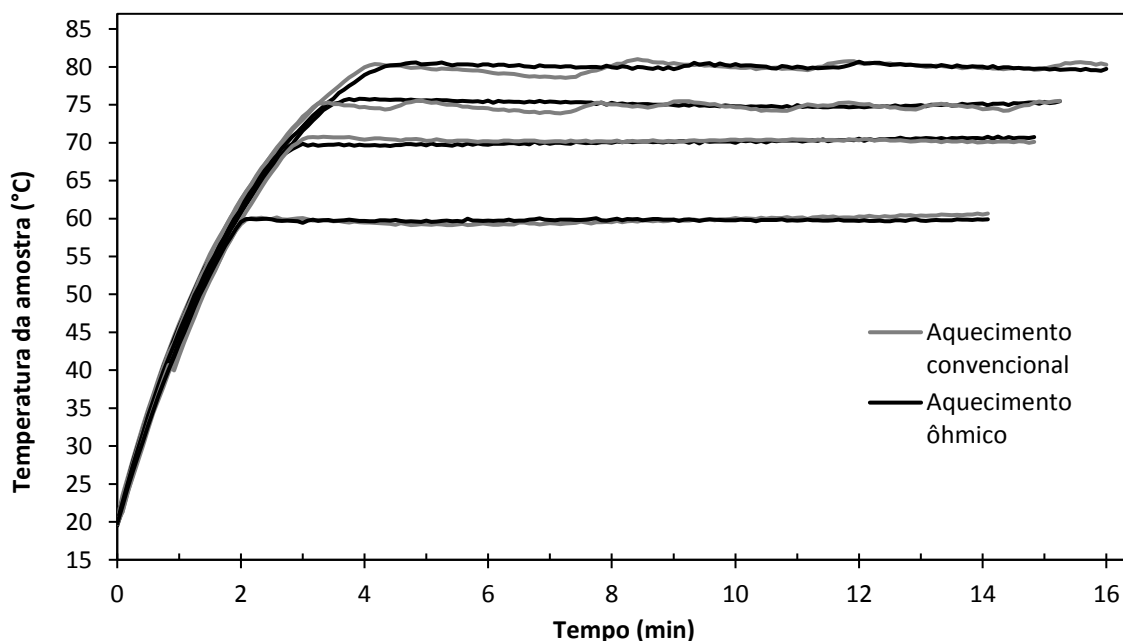
Em uma primeira etapa do trabalho, estudaram-se os efeitos do tratamento térmico convencional e ôhmico sobre a inativação enzimática da POD e da PPO e sobre o teor de fenólicos e flavonoides em diferentes temperaturas: 60, 70, 75 e 80 °C. Essa faixa de temperatura foi escolhida para possibilitar um estudo cinético de inativação de ambas as enzimas. Os ensaios cinéticos foram conduzidos no sistema I, com aplicação de 25 V entre os eletrodos por 12 minutos; utilizou-se campo elétrico na frequência de 60 Hz e onda senoidal (condições da rede elétrica). Trabalhou-se com 25 V, pois esse é o máximo gradiente de tensão permitido pelo sistema I, a fim de se trabalhar com segurança com o caldo de cana.

Nessa etapa, foi utilizada uma célula ôhmica que consiste de um recipiente de vidro de 600 mL encamisado. Os eletrodos de titânio (5 cm de altura) são curvados devido ao formato da célula, com distância máxima e mínima entre os eletrodos de 7 e 5,7 cm, respectivamente. Com essas condições de tensão e distância, obtém-se um campo elétrico de 3,57 a 4,39 V/cm. A temperatura foi medida por dois termopares do tipo T; um deles foi localizado próximo a um dos eletrodos e o outro afastado (equidistante) dos mesmos. A distribuição de temperatura da amostra foi homogênea durante os ensaios. A variação máxima durante a fase isotérmica foi de ± 1 °C em todos os experimentos.

Para manter a mesma rampa de aquecimento em todos os experimentos, foram utilizados dois banhos de aquecimento, um na temperatura estudada (para aquecimento convencional ou 1 grau abaixo da temperatura estudada para aquecimento ôhmico) e outro em temperatura mais alta (de 98 °C), a fim de acelerar o aquecimento. Para os experimentos conduzidos na presença de campo elétrico, primeiramente, a camisa da célula ôhmica foi aquecida com água a 98 °C; no momento em

que a temperatura da amostra atingia 1 °C abaixo da temperatura de manutenção, a água de aquecimento da camisa era trocada pela água do segundo banho de aquecimento, já na temperatura do ensaio, através de um sistema de mangueiras. O fornecimento de campo elétrico foi iniciado no tempo zero de cada experimento, ou seja, após se atingir a temperatura de trabalho. Para o tratamento convencional, seguiu-se o mesmo procedimento, porém sem a aplicação do campo elétrico. Isso foi necessário para coincidir os perfis de tempo e temperatura dos processos de aquecimento convencionais e ôhmicos. Este procedimento possibilitou a avaliação dos efeitos não térmicos da eletricidade durante o tratamento térmico. A Figura 4.3 apresenta um gráfico da temperatura em função do tempo para amostras tratadas via aquecimento ôhmico e convencional nas quatro temperaturas ensaiadas. Os tempos necessários para atingir a temperatura de manutenção desejada foram de, aproximadamente, 2, 3, 3,5 e 4 minutos para 60, 70, 75 e 80 °C, respectivamente.

Figura 4.3 – Evolução da temperatura durante os experimentos via aquecimento convencional e ôhmico do caldo de cana.



Os experimentos foram realizados com 250 g de caldo de cana. O caldo foi agitado com uso de equipamento agitador magnético (IKA-Werke, modelo C-MAG HS10, Alemanha) na velocidade de 750 rotações por minuto. As amostras foram coletadas com pipetas Pasteur em tubos Falcon de 15 mL em sete tempos de aquecimento (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 min), imediatamente colocadas em

banho de gelo; posteriormente, as atividades enzimáticas da POD e da PPO e demais análises foram realizadas. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

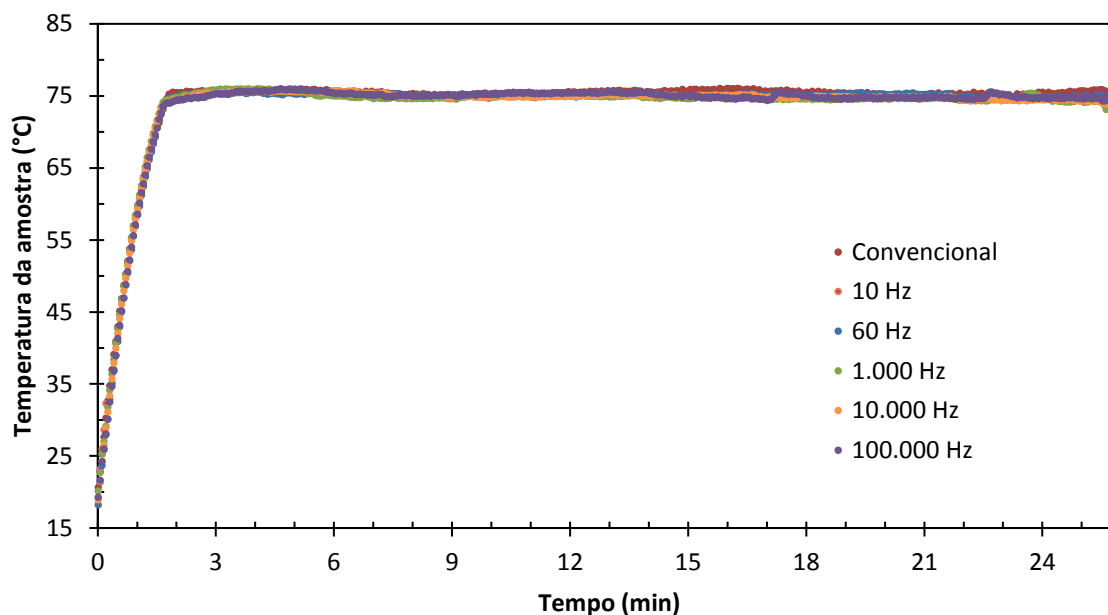
4.3.2 *Estudo do efeito da frequência do MEF*

Na segunda e na terceira etapa do trabalho, estudou-se o efeito de diferentes frequências (10, 60, 1.000, 10.000 e 100.000 Hz) sobre a inativação enzimática da POD e sobre o teor de fenólicos e flavonoides totais (esta última somente na segunda etapa) e sobre a estabilidade da cor do caldo de cana. Os ensaios cinéticos foram conduzidos no sistema I com caldo na temperatura de 75 ± 1 °C (na segunda etapa) e 60 e 80 °C (na terceira etapa), com aplicação de 25 V nos eletrodos e onda senoidal por 25 min e 30 min, respectivamente para cada etapa.

Para estes ensaios, foi utilizada uma célula ôhmica menor, para permitir aquecimento mais rápido da amostra e para se ter uma maior intensidade de campo elétrico. A célula consiste de um recipiente de vidro de 250 mL encamisado. Os eletrodos de titânio (3,4 cm de altura) dessa célula também são curvados, com distância máxima entre os eletrodos de 3,7 cm e a mínima de 2,8 cm (com essas condições de tensão e distância, obtém-se um campo elétrico de 6,76 a 8,93 V/cm). A temperatura foi medida por um termopar do tipo T, localizado próximo a um dos eletrodos.

Na segunda etapa, nos experimentos de AO, o campo elétrico foi aplicado já no início do aquecimento da amostra, a fim de acelerar o processo e possibilitar melhor visualização de possível efeito não térmico. Na terceira etapa, a passagem do campo elétrico foi iniciada somente no tempo zero, a fim de avaliar somente a temperatura da fase isotérmica. Novamente, foram usados dois banhos de aquecimento: um deles na temperatura de manutenção (para o caso de aquecimento convencional ou de um grau abaixo da temperatura de manutenção para o caso de aquecimento ôhmico) e outro a 98 °C (CH) ou a 97 °C (AO) para acelerar o aquecimento da amostra durante a fase de aumento da temperatura. A Figura 4.4 apresenta um gráfico da temperatura em função do tempo para os ensaios de aquecimento convencional e ôhmico a 75 °C, esse último conduzido nas cinco frequências citadas. O tempo necessário para atingir a temperatura de 75 °C foi de, aproximadamente, 1,7 min. Na terceira etapa, levou-se 1,1 min para atingir 60 °C e 2,6 min para o caldo chegar a 80 °C.

Figura 4.4 – Evolução da temperatura durante os aquecimentos convencional e ôhmico do caldo de cana a diferentes frequências.



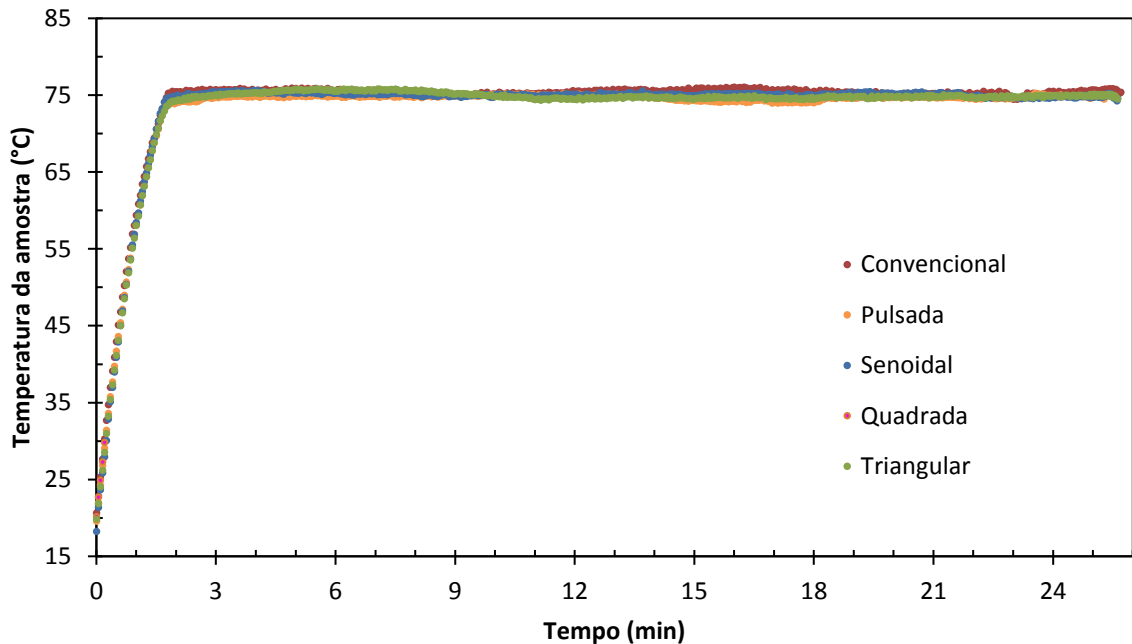
Os experimentos foram realizados com 85 g de caldo de cana que foi agitado em equipamento agitador magnético (IKA-Werke, modelo C-MAG HS10, Alemanha) na velocidade de 750 rpm. As amostras foram coletadas com pipetas Pasteur em tubos Falcon de 15 mL em nove tempos de aquecimento (0, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20 e 25 min), imediatamente colocadas em banho de gelo, e, posteriormente, as atividades enzimáticas da POD e da PPO e demais análises foram realizadas. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.3.3 Estudo da influência da forma da onda do MEF

Exatamente nos mesmos moldes da seção anterior, foram realizados ensaios a 75 e 80 °C, variando a forma de onda, porém mantendo a frequência em 60 Hz. Foram utilizadas as seguintes formas de onda: senoidal, quadrada, triangular e pulsada (pulsos de 3,2 ms, num período total de 8,3 ms) a 75 °C e excluindo-se a onda pulsada nos tratamentos a 80 °C.

A Figura 4.5 apresenta um gráfico da temperatura em função do tempo para os ensaios de aquecimento convencional e ôhmico a 75 °C, esse último conduzido nas cinco formas de onda trabalhadas. Os tempos necessários para atingir as temperaturas das fases isotérmicas foram os mesmos da seção anterior.

Figura 4.5 – Evolução da temperatura durante os aquecimentos convencional e ôhmico do caldo de cana com diferentes formas de onda.



4.3.4 Estudo do efeito do gradiente de tensão

Na segunda e na terceira etapa do trabalho, também foi estudado o efeito da tensão aplicada nos eletrodos durante o aquecimento ôhmico sobre a inativação enzimática da POD, o teor de fenólicos e a estabilidade da cor do caldo de cana. Utilizou-se o sistema II de AO, em que foi mantida a frequência e a forma de onda da rede elétrica (60 Hz e onda senoidal). Foi usada a mesma célula ôhmica e os mesmos eletrodos curvos de titânio descritos na etapa 2 da seção 4.3.1; a distância entre os eletrodos variou de 5,7 a 7 cm. Na segunda etapa, foram utilizadas as tensões de $25 \pm 0,5$ V (3,9 V/cm) e $130 \pm 2,5$ V (20,5 V/cm) a 75 °C por 25 minutos. Na terceira etapa, os ensaios cinéticos a 60 °C foram conduzidos usando $25 \pm 0,5$ V (5,2 V/cm) e $75 \pm 2,5$ V (15,6 V/cm) e na temperatura de 80 °C, usou-se $25 \pm 0,5$ V (5,2 V/cm) e $80 \pm 2,5$ V (16,7 V/cm) por 15 min na fase isotérmica.

A temperatura foi medida por dois termopares do tipo Pt-100; um deles foi localizado próximo a um dos eletrodos e o outro afastado dos mesmos. A distribuição de temperatura da amostra foi homogênea durante os ensaios. A variação máxima de temperatura durante a fase isotérmica foi de $\pm 1,0$ °C a 25 V e de $\pm 1,5$ °C nos experimentos a 130 V.

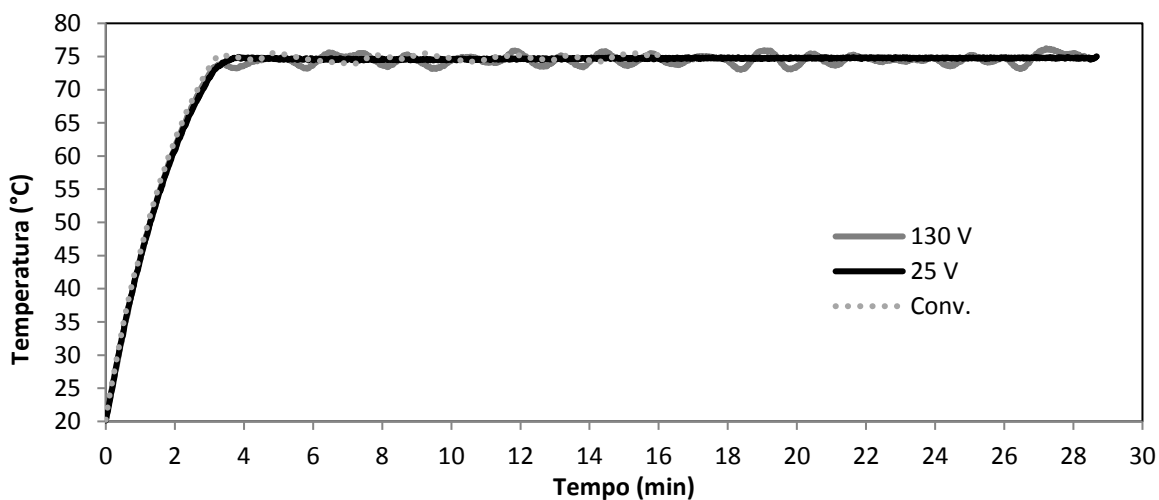
Para manter a mesma rampa de aquecimento em todos os experimentos, foram utilizados dois banhos termostáticos, um em temperatura de 98 °C (banho quente), a fim de acelerar o aquecimento durante a fase não isotérmica e outro em temperatura específica para cada tensão

aplicada (banho frio); a Tabela 4.1 mostra os valores de tensão e respectivas temperaturas mantidas no banho frio a fim de manter o caldo de cana a 75 °C durante a fase isotérmica. Em todos os ensaios, primeiramente a amostra foi aquecida com água a 98 °C passando pela camisa da célula; no momento em que a temperatura da amostra atingia 73 °C, a água de aquecimento da camisa era trocada pela água do banho frio (Tabela 4.1). No momento em que o caldo de cana atingia 74 °C (tempo zero), o fornecimento de campo elétrico era iniciado. A Figura 4.6 apresenta um gráfico da temperatura em função do tempo para amostras tratadas via aquecimento convencional e ôhmico nas duas tensões. O tempo necessário para atingir a temperatura de manutenção foi de, aproximadamente, 3,5 minutos para 75 °C, 2,1 min para 60 °C e 4,6 min para 80 °C.

Tabela 4.1 – Binômios de tensão e temperatura do banho frio para manutenção de 75 °C.

Tensão (V)	Temperatura do banho frio (°C)
25 ± 0,2	74
130 ± 2,5	5

Figura 4.6 – Evolução da temperatura do caldo de cana durante os experimentos com diferentes tensões a 75 °C.



Os experimentos foram realizados com 250 g de caldo de cana, agitado por agitador magnético (IKA-Werke, modelo C-MAG HS10, Alemanha) a 750 rpm na segunda etapa e 1250 rpm na terceira etapa. As amostras foram coletadas com pipetas Pasteur em tubos Falcon de 15 mL em nove tempos de aquecimento (0, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20 e 25 min) na segunda etapa e sete tempos (0, 1,5, 3, 5, 7,5, 10 e 15 min) na terceira etapa. As amostras coletadas foram imediatamente colocadas em

banho de gelo; posteriormente, as análises foram realizadas. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.3.5 Estudo com o caldo de cana fracionado e concentrado e com enzima comercial

Os experimentos de aquecimento ôhmico e convencional realizados com as frações líquida, sólida, concentrada e com a enzima comercial (descritas nas subseções 4.1.1 - 4.1.3) foram realizados na célula pequena (250 mL) no sistema I (Figura 4.1).

Um volume fixo de 50 mL de amostra com agitação de 1.250 rpm por uso de agitador magnético foi utilizado. Os tratamentos foram realizados durante 25 min, com coletas de amostra nos tempos 0, 2, 5, 10, 15, 20 e 25 min. Foram mantidos fixos a temperatura de trabalho (75 °C), a frequência da rede (60 Hz), a intensidade do campo elétrico (7,8 V/cm) e a forma de onda (senoidal). Os experimentos foram realizados em triplicata e as amostras levaram aproximadamente 93 s para atingir a fase isotérmica, com perfis de histórico de temperatura similares.

4.4 Análise da atividade enzimática

A atividade enzimática após a amostra atingir a fase isotérmica (a temperatura de estudo desejada) foi considerada a atividade enzimática inicial (tempo zero). Isto foi necessário pois os modelos cinéticos são aplicados somente em condições isotérmicas.

As análises das atividades enzimáticas da POD e da PPO foram baseadas nos métodos colorimétricos de Chisari, Barbagallo e Spagna (2007) e de Walker (2001), respectivamente. Para o preparo do extrato enzimático utilizado na análise da atividade enzimática das duas enzimas, foram misturados em vortex (agitador de soluções Phoenix, modelo AP-56) uma parte de caldo de cana para quatro partes de solução tampão fosfato 0,05 M com pH 7,0. A temperatura da mistura foi mantida abaixo de 4°C. O extrato enzimático, previamente agitado em vortex, foi centrifugado por 10 min a 4°C a 6.000 rpm (4.757 g) em centrífuga refrigerada (CIENTEC, modelo CT-5000R, Brasil) e filtrado em papel filtro qualitativo.

4.4.1 Peroxidase (POD)

Para a análise da atividade de POD, foi feita a leitura em espectrofotômetro (PG Instruments, modelo T80 UV/VIS) a 460 nm com cubetas contendo 1,5 mL de solução tampão fosfato 0,1 M pH 5,0, 1 mL de extrato enzimático, 0,2 mL de solução 1% de peróxido de hidrogênio e 0,5 mL de solução de guaiacol 1,5% (ou 0,5 mL de água destilada para o branco). As cubetas foram ambientadas a 25 °C antes da realização das leituras. É importante destacar que o substrato (guaiacol) foi adicionado à cubeta já dentro do espectrofotômetro e teve agitação provocada pela sucção/liberação de volume da mistura através da ponteira da pipeta imediatamente antes do início da leitura.

A mudança da coloração foi monitorada a cada 20 segundos durante 3 minutos na primeira etapa do trabalho. A partir da segunda etapa, devido às maiores atividades enzimáticas da amostra *in natura* quando comparadas ao caldo da primeira etapa, a leitura foi realizada a cada segundo durante 50 segundos. As análises foram realizadas em duplicata para cada ponto, sendo que quando o erro obtido foi maior do que 5%, a análise foi repetida pela terceira vez.

Uma vez que muitas enzimas não se encontram na sua forma pura, não é possível quantificá-las, então os resultados são expressos em termos de unidades de atividade enzimática (UAE), definidas arbitrariamente como a quantidade de enzima capaz de aumentar 0,001 unidade de absorbância por minuto nas condições mencionadas (Lupetti, Ramos e Fatibello-Filho, 2003). Neste sentido, a atividade enzimática, denominada *A*, foi determinada a partir da variação na absorbância por minuto ($\Delta\text{abs}/\text{min}$) e dividida por 0,001; para tanto, foi utilizada somente a parte linear da curva, usando regressão linear (Saxena *et al.*, 2016).

A atividade enzimática residual (A/A_0 - para o tempo *t* e 0, respectivamente) em função do tempo de processamento a diferentes temperaturas de processamento foram ajustadas para vários modelos (Tabela 3.6), utilizando regressão não-linear (Statistica versão 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

Para caracterização do caldo de cana e para melhor discutir os resultados, foram realizadas análises de temperatura ótima e pH ótimo da POD do caldo de cana do terceiro lote (resultados apresentados no terceiro artigo).

a) Temperatura ótima: a atividade da POD do caldo *in natura* foi determinada nas temperaturas de 11, 20, 30, 40, 50 e 60 ° C em tampão fosfato 0,1 M pH 5,0. Foi utilizado o mesmo protocolo de antes, com uma pequena diferença: o tampão e os substratos (guaiacol 1,5% e peróxido de hidrogênio 1%) foram pré-incubados durante 5 minutos na temperatura de análise e, em seguida, adicionou-se o extrato enzimático. As análises foram realizadas em um espectrofotômetro com controle de temperatura (Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 com controlador CPS, modelo 240A, Kyoto,

Japão), em triplicata, no Laboratório de Equipamentos Especiais do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS.

b) pH ótimo: a atividade da POD foi determinada em tampões fosfato-citrato 0,4 M na faixa de pH de 3,0 a 7,5, com intervalos de 0,5 unidade. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (PG Instruments, modelo T80 UV/VIS) a 25 °C sob condições padrão como descrito acima, mas utilizando todas as soluções tamponadas no respectivo pH. As análises foram realizadas em triplicata, na Central Analítica do Departamento de Engenharia Química.

4.4.2 Polifenoloxidase (PPO)

De maneira muito semelhante à realizada para a POD, a análise da atividade da PPO, deu-se com cubetas contendo 2,2 mL de solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,0, 0,5 mL de extrato enzimático e 0,3 mL de solução de catecol 0,6 M (ou 0,3 mL de água destilada para o branco). A absorbância da reação foi lida a 420 nm em espectrofotômetro. As cubetas foram ambientadas a 25 °C antes da realização das leituras.

O catecol foi adicionado à cubeta já dentro do espectrofotômetro e teve o mesmo tipo de agitação do que a POD. A mudança da coloração foi monitorada a cada 20 segundos durante 3 minutos. O cálculo da atividade da polifenoloxidase foi realizado de forma semelhante ao descrito no item 4.4.1

4.4.3 Pectinametilesterase (PME)

As análises da atividade enzimática de PME, assim como da pectinase total, foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Tecnologia Enzimática, no ICTA / UFRGS. A atividade de PME foi determinada pela titulação dos grupos carboxílicos liberados pela desesterificação da pectina, conforme descrito por Rouse e Atkins (1952). Primeiramente, adicionaram-se 9,95 mL substrato que contém pectina, na concentração de 5 g/L, diluída em tampão de NaCl pH 4,5 (0,15 mol/L), em copo de béquer. Após, colocou-se 0,05 mL de caldo de cana e se incubou sob agitação por 10 minutos a 30 °C. Passado o tempo de reação, titulou-se o extrato enzimático com NaOH (0,02M) até atingir um pH final de 4,5. Com o volume gasto de NaOH, calculou-se a quantidade de PME (mg/mL) necessária para liberar 1 miliequivalente de grupos carboxil por minuto, e expressa em unidades/mL, de acordo com a equação 4.1:

$$U \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{V_T \times M_{\text{NaOH}} \times V_R \times FD}{t \times V_E} \quad (4.1)$$

onde V_T é o volume da titulação em mL, M_{NaOH} é a concentração molar de NaOH, V_R é o volume da reação em mL, FD é o fator de diluição, t é o tempo da reação em minutos e V_E é o volume da amostra.

4.4.4 Pectinase total

A atividade enzimática das pectinases foi medida pela hidrólise da pectina, através do método descrito por Miller (1959), que mede a liberação de grupos redutores devido à degradação da pectina. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS. Adicionou-se 0,9 mL de substrato contendo pectina 0,25% (2,5 g/L) diluída em tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) em tubo de ensaio. Em seguida, incubou-se em banho com agitação a 37 °C e então se adicionou 0,1 mL de caldo de cana *in natura*, deixando-se agir por, exatamente, 1 minuto. Então, retirou-se o tubo do banho e colocou-se em gelo para interromper a atividade enzimática, juntamente com a ação de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A amostra foi fervida por exatamente 5 minutos, interrompendo-se a reação com banho de gelo. Por fim, agitou-se o tubo em vortex e leu-se a absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

O ponto zero (utilizado para zerar o equipamento) consiste em 1,0 mL de tampão de citrato de sódio, enquanto que o branco se resume a 0,9 mL de substrato e 0,1 mL de tampão de citrato de sódio (ambos também recebem o DNS). Os tubos do ponto zero e do branco foram fervidos juntamente com os tubos da amostra (realizada em triplicata).

Os valores de absorbância podem ser convertidos em concentração (C) através de uma curva de calibração de glicose. Assim, uma unidade de pectinase é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de grupos redutores, expresso em glicose, por minuto, nas condições da reação e expressa em unidades/mL. Essa atividade total da pectinase pode ser calculada por:

$$U \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{C \times v_f \times FD}{t \times v_e} \quad (4.2)$$

onde C é a concentração de grupos redutores liberados em mg/mL, v_f é o volume final da reação em mL, FD é o fator de diluição da amostra, t é o tempo de reação em minutos e v_e é o volume de amostra em mL. O valor de C é determinado pela equação da reta da curva de calibração da glicose (equação 4.3). Para o cálculo da atividade em μ mol/mL, utiliza-se a equação 4.4.

$$\text{Absorbância (Abs da amostra - Abs do branco)} = 1,5343 \times C - 0,0177 \quad (4.3)$$

$$U(\mu\text{mol}/\text{mL}) = \frac{U(\text{mg}/\text{mL}) \times 1000}{180} \quad (4.4)$$

4.5 Zimograma

Zimogramas foram realizados para as amostras de caldo *in natura*, fração líquida e fração sólida, com a finalidade de se conhecer o número de isoenzimas em cada fração da amostra. As análises foram realizadas no Laboratório de Enzimologia, situado no ICTA / UFRGS.

Para essa análise foram preparados dois geis (com a parte superior contendo características de concentração e a parte inferior contendo propriedades de separação) para depositar as amostras e fazer a separação das diferentes isoenzimas da POD presente no caldo de cana. Os geis de separação (10%) e de concentração (5%) foram preparados de acordo com Green e Sambrook (2012), exceto pelo detergente SDS (dodecilsulfato de sódio), que não foi usado nos geis. Foi utilizada uma guia na hora da confecção dos géis, para fazer a marcação de 10 canais, possibilitando a deposição de 10 amostras diferentes para a corrida do zimograma.

A análise também fez uso de tampões de corrida e de amostra para permitir a separação das isoenzimas durante a corrida na cuba de eletroforese. Cada amostra (volume de 10 µL) foi previamente misturada com 5 µL de tampão de amostra, foram depositadas no gel que se encontrava fixo dentro da cuba de eletroforese, preenchida com o tampão de corrida. Os zimogramas foram obtidos a 200 V (200 mA para 2 minigeis).

Após as corridas, os geis foram submersos na solução de atividade corante (contendo guaiacol) para revelação das distintas bandas de isoenzimas. Os tampões e a solução corante foram preparados de acordo com Wilkesman *et al.* (2014).

4.6 Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada nas amostras coletadas após 6 e 12 minutos de tratamento para a primeira etapa e para os tempos 0, 12 e 25 minutos nas segunda e

terceira etapas, além das amostras *in natura*, seguindo metodologia de Folin-Ciocalteu (Rodrigues *et al.*, 2011; Singleton e Rossi, 1965).

A colorimetria do método de Folin-Ciocalteu é baseada na redução química do reagente, composto por uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio. Os produtos da redução desses óxidos são de coloração azul e apresentam alta absorção de luz, tendo sua absorbância máxima no comprimento de onda de 765 nm; a intensidade da absorção de luz é proporcional à concentração de fenólicos (Waterhouse, 2002).

Para a análise, realizada em triplicata, as amostras de caldo de cana foram previamente centrifugadas por 3 minutos a 13.400 rpm (centrífuga Eppendorf, modelo Mini Spin). Foram misturados 400 µL de extrato de caldo de cana com fator de diluição 10 (ou de água destilada para o branco), 1,7 mL de água ultrapura e 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 2 N (marca Fator 1); a mistura foi vigorosamente agitada. Em seguida, foi adicionado 1,7 mL de solução de carbonato de sódio 7% aos tubos Falcon de 15 mL. As amostras foram agitadas em vortex e deixadas reagir por 1 hora a 25°C, protegidas da luz. A leitura da absorbância foi realizada a 765 nm em espectrofotômetro.

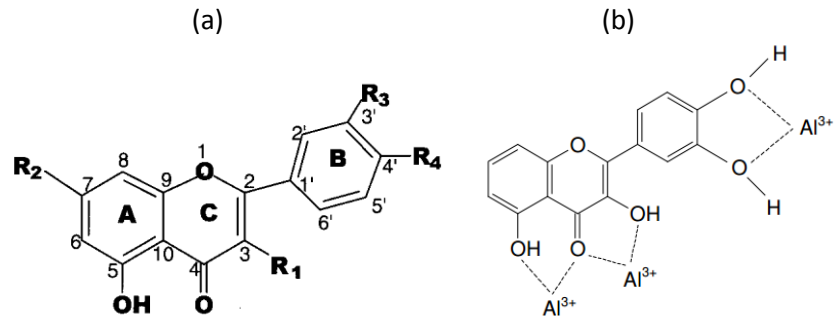
O teor de fenólicos totais foi determinado através de uma curva padrão de ácido gálico e expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro de amostra inicial (*in natura*). Para elaboração da curva padrão, foram preparadas soluções de ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) nas concentrações de 10, 20, 30, 50, 70 e 80 mg/L com leituras em triplicata; o coeficiente de determinação da curva de calibração foi superior a 0,997.

4.7 Flavonoides totais

A análise de flavonoides totais foi feita para as mesmas amostras indicadas no item 4.5. O teor de flavonóides totais foi estimado pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio (AlCl_3). O princípio envolvido no método é que o AlCl_3 forma complexos ácido-estáveis com os grupos ceto no C-4 ou com grupo hidroxila no C-3 ou no C-5 de flavonas e flavonois. Além disso, também forma complexos ácido-lábeis com os grupos *o*-dihidroxila no anel A ou B de flavonoides (Bag, Grihanjali Devi e Bhaigyaba, 2015). A Figura 4.7 apresenta a estrutura básica de um flavonoide e uma representação dos três possíveis sítios quelantes. Os produtos da reação com nitrito de sódio, seguidos pelo desenvolvimento de um composto colorido de flavonoide-alumínio, são de coloração

amarelo-alaranjada, com absorvância máxima no comprimento de onda de 510 nm (Abu Bakar *et al.*, 2009).

Figura 4.7 – Estrutura básica de um flavonoide (a) e esquema representativo da complexação de flavonoides com o íon Al^{3+} (b).



Fonte: Petry, Ortega e Silva (2001) e Mabry, Markham e Thomas (1970).

O método colorimétrico de cloreto de alumínio, proposto por Yang, Martinson e Liu (2009) foi seguido nesse trabalho. Para tanto, foram utilizados 250 μ L de caldo de cana, previamente centrifugado por 3 minutos a 13.400 rpm (centrífuga Eppendorf, modelo Mini Spin, Alemanha). Para o branco, utilizou-se água destilada no lugar do caldo de cana. Ao caldo de cana, foram misturados 1,25 mL de água destilada e 75 μ L de solução de nitrito de sódio 5% em tubos de Falcon de 15 mL. A mistura foi agitada em vortex e deixada reagir por 5 minutos. Então, foram adicionados 150 μ L de solução de cloreto de alumínio 10% aos tubos; os mesmos foram agitados em vortex e deixados reagir por 6 minutos. Por fim, foram adicionados 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 1 M e 775 μ L de água destilada aos tubos, que foram novamente agitados. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 510 nm.

O teor de flavonoides totais foi determinado através de uma curva padrão de (+)-catequina e expresso como miligramas de equivalentes de catequina por litro de amostra inicial. Para elaboração da curva padrão, foram preparadas soluções de (+)-catequina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 mg/L; o coeficiente de determinação da curva de calibração foi superior a 0,998. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.8 Antocianinas monoméricas totais

A análise de antocianinas monoméricas totais foi realizada seguindo a metodologia do pH diferencial proposta por Lee, Durst e Wrolstad (2005). Para análise, o caldo *in natura* foi previamente centrifugado (centrífuga Eppendorf, modelo Mini Spin, Alemanha) por 3 minutos a 13.400 rpm. Os sobrenadantes foram diluídos em soluções tampão pH 1,0 (cloreto de potássio 0,025 M) e pH 4,5 (acetato de sódio 0,4 M). O fator de diluição foi determinado através da diluição da amostra em tampão pH 1,0 até a obtenção de uma absorbância entre 0,2 e 0,8 no comprimento de onda de 520 nm (máxima absorção cianidina-3-glicosídeo: antocianina usada como equivalente quando não se sabe qual é a antocianina majoritária da amostra). Mesmo assim, realizou-se uma varredura no espectrofotômetro a fim de verificar o comprimento de onda de máxima absorção da amostra de caldo.

As amostras diluídas devem, então, ser mantidas em repouso no escuro e em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse tempo, a absorbância em 520 nm e 700 nm das amostras foi determinada, utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (PG Instruments Ltd, modelo T80 UV/VIS Spectrometer, Reino Unido).

A partir das absorbâncias, calcula-se o valor de A , utilizando-se a equação 4.5:

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 1} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 4,5} \quad (4.5)$$

onde $A_{520 \text{ nm}}$ é a absorbância no comprimento de onda de máxima absorção da cianidina-3-glicosídeo e $A_{700 \text{ nm}}$ é a absorbância em 700 nm.

A concentração de antocianinas monoméricas é expressa em mg/L da antocianina cianidina-3-glicosídeo, sendo calculada pela seguinte equação:

$$\text{Antocianinas (mg/L)} = \frac{(A \times MM \times FD \times 10^3)}{(\epsilon \times 1)} \quad (4.6)$$

onde MM é a massa molar da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g/mol), FD é o fator de diluição predeterminado e ϵ é a absorvidade molar da mesma antocianina (26.900 L/mol.cm) e 1 é equivalente ao caminho percorrido pelo feixe de luz (largura da cubeta igual a 1 cm).

4.9 Análise de cor

A medida de cor foi realizada por meio do colorímetro ColorQuest XE (Hunter Assoc. Laboratory, VA, Estados Unidos). Os parâmetros colorimétricos L^* , a^* e b^* da escala CIELAB foram determinados conforme indicado pela *Comission International de l'Eclairage* (CIE). A análise foi realizada com a fonte de luz D_{65} no ângulo de observação de 10° , usando o modo de reflectância especular incluída por leitura direta.

A cor espacial CIELAB possui três coordenadas:

- L^* representa a luminosidade da cor ($L^* = 0$ denota preto e $L^* = 100$ denota branco);
- a^* indica a posição entre verde e vermelho (a^* varia de -80 a +100) e
- b^* é a extensão de cor azul a amarelo (b^* varia de -50 a +70).

A diferença total de cor (ΔE^*) é importante quando se avalia a relação entre análises visuais e numéricas; é calculada como a distância Euclidiana entre dois pontos em um espaço tridimensional definido por L^* , a^* e b^* (Sant'Anna *et al.*, 2013). ΔE^* foi calculada segundo a equação 4.7, de Hunter-Scotfield (Hunter, 1975).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4.7)$$

onde $\Delta a^* = a^* - a_0^*$, $\Delta b^* = b^* - b_0^*$ e $\Delta L^* = L^* - L_0^*$; o subscrito "0", neste caso, indica a cor da amostra *in natura*.

4.10 Análise estatística

As atividades enzimáticas residuais em função do tempo foram ajustadas a modelos cinéticos de primeira ordem, isoenzimas distintas, duas frações, multicomponente de primeira ordem, conversão fracionária, distribuição de Weibull, *n*ésima ordem e séries, conforme mostrado na Tabela 3.6.

O desempenho de cada modelo foi avaliado através do coeficiente de determinação (R^2), obtido na estimação dos parâmetros, dos valores de chi-quadrado (χ^2) e da raiz do erro médio quadrático (REMQ). O cálculo de χ^2 e de REMQ são dados pelas equações 4.8 e 4.9 e tem o objetivo de mostrar a dimensão do erro de uma determinada estimativa.

$$\chi^2 = \frac{\sum(\alpha_{\text{observado}} - \alpha_{\text{predito}})^2}{n-p} \quad (4.8)$$

$$\text{REMQ} = \frac{1}{n} \left[\sum n (\alpha_{\text{observado}} - \alpha_{\text{predito}})^2 \right]^{0,5} \quad (4.9)$$

Nas equações 4.8 e 4.9, n é o número de observações e p é o número de parâmetros. $\alpha_{\text{observado}}$ e α_{predito} são as atividades enzimáticas residuais obtidas experimentalmente e preditas pelo modelo cinético, respectivamente.

Para a discriminação entre os modelos cinéticos testados, devem ser considerados critérios estatísticos e físicos. Os critérios estatísticos incluem R^2 , χ^2 e REMQ. Em geral, baixo R^2 e altos χ^2 e REMQ inferem que o modelo não é capaz de explicar a variação dos dados experimentais. Quanto aos critérios físicos para a seleção de um modelo, inclui-se que os parâmetros estimados a uma dada temperatura não devem ser negativos (Sant'anna *et al.*, 2010; Rudra Shalini *et al.*, 2008).

As diferentes condições testadas experimentalmente foram comparadas utilizando-se teste-t de *Student*, ANOVA e teste de Tukey com nível de confiança de 95% (Statistica versão 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

Capítulo 5 – RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

A Tabela 5.1 apresenta a caracterização dos lotes de caldo de cana utilizados nesse trabalho.

Tabela 5.1 – Caracterização do caldo de cana *in natura*.

Análise	1° Lote Caldo extraído em junho/2015	2° Lote Caldo extraído em dezembro/2015	3° Lote Caldo extraído em agosto/2016
pH	5,36 ± 0,05 ^a	5,41 ± 0,04 ^a	5,43 ± 0,05 ^a
Índice de acidez (% ácido cítrico)	1,20 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,01 ^b	-
Atividade de água	0,951 ± 0,001	-	-
Sólidos solúveis (°Brix, 20 °C)	16,4 ± 0,4 ^c	20 ± 1 ^a	18,0 ± 0,1 ^b
Cond. Elétrica (µS cm ⁻¹ , 20 °C)	2.022 ± 35 ^b	1.693 ± 20 ^c	4.393 ± 259 ^a
Atividade POD (UAE min ⁻¹ g ⁻¹)	4.631 ± 469 ^b	18.434 ± 1.337 ^a	19.393 ± 1.326 ^a
Atividade PPO (UAE min ⁻¹ g ⁻¹)	1.920 ± 124 ^b	2.640 ± 37 ^a	-
Atividade PME (mg mL ⁻¹)	-	56 ± 0	-
Atividade pectinase total (mg mL ⁻¹ e µmol mL ⁻¹)	-	1,07 ± 0,07 e 5,9 ± 0,4	-
Fenólicos Totais (mg EAG L ⁻¹)	460 ± 33 ^b	766 ± 52 ^a	389 ± 31 ^c
Flavonoides Totais (mg EC L ⁻¹)	222 ± 16 ^b	257 ± 25 ^a	-
Antocianinas Totais Monoméricas (mg/L)	-	Não detectadas	-

^a Letras iguais para uma mesma análise significa que não há diferença significativa ($p > 0,05$). Onde há o símbolo "-" a análise não foi realizada devido à ausência de necessidade.

Com exceção da acidez titulável, os demais resultados obtidos para o primeiro lote de caldo de cana estão de acordo com o esperado para a amostra, indicando baixa acidez e elevada atividade

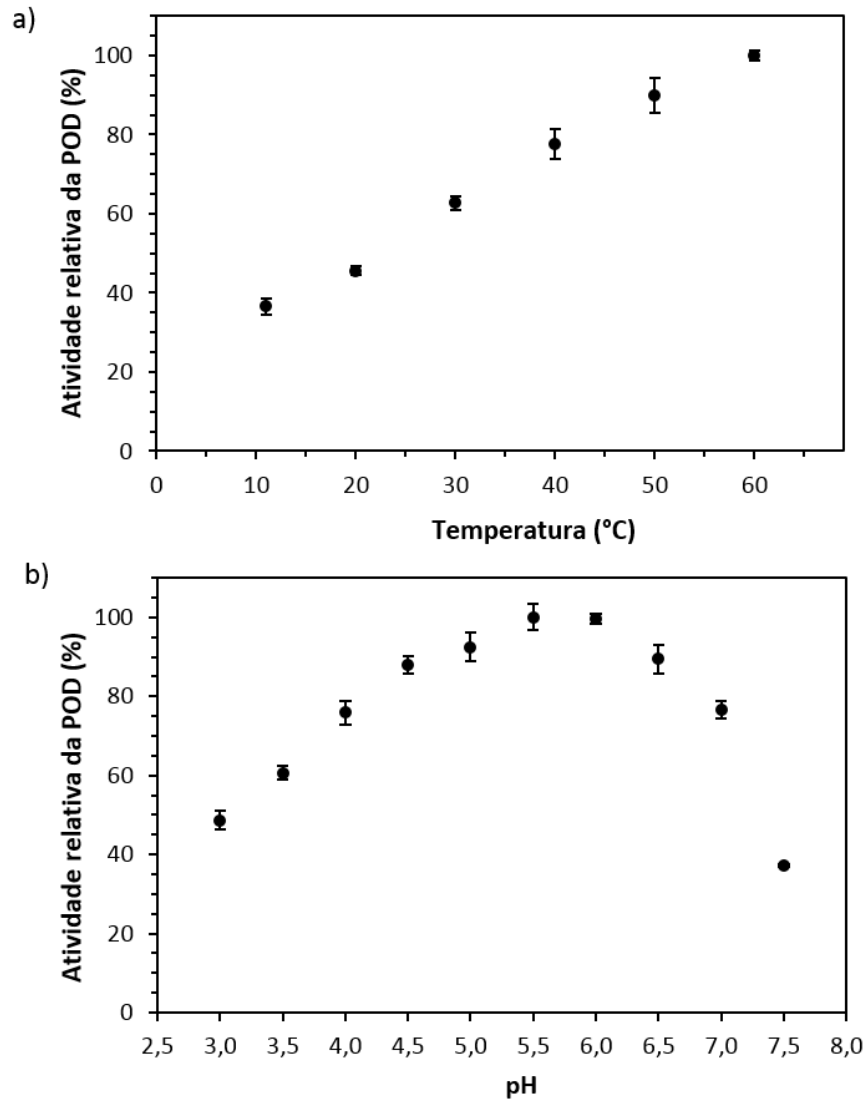
de água, condições ótimas para o crescimento de microrganismos na amostra não tratada. Kunitake (2012) e Oliveira *et al.* (2007) relataram valores de pH de 5,1 a 5,4, acidez titulável de 0,04 a 0,064% de ácido cítrico e sólidos solúveis totais de 17 ± 2 a $23,3 \pm 0,4$ °Brix. Mao *et al.* (2007) reportaram que a acidez titulável aumentou rapidamente durante o armazenamento refrigerado do caldo de cana. Os autores esclareceram que o aumento da acidez pode ser devido à produção de ácido acético e de ácido láctico provenientes de crescimento microbiano. O mesmo pode ter acontecido à amostra *in natura* extraída em junho/2015, pois a mesma foi armazenada refrigerada por alguns dias antes da realização da análise da acidez titulável, e estaria, portanto, somando esses outros ácidos de origem microbiana à concentração de ácido cítrico.

Embora o objetivo do trabalho não seja a comparação das amostras *in natura*, salvo o valor de pH que não variou entre as amostras, é importante destacar algumas diferenças entre ambas, principalmente a atividade enzimática da POD e o teor de fenólicos totais. Atribui-se essa variação da atividade enzimática devido às diferentes épocas de colheita da cana-de-açúcar, com maior período de maturação do segundo lote e maior temperatura de extração do caldo, causando uma ativação da enzima, ainda somada à ação da PPO que gera o substrato H_2O_2 para a atividade da POD. O maior teor de compostos fenólicos totais do caldo extraído no período quente deve-se, possivelmente, devido à ação do clima sobre a maturação da cana-de-açúcar. Com relação à Tabela 5.1, destaca-se ainda que, diferentemente do exposto por Mersad *et al.* (2003), não foram detectadas antocianinas no caldo de cana.

Os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade da POD do caldo de cana são mostrados na Figura 5.1. Pode-se verificar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da enzima com o aumento da temperatura. Não foi possível determinar a temperatura ótima para a atividade da POD, uma vez que, na faixa de temperaturas avaliada, não foi observado nenhum ponto de inflexão. Temperaturas acima de 60 °C não foram testadas devido a limitações do sistema de controle de temperatura do espectrofotômetro. É importante destacar que a temperatura ótima da enzima depende da matriz alimentícia: Martins *et al.* (2017) encontraram máxima atividade da POD de polpa de butiá (*Butia catarinensis*) a 45 °C e Mizobutsi *et al.* (2010) observaram temperatura ótima de 70 °C para a lichia.

Em relação ao pH, puderam ser verificadas maiores atividades atingidas na faixa de pH entre 5,5 e 6,0, próximo ao pH do caldo de cana (5,43), significando que o caldo fornece condição de pH ideal para a atividade da POD. Outros autores encontraram valores similares de pH ótimo para a POD: 6,0 para o morango do tipo *Madame Moutot* (Chisari *et al.*, 2007), 5,0 para a polpa de butiá (Martins *et al.*, 2017) e 6,5 para a lichia (Mizobutsi *et al.*, 2010).

Figura 5.1 – Efeito da temperatura (a) e do pH (b) na atividade da POD de caldo de cana.



A seguir são apresentados quatro artigos que contêm os resultados do presente trabalho, sempre comparando o desempenho do aquecimento ôhmico com o convencional. O primeiro artigo trata de uma avaliação da influência da temperatura na cinética da atividade enzimática da PPO e da POD (com escolha do modelo cinético apropriado), no teor de compostos fenólicos totais e flavonoides. No artigo 2, estudou-se o efeito da frequência, da forma de onda e do gradiente de tensão do campo elétrico sobre a cinética de inativação da POD do caldo de cana a 75 °C, além da resposta sobre o teor de compostos fenólicos e a cor do caldo. O artigo 3 apresenta a avaliação das mesmas variáveis do campo elétrico, porém nas temperaturas de 60 e 80 °C. Neste terceiro artigo, também são apresentados os resultados de temperatura e pH ótimos da POD do caldo de cana. Por fim, no último artigo, são apresentados os resultados relativos à atividade enzimática da POD nas frações sólida, líquida e concentrada do caldo de cana, além da atividade de POD de uma enzima comercial, na presença e na ausência de sacarose.

5.2 Artigo 1

Nesta seção é apresentado o primeiro artigo, publicado no periódico internacional *LWT - Food Science and Technology*.

Título: Influence of Moderate Electric Field on Inactivation Kinetics of Peroxidase and Polyphenol Oxidase and on Phenolic Compounds of Sugarcane Juice Treated by Ohmic Heating.

Abstract

This study investigated the non-thermal effects of electricity on enzymatic inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on degradation of total phenolic and total flavonoid compounds during ohmic heating of sugarcane juice. A kinetic modeling was carried out from the adjustment of various models applicable to enzyme inactivation, and the Weibull distribution model was the most suitable to describe the inactivation of peroxidase. The presence of an electric field with low intensity significantly influenced the biochemical reactions occurred during peroxidase activation at 60 °C and inactivation at 80 °C. Polyphenol oxidase, a more thermolabile enzyme, was almost totally inactivated before reaching the target temperature (holding phase) of the experiments. The maximum total phenolic and total flavonoid degradation were approximately 23 and 39%, respectively. Statistical analyses showed no differences between conventional and ohmic heating for total phenolic and total flavonoid compounds.

Keywords: Ohmic heating; sugarcane juice; peroxidase; moderate electric field, phenolic compounds.

5.2.1 Introduction

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L) is an important crop of the Brazilian economy, and the country is the world's largest producer of this vegetable, holding the global leadership in ethanol and sugar production technology. By-products and residues (such as bagasse, the filter cake, molasses and vinasse, among others) are also used for power cogeneration, animal feed manufacturing and fertilizer for crops (CONAB, 2015).

The juice, obtained through sugarcane grinding, is popular in many countries and is a sweet and cheap drink; however it is not industrialized and its selling takes place predominantly in the informal market, which makes difficult the access to statistics about its consumption (Kunitake, 2012). According to Oliveira, Spoto, Canniatti-Brazaca, Sousa, & Gallo (2007), the juice is

characterized as an energy drink, non-alcoholic, with sweet and pleasant taste, low acidity, opaque, with color ranging from dun to dark green. Regarding its nutritional composition, it contains vitamins (especially B₆ and C), minerals (Ca, Fe, P, Mg, Mn, K, and Zn) (TACO, 2011) and phenolic compounds, mainly phenolic acids and flavonoids (Payet, Shum Cheong Sing, & Smadja, 2006). These compounds have considerable physiological and morphological features in plants. Moreover, polyphenols exhibit many biological properties, such as anti-inflammatory, antiallergic, antibacterial, antimicrobial, antioxidant and cardioprotective (Havsteen, 2002). The composition may vary depending on the variety, age and health of the cane, soil characteristics, weather conditions and agricultural practices.

Sugarcane juice processing and marketing are limited due to its rapid deterioration (Yusof, Shian, & Osman, 2000), since the juice is considered a good substrate for the development of a microbial broad spectrum. Moreover, it contains organic and inorganic nutrients and has high water activity and pH ranging from 5.0 to 5.5 (Gallo & Canhos, 1991). After 24 h of extraction, even if stored under refrigeration, the fresh juice shows sedimentation and changes in their sensory characteristics (flavor and appearance deterioration), mainly due to fermentation and enzymatic browning, which significantly contributes to its color changes (Qudsieh, Yusof, Osman, & Rahman, 2002; Yusof *et al.*, 2000).

The development of effective treatments and procedures to maintain the quality of sugarcane juice would allow a broader market and increase their quality and safety (Mao, Xu, & Que, 2007). Ohmic heating (OH) is an emerging technology in the food industry, which consists of passing an alternating electric current (a moderate electric field) through a food with the main purpose of warming it by internal power generation. Due to its inherent electrical resistance, food transforms electrical energy into thermal, thereby promoting a temperature rise inside (Resnick, 1996). This technology is preferable over conventional processes, as it allows nutritional and sensory quality maintenance and makes possible greater efficiency and speed of heating (Castro, Macedo, Teixeira, & Vicente, 2004; Wang & Sastry, 2002).

The activity of naturally occurring enzymes in sugarcane juice, such as polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD), promotes undesirable changes in color, texture, flavor, aroma and nutritional composition. POD (EC 1.11.1.7) is an enzyme naturally present in vegetables with high thermal resistance and is, therefore, used for determining patterns of pasteurization parameters (Jakób *et al.*, 2010). PPO (EC 1.14.18.1) is an oxidoreductase enzyme which, in the presence of oxygen, catalyses the oxidation of *o*-phenolic to *o*-quinones substrates, which are subsequently polymerized to dark-colored pigments (İçier, Yildiz, & Baysal, 2008).

Enzymes are charged molecules and thus respond to external electric fields. At the present time, information concerning to the non-thermal effects of moderate electric field (MEF) treatments on food proteins and enzymes is scarce (Samaranayake & Sastry, 2016b). Castro *et al.* (2004) reported that lipoxygenase and polyphenol oxidase kinetics in buffer solutions were significantly affected by the electric field, reducing the time needed for inactivation, while alkaline phosphatase, pectinase, and β -galactosidase inactivation were not affected by the electric field.

Enzymes inactivation is desirable in most preservation processes, and hence their inactivation kinetics is of great interest (Corradini & Peleg, 2004). Considering the possibility of the presence of isozymes at the beginning of the inactivation process, the kinetic models used in the literature are based on different mechanisms: first order, consecutive or parallel reactions (Table 1) (Chen & Wu, 1998; Rudra Shalini, Shivhare, & Basu, 2008; Weemaes, Ludikhuyze, Van den Broeck, & Hendrickx, 1998).

The aim of this study was to evaluate the influence of MEF on phenolic compounds degradation and POD and PPO enzymes inactivation of sugarcane juice treated by ohmic heating. An additional objective was to establish the best kinetic model of enzymatic inactivation for both enzymes at temperatures ranging from 70 to 80 °C.

5.2.2 *Materials and methods*

Samples

The sugarcane juice was donated by a rural property located in Veranópolis (Rio Grande do Sul State/Brazil). The juice was homogenized and frozen in plastic bags in individual volumes of 300 mL. Samples were thawed in a water bath immediately prior to use.

The fresh juice was characterized according to its pH (Digimed, MD-22 model), soluble solids (refractometer portable SZJ-A model), electrical conductivity (Digimed, MD-3P model), water activity (measured in an electric hygrometer at 25 °C; Novasina, Labmaster-aw model), titratable acidity index (method 016 / IAL, 2008), POD and PPO enzymatic activities, total phenolic and total flavonoid contents. All analyzes were performed in triplicate.

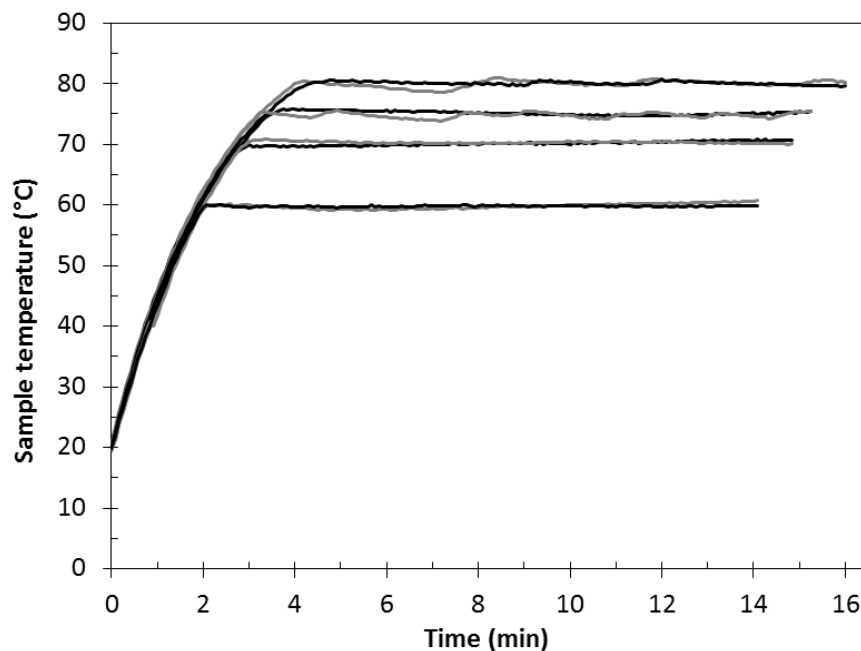
Ohmic and conventional heating processes

The ohmic heating apparatus used to conduct the experiments is described elsewhere (Mercali, Schwartz, Marczak, Tessaro, & Sastry, 2014a). The ohmic cell consisted of a 500 mL jacketed glass vessel. The electrodes were made of titanium and were curved to conform to the reactor

dimensions. The maximum inter-electrode gap was 7.5 cm and the minimum gap was 5.7 cm. Electrode height was 5 cm and reactor height was 9.9 cm.

Kinetic assays were conducted at temperatures of 60, 70, 75 and 80 °C using 25 V applied to the electrodes (electric field intensity varying from 3.57 to 4.39 V/cm because of the curvature of the electrode) and hot water through the jacket of the cell during 12 min. Two heating baths were used: one set at 98 °C to promptly increase the temperature up to the temperature of the study, and another set 1 K below the target temperature used during the isothermal phase. The electric field was turned on at time zero, the time at which the sample reached the working temperature. For conventional treatment, the same procedure was followed without the application of the electric field and with the second heating bath set at the target temperature. This was necessary to match the temperature profiles of the conventional and ohmic heating, enabling the assessment of the non-thermal effects of electricity during the heat treatment. Fig. 1 shows temperature over time for conventional and ohmic heating experiments, indicating identical profiles. As can be seen, the come-up period was approximately 2.0, 3.0, 3.5 and 4.0 min for 60, 70, 75 and 80 °C, respectively.

Fig. 1 – Temperature profile of sugarcane juice during conventional (grey lines) and ohmic (black lines) heating experiments.



The experiments were carried out with 250 g of sugarcane juice. The juice was agitated on a magnetic stirrer device (IKA, model C-MAG HS10, Germany) at the rate of 750 rpm. Samples were

collected in seven heating times (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 min), immediately placed on an ice bath to stop the effect of heating, and subsequently analyzed for POD and PPO enzymatic activity. All experiments were performed in duplicate.

Enzymes activities measurement

POD and PPO enzyme activities analyses were based on protocols described by Chisari, Barbagallo, & Spagna (2007) and Walker (2001), respectively. The enzyme extract was prepared with one part of sugarcane juice mixed to 4 parts of 0.05 mol/L phosphate buffer pH 7.0 in vortex (shaker Phoenix solutions, AP-56 model). The temperature of the extract was maintained below 4 °C. Then it was centrifuged (CIENITEC, CT, model 5000R, Brazil) for 10 min at 4 °C at 6000 rpm (4757 g) and filtered through qualitative filter paper.

For POD analysis, 1.5 mL of 0.1 mol/L phosphate buffer pH 5.0, 1 mL of enzyme extract, 0.2 mL of 1 g/100 g solution hydrogen peroxide and 0.5 mL of 1.5 g/100 g solution of guaiacol (0.5 mL of distilled water for blank) were mixed and read in a spectrophotometer (PG Instruments Ltd, T80 UV/VIS Spectrometer) at 460 nm. For PPO analysis, cuvettes containing 2.2 mL of 0.05 mol/L phosphate buffer pH 7.0, 0.5 mL enzyme extract and 0.3 mL of 0.6 mol/L catechol solution (or 0.3 mL of distilled water for blank) had absorbance read at 420 nm on the spectrophotometer. In both analyses, changes of color were monitored every 20 s for 3 min.

Enzyme activity was determined from a change in absorbance/min ($\Delta\text{abs}/\text{min}$, named A) under the assay conditions at 25 °C. The value of A was obtained by linear regression, and only the linear part of the absorption curve was taken into account.

Kinetics analysis

Data of enzyme residual activities (A/A_0) against time were fitted to several kinetic equations, described in Table 1, using non-linear regression (STATISTICA version 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

Table 1 – Kinetic equations used to predict enzymatic inactivation.

Model	Equation ^a
First-order	$\ln(A/A_0) = -k.t$
Distinct isozymes	$A/A_0 = A_L.exp(-k_L.t) + A_R.exp(-k_R.t)$
Two-fraction	$A/A_0 = a.exp(-k_L.t) + (1-a).exp(-k_R.t)$
Multicomponent first-order	$A/A_0 = \frac{[exp(-k_1.t) + r.exp(-k_2.t)]}{(1+r)}$
Fractional conversion	$A/A_0 = A_r + (A_0 - A_r).exp(-k.t)$
Weibull distribution	$A/A_0 = exp(-b.t^n)$
<i>n</i> th order	$A/A_0 = [A_0^{1-n} + (n-1).k.t]^{1/(n-1)}$
Series	$A/A_0 = \alpha_2 + [1 + (\alpha_1 k_1 / k_2 - k_1) - (\alpha_2 k_2 / k_2 - k_1)] exp(-k_1.t) - [(\alpha_1 k_1 / k_2 - k_1) - (\alpha_2 k_1 / k_2 - k_1)] exp(-k_2.t)$

^aA represents enzyme activity at time *t*; *A*₀ is the initial enzyme activity; *k* is the reaction rate constant at a given temperature (s⁻¹).

Total phenolic compounds analysis

Fresh and treated samples, collected at 6 and 12 min, were assayed following the colorimetric method of Folin-Ciocalteu (Rodrigues *et al.*, 2011; Singleton & Rossi, 1965). For the analysis, performed in triplicate, the sugarcane juice samples were previously centrifuged for 3 min at 13,400 rpm (Eppendorf centrifuge, Mini Spin model). The total phenolic content was expressed in mg of gallic acid equivalents per L of initial sample.

Total flavonoids analysis

The total flavonoid content of fresh and treated samples, withdrawn at 6 and 12 min, was determined in triplicate using the colorimetric method of Yang, Martinson, & Liu (2009). The flavonoid content was expressed as mg of catechin equivalents per L of initial sample.

Statistical data analysis

Statistical and physical criteria were considered to evaluate the goodness of fit of the proposed models. Statistical criteria include the coefficient of determination (*R*²), chi-square (χ^2) and the root mean square error (*RMSE*). χ^2 and *RMSE* are given by the equations 1 and 2 and show the size of the error of a given estimate.

$$\chi^2 = \frac{\sum(\alpha_{\text{predicted}} - \alpha_{\text{experimental}})^2}{n-p} \quad (1)$$

$$\text{RMSE} = \frac{1}{n} \left[\sum n(\alpha_{\text{predicted}} - \alpha_{\text{experimental}})^2 \right]^{0.5} \quad (2)$$

where n is the number of observations, and p is the number of parameters. α predicted and α experimental are the predicted and experimental residual enzyme activities, respectively. The physical criterion is the absence of negative estimated parameters (Rudra Shalini *et al.*, 2008; Sant'anna, Utpott, Cladera-Olivera, & Brandelli, 2010).

Comparison between experiments was carried out using t-test, ANOVA and Tukey's test with a confidence level of 95% (Statistica version 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

5.2.3 Results

Sugarcane juice characterization

Table 2 shows the fresh sugarcane juice characterization. The results indicate low acidity and high water activity, optimal conditions for microorganisms' growth in the untreated sample. Kunitake (2012) and Oliveira *et al.* (2007) found pH values varying from 5.1 to 5.4 and soluble solids from 15 to 23.7 °Brix in their works.

Table 2 – Fresh sugarcane juice characterization.

Parameter	Value
pH	5.36 ± 0.05
Water activity	0.951 ± 0.001
Soluble solids (°Brix)	16.4 ± 0.4
Electrical conductivity (µS cm ⁻¹ , 20°C)	2022 ± 35
POD activity (UEA min ⁻¹ g ⁻¹)	4631 ± 469
PPO activity (UEA min ⁻¹ g ⁻¹)	1920 ± 124
Total phenolic compounds (mg GAE L ⁻¹)	460 ± 33
Total flavonoid compounds (mg CE L ⁻¹)	222 ± 16

The electrical conductivity is a measure of the mobility of ions dissolved in the sugarcane juice. According to Stupiello (1987), sugarcane juice is made up mainly of water (80 g/100 g) and dissolved solids (20 g/100 g). Among the total solids, stand out sugars, as sucrose (17 g/100 g), glucose (0.4 g/100 g) and fructose (0.2 g/100 g); moreover, there are organic non-sugars, consisting

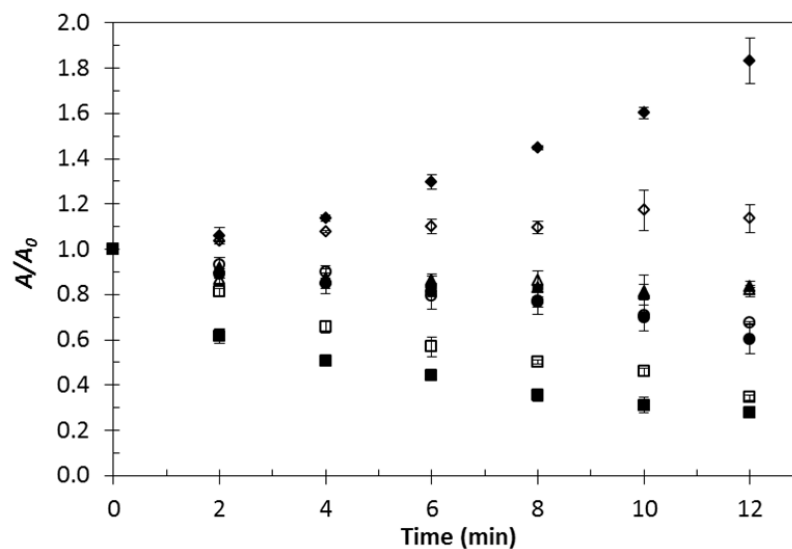
of nitrogenous substances, fats, waxes, pectins, organic acids, coloring matters and inorganic matter represented by ash.

The high POD and PPO enzymatic activities of the fresh juice demonstrated that a thermal treatment is necessary to preserve its sensorial characteristics and phenolic composition.

Peroxidase and polyphenol oxidase residual activity

Fig. 2 shows POD residual activity during ohmic and conventional heating treatments at 60, 70, 75 and 80 °C. It is worth mentioning that partial enzyme inactivation was observed during the come-up period (the first minutes of heating, when the temperature was increasing up to the target temperature of the experiment). This partial inactivation reached maximum values of 27% at 80 °C for POD and 91% at 70 °C for PPO. Since only the most heat resistant fraction of the PPO enzyme remained active during the isothermal phase, kinetic modeling of PPO was not conducted in the present work.

Fig. 2 – POD residual activity over time for sugarcane juice during conventional (empty symbols) and ohmic (filled symbols) heating at 60 °C (diamond), 70 °C (triangle), 75 °C (circle) and 80 °C (square).



From Fig. 2 it is possible to observe an increase in the POD activity at 60 °C throughout the heat treatment probably because this temperature is close to the optimum temperature of the enzyme. This behavior has been reported by other authors, with optimum temperatures for POD at 25 °C for strawberry (Chisari *et al.*, 2007), 20-35 °C for blueberry (Martyntenko & Chen, 2016) and 70 °C for litchi (Mizobutsi *et al.*, 2010). As can be seen in Fig. 2, the increased POD activity at 60 °C was higher for ohmic heating than for conventional heating. As thermal histories during OH and

conventional heating treatments were the same, it is possible to infer that any difference on the inactivation curve may be attributed to an electric field effect. This result indicates that MEF is affecting POD activity at this temperature. Recently, Samaranayake & Sastry (2016a) evaluated the effect of controlled-frequency moderate electric field treatments on pectin methylesterase and polygalacturonase activities in tomato homogenate, subjecting the treated control and electrically-treated samples to the same temperature history. They reported that the application of electric fields at a low field strength (0.4 V/cm) and constant temperature (65 °C) had a statistically significant effect on pectin methylesterase activity.

For the other temperatures evaluated (70, 75 and 80 °C), the POD activity had an opposite behavior, decreasing over time. The higher the temperature applied, the lower the residual enzyme activity ($p < 0.05$). As observed in Fig. 2, for temperatures of 70 and 75 °C, ohmic and conventional experiments showed closed values of residual activities in the end of the treatment. For 80 °C, enzyme inactivation was slightly different between ohmic (approximately 72%) and conventional (approximately 66%) treatments. For a proper comparison between treatments, data were fitted to kinetic models and the kinetic parameters were statistically compared. Data of the experiment at 60 °C were not fitted to the kinetic models because, at this temperature, it was observed activation.

Kinetic modeling of peroxidase inactivation

Table 3 shows the minimum and maximum ranges of R^2 , χ^2 and $RMSE$ obtained for the enzymatic inactivation kinetic models (70-80 °C). The series model (Henley & Sadana, 1985) is based on a sequence of two irreversible first-order steps: a conversion of the native enzyme (E) to an intermediate (EI) with lower specific activity, and the subsequent conversion of the intermediate to an inactive enzyme form (ED). The series and n^{th} order models did not generate parameters answers, either coefficients of determination.

In general, the first-order model is adopted to describe enzymatic inactivation, which is based on the assumption that the break of a single bond or a structure is sufficient to inactivate the enzyme; however, it is known that the process is much more complex (Corradini & Peleg, 2004; Fujikawa & Itoh, 1996; Ladero, Santos, & García-Ochoa, 2006). According to Gardossi *et al.* (2010), biocatalyst inactivation rarely follows precisely the first-order kinetics. Fujikawa & Itoh (1996) discussed the characteristics of a multicomponent (or multi-fraction) first-order model on cumulative simulation; this model is expressed as the sum of the thermal inactivation kinetics of their individual components and has been mainly studied for the inactivation of isozymes (protein structures with similar enzymatic activities which catalyze the same reaction) with different thermal stabilities.

Table 3 – Statistical parameters of the kinetic models describing POD inactivation during ohmic and conventional heating (70-80 °C).

Model	R^2	χ^2	RMSE
First-order	[0.413; 0.986]	[0.00021; 0.00571]	[0.00507; 0.02644]
Multi-component first-order	[0.413; 0.986]	[0.00335; 0.48233]	[0.01653; 0.19843]
Distinct isozymes	[0.941; 0.999]	[0.00013; 0.00122]	[0.00283; 0.00864]
Two-fraction	[0.941; 0.999]	[0.00010; 0.00093]	[0.00283; 0.00869]
Fractional conversion	[0.869; 0.991]	[0.00013; 0.00096]	[0.00323; 0.00884]
Weibull distribution	[0.924; 0.999]	[0.00008; 0.00076]	[0.00279; 0.00882]
<i>n</i> th order	-	-	-
Series	-	-	-

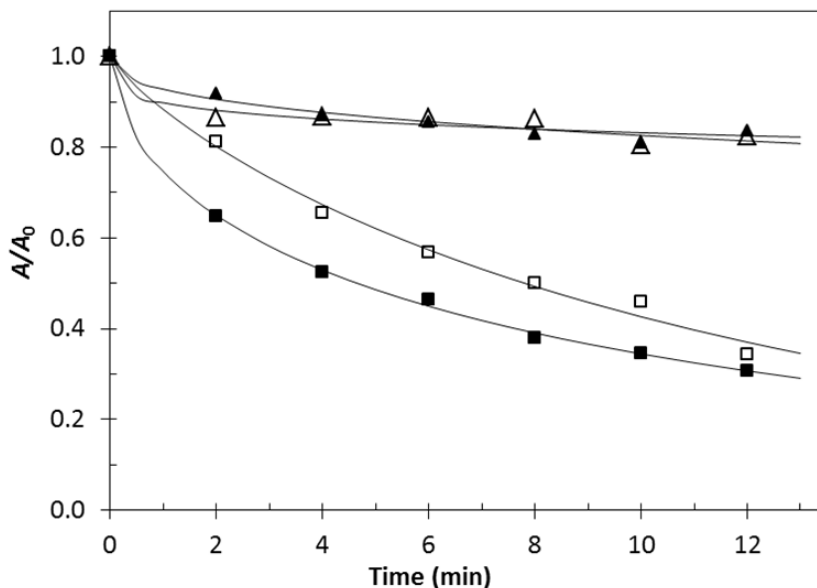
The first order and multicomponent first order models were discarded in the present work due to low R^2 and high χ^2 and RMSE values; these latter two parameters were particularly bad for the multicomponent model. This occurred because POD is an isozyme and, therefore, has no first order inactivation kinetics. POD enzyme has more than one isoform that can show catalytic activities simultaneously (Chakraborty, Rao, & Mishra, 2015), having many heat resistance profiles.

Weemaes *et al.* (1998) suggested that the distinct isozymes model is characterized by a loss of enzyme activity that can be described by the sum of two exponential decays, one for thermolabile enzyme (L index) and another for thermostable enzyme (R index). On the other hand, the two-fraction model hypothesizes that plant extracts contain various isozymes that can be separated into two groups, one more heat resistant than the other, and both thermally inactivated according to the kinetics first-order degradation (Chen & Wu, 1998). In this model, the coefficient a is the activity of the labile fraction isozyme relative to the total enzymatic activity. Fractional conversion model refers to a first-order inactivation process and takes into account the non-zero enzyme activity (A_r , the activity when the system reaches the equilibrium) upon prolonged heating because of the presence of an extremely heat-resistant fraction (Rizvi & Tong, 1997). These three aforementioned models were not physically feasible since negative parameter values were obtained.

The Weibull distribution pattern is based on the assumption that the momentary rate of thermal sensitivity to heat depends only on the transient heating intensity and on the residual activity, being independent of the rate at which the residual activity has been reached (Peleg & Penchina, 2000). This distribution is in fact a stochastic model, which is sufficiently flexible to account for enzyme inactivation at different processing conditions (Rudra Shalini *et al.*, 2008). As can be seen in Table 3, the Weibull model showed the best goodness of fit and was chosen to estimate the POD inactivation kinetics of sugarcane juice.

Fig. 3 shows the experimental (symbols) and predicted (curves) values of residual enzymatic activity for experiments conducted at 70 and 80 °C. Similar plots were obtained for experiments carried out at 75 °C but, for the sake of clarity, these results were not shown. Fig. 4 shows the parity between the experimental and predicted data where the dashed lines represent the $\pm 5\%$ confidence interval of the results. As can be seen, all data lie within the 5% confidence interval. These figures confirm that the Weibull distribution model adequately describes the kinetics of POD enzyme inactivation in the sugarcane juice in the worked conditions.

Fig. 3 – Experimental and predicted POD residual activity values for sugarcane juice: conventional (empty symbols) and ohmic (filled symbols) heating at 70 °C (triangle) and 80 °C (square).



According to Table 1, the Weibull distribution is characterized by two parameters b and n , suggesting a continuing degradation of the enzyme. The value of n determines the shape of the distribution curve, while b determines the thermal reaction rate; consequently, n and b are called the shape and scale factors, respectively (Hutchinson, 2000; Rudra Shalini *et al.*, 2008). The b and n parameters obtained for each treatment are reported in Table 4. The value of n ranged from 0.2338 to 1.0128 and parameter b was between 0.0327 and 0.2917. According to Peleg (2003), a Weibull distribution with n greater than 1 indicates that the semi-logarithmic survival curve has a downward concavity. As can be seen, the values of n were lower than 1 for all treatments (except for both types of heating at 75 °C), indicating a 'tailing' phenomena which is characterized by an upward concavity curve. This might be inferred as an indication of the presence of extremely heat resistant enzyme fraction. Moreover, the deviation in log-linearity ($n = 1$) of activity curve might be attributed to the presence of POD isozymes having different thermal stabilities (Chakraborty *et al.*, 2015).

Fig. 4 – Parity between experimental and predicted data values for sugarcane juice: conventional (empty symbols) and ohmic (filled symbols) heating at 70 °C (triangle), 75 °C (circle) and 80 °C (square).

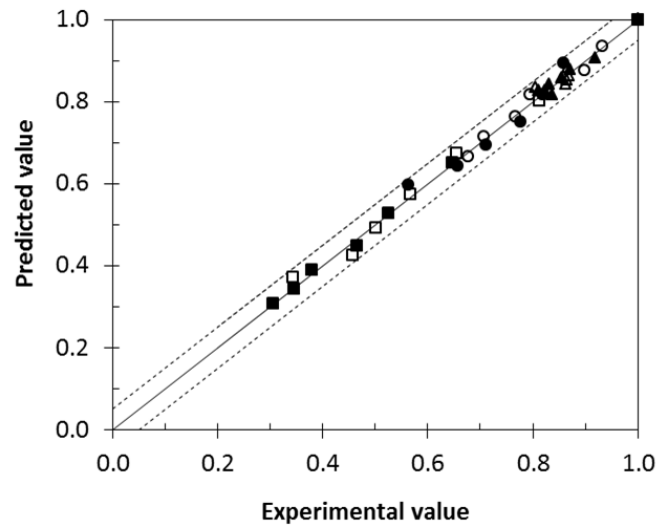


Table 4 – Coefficients of Weibull model.

Heating Treatment	b^b	n^b	R^2	χ^2	RMSE
70 °C conventional	0.08 ± 0.03^a	0.4 ± 0.2^a	0.924	0.0004	0.0060
70 °C ohmic	0.09 ± 0.06^a	0.5 ± 0.4^a	0.961	0.0002	0.0045
75 °C conventional	0.03 ± 0.01^A	1.0 ± 0.2^A	0.986	0.0003	0.0051
75 °C ohmic	0.06 ± 0.03^A	1.02 ± 0.04^A	0.981	0.0008	0.0088
80 °C conventional	$0.12 \pm 0.02^\alpha$	$0.84 \pm 0.08^\alpha$	0.992	0.0005	0.0068
80 °C ohmic	$0.32 \pm 0.03^\beta$	$0.556 \pm 0.006^\alpha$	0.999	0.0001	0.0028

^b Similar letters in the same column represent no significant difference ($p > 0.05$).

Effect of moderate electric field on peroxidase inactivation

Enzyme denaturation is caused by rearrangement and/or destruction of noncovalent bonds such as hydrogen bonds, hydrophobic interactions and ionic bonds of the tertiary protein structure (Castro *et al.*, 2004). Since the signal of the ohmic heating equipment is an alternating bipolar current, molecules with net charges and dipole moments, such as enzymes, will move in response to the oscillating electric field (Mercali, Schwartz, Marczak, Tessaro, & Sastry, 2014b; Samaranayake & Sastry, 2016b). The presence of the electric field can influence biochemical reactions by changing molecular spacing and increasing interchain reactions (Castro *et al.*, 2004). In the present study, the effect of temperature was eliminated as a variable by performing ohmic heating with the same temperature profile of the conventional heating (Fig. 1), which allowed to infer about the influence of the field applied during thermal treatment by ohmic heating.

A statistical analysis was performed comparing both heat treatments at the same temperature. As each temperature condition evaluated in this work had a different come-up period (the highest temperature took longer to be achieved), the enzymatic inactivation at the beginning of the isothermal phase was different for each case. This resulted in different initial enzymatic activity (A_0) for experiments conducted with distinct temperatures. Because of that, only a comparison between different types of treatment in the same temperature was conducted for POD; Table 4 shows this comparison between both technologies evaluated. The results demonstrate no differences between n values for each set of temperatures ($p > 0.05$). The parameter b was between 0.0327 and 0.2917. For experiments at 70 and 75 °C, ohmic and conventional treatments did not differ from each other; on the contrary, for the experiment conducted at 80 °C, differences between treatments were observed. The value of b was higher for the ohmic treatment, indicating a faster inactivation. This indicates that MEF can induce inactivation of enzymes. According to Samaranayake & Sastry (2016b), the mechanism of MEF-induced inactivation of enzymes is not well-known. Some hypothesis to explain the enhanced loss of enzyme activity and protein denaturation by MEF are the removal of metallic prosthetic groups present in some enzymes and conformational changes of their structure (Castro *et al.*, 2004; Pereira, Teixeira, & Vicente, 2011).

Castro *et al.* (2004) inactivated some apple enzymes during ohmic (50-90 V/cm in the heating phase and 20 V/cm in the holding phase) and conventional heating (70-95 °C) and found that the PPO and lipoxygenase inactivation was enhanced by the presence of electric field. On the other hand, the activity of pectinase, alkaline phosphatase and β -galactosidase did not seem to be affected by the electric field strength. Jakób *et al.* (2010) investigated inactivation of alkaline phosphatase, pectin methylesterase and peroxidase by ohmic heating of milk and juices of fruit and vegetable, and compared to conventional indirect heating in hot water. A slight decrease of enzyme stability was shown for pectin methylesterase in fruit juices and alkaline phosphatase in milk when the electric field was used. By contrast, peroxidase in vegetable juices was more prone to destabilization by ohmic heating. A kinetic study of enzyme inactivation showed that the decreased stability was not because of the modification of enzyme tertiary structure by the electric field, but rather by the effect of modified environment due to the increased number of ions and their different distributions around enzyme molecules.

The POD enzyme from pea puree was inactivated with voltage gradient of 20 V/cm when the sample was heated from 30 to 100 °C during 516 s (8.6 min) and blanched by another min at 100 °C. In the same study, the POD enzyme was inactivated at 50 V/cm after 54 s of heating up to 100 °C (Icier, Yildiz, & Baysal, 2006). Guida *et al.* (2013) achieved complete inactivation of PPO and POD artichoke heads with 360 and 480 s of ohmic blanching, respectively, with a voltage gradient of

24 V/cm at 80 °C. According to these authors, the faster enzymatic inactivation of samples ohmically blanched, when compared to the conventional blanching at 100 °C, can be explained by the increase of uniformity provided by ohmic heating treatment. However, it is worth pointing out that, in these two studies, the temperature profiles were not equal and, therefore, it is not possible to infer the effect of the electric field on the enzyme inactivation.

It is noteworthy that the kinetic parameters of enzymatic inactivation are unique to each plant (Rudra Shalini *et al.*, 2008), which may explain the difference between the data obtained for sugarcane juice and other foods. As stated by Samaranayake & Sastry (2016b), free-floating enzyme molecules may be highly responsive to the electric field - this is the case of juices and pulps - whereas enzyme molecules attached to or trapped in membrane segments (electrical insulator) and other debris (e.g. skin, seeds, and insoluble fibers) may be shielded from the electric field. At the present time, there are no studies in the literature about enzymatic inactivation in sugarcane juice by ohmic heating. Kunitake (2012) inactivated PPO after conventionally pasteurize the acidified sugarcane juice with 4% passion fruit pulp at 85-95 °C for 30 s; however, due to the POD thermoresistance, this enzyme was inactivated only with the application of a more severe binomial (95 °C / 30 s).

Overall, results of the present work indicate that the presence of an electric field with low intensity influenced the biochemical reactions occurred during activation and inactivation of POD in sugarcane at specific temperatures. At the lowest temperature (60 °C), an activation effect was observed with MEF in comparison to control, while at the highest temperature (80 °C), an inactivation effect was observed. Samaranayake & Sastry (2016a) reported a similar behavior when evaluating the effect of MEF on pectin methylesterase (PME) activity in tomatoes. They found a significant non-thermal effect of electric field on PME activity, which depends on MEF field strength and temperature. They also observed an activation effect with MEF in comparison to controls at low temperatures and an inactivation effect at high temperatures. These results reveal that the effect of MEF is still not fully understood and is worthy of future investigation.

Phenolic composition

Table 5 shows the residual of total phenolic and flavonoid content values obtained for each treatment after 6 and 12 min. The residual was calculated divided the value of total phenolic and flavonoid content by the corresponding value of the sugarcane juice with no treatment. As can be seen, the degradation of total phenolics was between 11 and 23% and the degradation of total flavonoids varied from 20 to 38%. Comparing the same heating treatment, there was no difference between the degradation of total phenolic compounds after 6 and 12 min ($p > 0.05$); the same

behavior was observed for flavonoid compounds; thus indicating that, for each treatment, the degradation occurred after 6 min. Moreover, there was no statistical difference ($p > 0.05$) of total phenolic contents between ohmic and conventional heating. The Tukey test also showed that there were no differences between different temperatures. These results indicate that the phenolic compounds are not so sensitive to heat as other components, such as ascorbic acid and anthocyanins. A similar behavior was observed for total flavonoid compounds: no differences between technologies and between temperatures. Although more studies are required to elucidate the effect of this technology on bioactive compounds stability, these results indicate similar mechanisms of degradation using ohmic or conventional heating.

Table 5 – Residual phenolic content after treatments.

Heating Treatment	Residual total phenolics ^b		Residual total flavonoids ^b	
	6 minutes	12 minutes	6 minutes	12 minutes
60 °C conventional	0.95 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.04 ^a	0.76 ± 0.05 ^a	0.79 ± 0.09 ^a
60 °C ohmic	0.84 ± 0.11 ^a	0.82 ± 0.10 ^a	0.74 ± 0.10 ^a	0.71 ± 0.07 ^a
70 °C conventional	0.77 ± 0.01 ^a	0.77 ± 0.02 ^a	0.63 ± 0.01 ^a	0.62 ± 0.00 ^a
70 °C ohmic	0.89 ± 0.04 ^a	0.89 ± 0.04 ^a	0.74 ± 0.01 ^a	0.74 ± 0.01 ^a
75 °C conventional	0.78 ± 0.01 ^a	0.77 ± 0.00 ^a	0.80 ± 0.07 ^a	0.79 ± 0.08 ^a
75 °C ohmic	0.85 ± 0.02 ^a	0.86 ± 0.01 ^a	0.72 ± 0.03 ^a	0.74 ± 0.02 ^a
80 °C conventional	0.87 ± 0.06 ^a	0.84 ± 0.05 ^a	0.72 ± 0.03 ^a	0.70 ± 0.03 ^a
80 °C ohmic	0.89 ± 0.03 ^a	0.88 ± 0.01 ^a	0.73 ± 0.01 ^a	0.74 ± 0.01 ^a

^b Similar letters in the same column represent no significant difference ($p > 0.05$).

Mercali, Gurak, Schmitz, & Marczak (2015) evaluated anthocyanin degradation in jaboticaba juice using ohmic and conventional heating (3.57-4.55 V/cm) with temperatures ranging from 70 to 90 °C. Both technologies, evaluated under the same thermal history, showed similar values for all the kinetic and thermodynamic parameters (when compared at the same temperature), indicating that anthocyanins have similar degradation pathways during ohmic and conventional heating. The authors concluded that the presence of the electric field did not affect the mechanism and the degradation rate of anthocyanins.

Guida *et al.* (2013) showed that the residual content of phenolic compounds in blanched artichoke samples was significantly dependent on the processing technology ($p < 0.05$). In particular, the ohmic treatment caused an increase of approximately 29% of total polyphenols concentration compared to fresh samples. In contrast, conventional heating promoted a decrease of about 27% of phenolic compounds content. The authors reported that the increase in total phenolic content in

plant after the heat treatment may be, in part, due to release of linked phenolic acids, as well as the breaking or softening cellular constituents of plants, increasing the accessibility of antioxidants. In addition, cooking can cause the breakdown of complex structures, releasing individual phenolic and/or phenolic degradation products, which can also react with the Folin-Ciocalteu reagent. Moreover, it was also reported that the application of ohmic heating with intensities below 100 V/cm can cause changes in the permeability of cell membranes of plants, increasing the extraction of carotenoids, flavonoids and total polyphenols from plant tissues (Kulshrestha & Sastry, 2010; Lebovka, Shynkaryk, & Vorobiev, 2007).

5.2.4 Conclusion

The present work evaluated the effect of the electric field on POD inactivation and on phenolic compounds degradations in sugarcane juice. Ohmic heating technology can be applied for the heat treatment of sugarcane juice up to 80 °C without compromising the concentration of phenolic antioxidant compounds when compared to conventional heating.

Concerning the POD residual activity, a distinct behavior was observed, depending on the temperature of the thermal treatment. For 60 °C, close to the optimum temperature of the enzyme, MEF influenced increasing the POD activity. For 80 °C, MEF increased the inactivation rate. On the other hand, for 70 and 75 °C, non-thermal effects were not observed during heating. These results suggest that the presence of the electric field modified the conformational structure of POD at some specific temperatures. Further experiments considering other variables, such as frequency, waveform and electric field strength, should be performed to better understand the effect of this technology on POD activation and inactivation. Moreover, the behavior of other enzymes naturally presented in food plants under electric field treatment should be investigated.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) as a scholarship for the first author and as the PNPd grant and also to the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- Castro, I., Macedo, B., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2004). The effect of electric field on important food-processing enzymes: Comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. *Journal of Food Science*, 69, 696-701.
- Chakraborty, S., Rao, P. S., & Mishra, H. N. (2015). Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 57–68.
- Chen, C., & Wu, M. (1998). Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. *Journal of Food Science*, 63, 1–4.
- Chisari, M., Barbagallo, R. N., & Spagna, G. (2007). Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3469–3476.
- CONAB. (2015). *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar*. v. 2 – Safra 2015/16, n. 2 - Segundo Levantamento. Brasília.
- Corradini, M. G., & Peleg, M. (2004). A model of non-isothermal degradation of nutrients, pigments and enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 217–226.
- Fujikawa, H., & Itoh, T. (1996). Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 263–271.
- Gallo, C. R., & Canhos, V. P. (1991). Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – Revisão. *STAB. Açúcar, Álcool E Subprodutos*, 9, 35–40.
- Gardossi, L., Poulsen, P. B., Ballesteros, A., Hult, K., Svedas, V. K., Vasić-Racki, D., ... Halling, P. J. (2010). Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends in Biotechnology*, 28, 171–180.
- Guida, V., Ferrari, G., Pataro, G., Chambery, A., Di Maro, A., & Parente, A. (2013). The effects of ohmic and conventional blanching on the nutritional, bioactive compounds and quality parameters of artichoke heads. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 569–579.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67–202.
- Henley, J. P., & Sadana, A. (1985). Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. *Enzyme and Microbial Technology*, 7, 50–60.
- Hutchinson, T. P. (2000). Graphing the death of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 77–81.
- IAL. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Instituto Adolfo Lutz (4th ed.). São Paulo.
- Içier, F., Yildiz, H., & Baysal, T. (2008). Polyphenoloxidase deactivation kinetics during ohmic heating of grape juice. *Journal of Food Engineering*, 85, 410–417.
- Içier, F., Yildiz, H., & Baysal, T. (2006). Peroxidase inactivation and colour changes during ohmic blanching of pea puree. *Journal of Food Engineering*, 74, 424–429.
- Jakób, A., Bryjak, J., Wójtowicz, H., Illeová, V., Annus, J., & Polakovič, M. (2010). Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating. *Food Chemistry*, 123, 369–376.
- Kulshrestha, S. A., & Sastry, S. K. (2010). Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 78–83.
- Kunitake, M. T. (2012). *Processamento e estabilidade de caldo de cana acidificado*. USP.

- Ladero, M., Santos, A., & García-Ochoa, F. (2006). Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 1–9.
- Lebovka, N. I., Shynkaryk, M., & Vorobiev, E. (2007). Moderate Electric Field Treatment of Sugarbeet Tissues. *Biosystems Engineering*, 96, 47–56.
- Mao, L. C., Xu, Y. Q., & Que, F. (2007). Maintaining the quality of sugarcane juice with blanching and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 104, 740–745.
- Martynenko, A., & Chen, Y. (2016). Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. *Journal of Food Engineering*, 171, 44–51.
- Mercali, G. D., Gurak, P. D., Schmitz, F., & Marczak, L. D. F. (2015). Evaluation of non-thermal effects of electricity on anthocyanin degradation during ohmic heating of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) juice. *Food Chemistry*, 171, 200–205.
- Mercali, G. D., Schwartz, S., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Sastry, S. (2014a). Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. *Journal of Food Engineering*, 123, 1–7.
- Mercali, G. D., Schwartz, S., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Sastry, S. (2014b). Effect of the electric field frequency on ascorbic acid degradation during thermal treatment by ohmic heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5865–5870.
- Mizobutsi, G. P., Finger, F. L., Ribeiro, R. A., Puschmann, R., Ludmila, J., De, L., ... Mota, D. (2010). Peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. *Sci. Agric. Piracicaba*, 67, 213–217.
- Oliveira, A. C. G. De, Spoto, M. H. F., Canniatti-Brazaca, S. G., Sousa, C. P. De, & Gallo, C. R. (2007). 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*, 27, 863–873.
- Payet, B., Shum Cheong Sing, A., & Smadja, J. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7270–7276.
- Peleg, M. (2003). Calculation of the Non-Isothermal Inactivation Patterns of Microbes Having Sigmoidal Isothermal Semi-Logarithmic Survival Curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 645–658.
- Peleg, M., & Penchina, C. M. (2000). Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 159–172.
- Pereira, R. N., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Exploring the denaturation of whey proteins upon application of moderate electric fields: A kinetic and thermodynamic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11589–11597.
- Qudsieh, H. Y. M., Yusof, S., Osman, A., & Rahman, R. A. (2002). Effect of Maturity on Chlorophyll, Tannin, Color, and Polyphenol Oxidase (PPO) Activity of Sugarcane Juice (*Saccharum officinarum* Var. Yellow Cane). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1615–1618.
- Resnick, D. (1996). Ohmic heating of fluid foods. In: Ohmic heating for thermal processing of foods: government, industry and academic perspectives - overview outstanding symposia in food science & technology. *Food Technology*, 50, 250–251.
- Rizvi, A. F., & Tong, C. H. (1997). Fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. *Journal of Food Science*, 62, 1–7.

- Rodrigues, E., Poerner, N., Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Mendes, C. R., & Fett, R. (2011). Compostos fenólicos e atividade antioxidante de cultivares de mirtilo produzidas no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31, 911–917.
- Rudra Shalini, G., Shivhare, U. S., & Basu, S. (2008). Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. *Journal of Food Engineering*, 85, 147–153.
- Samaranayake, C. P., & Sastry, S. K. (2016a). Effect of moderate electric fields on inactivation kinetics of pectin methylesterase in tomatoes: The roles of electric field strength and temperature. *Journal of Food Engineering*, 186, 17–26.
- Samaranayake, C. P., & Sastry, S. K. (2016b). Effects of controlled-frequency moderate electric fields on pectin methylesterase and polygalacturonase activities in tomato homogenate. *Food Chemistry*, 199, 265–272.
- Sant'anna, V., Utpott, M., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2010). Kinetic modeling of the thermal inactivation of bacteriocin-like inhibitory substance p34. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3147–3152.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Stupiello, J. P. (1987). *A Cana-de-açúcar como matéria-prima*. In S. B. Paranhos (Ed.), *Cana-de-açúcar: cultivo e utilização* (2, 761–804). Campinas: Fundação Cargill.
- TACO. (2011). *Tabela brasileira de composição de alimentos*. (NEPA-UNICAMP, Ed.) (4th ed.). Campinas.
- Walker, J. R. L. (2001). *Expression and Measurement of Enzyme Activity*. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. C4.1.1 – C4.1.15). John Wiley & Sons, Inc.
- Wang, W.-C., & Sastry, S. K. (2002). Effects of moderate electrothermal treatments on juice yield from cellular tissue. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 371–377.
- Weemaes, C. A., Ludikhuyze, L. R., Van den Broeck, I., & Hendrickx, M. E. (1998). Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 60, 292–300.
- Yang, J., Martinson, T. E., & Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332–339.
- Yusof, S., Shian, L. S., & Osman, A. (2000). Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. *Food Chemistry*, 68, 395–401.

5.3 Artigo 2

Nesta seção é apresentado o segundo artigo, publicado no periódico *Food and Bioprocess Technology* referente ao estudo do efeito do uso de diferentes frequências, formas de onda e gradientes de tensão sobre os parâmetros de qualidade do caldo de cana tratado a 75 °C.

Título: Effect of ohmic heating parameters on peroxidase inactivation, phenolic compounds degradation and color changes of sugarcane juice

Abstract

The non-thermal effects of electricity on enzymatic inactivation kinetics of peroxidase (POD) and on phenolic compounds degradation during ohmic heating (OH) of sugarcane juice were investigated. Experiments with different frequencies (10-10⁵ Hz), waveforms (sine, square, triangle and pulsed waves) and voltage gradients (3.9 and 20.5 V/cm) were conducted at 75 °C for 25 min and compared with the conventional treatment, performed with similar temperature histories. Overall, the results indicated that the non-thermal effects of OH (voltage gradient up to 20.5 V/cm, with different frequencies and waveforms) did not influence the biochemical reactions that occur during POD inactivation in sugarcane juice. Moreover, there was no effect of electric field frequency or voltage gradient on phenolic compounds stability; on the other hand, some waveforms promoted higher degradation of these compounds. Some color changes were observed when 10 Hz/25 V and 60 Hz/130 V were applied, with higher magnitude at the higher electric field strength.

Keywords: electricity; thermal treatment; enzyme inactivation; electric field.

5.3.1 Introduction

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is one of the most economically important crops in Brazil, being a source of sugar, raw material for production of alcohol and a variety of other products, such as sugarcane juice. The juice is a cheap and sweet beverage and it is a potential source of phenolic compounds, mostly phenolic acids and flavonoids (Colombo *et al.* 2006; Payet *et al.* 2006).

Sugarcane juice processing and marketing are limited due to its rapid deterioration (Yusof *et al.* 2000). Enzymatic browning significantly contributes to color changes of the product (Qudsieh *et al.* 2002; Yusof *et al.* 2000), being peroxidase (POD) the most thermostable enzyme related to this

problem. Thus, the development of effective treatments and procedures to maintain the sugarcane juice quality and safety would allow a broader market (Mao *et al.* 2007). Conventional heat processing is commonly used for the inactivation of spoilage microorganisms and food degrading enzymes; however, heat can cause undesirable changes in the sensory and nutritional quality of food products. Ohmic heating (OH) could be a potential technology for sugarcane juice since it allows nutritional and sensory quality maintenance and makes possible greater efficiency and speed of heating (Castro, Macedo, Teixeira, & Vicente, 2004; Wang & Sastry, 2002). OH is considered a novel thermal technology based on the passage of alternating electric current through the food; due to its inherent electrical resistance, heat is generated volumetrically by the Joule effect. In this process, beyond the thermal effects, there are also non-thermal effects associated with the presence of the moderate electric field (MEF).

Enzymes have net charges and dipole moments and thus undergo translation and rotation in response to external electric fields. Some studies have shown that the electric fields applied during OH exhibits a non-thermal inactivation effect on pectin methylesterase (PME) in tomato homogenate (Samaranayake and Sastry 2016a) and on lipoxygenase and polyphenoloxidase in buffer solutions (Castro *et al.* 2004). At the present time, data concerning the non-thermal effects of MEF treatments on food proteins and enzymes are limited (Samaranayake and Sastry 2016a).

The different OH variables, that are not yet widely studied, may also affect bioactive compounds stability of foods. When an increasing alternating electric field frequency is applied, motions of molecules arising from the polarization process become faster; at high frequencies, molecules do not have enough time to polarize (in response to the electric field) because of the rapid reversal of the polarity of the electric field (Mercali *et al.* 2014b; Samaranayake and Sastry 2016b), which may impact the rate of degradation of bioactive compounds. Likewise, the use of high voltage gradients may lead to a greater degradation due to the greater collision force between molecules. On the other hand, the effect of the waveform on bioactive compounds degradation is not yet elucidated: different possible forms of oscillation may or not influence the degradation process.

POD inactivation during OH was investigated in a previous work (Brochier *et al.* 2016) conducted by our research group. In that study, the presence of an electric field influenced the POD activity at some temperatures (60 and 80 °C); on the other hand, at temperatures of 70 and 75 °C this influence was not significant. For a better understanding of this behavior, a deeper investigation was accomplished at 75 °C, evaluating the effect of different variables of the OH technology on POD stability. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of electric field frequency, waveform and voltage gradient on POD activity, phenolic compounds stability and color changes at 75 °C. The OH experiments were compared to the conventional heating (CH), both conducted under

the same temperature profile.

5.3.2 *Materials and methods*

Samples

The sugarcane juice was donated by a rural property located in Veranópolis (Rio Grande do Sul /Brazil, 28° 56' 10" S, 51° 32' 58" W). The juice was homogenized and frozen in plastic bags in individual volumes of 100 and 300 mL. Samples were thawed in a water bath immediately prior to use.

The fresh juice was characterized according to its pH (Digimed, MD-22 model), soluble solids (refractometer portable SZJ-A model), electrical conductivity (Digimed, MD-3P model), titratable acidity index (method 016 / IAL, 2008), POD enzymatic activity and total phenolic content. All analyzes were performed in triplicate.

Ohmic and conventional heating processes

Two OH systems were used in the present study. The first one, named system I, was employed to conduct the experiments with distinct frequencies (10, 60, 10^3 , 10^4 and 10^5 Hz) and waveforms (sine, square, triangle and pulsed - pulses of 3.2 ms, in a total period of 8.3 ms). It comprised a power amplifier (Industrial Test Equipment, model 500A, Port Washington, NY, USA), a function generator (Tektronix Inc., model AFG3251, Richardson, Tex, USA), a data acquisition unit (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA), a computer and an ohmic cell. A schematic diagram of the OH setup is presented in Fig. 1. The ohmic cell consisted of a 250 mL jacketed glass vessel (containing 85 g of juice). Titanium electrodes were curved to conform to the cell dimensions. The electrode height was 3.4 cm and the maximum and minimum inter-electrode gaps were 3.7 and 2.8 cm, respectively. Kinetic assays were conducted at 75 ± 1 °C using simultaneously 25 V applied to the electrodes and hot water through the jacket of the cell during 25 min (voltage gradient, $E = 7.8$ V/cm). For distinct frequencies, the waveform chosen to run the experiments was sine wave; when different waveforms were evaluated, the frequency was kept at 60 Hz. The amplified waves were checked by an oscilloscope (Tektronix, model TDS 360, Richardson, Tex, USA). Fig. 2 shows a flowchart to better understanding the experiment design.

Fig. 1 – Schematic diagram of the ohmic heating setup

(V = voltage measurement; A = current transformer and T = temperature sensor).

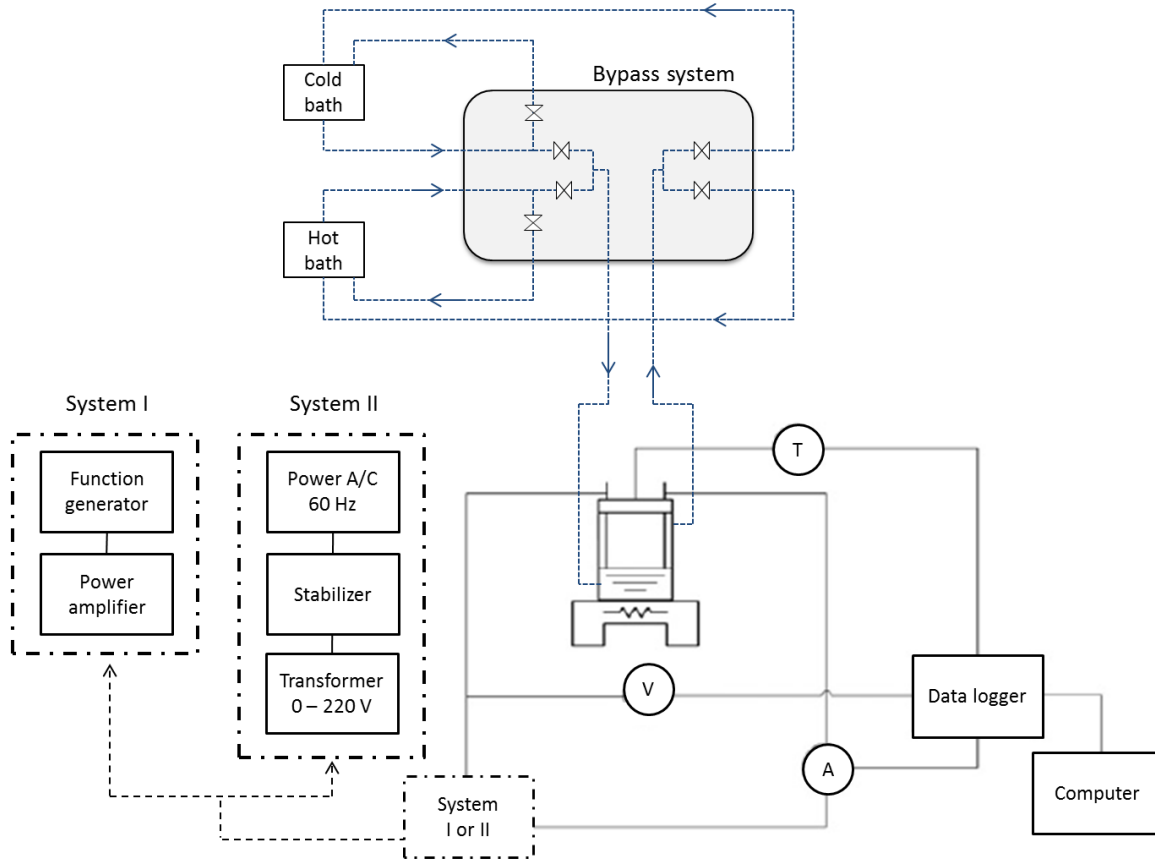
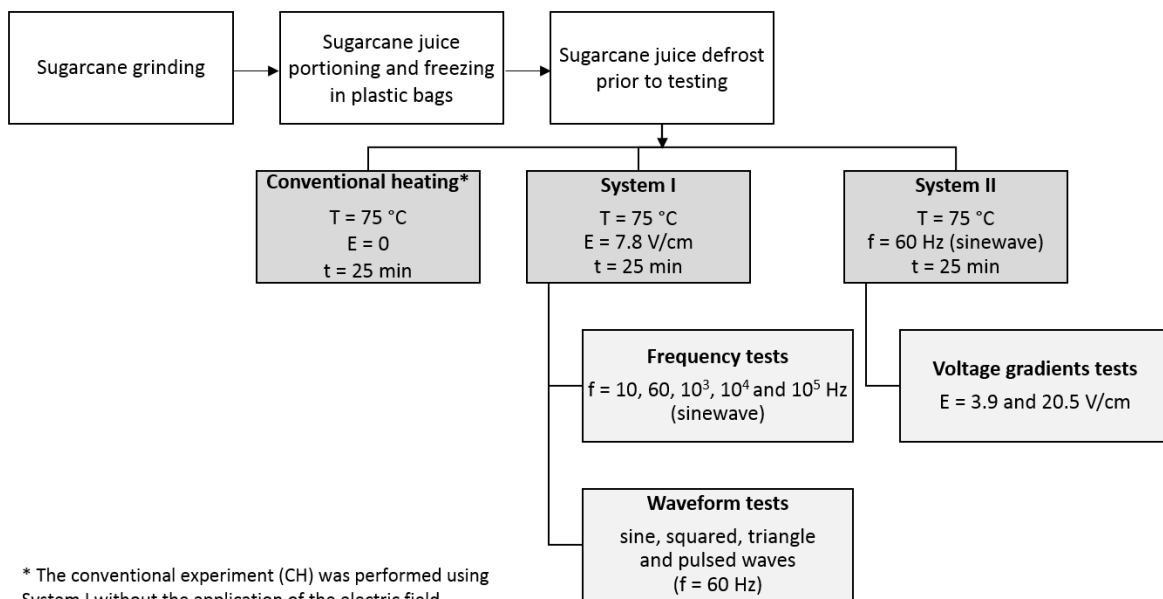


Fig. 2 – Flowchart of the experiments.



* The conventional experiment (CH) was performed using System I without the application of the electric field.

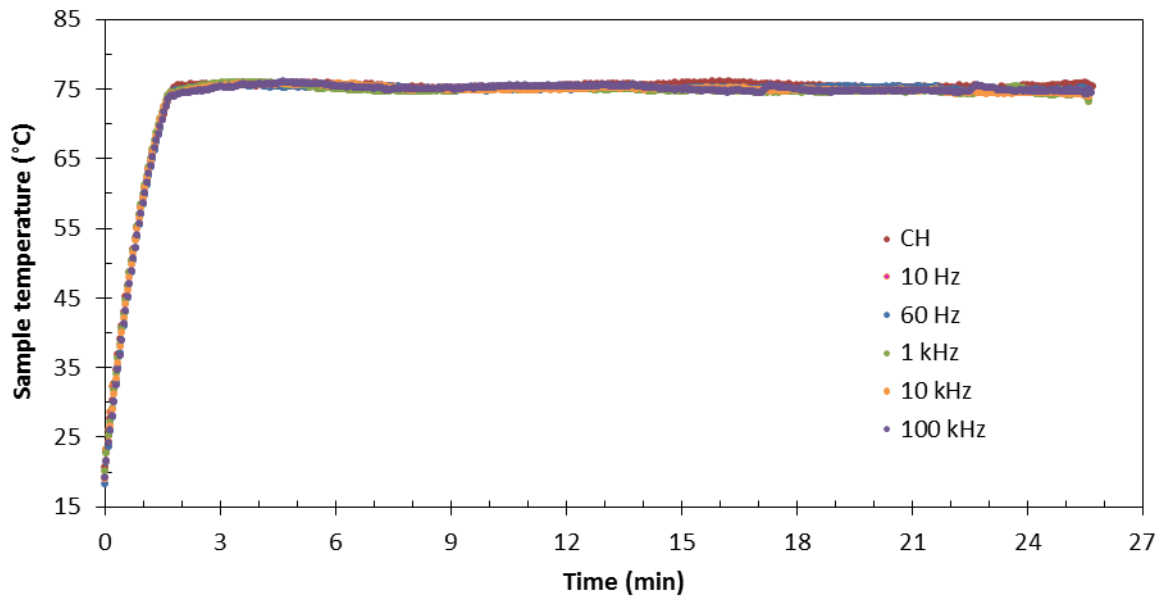
The experiments to evaluate the influence of the voltage gradient were performed using the system II (shown in Fig. 1) and described by Mercali *et al.* (2012). The ohmic cell consisted of a 500 mL jacketed glass vessel (in this case, 250 g of sugarcane juice were used). Titanium electrodes were curved to conform to the cell dimensions. The electrode height was 5 cm, and the maximum and minimum inter-electrode gaps were 7.0 and 5.7 cm, respectively. Kinetic assays were conducted at 75 ± 1 °C using 25 ± 0.3 V ($E = 3.9$ V/cm) or 130 ± 2.5 V ($E = 20.5$ V/cm) applied to the electrodes and water through the jacket of the cell during 25 min.

A bypass system (shown in Fig. 1) was used to enable the use of two thermostatic baths to feed the jacket vessels: one for the come-up phase and another for the isothermal phase. This procedure was necessary to regulate the heating rate of the come-up phase and to match the temperature profiles of CH and OH, allowing the assessment of the non-thermal effects of electricity during the heat treatment. For CH, the same procedure was followed without the application of the electric field. Fig. 3 shows temperature over time for CH and OH experiments (with distinct frequencies), indicating identical profiles. Similar plots were obtained for experiments evaluating different waveforms. The come-up time was approximately 1.7 and 3 min for system I and II, respectively.

The experiments were carried out with the sugarcane juice agitated on a magnetic stirrer device (IKA, model C-MAG HS10, Germany) at the rate of 750 rpm. Samples were collected in nine heating times (0 – time at which the sample reached 74 °C, and 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20 and 25 min), immediately placed on an ice bath to stop the effect of heating, and subsequently analyzed for POD enzymatic activity, total phenolic content and color. All experiments were performed in triplicate.

One of the experimental challenges in determining if electric fields have non-thermal effects on enzymes is to maintain a homogeneous temperature distribution and an electric field well-controlled inside the chamber. The temperature was measured by 2 thermocouples: one was located close to the electrode and the other away from the electrodes. The system used in this work allowed a homogeneous temperature distribution in the sample during heating. On the other hand, the curved nature of the electrodes provides an electric field distribution that vary near the electrode edges, where there is a little intensification of the field (the electric field distribution can be seen at Mercali *et al.*, 2014b); this could result in high variation of local inactivation. In the present work, however, this variation was not high and did not affect the analysis, since error bars of the replicates were low, allowing a good estimation of the effects.

Fig. 3 – Temperature profile of sugarcane juice during conventional and ohmic heating experiments with frequencies varying from 10 to 10⁵ Hz.



Enzyme activity measurement

POD enzyme activity analysis was based on Chisari *et al.* (2007) protocol, already described in a previous study (Brochier *et al.* 2016). Enzyme activity was determined from change in absorbance/min ($\Delta\text{abs}/\text{min}$, named A) under the assay conditions at 25 °C. The value of A was obtained by linear regression, and only the linear part of the absorption curve was taken into account. Residual activities plotted against processing time were fit to Weibull distribution model (STATISTICA version 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK), which was previously found to be the best kinetic model to describe enzyme activity of POD in sugarcane juice (Brochier *et al.* 2016).

Total phenolic compounds

Fresh and treated samples, collected at times 0, 12 and 25 min, were assayed following the colorimetric method of Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) for total phenolic compounds. Analyses were performed in triplicate.

Color measurement

Color measurements were performed using a ColorQuest XE colorimeter (Hunter Assoc. Laboratory, VA, USA) in triplicate. The CIELAB parameters, L^* (lightness or brightness/darkness), a^*

(redness) and b^* (yellowness), were obtained with the light source D65 and an observation angle of 10° , using the reflectance specular included mode.

Statistical data analysis

Comparison between experiments was carried out using Student's t-test, ANOVA and Tukey's test with a confidence level of 95% (Statistica, version 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

5.3.3 Results and discussion

Sugarcane juice characterization

Table 1 shows the fresh sugarcane juice characterization. The characterization showed values similar to those found in a previous work (Brochier *et al.* 2016), except for the POD activity that was higher in the present study. This can be associated with different harvest seasons of the sugarcane that underwent different climatic and maturation conditions: one in the winter ($4,631 \pm 469$ UEA/min.g) and the other in the summer ($18,434 \pm 1,337$ UEA/min.g). The high enzyme activity demonstrates that a thermal treatment is necessary to preserve the juice sensorial characteristics and the phenolic composition.

Table 1 – Fresh sugarcane juice characterization.

Parameter	Value
pH	5.41 ± 0.04
Soluble solids ($^\circ$ Brix)	20 ± 1
Electrical conductivity (μ S/cm, 20° C)	$1,693 \pm 20$
POD activity (UEA/min. g)	$18,434 \pm 1,337$
Total phenolic compounds (mg GAE/L)	766 ± 52

UEA = unit of enzyme activity; GAE = gallic acid equivalent.

Peroxidase residual activity

Fig. 4 shows experimental and predicted POD residual activities during CH and OH treatments at different electric field frequencies (a and b), waveforms (c) and voltage gradients (d), where A_0 is the enzyme activity at time zero. As can be seen, the POD activity decreased over time for all treatments, with inactivation varying from 62.8 to 72.6% after 25 min. It is important to point out that a partial enzyme inactivation (approximately 14%) during the come-up period was observed.

This partial inactivation was low and represents the most thermolabile fraction of the enzyme. For a proper comparison between heating technologies (CH and OH) and the different variables evaluated, results of inactivation were fitted to kinetic equations, and the kinetic parameters were compared. The Weibull distribution model was used to describe the POD inactivation kinetics of sugarcane juice. This model [$a/a_0 = \exp(-b.t^n)$] is characterized by two parameters b and n , suggesting a continuous degradation of the enzyme. The value of n determines the shape of the distribution curve, while b determines the thermal reaction rate; consequently, n and b are called the shape and scale factors, respectively (Hutchinson 2000; Rudra Shalini *et al.* 2008). The Weibull model was suitable to predict POD inactivation with coefficients of determination (R^2) higher than 0.984, chi-square (χ^2) lower than 0.00096 and root mean square error (RMSE) lower than 0.0098. In a previous study, Brochier *et al.* (2016) found that the Weibull distribution was the best model to predict enzymatic inactivation in sugarcane juice. The b and n parameters obtained for each treatment are reported in Table 2. The values of b ranged from 0.06 to 0.15, and the parameter n was between 0.68 and 0.86. As can be seen, the values of n were lower than 1, indicating a ‘tailing’ phenomena which is characterized by an upward concavity curve. This might be inferred as an indication of the presence of extremely heat resistant enzyme fraction (Peleg 2003).

Fig. 4 – Experimental and predicted POD residual activity values for sugarcane juice during conventional and ohmic heating: different electric field frequencies (a and b), (c) waveforms and (d) voltage gradients.

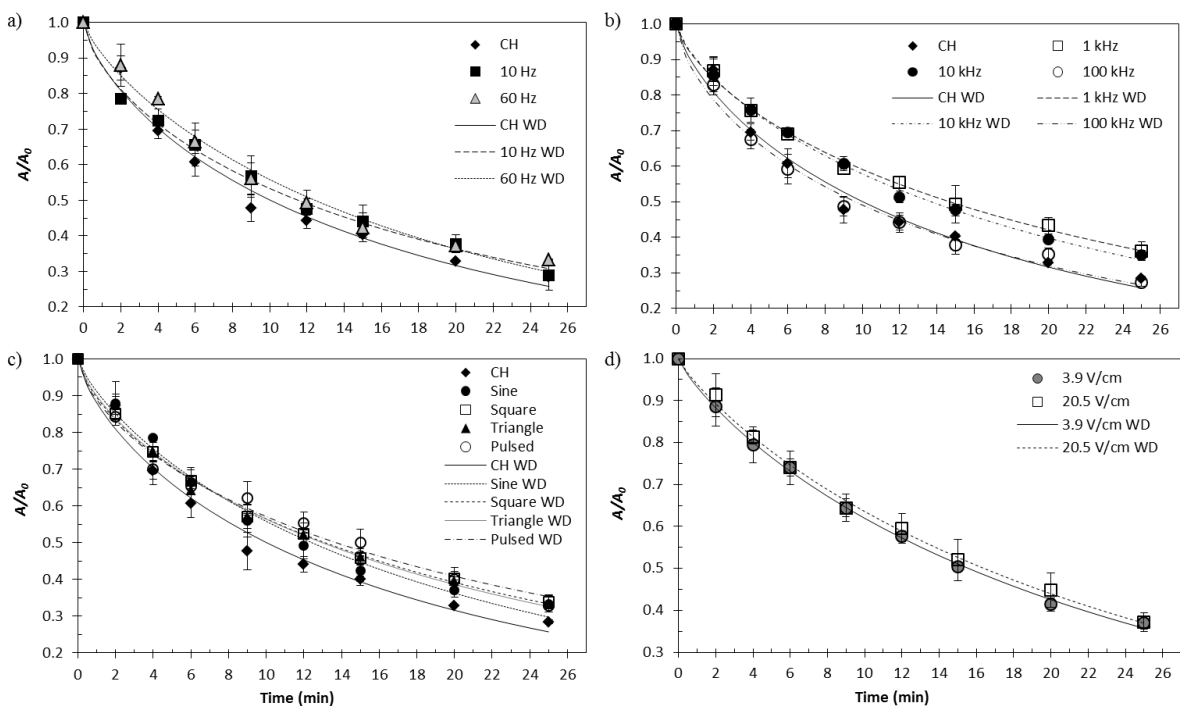


Table 2 – Coefficients of the Weibull distribution model.

Frequency tests						
Treatment	Frequency (Hz)	b^c	n^c	R^2	χ^2	RMSE
CH	-	0.13 ± 0.03^a	0.74 ± 0.08^a	0.984	0.00096	0.0098
OH	10	0.13 ± 0.02^a	0.69 ± 0.03^a	0.996	0.00023	0.0047
OH	60	0.09 ± 0.01^a	0.80 ± 0.03^a	0.990	0.00058	0.0076
OH	10^3	0.10 ± 0.02^a	0.72 ± 0.07^a	0.997	0.00013	0.0036
OH	10^4	0.10 ± 0.02^a	0.75 ± 0.07^a	0.998	0.00009	0.0030
OH	10^5	0.15 ± 0.01^a	0.68 ± 0.01^a	0.991	0.00052	0.0072
Waveform tests						
Treatment	Waveform	b^c	n^c	R^2	χ^2	RMSE
CH	-	0.13 ± 0.03^A	0.74 ± 0.08^A	0.984	0.00096	0.0098
OH	Sine	0.09 ± 0.01^A	0.80 ± 0.03^A	0.990	0.00058	0.0076
OH	Square	0.11 ± 0.02^A	0.72 ± 0.05^A	0.998	0.00011	0.0033
OH	Triangle	0.11 ± 0.02^A	0.73 ± 0.08^A	0.992	0.00040	0.0063
OH	Pulsed	0.12 ± 0.03^A	0.68 ± 0.05^A	0.987	0.00058	0.0076
Voltage gradient tests						
Treatment	Voltage gradient (V/cm)	b^c	n^c	R^2	χ^2	RMSE
OH	3.9	$0.08 \pm 0.03^\alpha$	$0.84 \pm 0.17^\alpha$	0.999	0.00006	0.0024
OH	20.5	$0.06 \pm 0.01^\alpha$	$0.86 \pm 0.08^\alpha$	0.998	0.00011	0.0033

^c Means in the same column with the same lowercase (frequencies), uppercase (waveforms) or Greek (voltage gradient) letters are not significantly different ($p > 0.05$).

Conventional versus ohmic heating

Since the signal of the ohmic heating equipment is an alternating bipolar current, molecules with net charges and dipole moments, such as enzymes, will move in response to the oscillating electric field (Mercali *et al.* 2014a; Samaranayake and Sastry 2016b). According to Castro *et al.* (2004), the presence of the electric field can influence biochemical reactions by changing molecular spacing and increasing interchain reactions. This can cause a distinct inactivation behavior during heating. This behavior was observed by Jakóbc *et al.* (2010) during OH of vegetable juices (58 – 78 °C): a significant destabilization of the labile isozyme fraction of POD occurred under the effect of OH, and the greatest decrease of the stability was obtained for carrot juice at 70 °C.

In a previous work (Brochier *et al.* 2016), differences were not observed at 75 °C between CH and OH (60 Hz) treatments for voltage gradient lower than 4.4 V/cm; on the other hand, significant differences were found at 60 °C on POD activation and at 80 °C on POD inactivation. In the present work, according to Table 2, there were no differences between OH and CH kinetic parameters, indicating that conformational structure of the enzyme was not altered by the external electric field in the conditions applied. Pereira *et al.* (2011) evaluated the effect of MEF (voltage gradient from 15 to 22 V/cm for the come-up phase, and from 4 to 8 V/cm for the holding phase) on whey protein

denaturation at temperatures ranging from 75 to 90 °C and reported a similar behavior: the effect of electricity on denaturation was not significant compared to the effect of heat.

For the sake of clarity, the influence of different variables (frequency, waveform and voltage gradient) will be presented separately in the following sections.

Effect of the electric field frequency on peroxidase activity

Moreover, as shown in Table 2, b and n values under OH using different frequencies were similar ($p > 0.05$), demonstrating that the time available for molecules to respond to the external imposed electric field is not affecting enzyme inactivation rates. Leaving the kinetic model aside and evaluating the results of the residual activity at points 12 and 25 minutes, it is possible to identify that there were no significant differences between CH and OH low frequency treatments (10 and 60 Hz) ($p > 0.05$). However, comparing CH and OH with higher frequencies after 12 minutes, the frequency of 1 and 10 kHz promoted lower inactivation than CH treatment ($p < 0.05$). Samaranayake and Sastry (2016b) evaluated the effect of the electric field frequency on pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato homogenate subjecting treated control and electrically-treated samples to the same temperature history. The authors found that low frequencies (1 – 60 Hz) yielded the highest level of pectin methylesterase inactivation. On the other hand, polygalacturonase results were inconclusive. The authors also developed a model to explain the motion of the enzyme molecule subjected to an electric field; the molecular motion simulation suggested that at lower frequencies the amplitude of the motion is of the order of the intermolecular distance of water, which contributes for additional collisions with water molecules in the same environment.

Effect of the electric field waveform on peroxidase activity

For the waveform tests (Figure 4c), it was observed no difference between CH and OH ($p > 0.05$) according to the Weibull distribution model parameters (Table 2). Comparing the different waveforms, it can be seen that all parameters were statistically identical, indicating that this parameter is not affecting the POD inactivation. Moreover, no differences were found between all treatments regarding POD residual activities at 12 and 25 minutes. Studies evaluating the influence of the waveforms on enzymatic activities were not found in the literature. These results bring, in some extent, a new contribution for this research field.

Effect of the voltage gradient on peroxidase activity

The voltage gradient tests conducted with 3.9 and 20.5 V/cm showed no differences between b and n values ($p > 0.05$) (Table 2). Likewise, the comparison point by point at 12 and 25 min did not show significant differences. Nistor *et al.* (2015) reported an increase of PME inactivation when the voltage gradient increased from 15 to 25 V/cm during OH experiments (50-70 °C) of a crude extract and apple puree. Samaranayake and Sastry (2016a) investigated the effect of the voltage gradient (5, 8 and 10.5 V/cm) of MEF on pectin methylesterase activity in tomatoes. The inactivation kinetics parameters of MEF and conventional thermal treatments were determined for samples subjected to nearly identical linearly increasing temperature histories. The presence of electric field (60 Hz, sine wave) resulted in activation of PME at 70 (± 1) °C, and accelerated inactivation at higher temperatures. This effect increased with field strength.

Overall, the results obtained in the present study indicate that voltage gradients lower than 20.5 V/cm with different forms of oscillation and frequencies (10-10⁵ Hz) did not influence the biochemical reactions that occur during inactivation of POD in sugarcane juice at 75 °C. According to Rudra Shalini *et al.* (2008), kinetic parameters of enzymatic inactivation are unique to each plant, which may explain the difference between the data obtained for sugarcane juice and other foods; besides, enzymes have distinct temperature stability which may explain why some results differ for distinct temperatures. It is important to emphasize that studies in the literature are contradictory and a larger body of research is still needed to evaluate the effect of electric field on conformational disturbances of tertiary protein structure or distinctive interactions and associations between denatured proteins.

Phenolic composition

Phenolic compounds degradation ranged from 7 to 12% in the come-up phase for all frequencies evaluated. Measurements in the end of the thermal treatment (25 min) indicated no further degradation after time zero. The residual phenolic content of samples treated by CH and OH with frequencies from 10-10⁵ Hz did not show statistical differences ($p > 0.05$); this indicates that the presence of MEF is not promoting less or extra degradation of these compounds, even though it is known that phenolic compounds carry electric charges and they must respond individually to an externally imposed electric field. These results are demonstrating that distinct available times for molecules to respond and orientate in accordance to the direction of electric field are not changing the degradation reaction. The polarization is probably not enhancing the hydrogen or electron

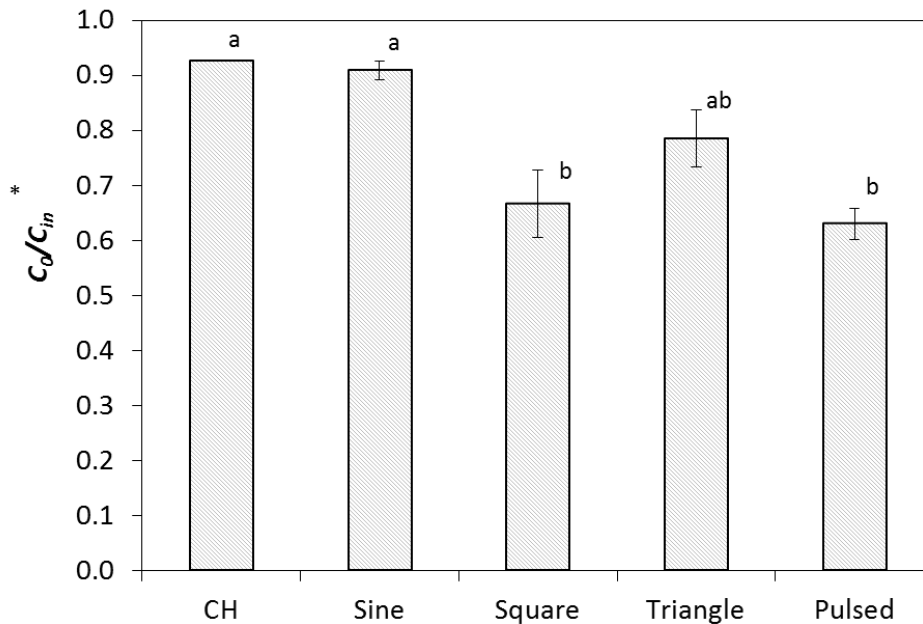
donation from hydroxyl groups positioned along the aromatic ring for free radical scavenging activities and metal-chelating potential (Dey *et al.* 2016).

Similarly, Brochier *et al.* (2016) found no statistical difference ($p > 0.05$) of total phenolic content between CH and OH using sine wave at 60 Hz and temperatures ranging from 60 to 80 °C. Mercali *et al.* (2014a) observed that above 100 Hz the presence of MEF did not influence ascorbic acid degradation in acerola pulp. On the other hand, the authors reported higher ascorbic acid degradation rates when the sample was treated at 10 Hz, probably due to the occurrence of electrochemical reactions. In the present study, electrochemical reactions, such as electrolysis of water and electrode corrosion, may not have influenced the phenolic degradation rates since no differences between the experiment conducted at 10 Hz and the conventional treatment were observed.

Regarding the experiments with different voltage gradients, similar total phenolic degradations after 25 min of heating were observed: 14 ± 1 and $10 \pm 1\%$, applying 3.9 and 20.5 V/cm, respectively. These results demonstrated that a high voltage gradient did not influence the degradation rate of phenolic compounds. For the waveforms, the residual contents of total phenolic compounds during the come-up phase are shown in Fig. 5. As can be observed, values for CH ($93 \pm 0\%$) and sine wave ($91 \pm 2\%$) were higher ($p < 0.05$) than those found for square and pulse treated samples (63 ± 3 and $67 \pm 6\%$, respectively). The similarity between square and pulsed waves can be explained by the fact that the later behaves as a square wave, but with larger amplitude and shorter time pulse. As square waves can be decomposed into sinusoidal functions through the Fourier series, the sum of their frequencies may have affected phenolic compounds stability. The higher phenolic compounds degradation with the square wave may also be related to the high speed of the peak voltage exchange and to its higher power (the power for square wave is the voltage V, while the powers for sinusoidal and triangular are $0.707 \times V$ and $0.577 \times V$, respectively).

The effects of MEF treatments on phenolic compounds stability have not been deeply considered. The present study contributes for a better understanding but, undoubtedly, more studies are necessary to elucidate the precise mechanism of MEF-induced changes. Thus, further studies have been conducting by our research group with more sensitive and reliable analysis.

Fig. 5 – Residual content of total phenolic compounds of sugarcane juice after conventional and ohmic heating with different waveforms.



* C is the total phenolic content of the fresh sample (C_{in}) and at time zero (C_0).

Color changes

The fresh sugarcane juice showed L^* value of 31.3 ± 0.2 , a^* value of 1.08 ± 0.07 and b^* value of 1.71 ± 0.07 , characteristics of a dun color. For all treatments, the values of L^* and b^* increased while a^* decreased when the fresh sample was heated up to 75°C , indicating a more yellowish and lighter coloration than the fresh sample. This behavior may be due to several factors, since mechanisms of color formation/degradation in sugarcane juice include Maillard reaction, thermal/electrical degradation of compounds, POD and polyphenol oxidase activities, among others.

Sant'Anna *et al.* (2013) summarized studies that showed a good correlation between the CIELAB parameters and the presence of bioactive compounds in a broad range of foods. According to these authors, in the last years, several studies have focused on evaluating color instrumentation as an alternative to control the presence of bioactive compounds with antioxidant activities. Duarte-Almeida *et al.* (2011) reported that the pigments found in sugarcane juice are mainly phenolic compounds; in the present work, some color changes could probably be related to the degradation of these compounds (approximately 10% during the come-up period). However, due to the great variety of phenolic compounds found in sugarcane, it is difficult to correlate this degradation with changes of CIELAB parameters. Furthermore, the action of the enzyme fraction that has not been inactivated could also explain color changes in the product.

Regarding frequency tests, it was not found differences ($p > 0.05$) between all treatments, except for the parameter b^* which showed a significant difference at 10 Hz, with a lower value (2.0 ± 0.2) than the other conditions (average value of 2.46 ± 0.05) indicating that the sample turned less yellowish than other treatments. Mercali *et al.* (2014a) also found differences of color in acerola pulp working with 10 Hz of frequency. The authors indicated that the occurrence of electrochemical reactions may have accelerated the degradation of the pigments (anthocyanins and carotenoids) at this frequency. It is worth mentioning that this conclusion does not apply for the present study since the sugarcane juice used did not contain anthocyanins (verified by HPLC analysis). Lee *et al.* (2013) reported a similar behavior for all parameters when applying OH in a tomato-based salsa: L^* , a^* and b^* values of treated samples (at various frequencies with 12.5 V/cm) were not significantly different ($p > 0.05$) from those of the non-treated sample.

Concerning the waveforms applied, a significant difference was only observed using square wave in the b^* parameter, which showed lower value after 25 min of heating (1.35 ± 0.03) than those found using other waveforms (average value of 2.05 ± 0.05), indicating that the sample became less yellowish than the other treated samples. This difference observed indicates that some non-thermal effect has occurred with the use of square wave and it may be correlated to phenolic compounds degradation, which was higher for this waveform. It is not yet clear what may has occurred, so more research will be conducted to better understand this behavior.

Table 3 shows the CIELAB parameters obtained for voltage gradient tests. It can be seen that the sample heated with 20.5 V/cm showed changes in L^* and b^* parameters during the isothermal phase, while sample treated with 3.9 V/cm gradient did not show differences during this period. Moreover, a^* and b^* parameters showed significant differences between different voltage gradients after 25 min. For 20.5 V/cm, samples became less reddish and less yellowish than for 3.9 V/cm, showing that the color of the sugarcane juice was modified by the increase of the voltage gradient. İçier *et al.* (2006) used conventional (100 °C for 300 s) and ohmic blanching (20 – 50 V/cm) to inactivate peroxidase of pea puree. The ohmic blanching was performed applying four different voltage gradients in the range of 20 – 50 V/cm. The puree samples were heated from 30 to 100 °C and held at 100 °C to achieve adequate blanching. The ohmic blanching above 20 V/cm promoted better color values than the water blanched puree at critical peroxidase inactivation times. The voltage gradient of 50 V/cm gave the shortest critical inactivation time (54 s - time necessary for complete inactivation) with the best color quality. It is important to point out that in this study the experiments were conducted without matching temperature profiles, which blinds the voltage gradient real effect on the color.

Table 3 – CIELAB parameters for sugarcane juice treated with different voltage gradients.

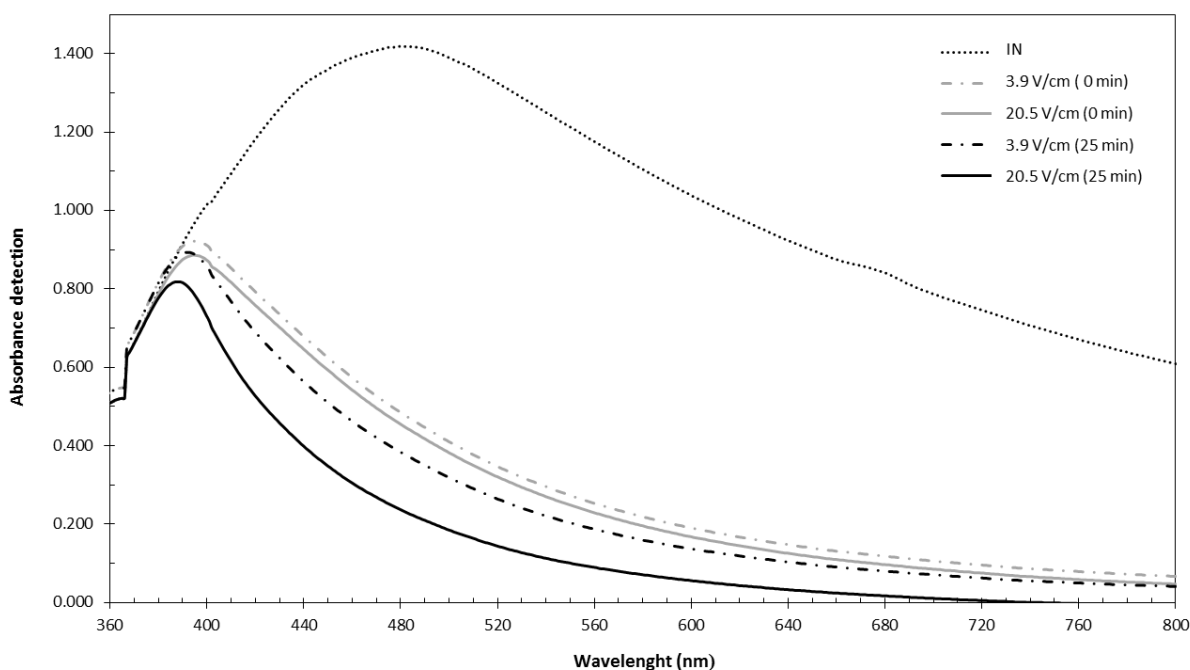
Voltage gradient (V/cm)	0 min	25 min
<i>L*</i> parameter		
3.9	32.6 ± 0.4 ^{A,a}	32.3 ± 0.3 ^{A,a}
20.5	33.2 ± 0.2 ^{A,a}	32.4 ± 0.1 ^{B,a}
<i>a*</i> parameter		
3.9	0.86 ± 0.06 ^{A,a}	0.83 ± 0.04 ^{A,a}
20.5	0.70 ± 0.07 ^{A,a}	0.55 ± 0.07 ^{A,b}
<i>b*</i> parameter		
3.9	2.5 ± 0.2 ^{A,a}	2.61 ± 0.07 ^{A,a}
20.5	2.20 ± 0.04 ^{A,a}	1.6 ± 0.2 ^{B,b}

Same capital letters in the same line represent no statistical difference between treatment time; means in the same column with the same lowercase letters are not significantly different ($p > 0.05$).

In an attempt to correlate the CIELAB parameters with degradation of bioactive compounds presented in sugarcane juice, samples were analyzed in a spectrophotometer performing a scanning from 360 to 800 nm, with intervals of 1 nm. The analysis was carried out for fresh sample (IN) and sample treated with 3.9 and 20.5 V/cm, at times 0 and 25 min. Fig. 6 shows the results obtained. The spectrum evidences the absence of chlorophyll in the fresh sample (the visible spectra of chlorophylls *a* and *b* and their derivatives are characterized by marked absorption bands of light between 600 and 700 nm (red region) and between 400 and 500 nm (blue region) (Schwartz *et al.* 2010). Additionally, it is possible to observe a significant difference between curves of fresh and treated samples (0 and 25 min); the fresh sample had maximum absorbance at 480-481 nm and the treated samples had the maximum absorbance shifted to the left. Comparing both voltage gradients, the higher electric field showed lower peaks, corroborating the idea that a greater collision force causes greater degradation of compounds, as it was observed for *a** and *b** color parameters (Table 3).

Unfortunately, it was not possible to identify any compound that could explain the color changes found in this study. Clarke *et al.* (1984) reported that phenolic and flavonoid compounds have a strong effect on sugarcane juice color. According to Suzart *et al.* (2007) and Prati *et al.* (2005), besides enzymatic browning, sugarcane juice darkening is related to the Maillard reaction between reducing sugars and amino acids present in sugarcane, forming dark pigment (melanoidins). These authors also attribute color changes to oxidative reactions of phenolic compounds and chlorophyll.

Fig. 6 – Absorbance spectrum of the fresh sample and samples treated for 0 and 25 min at 3.9 and 20.5 V/cm.



It is also important to highlight that in the present study differences in color between treatments could not be attributed to enzymatic browning since there was no statistical difference in the POD inactivation between treatments. Bucheli and Robinson (1994) evaluated the contribution of enzymic browning to color changes in sugarcane juice. They stated that the progressive decrease in color, measured at 420 nm, with increasing extraction temperature, indicates that more than 70% of the color initially formed in sugarcane extracts could be attributed to enzymic browning reactions. This is in agreement with others previous studies which showed that heat treatments inhibited color formation in sugarcane juice (Goodacre and Coombs 1978; Smith 1976).

5.3.4 Conclusion

The present work evaluated the effect of applying different frequencies, waveforms and voltage gradients of the ohmic heating technology on POD inactivation, phenolic compounds degradation and color changes in sugarcane juice at 75 °C. It was not observed a non-thermal effect on the enzymatic inactivation, indicating that the presence of an electric field did not alter the conformational structure of POD in the assayed conditions. Despite these results, the effect of OH on enzyme inactivation should be further investigated, since food matrix significantly influences the electric field effect on enzymes.

The effects of the electric field frequency and voltage gradient on phenolic compounds stability were not evident, while the waveform, square and pulsed, influenced their degradation. These two waveforms also promoted color changes in the product, indicating a possible relationship between color changes and phenolic compounds degradation. Among frequencies, significant color changes were found only at 10 Hz probably due to electrochemical reactions. When increasing voltage gradient to 20.5 V/cm, some changes in the color pattern were also observed.

Overall, OH (when specific process parameters are chosen) has the potential to be applied as an alternative technology for enzymatic inactivation in sugarcane juice without compromising the concentration of phenolic compounds and with minimal color changes. It is important to highlight that this study was conducted with same temperature histories for OH and CH to infer the non-thermal effects associated the presence of an external electric field. So, one of the main advantages of the OH technology - the rapid heating up to the desire holding temperature - was not considered. This advantage reduces the treatment time, which is critical to avoid excessive thermal damage of labile substances and to avoid sensory changes.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

References

- Brochier, B., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2016). Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. *LWT - Food Science and Technology*, *74*, 396–403.
- Bucheli, C. S., & Robinson, S. P. (1994). Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(2).
- Castro, I., Macedo, B., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2004). The effect of electric field on important food-processing enzymes: Comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. *Journal of Food Science*, *69*(9), 696–701.
- Chisari, M., Barbagallo, R. N., & Spagna, G. (2007). Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(9), 3469–76.
- Clarke, M. A., Blanco, R. S., & Godshall, M. A. (1984). Color tests and other indicators of raw sugar refining characteristics. In *Proceedings of the Sugar Processing Research Conference* (pp. 284–302). New Orleans.

Colombo, R., Lanças, F. M., & Yariwake, J. H. (2006). Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. *Journal of Chromatography A*, *1103*(1), 118–124.

Dey, T. B., Chakraborty, S., Jain, K. K., Sharma, A., & Kuhad, R. C. (2016). Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *53*, 60–74.

Duarte-Almeida, J. M., Salatino, A., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. *Food Chemistry*, *125*(2), 660–664.

Goodacre, B. C., & Coombs, J. (1978). Formation of colour in cane juice by enzyme-catalysed reactions - 2. distribution of enzyme and colour precursors. *International Sugar Journal*, *80*(959).

Hutchinson, T. P. (2000). Graphing the death of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, *62*(1–2), 77–81.

IAL. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Instituto Adolfo Lutz (4th ed.). São Paulo.

Içier, F., Yildiz, H., & Baysal, T. (2006). Peroxidase inactivation and colour changes during ohmic blanching of pea puree. *Journal of Food Engineering*, *74*(3), 424–429.

Jakób, A., Bryjak, J., Wójtowicz, H., Illeová, V., Annus, J., & Polakovič, M. (2010). Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating. *Food Chemistry*, *123*(2), 369–376.

Lee, S.-Y., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2013). Effect of frequency and waveform on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in salsa by ohmic heating. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(1), 10–7.

Mao, L. C., Xu, Y. Q., & Que, F. (2007). Maintaining the quality of sugarcane juice with blanching and ascorbic acid. *Food Chemistry*, *104*(2), 740–745.

Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2012). Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. *LWT - Food Science and Technology*, *47*(1), 91–95.

Mercali, G. D., Schwartz, S., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Sastry, S. (2014a). Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. *Journal of Food Engineering*, *123*, 1–7.

Mercali, G. D., Schwartz, S., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Sastry, S. (2014b). Effect of the electric field frequency on ascorbic acid degradation during thermal treatment by ohmic heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(25), 5865–70.

Nistor, O.-V., Stănciuc, N., Andronoiu, D. G., Mocanu, G. D., & Botez, E. (2015). Ohmic treatment of apple puree (Golden Delicious variety) in relation to product quality. *Food Science and Biotechnology*, *24*(1). <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0009-z>

Payet, B., Shum Cheong Sing, A., & Smadja, J. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(19), 7270–6.

Peleg, M. (2003). Calculation of the Non-Isothermal Inactivation Patterns of Microbes Having Sigmoidal Isothermal Semi-Logarithmic Survival Curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *43*(6), 645–658.

Pereira, R. N., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Exploring the denaturation of whey proteins upon application of moderate electric fields: A kinetic and thermodynamic study. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 59(21), 11589–11597.

Prati, P., Moretti, R. H., & Cardello, H. M. A. B. (2005). Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas. *Ciência Tecnologia de Alimentos*.

Qudsieh, H. Y. M., Yusof, S., Osman, A., & Rahman, R. A. (2002). Effect of Maturity on Chlorophyll, Tannin, Color, and Polyphenol Oxidase (PPO) Activity of Sugarcane Juice (*Saccharum officinarum* Var. Yellow Cane). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1615–1618.

Rudra Shalini, G., Shivhare, U. S., & Basu, S. (2008). Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. *Journal of Food Engineering*, 85(1), 147–153.

Samaranayake, C. P., & Sastry, S. K. (2016a). Effect of moderate electric fields on inactivation kinetics of pectin methylesterase in tomatoes: The roles of electric field strength and temperature. *Journal of Food Engineering*, 186, 17–26.

Samaranayake, C. P., & Sastry, S. K. (2016b). Effects of controlled-frequency moderate electric fields on pectin methylesterase and polygalacturonase activities in tomato homogenate. *Food Chemistry*, 199, 265–72.

Sant'Anna, V., Gurak, P. D., Ferreira Marczak, L. D., & Tessaro, I. C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. *Dyes and Pigments*.

Schwartz, S. J., von Elbe, J. H., & Giusti, M. M. (2010). Corantes. In S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema (Eds.), *Química de Alimentos de Fennema* (4 Ed., p. 900). Porto Alegre, RS: Artmed.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Smith, N. H. (1976). Inhibition of enzymatic browning in cane sugar processing. *International Sugar Journal*, 78(933).

Spiegel, M. R. (1981). *Manual de fórmulas e tabelas matemáticas*. São Paulo, SP: McGraw-Hill.

Suzart, C. A. G., Bergara, S., Molina, G., & Moretti, R. H. (2007). Caracterização de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) para a produção de caldo de cana: rendimento de caldo e valor de brix. In *XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Belo Horizonte, MG.

Yusof, S., Shian, L. S., & Osman, A. (2000). Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. *Food Chemistry*, 68(4), 395–401. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00180-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00180-6)

5.4 Artigo 3

Nesta seção, apresenta-se o terceiro artigo, referente ao estudo do efeito do uso de diferentes frequências, formas de onda e gradientes de tensão sobre os parâmetros de qualidade do caldo de cana tratado a 60 e 80 °C. Nessas temperaturas, o MEF apresentou efeito significativo na ativação e na inativação da POD, respectivamente, no caldo de cana.

Título: Effect of moderate electric field during ohmic heating of sugarcane juice on peroxidase activity, phenolic compounds and color.

Abstract

In the present study, the influence of moderate electric field (MEF) was evaluated during thermal treatment of sugarcane juice. Experiments of conventional (CH) and ohmic heating (OH) at temperatures of 60 and 80 °C were conducted to investigate the effect of frequency (0 – 10⁵ Hz), waveform (sine, square and triangle) and voltage gradient (0 – 16.7 V/cm) on inactivation of peroxidase (POD), phenolic compounds stability and color changes. Enzyme activity was significantly ($p < 0.05$) affected by OH; the non-thermal effects promoted POD activation at 60 °C (mostly at 10 Hz) and inactivation at 80 °C (mostly at 100 kHz). It was observed no variation of phenolic compounds content under the different conditions tested. However, the juice color was modified using low frequency (possibly due to electrochemical reactions) and different waveforms. Based on the results, it can be concluded that OH is suitable for POD inactivation at 80 °C with the usual process parameters (sine wave and 60 Hz) or higher frequencies.

Keywords: electricity; thermal treatment; enzyme activity; electric field.

5.4.1 Introduction

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice is a popular and sweet beverage with a rich composition: sugar, vitamins, minerals, phenolic compounds, mainly phenolic acids and flavonoids, and other organic compounds (Payet, Sing and Smadja, 2006; UNICAMP, 2011). The juice is highly recommended for convalescing patients with jaundice, cancer and cardiovascular diseases making it an ideal refreshing healthy drink (Nishad *et al.*, 2017). However, its processing and marketing are

limited due to its rapid deterioration (Yusof, Shian and Osman, 2000), and, as a consequence, the juice is usually consumed as soon as the cane is milled. Enzymatic browning significantly contributes to color changes of the product (Qudsieh *et al.* 2001; Yusof *et al.*, 2000), causing deleterious changes in the appearance and the organoleptic properties and also in the nutrient content of the beverage. Peroxidase (POD; EC 1.11.1.7) is the most thermostable oxidoreductase enzyme involved in enzymatic browning. POD catalyzes oxidation reactions using peroxides or oxygen as hydrogen acceptor, and the hydrogen donor may be phenols, amines and other organic compounds or products formed during the oxidation (Chisari, Barbagallo and Spagna, 2007; Hemeda and Klein, 1990; Soysal and Söylemez 2005).

POD along with polyphenol oxidase (PPO) and pectin methylesterase (PME) are the main enzymes involved in food spoilage (Meneses *et al.*, 2013), and thermal treatments are usually needed to increase shelf life of these products. In this way, alternative and/or complementary processing technologies have been investigated in recent years for controlling enzyme activities (Samaranayake and Sastry, 2016b). Some examples include microwave for inactivation of PPO and POD of green coconut water (Matsui *et al.*, 2008), high pressure thermal processing on PME, POD and PPO inactivation of an *Aloe vera*-litchi mixed beverage (Swami Hulle, Chakraborty and Rao, 2017), ultrasonication treatment to inactivate POD in *bael* (*Aegle marmelos*) fruit extract (Dabir and Ananthanarayan, 2017), pulsed electric field (PEF) processing for PPO and POD inactivation of mango and papaya juice combined with stevia extract (Criado, Martínez and Rodrigo, 2016), and ohmic heating to control the PME activity in tomato homogenate (Samaranayake and Sastry, 2016b).

Ohmic heating (OH) is an emerging technology in food industry, which consists of passing an alternating electric current through a food with the main purpose of warming it by internal power generation. Due to its inherent electrical resistance, food transforms electrical energy into thermal, thereby promoting a temperature rise inside it (Resnick, 1996, Sastry, 2008). OH is commonly preferable over conventional processes once it allows nutritional and sensory quality maintenance and makes possible greater efficiency and speed of heating (Castro *et al.*, 2004; Sastry, 2008).

The OH is distinguished from other methods of electric heating by the presence of electrodes in contact with the food, thus allowing control of the frequency (which is lower compared to microwave and radiofrequency), waveform (although the most used is the sinusoidal) and the strength of the electric field imposed between the electrodes (Castro *et al.*, 2004; Pereira, Teixeira and Vicente, 2011), In OH, the electric field applied is moderate (MEF), since it is smaller than 1 kV/cm, therefore with a smaller magnitude than in PEF (Kulshrestha and Sastry, 2010, Sastry, 2008).

In a previous study conducted by our research group, the efficacy of MEF frequencies at 60 Hz either to stimulate (60 °C) or to inhibit (80 °C) the POD activity in sugarcane juice was observed (Brochier *et al.*, 2016). Since molecules with net charges and dipole moments, such as enzymes, will move in response to the oscillating electric field (Mercali *et al.*, 2014; Samaranayake & Sastry, 2016b), the study of the enzymes behavior under different frequencies, waveforms and field strength is a matter worthy of being investigated. Therefore, the objective of the present work was to evaluate MEF parameters (frequency, waveform and field strength) on POD activity, phenolic compounds stability and color changes at 60 and 80 °C in an attempt to clarify those non-thermal effects observed in the previous work. In order to assess the effects of MEF, OH experiments were compared to the conventional heating (CH), both conducted under the same temperature profile.

5.4.2 Materials and methods

Samples

The sugarcane juice was donated by a rural property located in Veranópolis (Rio Grande do Sul /Brazil, 28° 56' 10" S, 51° 32' 58" W). The juice was homogenized and frozen in plastic bags and was thawed in a water bath immediately prior to use.

The fresh juice was characterized according to its pH (Digimed, MD-22 model), soluble solids (refractometer portable SZJ-A model), electrical conductivity (Digimed, MD-3P model), POD enzymatic activity and total phenolic content. All analyzes were performed in triplicate. Table 1 shows the fresh sugarcane juice characterization. The characterization showed similar values to those found in a previous work (Brochier *et al.*, 2018), except for the electrical conductivity that was approximately two times higher. This can be associated with different harvest seasons of the sugarcane that underwent different climatic and maturation conditions.

Table 1 – Fresh sugarcane juice characterization.

Parameter	Value
pH	5.43 ± 0.05
Soluble solids (°Brix)	18.0 ± 0.1
Electrical conductivity (mS/cm, 20 °C)	4.4 ± 0.3
POD activity (UEA/min. g)	19393 ± 1326
Total phenolic compounds (mg GAE/L)	389 ± 31

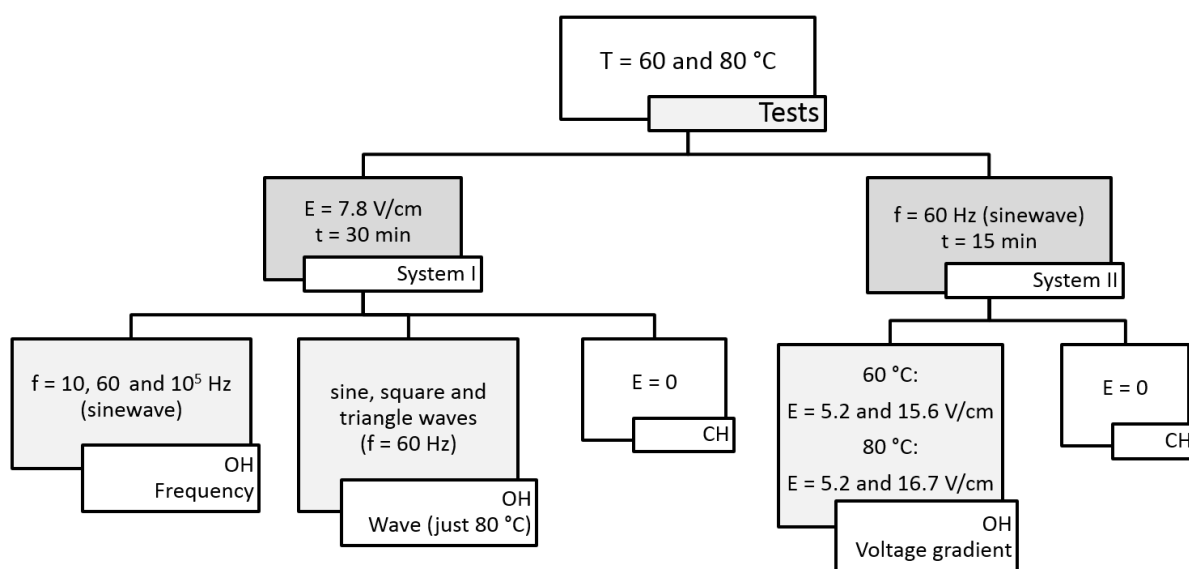
UEA = unit of enzyme activity; GAE = gallic acid equivalent.

Ohmic and conventional heating processes

Two OH equipments were used to conduct this study. The first one, used to evaluate distinct frequencies and waveforms, were previously described by Brochier *et al.* (2018). The titanium electrodes used were curved to conform to the cell dimensions (250 mL). The electrode height was 3.4 cm and the maximum and minimum inter-electrode gaps were 3.7 and 2.8 cm, respectively. The temperature was measured by 2 thermocouples: one located close to the electrode and the other away from the electrodes.

The experiments were conducted similarly to those described by Brochier *et al.* (2018). In the present work, the kinetic assays were conducted at 60 and 80 ± 1 °C. Fig. 1 presents a flowchart of the experiment designs. For distinct frequencies, the waveform chosen to run the experiments was sine wave; for different waveforms, the frequency was kept at 60 Hz. The procedure to regulate the heating rate of the come-up phase and match the temperature profiles of CH and OH were performed according to Brochier *et al.* (2018). Fig. 2 shows temperature over time for CH and OH experiments (with distinct frequencies), indicating identical profiles. Similar plots were obtained for experiments evaluating different waveforms. The come-up time was approximately 66 s (1.1 min) for 60 °C and 156 s (2.6 min) for 80 °C.

Fig. 1. Flowchart of the experiments

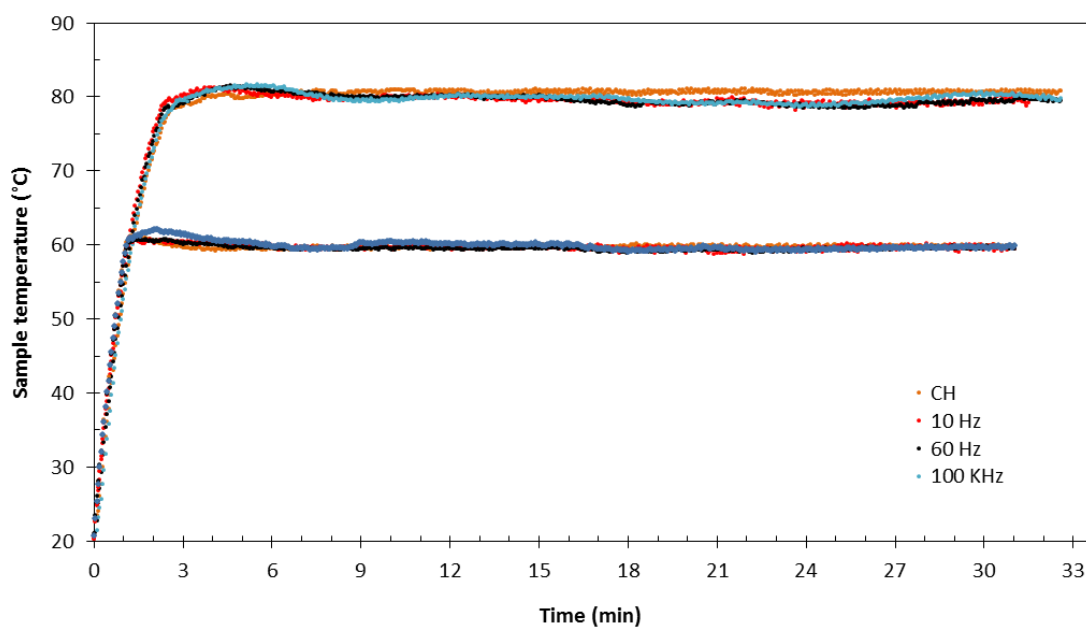


The experiments were carried out with 85 g of sugarcane juice agitated on a magnetic stirrer device (IKA, model C-MAG HS10, Germany) at the rate of 1250 rpm. Samples were collected in seven heating times (0 – time at which the sample reached the thermal phase zone and 2, 5, 10, 15, 20 and 30 min), immediately placed on an ice bath to stop the effect of heating, and subsequently analyzed

for POD enzymatic activity, total phenolic content and color. All experiments were performed in triplicate.

The experiments to evaluate the influence of the voltage gradient were performed using the second equipment which was previously described by Mercali *et al.* (2012). The curved titanium electrodes heighted 6.0 cm and the maximum and minimum inter-electrode gaps were 4.0 and 6.0 cm, respectively. The temperature was measured by 2 thermocouples which assessed a homogeneous temperature distribution in the sample during heating. Samples of 250 g of sugarcane juice were used in a 500 mL ohmic cell. The kinetic assays at 60 °C were conducted using 25 ± 0.5 V (5.2 V/cm) and 75 ± 2.5 V (15.6 V/cm) at 80 °C, the voltage gradients were 25 ± 0.5 V (5.2 V/cm) and 80 ± 2.5 V (16.7 V/cm). The isothermal phase lasted 15 min in which samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7.5, 10 and 15 min. The same procedure to guarantee similar temperature profiles was adopted. The come-up time took approximately 2.1 min for 60 °C and 4.6 min for 80 °C treatments. Similar plots of Figure 1 were obtained for OH and CH indicating identical heating profiles. Experiments were performed in triplicate.

Fig. 2. Temperature profile of sugarcane juice during conventional and ohmic heating experiments with frequencies varying from 10 to 10^5 Hz.



Enzyme activity measurement

POD enzyme activity analysis was based on Chisari, Barbagallo and Spagna (2007) protocol, already described in a previous study (Brochier, Mercali e Marczak, 2016). The enzyme activity was determined from change in absorbance/min ($\Delta\text{abs}/\text{min}$, named A) under the assay conditions at 25 °C. The value of A was obtained by linear regression, and only the linear part of the absorption curve was taken into account. Residual activities plotted against processing time were fit to Weibull distribution model, which was the best kinetic model to describe enzyme activity of POD in sugarcane juice (Brochier *et al.*, 2016). This model is expressed by $A/A_0 = \exp(-b.t^n)$, where A/A_0 is the POD residual activity, b determines the thermal reaction rate, t is the time (min) and n determines the shape of the distribution curve (Hutchinson, 2000; Rudra Shalini *et al.*, 2008).

Total phenolic compounds

Fresh and treated samples, collected at times 0, 15 and 30 min (for frequencies and waveforms evaluation) and at 0, 7.5 and 15 min (for voltage gradient evaluation), were assayed following the colorimetric method of Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) for total phenolic compounds. For the analysis, performed in triplicate, the sugarcane juice samples were previously centrifuged for 3 min at 13,400 rpm (Eppendorf centrifuge, Mini Spin model).

Color measurement

Color measurements were performed using a ColorQuest XE colorimeter (Hunter Assoc. Laboratory, VA, USA). The CIELAB parameters, L^* (lightness or brightness/darkness), a^* (redness) and b^* (yellowness), were obtained with the light source D65 and an observation angle of 10°, using the reflectance specular included mode.

Statistical data analysis

Statistical analysis was carried out using Student's t -test, ANOVA and Tukey's test with a confidence level of 95% (Statistica, version 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK). The same software was used to model the kinetic model.

5.4.3 Results and discussion

Effect of moderate electric field on peroxidase activity

Fig. 3 shows data obtained during CH and OH treatments at 60 °C using different electric field frequencies (a) and voltage gradients (b). At this temperature, it was not possible to perform a kinetic modeling of the enzymatic activity because the residual enzymatic activity of the treated juice remained constant over time for all treatments, except for 10 Hz which showed an activation behavior in the first minutes. Analyzing point-by-point, the 10 Hz treatment differed from the others ($p < 0.05$) in almost all time intervals, suggesting that POD activity is stimulated at low frequency. It is possible that electrochemical reactions that happens at 10 Hz, such as electrolysis of water and electrode corrosion (Mercali *et al.*, 2014), may have changed the conformational structure of the active site of the enzyme to more nonpolar regions, leading to a conformation in which the active site is more protected, promoting the activation of the enzyme (Lopes *et al.*, 2015). Lopes *et al.* (2015) also observed horseradish peroxidase (HRP) activation in buffer solution (0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 6.0) conventionally heated at 30-60 °C for 48 h. The results indicated that incubation of HRP between 30 and 45 °C (maximal enzyme activation) may modify the HRP secondary structure, promoting better access of the substrate to the active site region, increasing the enzyme activation (Kelly and Price, 1997).

On the other hand, Samaranyake and Sastry (2016) found that the tomato homogenate ohmically treated (0.4 V/cm at 65 °C for 300 s) at low frequencies (in the range of 1 – 60 Hz) yield statistically higher ($p < 0.05$) PME inactivation compared to 100 Hz and 1 kHz. So far, the mechanism of MEF-induced inactivation of enzymes is not well-known (Samaranyake and Sastry, 2016). In the food science and engineering literature, removal of metallic prosthetic groups presented in some enzymes (Castro *et al.*, 2004) and conformational changes of proteins (Pereira *et al.*, 2011) by the electric field are factors that may explain the enhanced loss of enzyme activity and protein denaturation (Samaranyake and Sastry, 2016). Samaranyake and Sastry (2016) also simulated molecular motions of PME in response to alternating electric fields. They stated that the linear displacements at the lower frequencies are in the same order of magnitude as the intermolecular distance for water at atmospheric pressure (about 2.8×10^{-10} m), and the value for a number of frequencies in this range is still of the order of the intermolecular distance. This suggests that exposure of PME molecules to lower frequency electric fields at low field strengths results in sufficient motion to increase the probability of additional collisions with water molecules in the same environment. At high frequencies, the translational electrical motion appears to be negligible in

comparison to intermolecular distance (Samaranayake and Sastry, 2016). However, it must be considered that in the cited work a different molecule was studied with a very different field strength.

In Fig. 3b, it was possible to observe that the residual enzyme activity remained constant over time, presenting a similar behavior for all voltage gradients evaluated ($p > 0.05$). According to Castro *et al.* (2004), the presence of the electric field can influence biochemical reactions by changing molecular spacing and increasing interchain reactions. This can cause a distinct enzyme activity behavior during heating. In a previous work conducted by our research group (Brochier *et al.*, 2016), OH treatment (60 Hz and 3.3 - 4.4 V/cm) promoted a higher POD activation ($p < 0.05$) than CH treatment at 60 °C during 12 min of heating, in contrast with results aforementioned. This different behavior may have occurred due to the different samples (sugarcane harvested with 14 months of difference). Samaranayake and Sastry (2016a) found an opposite behavior studying the effect of three electric field strengths (5, 8 and 10.5 V/cm) on pectin methylesterase activity in tomatoes (60 Hz, sine wave): a significant activation at 70 °C and inactivation at higher temperatures up to 95 °C (for 8 and 10.5 V/cm). Nevertheless, it is worth emphasizing that the evaluated food matrices and enzymes were different.

Fig. 3. Experimental POD residual activity values for sugarcane juice during CH and OH at 60 °C: different (a) electric field frequencies, and (b) voltage gradients.

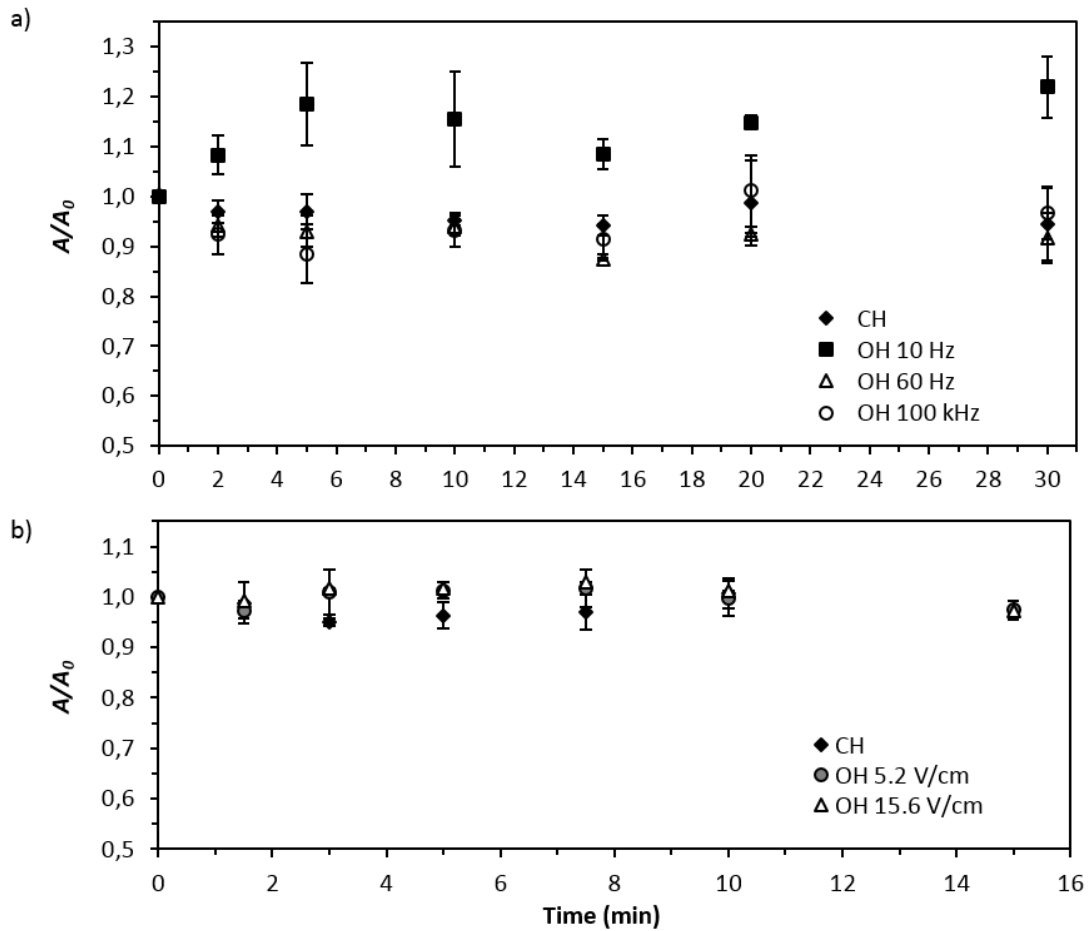
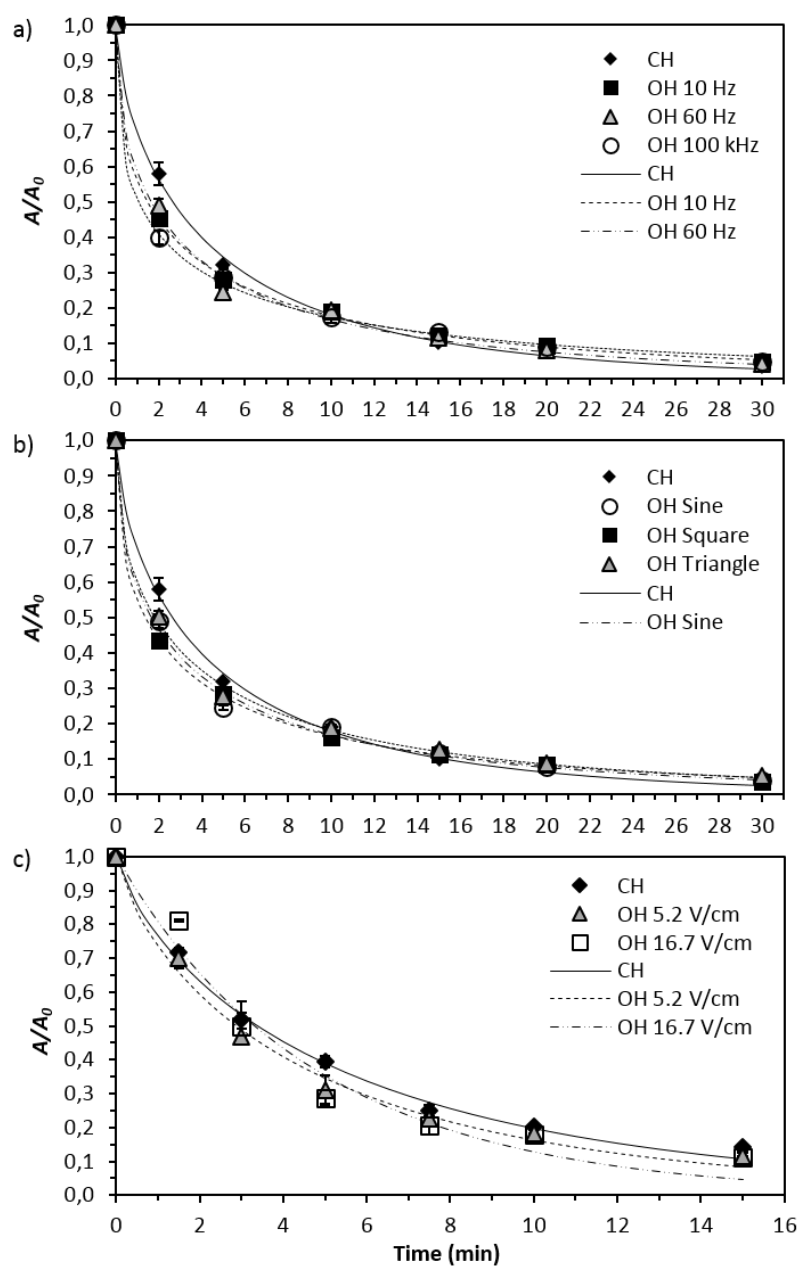


Fig. 4 shows experimental and predicted POD residual activities during CH and OH treatments at 80 °C, using different electric field frequencies (a), waveforms (b) and voltage gradients (c). As can be seen, the POD activity decreased over time for all treatments, with inactivation varying from 94.8 to 96.5% after 30 min of CH or OH (distinct frequencies and waveforms) and from 85.8 to 88.9% after 15 min with distinct voltage gradients. It is important to point out that a partial enzyme inactivation (approximately 26%) during the come-up period was observed, meaning that the most thermolabile fraction of the enzyme was deactivated before 80 °C were reached.

Fig. 4. Experimental (points) and predicted (lines) POD residual activity values for sugarcane juice during CH and OH at 80 °C: different (a) electric field frequencies, (b) waveforms and (c) voltage gradients.



Results of inactivation were fitted to kinetic equations, and the kinetic parameters were compared for a proper comparison between heating technologies (CH and OH) and the different variables evaluated. The Weibull distribution model was suitable to predict POD inactivation with coefficients of determination (R^2) higher than 0.97, chi-square (χ^2) lower than 0.0033 and root mean square error (RMSE) lower than 0.02. The b and n parameters of the Weibull model, as well as the statistical criteria, are reported in Table 2.

Table 2 - Coefficients of the Weibull distribution model of peroxidase activity of sugarcane juice treated at 80 °C.

Frequency tests						
Treat.	Frequency (Hz)	b^c	n^c	R^2	χ^2	RMSE
CH	-	0.36 ± 0.03^c	0.68 ± 0.03^a	0.998	0.00020	0.005
OH	10	0.569 ± 0.008^{ab}	0.48 ± 0.02^b	0.999	0.00005	0.002
OH	60	0.53 ± 0.02^b	0.53 ± 0.02^b	0.995	0.00052	0.008
OH	10^5	0.67 ± 0.01^a	0.42 ± 0.01^b	0.997	0.00010	0.004
Waveform tests						
Treat.	Waveform	b^c	n^c	R^2	χ^2	RMSE
CH	-	0.36 ± 0.03^B	0.68 ± 0.03^A	0.998	0.00020	0.005
OH	Sine	0.53 ± 0.02^A	0.53 ± 0.02^B	0.995	0.00052	0.008
OH	Square	0.59 ± 0.03^A	0.49 ± 0.02^B	0.999	0.00003	0.002
OH	Triangle	0.50 ± 0.01^A	0.532 ± 0.007^B	0.997	0.00020	0.005
Voltage gradient tests						
Treat.	Voltage gradient (V/cm)	b^c	n^c	R^2	χ^2	RMSE
CH	0	$0.27 \pm 0.03^\alpha$	$0.78 \pm 0.04^\beta$	0.993	0.00042	0.007
OH	5.2	$0.31 \pm 0.04^\alpha$	$0.77 \pm 0.05^\beta$	0.991	0.00084	0.010
OH	16.7	$0.21 \pm 0.02^\alpha$	$0.98 \pm 0.06^\alpha$	0.970	0.00330	0.020

^c Means in the same column with the same lowercase (frequencies), uppercase (waveforms) or Greek (voltage gradient) letters are not significantly different ($p > 0.05$).

As can be seen in Table 2, for 80 °C, b values ranged from 0.21 to 0.67, and n values ranged from 0.42 to 0.98. The highest value of b , indicating the highest inactivation rate, was obtained for the experiment performed at the frequency of 10^5 Hz.

Evaluating the CH and OH treatment with different frequencies, it is possible to verify that the use of MEF promoted a higher rate of inactivation (b value), which was pronounced using 100 kHz. However, observing the curves of Fig. 4a, it can be seen that an electrical effect occurred only in the first few minutes of the treatments, with the thermal effect standing out for the rest of the time. Regarding the use of distinct waveforms, the same behavior can be seen in Fig. 4b. Moreover, according to Table 2, experiments with different waveforms were statistically similar ($p < 0.05$) but different from the CH. In fact, the b value of CH treatment was lower than all OH experiments at 7.8 V/cm. Concerning the experiments conducted to evaluate the voltage gradient, no differences between b values ($p > 0.05$) were found.

It is speculated that the high sugar content of the sample could protect the POD structure of the electric effects, preventing further inactivation during OH treatment. This hypothesis needs a deeper investigation to be confirmed.

Phenolic composition

Phenolic compounds can be classified into water-soluble compounds (phenolic acids, phenylpropanoids, flavonoids and quinones) and water-insoluble compounds (condensed tannins, lignins and cell-wall bound hydroxycinnamic acids). These molecules have an aromatic ring bearing one or more hydroxyl groups and their structure may vary from a simple phenolic molecule to a complex high-molecular mass polymer (Haminiuk *et al.*, 2012). Phenolics can donate electrons to other compounds, so, they may respond to the alternate electric field, especially if they are deprotonated. In this study, phenolic compounds degradation occurred in the come-up phase and ranged from 6 to 18% for treatments at 60 °C and from 8 to 20% for experiments at 80 °C. There was no further degradation in the isothermal phase, period in which the electric field was applied, suggesting degradation only by the thermal effect.

Similar results were obtained in a previous work with other conditions (60 - 80 °C, CH or OH at 3.3 - 4.4 V/cm, 60 Hz and sinewave): no statistical difference ($p > 0.05$) of total phenolic content was found between OH and CH treatments (Brochier *et al.*, 2016).

Color changes

The fresh sugarcane juice showed L^* value of 31.8 ± 0.4 , a^* value of 0.64 ± 0.04 and b^* value of 1.3 ± 0.1 , characteristics of a dun color. The color parameters were measured in the fresh sample, when the sample reached the isothermal phase (time zero) and in the end of the heating process. Tables 3 and 4 show only the CIELAB parameters that showed significant differences ($p < 0.05$) between times and treatments at 60 and 80 °C, respectively. The L^* parameter did not showed differences between distinct frequencies evaluated and also between different voltages. Moreover, it was observed no differences between time zero and the final time for all treatments (when the electric field was applied). Makroo *et al.* (2017) also observed no significant change in the L^* parameter of OH treated watermelon juice at 90 °C, 24 V/cm and 50 Hz for 1 min.

The a^* value (ranging from green to red) decreased with time (from the fresh sample to the zero time), providing a more greenish color to the sample. As can be seen in Table 3, the a^* values were similar in the end of the treatment for all frequencies evaluated and for all voltage gradients applied. On the other hand, it was observed difference between treatment times for experiments conducted with 5.2 and 15.6 V/cm. Since the presence of MEF is not affecting color, and treatment time and temperature are similar for all experiments, this difference could not be explained.

Table 3 – CIELAB a^* parameter for sugarcane juice treated by CH and OH at 60 °C.

Frequency tests			
Treatment	Frequency (Hz)	Zero time	Final time
CH	-	0.47 ± 0.06 ^A	0.32 ± 0.03 ^{B,a}
OH	10	0.46 ± 0.05 ^A	0.41 ± 0.05 ^{A,a}
OH	60	0.54 ± 0.05 ^A	0.42 ± 0.05 ^{A,a}
OH	10 ⁵	0.46 ± 0.06 ^A	0.36 ± 0.05 ^{A,a}
Voltage gradient tests			
Treatment	Voltage gradient (V/cm)	Zero time	Final time
CH	0	0.38 ± 0.02 ^A	0.32 ± 0.05 ^{A,α}
OH	5.2	0.44 ± 0.05 ^A	0.32 ± 0.04 ^{B,α}
OH	16.7	0.52 ± 0.03 ^A	0.27 ± 0.06 ^{B,α}

Similar capital letters in the same line represent no statistical difference between treatment time; means in the same column with the same lowercase letters (frequencies) or Greek letters (voltage gradient) are not significantly different ($p > 0.05$).

The yellowness (b^* parameter) did not change neither between treatment time nor between different conditions of frequency and voltage gradient. Ibarz *et al.* (1999) studied the application of CH on 11 °Brix pear puree at temperatures from 80 °C to 98 °C during 500 min, and Makroo *et al.* (2017) ohmically treated watermelon juice at 90 °C, 24 V/cm and 50 Hz for 1 min. In both studies, the b^* value of the treated samples remained unchanged after thermal treatments.

Comparing the results between Tables 3 and 4, it can be seen that temperature influenced on the juice color: in the beginning of the isothermal phase (time zero) samples heated at 60 °C showed higher a^* parameter than those heated at 80 °C, meaning that at higher temperature the sugarcane juice became more greenish. At 80 °C, non-enzymatic browning might be occurred, resulting in a more intense color change of the samples due to the presence of sucrose (which can hydrolyze during thermal treatment). Color changes can also be related to the thermal destruction of pigments present in the samples.

Regarding the L^* parameter, no differences between distinct frequencies evaluated and also between different voltages were observed, meaning that the presence of MEF is not contributing for lightness changes. For different frequencies, a^* and b^* parameters for 10 Hz were statistically different from the other treatments. Mercali *et al.* (2014a) also found color changes in acerola pulp ohmically heated at 10 Hz; the authors indicated that the occurrence of electrochemical reactions may have accelerated the degradation of the pigments (anthocyanins and carotenoids) at this frequency. In sugarcane juice, the pigments could be also affected by these electrochemical reactions. On the other hand, no differences were found for distinct voltage gradients.

Table 4 – CIELAB a^* and b^* parameters for sugarcane juice treated by CH and OH at 80 °C.

a^* parameter			
Frequency tests			
Treatment	Frequency (Hz)	Zero time	Final time
CH	-	0.27 ± 0.02^A	$0.28 \pm 0.02^{A,ab}$
OH	10	0.23 ± 0.03^B	$0.39 \pm 0.03^{A,a}$
OH	60	0.25 ± 0.02^A	$0.25 \pm 0.03^{A,b}$
OH	10^5	0.25 ± 0.02^A	$0.29 \pm 0.01^{A,ab}$
b^* parameter			
Frequency tests			
Treatment	Frequency (Hz)	Zero time	Final time
CH	-	1.6 ± 0.2^A	$1.29 \pm 0.03^{A,\beta}$
OH	10	1.8 ± 0.2^A	$2.0 \pm 0.2^{A,\alpha}$
OH	60	1.28 ± 0.04^A	$1.06 \pm 0.00^{B,\beta}$
OH	10^5	1.43 ± 0.03^A	$1.3 \pm 0.1^{B,\beta}$
Waveform tests			
Treatment	Waveform	Zero time	Final time
CH	-	1.6 ± 0.2^A	$1.29 \pm 0.03^{A,1}$
OH	Sine	1.28 ± 0.04^A	$1.06 \pm 0.00^{B,2}$
OH	Square	1.40 ± 0.06^A	$0.99 \pm 0.05^{B,2}$
OH	Triangle	1.5 ± 0.1^A	$1.09 \pm 0.07^{B,2}$

Similar capital letters in the same line represent no statistical difference between treatment time; means in the same column with the same lowercase letters (frequencies/ a^*), Greek letters (frequencies/ b^*) or numbers waveforms/ b^*) are not significantly different ($p > 0.05$).

When evaluating different waveforms, it was observed that yellowness (b^* value) decreased during time for the square and triangle waveform treatments, suggesting that some non-thermal effect may have occurred during the application of MEF. It is important to point out that the understanding of the waveform influence still lacks study. Also, the OH using the three waveforms presented lower b^* values than the CH ($p < 0.05$), which can be attributed to the electric field presence.

5.4.4 Conclusion

The effects of frequency, waveform and voltage gradient of the electric field on POD activity, phenolic compounds and color degradations were studied in sugarcane juice treated at 60 and 80 °C. There was observed POD activation at 60 °C/10 Hz, possibly due to electrical reactions between the sample and the electrodes. Higher inactivation rates were found at 80 °C with OH, especially at 100 kHz, indicating non-thermal effects of the moderate electric field. There was no difference on POD inactivation between the different waveforms and voltage gradient tested.

Phenolic compounds were not affected by the electric field applied. Despite the relationship of the phenolic compounds with the color of the food, some changes in the color of sugarcane juice were observed. Raising the sugarcane juice temperature up to 80 °C, there was a greater change in a^* parameter, attributed to the greater inactivation of POD at OH treated juice and due to Maillard reactions and pigment degradation. The reduction of yellowness was evidenced with the use of OH at 60 Hz and different waveforms, these changes were attributed to the MEF presence.

Overall, it was found that the effect of temperature on the POD inactivation and color responses was greater than the electrical effect on the studied conditions, mostly at 80 °C. Nevertheless, ohmic heating technology can be applied for the heat treatment of sugarcane juice at 80 °C without compromising the concentration of phenolic compounds when compared to conventional heating. Further experiments are being performed to understand if the presence of soluble compounds, such as sugars, could protect POD from the electric field.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) as a scholarship for the first author and as the PNPd grant and also to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and to FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

References

- Brochier, B., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2016). Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. *LWT - Food Science and Technology*, *74*, 396–403.
- Brochier, B., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2018). Effect of ohmic heating parameters on peroxidase inactivation, phenolic compounds degradation and color changes of sugarcane juice. *Food and Bioproducts Processing*, *111*, 62–71.
- Castro, I., Macedo, B., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2004). The effect of electric field on important food-processing enzymes: Comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. *Journal of Food Science*, *69*(9), 696–701.
- Chisari, M., Barbagallo, R. N., & Spagna, G. (2007). Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(9), 3469–3476.
- Criado, M. N., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2016). Control of polyphenoloxidase and peroxidase activities in mango and papaya juice by pulsed electric field and stevia rebaudiana bertonii extract combined process. In *IFMBE Proceedings* (Vol. 53, pp. 128–131). https://doi.org/10.1007/978-981-287-817-5_28

- Dabir, M. P., & Ananthanarayan, L. (2017). Comparative inactivation studies of Aegle marmelos (bael) peroxidase in crude extract of fruit by heat processing and ultrasonication treatment. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 417–422.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10), 2023–2044.
- Hemeda, H. M., & Klein, B. P. (1990). Effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts. *Journal of Food Science*, 55(1), 184–185.
- Hutchinson, T. P. (2000). Graphing the death of Escherichia coli. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 77–81.
- Ibarz, A., Pagán, J., & Garza, S. (1999). Kinetic models for colour changes in pear puree during heating at relatively high temperatures. *Journal of Food Engineering*, 39(4), 415–422.
- Kelly, S. M., & Price, N. C. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1338(2), 161–185.
- Kulshrestha, S. A., & Sastry, S. K. (2010). Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 78–83.
- Lopes, L. C., Barreto, M. T. M., Gonçalves, K. M., Alvarez, H. M., Heredia, M. F., de Souza, R. O. M. A., ... Fricks, A. T. (2015). Stability and structural changes of horseradish peroxidase: Microwave versus conventional heating treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 69, 10–18.
- Makroo, H. A., Saxena, J., Rastogi, N. K., & Srivastava, B. (2017). Ohmic heating assisted polyphenol oxidase inactivation of watermelon juice: Effects of the treatment on pH, lycopene, total phenolic content, and color of the juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6).
- Martins, J. S., Cardoso, J., Melo, E., & Hertz, P. F. (2017). Caracterização e comparação das atividades enzimáticas das peroxidases (POD) de Butia catarinenses e de Butia yatay. In *VII SIEPEX-Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão da UERGS*. Brazil. Retrieved from <http://conferencia.uergs.edu.br/index.php/7/VIISiepex/paper/view/2686>
- Matsui, K. N., Gut, J. A. W., de Oliveira, P. V., & Tadini, C. C. (2008). Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. *Journal of Food Engineering*, 88(2), 169–176.
- Meneses, N., Saldaña, G., Jaeger, H., Raso, J., Álvarez, I., Cebrián, G., & Knorr, D. (2013). Modelling of polyphenoloxidase inactivation by pulsed electric fields considering coupled effects of temperature and electric field. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 126–132.
- Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2012). Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 91–95.
- Mercali, G. D., Schwartz, S., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Sastry, S. (2014). Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. *Journal of Food Engineering*, 123, 1–7.
- Mizobutsi, G. P., Finger, F. L., Ribeiro, R. A., Puschmann, R., Ludmila, ;, De, L., ... Mota, D. (2010). Peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. *Sci. Agric. (Piracicaba)*, 67(2), 213–217.
- Nishad, J., Selvan, C. J., Mir, S. A., & Bosco, S. J. D. (2017). Effect of spray drying on physical properties of sugarcane juice powder (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 54(3), 687–697.

Payet, B., Shum Cheong Sing, A., & Smadja, J. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(19), 7270–7276.

Pereira, R. N., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Exploring the denaturation of whey proteins upon application of moderate electric fields: A kinetic and thermodynamic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(21), 11589–11597.

Qudsieh, H. Y. M., Yusof, S., Osman, A., & Rahman, R. A. (2002). Effect of Maturity on Chlorophyll, Tannin, Color, and Polyphenol Oxidase (PPO) Activity of Sugarcane Juice (*Saccharum officinarum* Var. Yellow Cane). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(6), 1615–1618.

Resnick, D. (1996). Ohmic heating of fluid foods. In: Ohmic heating for thermal processing of foods: government, industry and academic perspectives - overview outstanding symposia in food science & technology. *Food Technology*, *50*(5), 250–251.

Rudra Shalini, G., Shivhare, U. S., & Basu, S. (2008). Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. *Journal of Food Engineering*, *85*(1), 147–153.

Samaranayake, C. P., & Sastry, S. K. (2016). Effects of controlled-frequency moderate electric fields on pectin methylesterase and polygalacturonase activities in tomato homogenate. *Food Chemistry*, *199*, 265–272.

Sastry, S. (2008). Ohmic Heating and Moderate Electric Field Processing. *Food Science and Technology International*, *14*(5), 419–422.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.

Soysal, Ç., & Söylemez, Z. (2005). Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, *68*(3), 349–356.

Swami Hulle, N. R., Chakraborty, S., & Rao, P. S. (2017). Effect of high pressure thermal processing on the quality attributes of Aloe vera-litchi mixed beverage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *40*, 68–77.

UNICAMP. (2011). *TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos*. (NEPA-UNICAMP, Ed.) (4th ed.). Campinas.

Yusof, S., Shian, L. S., & Osman, A. (2000). Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. *Food Chemistry*, *68*(4), 395–401.

5.5 Artigo 4

Nesta seção, apresenta-se o quarto artigo, referente, principalmente, a um estudo realizado para verificação de um possível efeito protetor do açúcar sobre a enzima, diminuindo a sua inativação.

Título: Influence of ohmic heating on commercial peroxidase and sugarcane juice peroxidase inactivation

Abstract

Different fractions of sugarcane juice (liquid, solid and concentrated) were ohmically treated to investigate the effect of different sample compounds on peroxidase inactivation. Moreover, commercial peroxidase solutions with and without the addition of sucrose were evaluated during ohmic and conventional heating. It was observed that samples ohmically treated presented greater enzymatic inactivation (78% in the liquid fraction and 100% in the solid fraction, after 25 min of treatment) than those treated by conventional heating (72% and 95% for liquid and solid fraction, respectively). The solid fraction was the most labile, and the liquid the most resistant fraction during both heating treatments. The concentrated fraction, which contains all isozymes, presented an intermediate inactivation rate. A zymogram showed three POD isozymes in the fresh sugarcane juice, explaining the different stabilities of the assayed fractions. Furthermore, the presence of sugar promoted a protective effect on the enzyme stability, delaying its denaturation.

Keywords: *moderate electric field; sugarcane juice; enzyme inactivation; sugar.*

5.5.1 Introduction

Peroxidase (POD - EC 1.11.1.7) is the most thermostable oxidoreductase enzyme involved in enzymatic browning in food products that catalyzes the oxidation of a wide variety of organic and inorganic substrates using hydrogen peroxide as the electron acceptor (Banci, 1997). In plants, POD plays different roles, including construction, rigidification, and eventual lignification of cell walls. This enzyme is able to cross-link phenolic residues of cell wall polysaccharides and glycoproteins, serving to strengthen the cell wall components (Soung and Dong, 2005; Lee et al., 2007). POD is located partly as soluble form (in the cytoplasm, primarily in mitochondria and other subcellular membranes) and partly as insoluble form (in the cell-wall bound) in a plant cell (Vamos-Vigyázó and Haard, 1981;

Toivonen and Brummell, 2008). In a wide range of woody and nonwoody plant species, POD is located in the cell wall free spaces probably in equilibrium with those bound to the cell walls, where it plays a well-established role in lignin biosynthesis (Bernal *et al.*, 1997). Different POD isoenzymes have been associated with the soluble and bound fractions in the same tissue (McLellan and Robinson, 1987).

The development of alternative food processing technologies that use minimal heat and/or preservatives to inactivate quality-related enzymes in fruit and vegetable products is a topic of interest by both food industry and academia (Terefe, Buckow and Versteeg, 2014). One of the technologies that has been investigated is ohmic heating (OH). This technology can be used to pasteurize, sterilize or blanch food products causing less undesirable changes in sensory and nutritional attributes since it presents higher heating rates when compared to the conventional heating (CH).

Recent studies have demonstrated that non-thermal effects on biological cells and bioactive compounds exist within the range of moderate electric field (MEF) strengths associated with ohmic heating (Makroo *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018; Samaranayake and Sastry, 2016b). As the signal of the OH equipment is an alternating bipolar current, molecules with net charges and dipole moments, such as enzymes, will move in response to the oscillating electric field (Merciali *et al.*, 2014; Samaranayake and Sastry, 2016b). According to Castro *et al.* (2004), the presence of the electric field can influence biochemical reactions by changing molecular spacing and increasing interchain reactions. A previous work (Brochier, Merciali and Marczak, 2016) conducted by our research group evaluated the effect of the electric field on POD inactivation in sugarcane juice. Results showed a distinct behavior depending on the temperature of the thermal treatment. For 60 °C, close to the optimum temperature of the enzyme, the moderate electric field (MEF) increased the POD activity; for 80 °C, MEF increased the inactivation rate. On the other hand, for 70 and 75 °C, non-thermal effects were not observed during heating, indicating that the conformational structure of the enzyme was not altered by the external electric field imposed. As stated by Samaranayake and Sastry (2016), free-floating enzyme molecules may be highly responsive to the electric field, whereas enzyme molecules attached to or trapped in membrane segments (electrical insulator) and other debris (e.g. skin, seeds, and insoluble fibers) may be shielded from the electric field. Moreover, the presence of sugars compounds may play a role on protecting the enzyme structure of the electric field; this is expected to happen, among other factors, because nonionic constituents such as fat, oil and sugar cause a decrease in electrical conductivity (Sastry, 1992).

The objective of the present work was to evaluate if sugar and other soluble solids could influence the POD inactivation kinetics during ohmic heating. To do this, the sugarcane juice was

firstly separated in two distinct fractions (liquid and solid) and then treated by ohmic and conventional heating. Secondly, the juice was concentrated using membranes, which promoted sugar concentration reduction, and then was treated by both technologies. Moreover, a commercial POD enzyme was ohmically treated with and without sugar in the medium to evaluate a possible protective effect of this compound on the inactivation process. These procedures were performed to better understand the influence of the environment conditions on POD inactivation behavior when exposed to an electric field. Studies investigating the non-thermal effects of the ohmic heating technology on enzyme inactivation are barely found in the literature. The present work aims to contribute for the elucidation of these phenomena.

5.5.2 Materials and methods

Samples

The sugarcane juice was donated by a rural property located in Veranópolis (Rio Grande do Sul State/Brazil, 28° 56' 10" S, 51° 32' 58" W). The juice was homogenized and frozen in plastic bags in individual volumes of 100 and 300 mL. Samples were thawed in a water bath immediately prior to use.

The fresh juice was characterized according to its pH (Digimed, MD-22 model), soluble solids (refractometer portable SZJ-A model), electrical conductivity (Digimed, MD-3P model), titratable acidity index (method 016 / IAL, 2008), POD enzymatic activity and total phenolic content. All analyzes were performed in triplicate. Table 1 shows the fresh sugarcane juice characterization. The characterization showed values similar to those found in a previous work (Brochier, Mercali and Marczak, 2018). The sugarcane juice has a high content of soluble solids, due to the amount of sucrose present in the plant. Besides that, the high POD enzyme activity demonstrates that a thermal treatment is necessary to preserve the juice sensorial characteristics and the phenolic composition.

Table 1 – Fresh sugarcane juice characterization.

Parameter	Value
pH	5.43 ± 0.05
Soluble solids (°Brix)	18.0 ± 0.1
Electrical conductivity (mS/cm, 20 °C)	4.4 ± 0.3
POD activity (UEA/min.g)	19393 ± 1326
Total phenolic compounds (mg GAE/L)	389 ± 31

UEA = unit of enzyme activity; GAE = gallic acid equivalent.

Centrifugation of the sugarcane juice

First the cooled juice was centrifuged at 1,000 g (CIEN TEC, CT, model 5000R, Brazil) for 10 min to pellet out nuclei and cell debris. The resultant supernatant was again centrifuged at 20,000 g (Hitachi CR21GIII high speed refrigerated centrifuge) for 20 min to pellet large intact organelles, including mitochondria, peroxisome, lysosome, Golgi and chloroplast (Loewen, 2017). This second supernatant was named liquid fraction and the resultant pellet, solid fraction. Solid fraction was resuspended in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0, 0.8% w/v) and then treated by CH and OH.

Concentration of the sugarcane juice

The sugarcane juice was concentrated aiming to obtain a fraction rich in POD and free of sugar as much as possible. The concentration step was performed using an Amicon Ultra 15 mL centrifugal filter (Merck Millipore Ltd., Ireland) that enables protein concentration by using a membrane of 50 kDa. For this, the juice was thawed (18 °Brix), centrifuged for 10 min at 5,000 g at 3 °C, filtered on qualitative filter paper and then centrifuged in the 50 kDa cartridge for 80 min at 5,000 g in a fixed-angle rotor at 3 °C (Sigma centrifuge, 2-16KL model, Germany). The concentrated juice was diluted (1:1) in a 50 mM phosphate buffer pH 7.0 and was again centrifuged in the cartridge in the same conditions above, but for 60 min. The concentrated sample (9.7 °Brix) was resuspended in the buffer (1:15), and then this extract (1.3 °Brix), named concentrated fraction, was thermally treated by CH and OH.

Commercial horseradish peroxidase

A solution of horseradish peroxidase (HRP) was used to verify the OH effect on the pure enzyme. HRP was purchase from Calbiochem (RZ = 0.79). The HRP solution was prepared by dissolving 12 mg of the powder in 1 L of 50 mM phosphate buffer pH 7.0. To evaluate a possible protective effect of sugar on the enzyme, 12 mg/L HRP solution with sucrose (18 °Brix, same soluble solids content of the sugarcane juice) was also prepared. Both HRP solutions were treated by CH and OH.

Ohmic and conventional heating processes

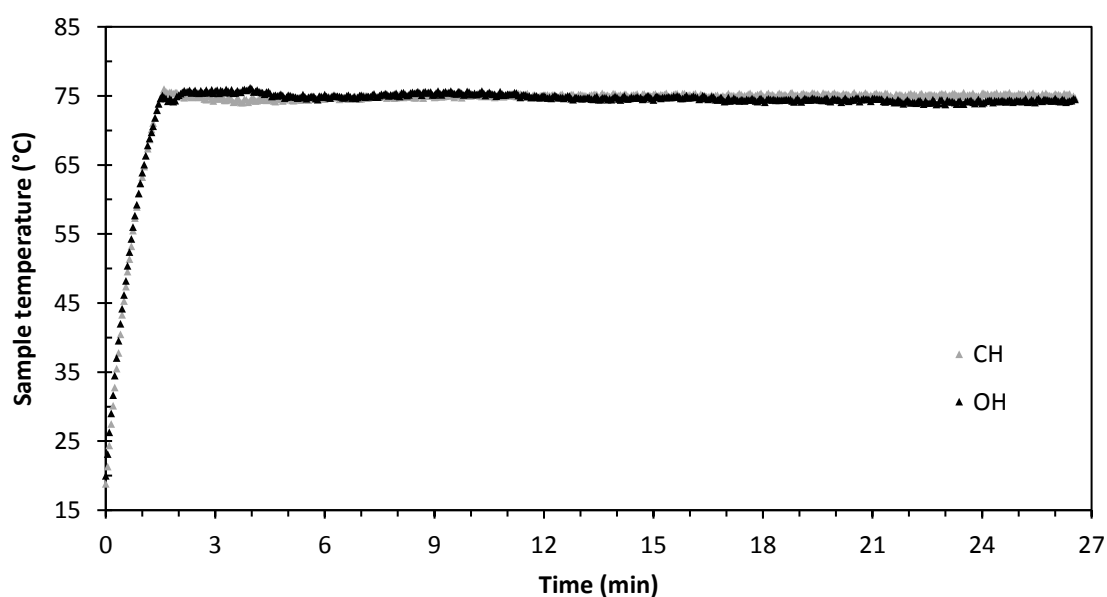
The OH apparatus used to conduct the experiments comprised a power amplifier (Industrial Test Equipment, model 500A, Port Washington, NY, USA), a function generator (Tektronix Inc., model

AFG3251, Richardson, Tex, USA), a data acquisition unit (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA), a computer and an ohmic cell. The ohmic cell consisted of a 250 mL jacketed glass vessel. Titanium electrodes were curved to conform to the reactor dimensions. The electrode height was 3.4 cm and the maximum and minimum inter-electrode gaps were 3.7 and 2.8 cm, respectively.

Kinetic assays were conducted at 75 ± 1 °C using simultaneously 25 V (electric field strength of 7.8 V/cm) applied to the electrodes (frequencies of 60 Hz and sine wave). Two heating baths were used: one for the come-up phase and another for the isothermal phase. This procedure was necessary to decrease the heating rate of the come-up phase and match the temperature profiles of CH and OH, allowing the assessment of the non-thermal effects of electricity during the heat treatment. The electric field was turned on when the sample reached the isothermal phase. For CH, the same procedure was followed without the application of the electric field. Fig. 1 shows temperature profile of the concentrated fraction heated by CH and OH, indicating identical temperatures histories.

The experiments were carried out with 50 mL of sample agitated on a magnetic stirrer device (IKA, model C-MAG HS10, Germany) at the rate of 1250 rpm. Samples were collected in seven heating times (0 – time at which the sample reached the isothermal phase –, 2, 5, 10, 15, 20 and 25 min), immediately placed on an ice bath to stop the effect of heating, and subsequently analyzed for POD enzymatic activity. All experiments were performed in triplicate.

Fig. 1. Temperature profile of concentrated fraction during OH and CH.



Enzyme activity measurement

POD enzyme activity analysis was based on Chisari, Barbagallo and Spagna (2007) protocol, already described in a previous study (Brochier, Mercali and Marczak, 2016). Enzyme activity was determined from a change in absorbance/min ($\Delta\text{abs}/\text{min}$, named *A*) under the assay conditions at 25 °C. The value of *A* was obtained by linear regression, and only the linear part of the absorption curve was taken into account. Residual activities plotted against processing time were fit to Weibull distribution model (STATISTICA version 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK), which was previously found as the best kinetic model to describe enzyme activity of POD in sugarcane juice (Brochier *et al.*, 2016).

Zymogram of the sugarcane juice peroxidase

The 10% resolving and 5% stacking gels were prepared according Green and Sambrook (2012), except by the SDS detergent (sodium dodecyl sulfate) that was not used. The running and sample buffers and the activity of the staining solution were prepared according to Wilkesman *et al.* (2014). The fresh juice, the liquid fraction and the solid fraction (10 μL of sample mixed with 5 μL of sample buffer) were loaded, and the run at 200 V (200 mA for 2 mini-gels) occurred until the blue front reached the bottom of the gel.

Statistical data analysis

Comparison between experiments was carried out using Student's t-test, ANOVA and Tukey's test with a confidence level of 95% (Statistica, version 12.0, StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

5.5.3 Results and discussion

Zymogram

The presence of more than one peroxidase enzyme is common in plants. The aggregation or the glycosylation of peroxidase with phenolic compounds might cause different electrophoretic mobility in crude extract of plant tissues, which can be seen as isozyme bands on a zymogram (Tang *et al.*, 2013).

Fig 2 shows the zymogram obtained from the fresh sugarcane juice, where three bands with enzymatic activity can be seen, indicating that at least three isozymes were presented in the juice. Other authors found more than one isozyme in food products. Wilkesman *et al.* (2014) described the presence of two active POD isozymes in radish homogenate; and Tang *et al.* (2013) reported four

isoforms of POD in both young and mature kale leaves, and two additional isozymes with lower molecular weights emerged in mature leaves.

Fig. 2. Zymogram of the POD sugarcane juice



For the liquid and solid fractions, (data not shown) the same bands were identified; however, comparing with the fresh juice, the former showed more intense bands while the later presented less intense bands. This indicates that no sub-unit separation occurred with the centrifugation, but a higher amount of the enzyme remained in the liquid fraction.

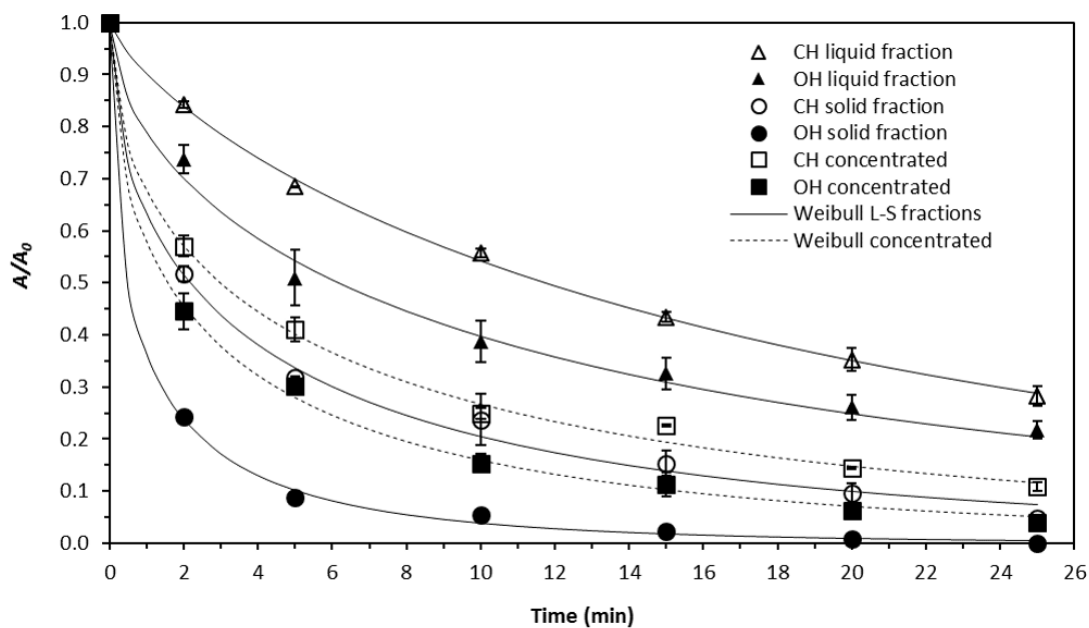
Although POD plays an important role in plant defense mechanisms, the precise function of all POD isozymes is still unknown. Moreover, plant PODs are tissue specific and developmentally regulated in the absence of stress stimuli, thus, its study is more complex (Banci, 1997; Scialabba, Bellani and Dell'Aquila, 2002; Veitch, 2004). However, it is proposed that there is always a basal level of peroxidase activity in plants, probably to perform "housekeeping" functions (Passardi *et al.*, 2005). In the case of sugarcane, these three isozymes might play such kind of roles, being the third band (the one that presents smaller size) the major one.

Peroxidase residual activity in liquid, solid and concentrated fractions

Fig. 3 shows experimental and predicted POD residual activities for the liquid, solid and concentrated fractions during CH and OH treatments; in this figure, A_0 is the enzyme activity at time zero (19393 ± 1326 UEA/min g). As can be seen, the POD activity decreased over time for all treatments, with inactivation varying from 72 to 78% for the liquid fraction, from 95 to 100% for the solid fraction and from 89 to 96 for the concentrated fraction after 25 min of CH and OH, respectively. It is important to point out that a partial enzyme inactivation (approximately 16%)

during the come-up period was observed in the liquid fraction; this partial inactivation was low and represents the most thermolabile fraction of the enzyme. For the solid fraction, the inactivation during the come-up period was higher (47% on average); this may be due to centrifugation step, which removed protective components of POD found within the cytoplasmic cells (such as mitochondria, peroxisomes, chloroplasts and Golgi apparatus), leaving the enzyme more exposed to the effects of heat.

Fig. 3. Experimental and predicted POD residual activity for the liquid, solid and concentrated fractions during OH and CH.



As can be seen in Fig. 3, the liquid and solid fractions showed distinct inactivation rates, being the latter most thermolabile. The solid fraction reached total inactivation when OH was applied. This behavior may be explained by the presence of soluble sugars and proteins in the liquid fraction that can cause a protective effect on free-floating enzyme. These molecules can protect the enzyme from biochemical modifications during heating. This is in agreement with Neves and Lourenço (1998), who reported that the presence of different types of sugars increased the thermal stability of the POD activity from peach fruit, in the following order: sucrose > lactose > glucose > fructose. In their study, sucrose showed a stabilizing effect on enzyme activity at various temperature/concentration ratios (10-40%, w/w).

In a previous work performed by our research group (Brochier *et al.* 2016), there were no differences between CH and OH of sugarcane juice at 75 °C, in contrary of what was found in the

present study. This difference may be associated with the reduction of soluble solids achieved with the concentration and centrifugation steps, letting the enzyme more susceptible to the action of the electric field. Aiming to clarify this possible protective effect of sugar on the enzyme structure, experiments with HRP solution were conducted; the next section approaches this assessment.

Another hypothesis for the differences between liquid and solid fraction inactivation rates is the presence of distinct concentrations of the three isozymes in each fraction; this was confirmed by a zymogram of liquid and solid fractions (data not shown), where distinct intensities of bands were observed for each isozyme. These isozymes have distinct thermoresistance, impacting the inactivation rates of the liquid and solid fractions. The concentrated fraction, which contains all isozymes, showed an intermediate stability, corroborating this hypothesis. Therefore, the solid fraction may have a higher concentration of the most thermosensitive isozyme, while the liquid fraction remained with a higher concentration of the most thermostable isozyme.

In Fig. 3 it is also possible to verify that all fractions (solid, liquid and concentrated) showed a higher inactivation rate when OH was applied. For a better comparison between heating technologies, results of inactivation were fitted to the Weibull distribution model. This model was chosen to represent enzyme inactivation since it showed the best fit to experimental data in a previous study (Brochier *et al.*, 2016). Table 2 presents the kinetic and the model adjustment parameters. As can be seen, the Weibull model was suitable to predict POD inactivation with coefficients of determination (r^2) higher than 0.976, chi-square (χ^2) lower than 0.00099 and root mean square error (RMSE) lower than 0.011. The values of b ranged from 0.10 to 4.23, and the parameter n was between 0.37 and 1.14. Values of n lower than 1 are an indication of the presence of extremely heat resistant enzyme fraction (Peleg, 2003).

Table 2 – Coefficients of the Weibull distribution model.

Sample*	Treatment	b	n	R^2	χ^2	RMSE
Liquid fraction	CH	0.10 ± 0.01^b	0.77 ± 0.03^a	0.998	0.00008	0.003
	OH	0.24 ± 0.04^a	0.59 ± 0.03^b	0.993	0.00052	0.008
Solid fraction	CH	0.45 ± 0.03^B	0.54 ± 0.06^A	0.994	0.00039	0.007
	OH	1.01 ± 0.03^A	0.51 ± 0.03^A	0.999	0.00008	0.003
Concentrated sample	CH	0.39 ± 0.03^B	$0.53 \pm 0.03^\alpha$	0.997	0.00025	0.006
	OH	$0.54 \pm 0.05^\alpha$	$0.53 \pm 0.01^\alpha$	0.998	0.00016	0.005

*Fraction samples were individually compared by Student's t-test to evaluate the effect of the heating technology. Means in the same column with the same lowercase, uppercase or Greek letters are not significantly different ($p > 0.05$).

Regarding the heating treatment, OH showed higher inactivation rates than CH for solid, liquid and concentrated fractions, meaning that MEF has influenced the biochemical reactions that occurred during POD inactivation. The presence of a moderate electric field may influence the interactions between protein chains via electrostatic forces, hydrogen bonding and hydrophobic interactions. These interactions are responsible for protein conformational structure, and the breakage of one to three hydrogen bonds or a few hydrophobic interactions can easily cause a conformational change in proteins, leading to its unfolding. In addition, higher inactivation rates with MEF application agrees with the calculations of Brownian and electrophoretic motions performed by Samaranyake and Sastry (2016a): in the presence of an electric field the enzyme molecules behave as if they were at a higher temperature than the bulk temperature. It was not found in the literature studies using the same approach for comparison, but some studies with juices corroborate the better performance of the OH technology. Saxena, Makroo and Srivastava (2016) studied polyphenol oxidase (PPO) inactivation in sugarcane juice (24 – 48 V/cm at $80 \pm 2^\circ\text{C}$) and found that the OH treatment inhibited PPO enzyme activity in a shorter processing time than CH, while maintaining the potential quality attributes of the juice. This behavior was also observed by Jakó**́**b *et al.* (2010) during OH of vegetable juices (58 – 78 °C): a significant destabilization of the POD labile isozyme occurred under the effect of OH.

From Figure 3 it is also possible to observe that the non-thermal effects of the electricity are more intense in the beginning of the isothermal phase. This effect became less intense over time. As time passes, it is more difficult to observe the non-thermal effects because temperature promotes the greater effect on the inactivation process, masking the non-thermal effects.

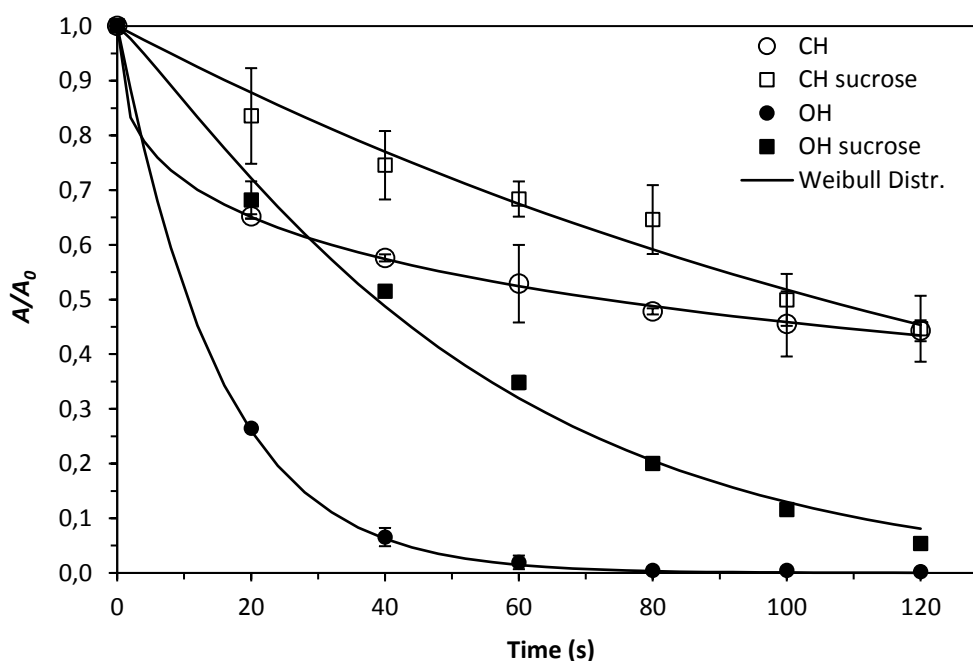
Another important factor that needs to be considered is that the presence of the electric field may affect how the prosthetic groups are binding to enzymes. Castro *et al.* (2004) reported that lipoxygenase and polyphenol oxidase kinetics in buffer solutions were significantly affected by the electric field, reducing the time needed for inactivation, while alkaline phosphatase, pectinase, and β -galactosidase inactivation were not affected by the electric field. Similarly to POD, lipoxygenase and polyphenol oxidase have a metal in their prosthetic center. These results and the results of the present study evidence that metal-containing enzymes may suffer influence of the alternating electric field imposed by the OH technology. Castro *et al.* (2004) also evaluated lipoxygenase by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) before and after the thermal treatments (CH or OH) and verified that the enzyme had the same molecular weight and no sub-unit separation occurred.

Ohmic and conventional heating of commercial horseradish peroxidase solutions

Fig. 4 shows experimental and predicted POD residual activities of the HRP solution with and without sucrose during CH and OH treatments. Table 3 describes the kinetics parameters of the Weibull distribution model. First, it is possible to observe that samples treated by OH were inactivated faster than those treated by CH. This behavior was observed in both HRP solutions (with and without sugar). This result is in accordance with those found for the liquid, solid and concentrated fractions. OH technology is impacting the denaturation process, increasing the inactivation rate. The native structure of POD is the product of the protein's environment. POD is an enzyme with net charges and has a metal in its prosthetic center and, as a consequence, it may suffer the influence of the exposed electric field applied during the OH treatment.

Evaluating the effect of sugar in the environment, it is possible to observe that HRP solution with sucrose showed higher stability. When OH was applied to the solution without the addition of sugar, the POD activity drastically decreased. The effect of sugar was also observed for the conventional heating but with less intensity. Additives such as salts and sugars affect the thermostability of proteins in aqueous solutions. Sugars like sucrose, lactose, glucose and glycerol stabilize proteins against thermal denaturation (Kulmyrzaev, Bryant and McClements, 2000; Damodaran, Parkin and Fennema, 1996).

Fig. 4. Experimental and predicted POD residual activity values for the HRP solution with and without sucrose during conventional and ohmic heating



Kulmyrzaev, Bryant and McClements (2000) studied the influence of sucrose (0-40 wt %) on thermal denaturation and functionality of whey protein isolate solutions and observed that sucrose increased the temperature in which protein denaturation occurred (by 6-8 °C for 40% sucrose). The increase of the thermal stability with the increase of the sucrose concentration can be attributed to the decrease in thermodynamic affinity of the protein's surface with the solvent in the presence of sugar (Timasheff and Arakawa, 1989; Timasheff, 1993; Parsegian, Rand and Rau, 1995). The thermal denaturation of a globular protein causes an increase of the surface area exposed to the solvent, as well as an increase of the surface hydrophobicity (Damodaran, Parkin and Fennema, 1996); both factors favor protein unfolding. The increase of the surface free energy caused by sucrose, therefore, tends to oppose protein unfolding, which accounts for its ability to enhance the thermal stability of globular proteins (Kulmyrzaev *et al.*, 2000, Timasheff, 1993).

Table 3 – Coefficients of the Weibull distribution model for experiments conducted with commercial peroxidase solutions.

Sample	Treatment*	<i>b</i>	<i>n</i>	<i>R</i> ²	χ^2	RMSE
Pure HRP solution	CH	0.65 ± 0.04 ^c	0.37 ± 0.06 ^c	0.980	0.00003	0.002
	OH	4.23 ± 0.70 ^a	1.04 ± 0.17 ^{ab}	0.999	0.00001	0.001
HRP + sucrose solution	CH	0.39 ± 0.07 ^d	0.70 ± 0.21 ^{bc}	0.976	0.00099	0.011
	OH	1.14 ± 0.03 ^b	1.14 ± 0.08 ^a	0.994	0.00069	0.009

*Means in the same column with the same lowercase are not significantly different ($p > 0.05$).

According to Bromberg, Marx and Frishman (2008), the preferential exclusion model explains the stabilizing effect of osmolytes like sugars, amino acids, among others. The osmolytes are rejected from the protein surface, resulting in lower concentrations of these additives in the vicinity of the protein compared to the concentration of the bulk solution, a state that is thermodynamically unfavorable. However, osmolytes like sugars are more excluded from the backbone of the unfolded protein than from the backbone of the native structure. Hence, the native structure is less destabilized than the unfolded one and, therefore, is more preserved in the presence of sugars and other osmolytes. This preferential exclusion model can be applied to explain the stabilizing effect of sugar on POD of sugarcane juice.

The same effect was observed by Klein *et al.* (2013), in an effort to accurately investigate the effect of substrate and products (D-glucose and D-galactose) on the chitosan-immobilized β -D-galactosidase thermal stability. When inactivation was carried out in the presence of D-glucose and

D-galactose, the enzyme stability increased (47% of activity still remained after 180 min of incubation at 55 °C), suggesting a stabilizing effect by these osmolytes. This result is explained by an increase of the surface tension of the solution, causing the exclusion of the saccharides from the protein domain and reducing backbone movements of the fully folded protein form (Bromberg *et al.*, 2008; Butler and Falke, 1996; Lin and Timasheff, 1996; Sampedro *et al.*, 2001).

5.5.4 Conclusion

This study investigated the MEF effects on peroxidase inactivation presented in different fractions of sugarcane juice. Ohmic heating promoted higher enzymatic inactivation than conventional heating in the solid, liquid and concentrated sugarcane juice fractions, indicating that the non-thermal effects may influence the conformational structure of the enzyme, mainly in the absence of sugar. The mechanism behind this behavior was not completely elucidated, being necessary more studies in the area. A possible explanation is an effect on the prosthetic center of the enzyme, that contains a metal in its structure. The metal has the capacity of exist in more than one oxidation state and is highly reactive.

Concerning the experiments with the commercial POD solutions, OH again proved to be a more efficient technology for enzyme inactivation. The addition of sucrose contributed to a protective effect on the enzyme stability, delaying its denaturation. This effect was also observed in the liquid fraction of the sugarcane juice, since it showed lower inactivation rates than the concentrated and solid fractions. The presence of soluble sugars in the liquid fraction causes a protecting effect on free-floating enzyme.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

References

- BANCI, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2–3, p. 253–263, 1997.
- BERNAL, M. A. et al. Peroxidase isoenzymes in normal and habituated calli of sugar beet during

transfer from light to darkness. **Biologia Plantarum**, v. 39, n. 2, p. 161–168, 1997.

BROCHIER, B.; MERCALI, G. D.; MARCZAK, L. D. F. Effect of ohmic heating parameters on peroxidase inactivation, phenolic compounds degradation and color changes of sugarcane juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 62–71, 2018.

BROCHIER, Bethania; MERCALI, Giovana Domeneghini; MARCZAK, Ligia Damasceno Ferreira. Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 396–403, 2016.

BROMBERG, Avraham; MARX, Sharon; FRISHMAN, Gad. Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 6, p. 961–966, 2008.

BUTLER, S. L.; FALKE, J. J. Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: A disulfide trapping study. **Biochemistry**, v. 35, n. 33, p. 10595–10600, 1996.

CASTRO, I. et al. The effect of electric field on important food-processing enzymes: Comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 9, p. 696–701, 2004.

CHISARI, Marco; BARBAGALLO, Riccardo N.; SPAGNA, Giovanni. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3469–76, 2007.

DAMODARAN, S.; PARKIN; FENNEMA, D. R. Amino acids, peptides and proteins. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. 3rd. ed. New York - USA: Dekker, 1996. p. 321.

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo.

JAKÓB, Alina et al. Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 369–376, 2010.

KLEIN, Manuela P. et al. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 465–470, 2013.

KULMYRZAEV, A.; BRYANT, C.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1593–1597, 2000.

LEE, B. R. et al. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 6, p. 1271–1279, 2007.

LIN, T. Y.; TIMASHEFF, S. N. On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. **Protein Science**, v. 5, n. 2, p. 372–381, 1996.

LOEWEN, M. **Subcellular Fractionation: Ultracentrifugation. 310.3 - Proteins and Enzymes**. Canada Plant Biotechnology Institute, National Research Council of Canada, 2017. Disponível em: <<http://www.ehu.es/biofisica/pdf/ultracentrifugation.pdf>>

MAKROO, H. A. et al. Ohmic heating assisted polyphenol oxidase inactivation of watermelon juice: Effects of the treatment on pH, lycopene, total phenolic content, and color of the juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 6, 2017.

MCLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. The heat stability of purified spring cabbage peroxidase

isoenzymes. **Food Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 97–107, 1987.

MERCALI, Giovana Domeneghini et al. Effect of the electric field frequency on ascorbic acid degradation during thermal treatment by ohmic heating. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 25, p. 5865–70, 2014.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Peroxidase from peach fruit: Thermal stability. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 41, n. 2, p. 179–186, 1998.

PARSESIAN, V. A.; RAND, R. P.; RAU, D. C. Macromolecules and water: Probing with osmotic stress. **Methods in Enzymology**, v. 259, p. 43-94, 1995.

PASSARDI, F. et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 5, p. 255–265, 2005.

PELEG, Micha. Calculation of the Non-Isothermal Inactivation Patterns of Microbes Having Sigmoidal Isothermal Semi-Logarithmic Survival Curves. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 645–658, 2003.

RODRIGUES, R. Q. et al. Evaluation of nonthermal effects of electricity on inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* during ohmic heating of infant formula. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 1, p. e12372, 2018.

SAMARANAYAKE, Chaminda P.; SASTRY, Sudhir K. Effect of moderate electric fields on inactivation kinetics of pectin methylesterase in tomatoes: The roles of electric field strength and temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 186, p. 17–26, 2016. a.

SAMARANAYAKE, Chaminda P.; SASTRY, Sudhir K. Effects of controlled-frequency moderate electric fields on pectin methylesterase and polygalacturonase activities in tomato homogenate. **Food chemistry**, v. 199, p. 265–72, 2016. b.

SAMPEDRO, J. G. et al. Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1544, n. 1–2, p. 64–73, 2001.

SASTRY, S. K. A model for heating of liquid-particle mixtures in a continuous flow ohmic heater. **Journal of Food Process Engineering**, v. 15, n. 4, p. 263–278, 1992.

SAXENA, Juhi; MAKROO, Hilal Ahmad; SRIVASTAVA, Brijesh. Optimization of time-electric field combination for PPO inactivation in sugarcane juice by ohmic heating and its shelf life assessment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 329–338, 2016.

SCIALABBA, A.; BELLANI, L. M.; DELL'AQUILA, A. Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **European Journal of Histochemistry**, v. 46, n. 4, p. 351–358, 2002.

SOUNG, S. K.; DONG, J. L. Purification and characterization of a cationic peroxidase Cs; in *Raphanus sativus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 6, p. 609–617, 2005.

TANG, L. et al. Comparative analysis of peroxidase profiles in Chinese kale (*Brassica alboglabra* L.): Evaluation of leaf growth related isozymes. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 632–635, 2013.

TEREFE, N. S.; BUCKOW, R.; VERSTEEG, C. Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, part 1: high-pressure processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 24–63, 2014.

TIMASHEFF, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 22, p. 67-97, 1993.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stability of Protein Structure by Solvents. In: CREIGHTON, T. E. (Ed.). **Protein Structure: A Practical Approach**. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 1989.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2008.

VAMOS-VIGYÁZÓ, L.; HAARD, N. F. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 49–127, 1981.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249–259, 2004.

WILKESMAN, J. et al. Guaiacol peroxidase zymography for the undergraduate laboratory. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 42, n. 5, p. 420–426, 2014.

Capítulo 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DESTE TRABALHO

Foram avaliadas diferentes temperaturas de pasteurização do caldo de cana, além de diferentes frequências, formas de onda e gradientes de tensão do campo elétrico aplicado durante o aquecimento ôhmico.

O objetivo inicial de monitorar a inativação enzimática da PPO não pôde ser realizado uma vez que, devido à sua termossensibilidade, a PPO teve perda de cerca de 90% de sua atividade enzimática durante a rampa de aquecimento (fase não isotérmica). Assim, como somente uma pequena fração mais termorresistente da enzima permaneceu na fase isotérmica, o modelamento cinético da mesma não pôde ser realizado e, por isso, não foi apresentado no presente trabalho. Por outro lado, os experimentos realizados mostraram bons resultados para a enzima POD, que teve cinética de inativação modelada por diversas funções, sendo o modelo de distribuição de Weibull o que melhor descreveu o comportamento de inativação da enzima.

O uso de campo elétrico de baixa intensidade (inferior a 4,5 V/cm) influenciou reações bioquímicas de ativação e inativação da POD em temperaturas específicas; foi possível verificar um efeito de ativação da enzima na temperatura de 60 °C quando o MEF foi aplicado. Sugere-se que, com o uso do campo elétrico a 60 °C, devido a uma mudança de localização do sítio ativo para regiões menos polares, o sítio é protegido, provocando uma maior atividade enzimática. Nas temperaturas de 70 a 80 °C houve inativação da POD, que aumentou com o aumento da temperatura e do tempo de tratamento. Somente na temperatura de 80 °C foi verificada diferença entre os tratamentos convencional e o ôhmico, possivelmente devido à remoção de grupos prostéticos ou a mudanças na conformação da enzima provocadas pelo uso de campo elétrico. A fim de investigar de forma mais profunda a possibilidade de efeitos não térmicos, a temperatura de 75 °C foi escolhida para a realização dos experimentos com variação de frequência, forma de onda e gradiente de tensão (artigo 2). De maneira geral, os resultados indicaram que os efeitos não térmicos do aquecimento ôhmico (gradiente de tensão de até 20,5 V/cm, com diferentes frequências e formas de

onda) não influenciaram as reações bioquímicas que ocorrem durante a inativação da POD no caldo de cana. Na sequência, realizou-se um estudo mais aprofundado (diferentes frequências, formas de onda e gradiente de tensão) nas temperaturas-chave de 60 e 80 °C (artigo 3). Nesta etapa do trabalho, verificou-se a ativação a 60 °C (principalmente na frequência de 10 Hz) e a inativação a 80 °C que foi pronunciada com o uso de altas frequências (100 kHz), confirmando, com este último dado, que as moléculas da enzima se comportam como se estivessem acima da temperatura da amostra quando é aplicado o campo elétrico.

No que tange aos compostos fenólicos, dentre todos os ensaios realizados, apenas foi verificada maior degradação destes compostos com o uso das ondas quadrada e pulsada. Possíveis explicações são que, como as ondas quadradas podem ser decompostas em funções senoidais através das séries de Fourier, elas acabam apresentando diversas ondas senoidais, ou seja, a soma de suas frequências pode ter afetado a estabilidade dos compostos fenólicos. A maior degradação de compostos fenólicos com a onda quadrada também pode estar relacionada à alta velocidade de troca de tensão de pico e à sua maior potência. Embora essas hipóteses tenham sido levantadas, explicações para estes fenômenos ainda são inconclusivas e, também, carecem de literatura.

Nas condições trabalhadas, verificou-se diferença visual na cor do caldo de cana. De maneira geral, para todos os tratamentos, os valores de L^* e b^* aumentaram, enquanto a^* diminuiu quando a amostra fresca foi aquecida, indicando uma coloração mais amarelada e mais clara do que a amostra fresca. Em relação ao tratamento ôhmico, a cor do caldo foi modificada usando baixa frequência (possivelmente devido a reações eletroquímicas) e diferentes formas de onda (as amostras ficaram mais amareladas com ondas quadrada e triangular). Em geral, verificou-se que o efeito da temperatura nas respostas da atividade enzimática da POD e da cor foi maior do que o efeito elétrico (o que era esperado), principalmente a 80 °C.

Em relação aos testes realizados com a POD comercial, confirmou-se que a sacarose contribui para a estabilidade da enzima, retardando sua desnaturação. Tal fato ainda foi verificado nas frações sólida e líquida do caldo, onde se observou que a presença de açúcares e proteínas solúveis na fração líquida causou um efeito protetor na enzima. Já na fração sólida, com pequena quantidade de sacarose, o aquecimento ôhmico promoveu maior inativação enzimática do que o aquecimento convencional, corroborando que esses efeitos elétricos podem influenciar a estrutura conformacional da enzima.

Logo, foi possível observar a presença de efeitos não-térmicos, conforme almejado no início deste trabalho, confirmando a vantagem da tecnologia de aquecimento ôhmico sobre o aquecimento convencional em sistemas que respondem ao campo elétrico.

Com base em todos os resultados obtidos, é possível concluir que a tecnologia de aquecimento ôhmico pode ser aplicada como alternativa para pasteurização do caldo de cana nas condições estudadas (evitando o uso de baixas frequências e ondas quadradas) sem comprometer a composição fenólica nem o aspecto visual (cor) da bebida.

Para a continuidade desse trabalho, sugere-se a análise das estruturas secundária e terciária da POD a fim de aprofundar esse estudo e corroborar os resultados obtidos até o momento. Adicionalmente, sugere-se o estudo do efeito de outras tecnologias emergentes, como o ultrassom e a alta pressão hidrostática, sobre a inativação enzimática e sobre a estabilidade de compostos fenólicos do caldo de cana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Syed Rizwan *et al.* Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Food Chemistry**, v. 147, p. 10–16, 2014.

ABHILASHA, P.; PAL, U. S. Effect of Ohmic Heating on Quality and Storability of Sugarcane Juice. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 2856–2868, 2018.

ABU BAKAR, Mohd Fadzelly *et al.* Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 479–483, 2009.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Washington, DC.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods os Analysis**. Washington, DC.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos, Teoria e Prática**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004.

AUGUSTO, Pedro E. D. *et al.* Peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) photo-inactivation in a coconut water model solution using ultraviolet (UV). **Food Research International**, v. 74, p. 151–159, 2015.

BAG, G. C.; DEVI, P. Grihanjali. Research Article Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley 1. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 30, n. 28, p. 154–159, 2015.

BAGATINI, E. **Avaliação da aplicação de aquecimento ôhmico na inativação enzimática e seu efeito no armazenamento de caldo de cana**. Trabalho de Conclusão de Curso. Porto Alegre, RS. Departamento de Engenharia Química, UFRGS, 2017.

BAGATINI, E.; BROCHIER, B., MERCALI, G. D.; MARCZAK, L. D. F. Avaliação da aplicação de aquecimento ôhmico na inativação enzimática de peroxidase de caldo de cana e seu efeito na regeneração da enzima durante o armazenamento. In: (F. C. Olivera, R. Thys, Nitzke. J. A., Eds.) 6º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR 2018, Gramado, RS. **Anais...** Gramado, RS: SBCTA Regional, RS, 2018. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/ssa6/anais/trabalhos.php>>

BANCI, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2–3, p. 253–263, 1997.

BARKER, P. E.; AJONGWEN, N. J. The production of the enzyme dextransucrase using nonaerated fermentation techniques. **Biotechnology and Bioengineering**, . 37, n. 8, p. 703–707, 1991.

BARNES, Jeremy S.; FOSS, Frank W.; SCHUG, Kevin A. Thermally accelerated oxidative degradation of quercetin using continuous flow kinetic electrospray-ion trap-time of flight mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, n. 10, p. 1513–1522, 2013.

BELINATI, K. D. **Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos: estudos in vitro**. 2010. USP - São Paulo, 2010.

BERNAL, M. A. *et al.* Peroxidase isoenzymes in normal and habituated calli of sugar beet during transfer from light to darkness. **Biologia Plantarum**, v. 39, n. 2, p. 161–168, 1997.

BHUPINDER, K.; SHARMA, K. P.; HARINDER, K. Studies on the development and storage stability of ready to serve bottled sugarcane juice. **International Journal of Tropical Agriculture**, v. 9, n. 2, p. 128–134, 1991.

BRAGA, Leandro Ribeiro *et al.* Total phenolics , flavonoids , tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian Genebank. **Food Technology**, v. 45, n. 2, p. 335–341, 2015.

BRAZ, H. Garapa boa deve vir de cana apropriada. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, p. 1–3, 2003.

BROCHIER, B.; MERCALI, G. D.; MARCZAK, L. D. F. Effect of ohmic heating parameters on peroxidase inactivation, phenolic compounds degradation and color changes of sugarcane juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 62–71, 2018.

BROCHIER, Bethania; MERCALI, Giovana Domeneghini; MARCZAK, Ligia Damasceno Ferreira. Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 396–403, 2016.

BROMBERG, Avraham; MARX, Sharon; FRISHMAN, Gad. Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 6, p. 961–966, 2008.

BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2, 1994.

BUTLER, S. L.; FALKE, J. J. Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: A disulfide trapping study. **Biochemistry**, v. 35, n. 33, p. 10595–10600, 1996.

CADENAS, Enrique. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 127–140, 1995.

CAMPOS, A. D. *et al.* Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637–643, 2004.

CANADA, A. T. *et al.* The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. **Free radical biology & medicine**, v. 9, n. 5, p. 441–9, 1990.

CARVALHO, L. C. *et al.* Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 530–542, 2013.

CASTRO, I. *et al.* The effect of electric field on important food-processing enzymes: Comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 69, n. 9, p. 696–701, 2004.

CHAKRABORTY, Snehasis; RAO, Pavuluri Srinivasa; MISHRA, Hari Niwas. Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 57–68, 2015.

CHAUHAN, Dheer Singh; TYAGI, S. M.; BALYAN, D. K. Studies on Preservation of Sugarcane Juice.

International Journal of Food Properties, v. 5, n. 1, p. 217–229, 2002.

CHEN, Cs; WU, Mc. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. **Journal of food science**, v. 63, n. 5, p. 1–4, 1998.

CHEN, J. C. P.; CHOU, C. **Cane Sugar Handbook. A manual for cane sugar manufacturers and their chemists**. 12. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993.

CHISARI, Marco; BARBAGALLO, Riccardo N.; SPAGNA, Giovanni. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3469–76, 2007.

CHO, Won Il; YI, Ji Yoon; CHUNG, Myong Soo. Pasteurization of fermented red pepper paste by ohmic heating. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 180–186, 2016.

CLARKE, M. A.; BLANCO, R. S.; GODSHALL, M. A. Color tests and other indicators of raw sugar refining characteristics. In: PROCEEDINGS OF THE SUGAR PROCESSING RESEARCH CONFERENCE 1984, New Orleans. **Anais...** New Orleans

CLERICI, M. T. P. S. *et al.* Escurecimento enzimático: uma aula prática. **Revista de Ensino de Bioquímica**, v. 12, n. 2, p. 71–90, 2014.

CLIFFORD, M. N. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1063–1072, 2000.

COLOMBO, Renata; LANÇAS, Fernando M.; YARIWAKE, Janete H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 118–124, 2006.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. v. 3 – Safra 2016/17, n. 2 - Segundo Levantamento**. Brasília. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_08_18_12_03_30_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_16-17.pdf>.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. v. 5 - Safra 2018/19, n. 1 - Primeiro Levantamento**. Brasília.

CORRADINI, Maria G.; PELEG, Micha. A model of non-isothermal degradation of nutrients, pigments and enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 3, p. 217–226, 2004.

DALL'ACQUA, Stefano *et al.* The photodegradation of quercetin: Relation to oxidation. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 8898–8907, 2012.

DAMODARAN, S.; PARKIN; FENNEMA, D. R. Amino acids, peptides and proteins. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. 3rd. ed. New York - USA: Dekker, 1996. p. 321.

DELGADO-ANDRADE, Cristina *et al.* Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 145–153, 2010.

DEY, Tapati Bhanja *et al.* Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 60–74, 2016.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício *et al.* Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 660–664, 2011.

DUARTE SILVA, I. *et al.* Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 124, n. 1, p. 29–51, 2000.

EISELE, T. *et al.* Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

FAGUNDES, A. D. E. R. **Características nutricionais com ênfase no ferro e capacidade antioxidante de melados produzidos em Santa Catarina**. 2010. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

FAO. **FAO Water - Land and Water Division. Crop Water Information: Sugarcane**. Disponível em: <http://www.fao.org/nr/water/crop_info_sugarcane.html>.

FAO. **FAOSTAT - Statistics Division. Sugar cane production in 2016**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>.

FELLOWS, P. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2006.

FENG, Simin *et al.* Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 970–976, 2015.

FENNEMA, D. R. Food chemistry. In: DEKKER, Marcel (Ed.). **Principles of food science**. p. 285–345, 2010.

FERREIRA, J. E. M. **Estabilidade de carotenóides, flavonóides e vitamina C em alimentos submetidos às tecnologias emergentes de processamento**. 2011. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, 2011.

FONTE, N. N. **Aula 10: Flavonoides. Disciplina de Farmacognosia I**. Universidade Federal do Paraná, UFPR, 2005.

FUJIKAWA, Hiroshi; ITOH, Takeshi. 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.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – Revisão. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 4/5, p. 35–40, 1991.

GARDOSSI, Lucia *et al.* Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 171–80, 2010.

GOMES, C. F.; SARKIS, J. R.; MARCZAK, L. D. F. Ohmic blanching of Tetsukabuto pumpkin: Effects on peroxidase inactivation kinetics and color changes. **Journal of Food Engineering**, v. 233, p. 74–80, 2018.

GOODACRE, B. C.; COOMBS, J. Formation of colour in cane juice by enzyme-catalysed reactions - 2. Distribution of enzyme and colour precursors. **International Sugar Journal**, v. 80, n. 959, 1978.

GUIDA, V. *et al.* The effects of ohmic and conventional blanching on the nutritional, bioactive compounds and quality parameters of artichoke heads. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 569–579, 2013.

HÄSSIG, A *et al.* Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. **Medical hypotheses**, v. 52, n. 5, p. 479–481, 1999.

HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, 2002.

HENG, Paul W. S. *et al.* Dielectric properties of pharmaceutical materials relevant to microwave processing: Effects of field frequency, material density, and moisture content. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 941–957, 2010.

HENLEY, James P.; SADANA, Ajit. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 2, p. 50–60, 1985.

HODNICK, William F. *et al.* Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2607–2611, 1988.

HONIG, P. **Princípios de Tecnologia Azucareira**. V. 1 ed. [s.l.: s.n.].

HUNTER, R. S. Measurement of Appearance. In: WILEY-INTERSCIENCE (Ed.). **Scales for measurements of color differences**. NY. p. 133, 1975.

HUTCHINSON, T. P. Graphing the death of *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1–2, p. 77–81, 2000.

IADEROZA, M.; DRAETTA, I. S. Enzimas e Pigmentos – influências e alterações durante o processamento. In: SOLER, M. P. *et al.* (Ed.). **Industrialização de frutas**. 2. ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1991. p. 17–31.

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo.

IÇIER, Filiz; YILDIZ, Hasan; BAYSAL, Taner. Peroxidase inactivation and colour changes during ohmic blanching of pea puree. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 3, p. 424–429, 2006.

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

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. (Eds.). **Natural food colorants**. New York - USA: AVI, 1992.

JAKÓB, Alina *et al.* Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 369–376, 2010.

JEMAI, A. B.; VOROBIEV, E. Effect of moderate electric field pulses on the diffusion coefficient of soluble substances from apple slices. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 73–86, 2002.

JOURNAL, Tiie; BIOLOGICAL, O. F. Bonds Studies on the and Modification Chymotrypsinogen of Specific Disulfide of Trypsinogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 16, p. 1630–1637, 1971.

- JOVANOVIC, Slobodan V. *et al.* Flavonoids as antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 11, p. 4846–4851, 1994.
- KAAYYA, R. *et al.* Sugarcane Juice Preservation: A Critical Review of the State of the Art and Way Forward. **Sugar Tech**, p. 1–11, 2018.
- KAMMERER, Dietmar R. *et al.* Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. **Food Research International**, v. 65, n. PA, p. 2–12, 2014.
- KAYALVIZHI, V. *et al.* Effect of pulsed electric field (PEF) treatment on sugarcane juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 1371–1379, 2016.
- KLEIN, Manuela P. *et al.* High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 465–470, 2013.
- KNIGHT, R. **Física 1: uma abordagem estratégica**. 2. ed. [s.l.]: Grupo A - Bookman, 2009.
- KORT, M. J. Colour in the sugar industry. In: BIRCH, G. G.; PARKER, K. J. (Eds.). **Sugar: Science and Technology**. London: Applied Science Publishers, 1979.
- KULMYRZAEV, A.; BRYANT, C.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1593–1597, 2000.
- KULSHRESTHA, Suzanne A.; SASTRY, Sudhir K. Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 78–83, 2010.
- KUNITAKE, M. *et al.* Effect of pasteurization temperature on stability of an acidified sugarcane juice beverage | Efeito da temperatura de pasteurização na estabilidade de caldo de cana acidificado. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 38, n. 6, p. 554–561, 2014.
- KUNITAKE, M. T. **Processamento e estabilidade de caldo de cana acidificado**. Dissertação de Mestrado. USP, [s. l.], 2012.
- KUSHNER, V. P. **Conformational Flexibility and Denaturation of Biopolymers**. Leningrad: Nauka Press, 1977.
- KUSNADI, C.; SASTRY, S. K. Effect of moderate electric fields on salt diffusion into vegetable tissue. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 329–336, 2012.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 1–9, 2006.
- LAUGHTON, Miranda J. *et al.* Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 17, p. 2859–2865, 1989.
- LEBOVKA, N. I.; SHYNKARYK, M.; VOROBIEV, E. Moderate Electric Field Treatment of Sugarbeet Tissues. **Biosystems Engineering**, v. 96, n. 1, p. 47–56, 2007.

LEE, B. R. *et al.* Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 6, p. 1271–1279, 2007.

LEE, Su-Yeon; RYU, Sangryeol; KANG, Dong-Hyun. Effect of frequency and waveform on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* in salsa by ohmic heating. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 1, p. 10–7, 2013.

LEHMKUHL, A. L. **Biorredução de 4-aminoacetofenona catalisada por células de *Saccharomyces cerevisiae* sp. em sistemas bifásicos**. 2006. Universidade Regional de Blumenau, SC, 2006.

LEIZERSON, Shirly; SHIMONI, Eyal. Effect of ultrahigh-temperature continuous ohmic heating treatment on fresh orange juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3519–3524, 2005.

LEMOS, M. A.; OLIVEIRA, J. C.; SARAIVA, J. A. Influence of pH on the Thermal Inactivation Kinetics of Horseradish Peroxidase in Aqueous Solution. **LWT - Food Science and Technology**, v. 33, n. 5, p. 362–368, 2000.

LIN, T. Y.; TIMASHEFF, S. N. On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. **Protein Science**, v. 5, n. 2, p. 372–381, 1996.

LIN, Ya-Tze *et al.* Degradation of flavonoid aglycones by rabbit, rat and human fecal flora. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 5, p. 747–51, 2003.

LOEWEN, M. **Subcellular Fractionation: Ultracentrifugation. 310.3 - Proteins and Enzymes**. Canada Plant Biotechnology Institute, National Research Council of Canada, 2017. Disponível em: <<http://www.ehu.es/biofisica/pdf/ultracentrifugation.pdf>>

LUBATTI, M. R. S. Vendedor ambulante, profissão folclórica: pesquisa nas ruas, parques e jardins de São Paulo. **Jangada Brasil**, [s. l.], v. 7, p. 1–2, 1999.

LUMRY, Rufus; EYRING, Henry. Conformation changes of proteins. **J. Phys. Chem**, v. 58, n. 2, p. 110–120, 1954.

LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 197–201, 2003.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer, 1970.

MANTELATTO, P. E. **Estudo do processo de cristalização de soluções impuras de sacarose de cana-de-açúcar por resfriamento**. 2005. Universidade Federal de São Carlos, SP, 2005.

MANZOCCO, L.; PANOZZO, A.; NICOLI, M. C. Inactivation of polyphenoloxidase by pulsed light. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 8, 2013.

MAO, Lin Chun; XU, Yong Quan; QUE, Fei. Maintaining the quality of sugarcane juice with blanching and ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 740–745, 2007.

MARQUES, M. O. *et al.* **Tecnologias na agroindústria canavieira**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 2008.

- MARTINS, C. P. C. *et al.* Estudo do efeito do branqueamento sobre a peroxidase presente no caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*). In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE PROCESSAMENTO DE FRUTAS E HORTALIÇAS 2013, Ilhéus, Bahia. **Anais...** Ilhéus, Bahia
- MCLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. The heat stability of purified spring cabbage peroxidase isoenzymes. **Food Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 97–107, 1987.
- MEADE, G. P.; CHEN, J. C. **Cane Sugar Hand Book**. New York/London: John Williamson Ltd, 1977.
- MERCALI, Giovana Domeneghini *et al.* Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 91–95, 2012.
- MERCALI, Giovana Domeneghini *et al.* Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. **Journal of Food Engineering**, v. 123, p. 1–7, 2014. a.
- MERCALI, Giovana Domeneghini *et al.* Effect of the electric field frequency on ascorbic acid degradation during thermal treatment by ohmic heating. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 25, p. 5865–70, 2014. b.
- MERCALI, Giovana Domeneghini *et al.* Evaluation of non-thermal effects of electricity on anthocyanin degradation during ohmic heating of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) juice. **Food chemistry**, v. 171, p. 200–5, 2015.
- MERSAD, Amel *et al.* Colorants in the sugar industry: Laboratory preparation and spectrometric analysis. **International Sugar journal**, v. 105, n. 1254, p. 269–281, 2003.
- METODIEWA, Diana *et al.* Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 1–2, p. 107–116, 1999.
- MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MORENO, J. *et al.* Influence of ohmic heating/osmotic dehydration treatments on polyphenoloxidase inactivation, physical properties and microbial stability of apples (cv. Granny Smith). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, p. 198–207, 2013.
- MOZHAEV, V. V.; MARTINEK, Karel. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 5, p. 299–309, 1982.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Sarvier: Artmed, 2009.
- NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Peroxidase from peach fruit: Thermal stability. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 41, n. 2, p. 179–186, 1998.
- NISTOR, O. V. *et al.* Ohmic treatment of apple puree (Golden Delicious variety) in relation to product quality. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 1, 2015.
- NORTH, A. M. Dielectric relaxation in polymer solutions. **Chemical Society Reviews**, v. 1, n. 1, p. 49, 1972.

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

OPPENHEIM, Alan V.; WILLSKY, Alan S. **Signals & Systems**. 2. ed. [s.l.] : Prentice-Hall, 1997.

OPPENHEIMER, Hannah L.; GREEN, Robert W.; MCKAY, Robert H. Function of zinc in horse liver alcohol dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 119, p. 8517, 2015.

PALANIAPPAN, Sevugan; SASTRY, Sudhir 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.

PARSEGHIAN, V. A.; RAND, R. P.; RAU, D. C. Macromolecules and water: Probing with osmotic stress. **Methods in Enzymology**, v. 259, p. 43–94, 1995.

PASSARDI, F. *et al.* Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 5, p. 255–265, 2005.

PATON, N. H.; DUONG, M. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour—Part III. **International Sugar Journal**, v. 94, p. 170–176, 1992.

PAYET, Bertrand; SHUM CHEONG SING, Alain; SMADJA, Jacqueline. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7270–6, 2006.

PELEG, Micha. Calculation of the Non-Isothermal Inactivation Patterns of Microbes Having Sigmoidal Isothermal Semi-Logarithmic Survival Curves. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 645–658, 2003.

PELEG, Micha; PENCHINA, Claude M. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 159–172, 2000.

PEREIRA, Ricardo N.; TEIXEIRA, José A.; VICENTE, António A. Exploring the denaturation of whey proteins upon application of moderate electric fields: A kinetic and thermodynamic study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11589–11597, 2011.

PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride – flavonoid complex. **Pharmazie**, v. 56, n. 6, p. 465–470, 2001.

PMSAP – PREFEITURA MUNICIPAL SANTO ANTÔNIO DA PATRULHA. **História do município**. 2016. Disponível em: <<http://www.santoantoniopatrulha.rs.gov.br/pmsap/historia-do-municipio>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

POLAKOVIČ, Milan; VRÁBEL, Peter. Analysis of the mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Critical assessment of isothermal inactivation experiments. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 8, p. 787–800, 1996.

PRATI, P. **Desenvolvimento de processo de estabilização de caldo de cana adicionado de sucos de frutas ácidos**. 2004. Universidade Estadual de Campinas, SP, 2004.

PRATI, P.; MORETTI, R. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Elaboração de bebida composta por mistura de

garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, 2005.

QUDSIEH, Hanan Yassin M. *et al.* Effect of Maturity on Chlorophyll, Tannin, Color, and Polyphenol Oxidase (PPO) Activity of Sugarcane Juice (*Saccharum officinarum* Var. Yellow Cane). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1615–1618, 2002.

RAMACHANDRAN, C. *et al.* Optimization of Shelf Stability of Sugarcane Juice with Natural Preservatives. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, 2017.

RAMIREZ, E. C.; WHITAKER, J. R.; VIRADOR, V. M. Polyphenol Oxidase. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. F. J.; WONG, D. W. S. (Eds.). **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2003. p. 509–524.

REIS, F. R. **Efeito dos processos de branqueamento e acidificação sobre a cor e a absorção de gorduras de batatas-palha**. 2007. Universidade Federal do Paraná, 2007.

RESNICK, D. Ohmic heating of fluid foods. In: Ohmic heating for thermal processing of foods: government, industry and academic perspectives - overview outstanding symposia in food science & technology. **Food Technology**, v. 50, n. 5, p. 250–251, 1996.

RICHARD-FORGET, Florence C. Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv . Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8561, n. 97, p. 2472–2476, 1997.

RIZVI, A. F.; TONG, C. H. Fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. **Journal of Food Science**, v. 92, n. 1, p. 1-7, 1997.

ROBBINS, Rebecca J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROBINSON, D. S. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: FOX, P. F. (Ed.). **Food enzymology**. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1991. p. 399–425.

RODRIGO, Carmen *et al.* Thermal Inactivation at High Temperatures and Regeneration of Green Asparagus Peroxidase. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1065–1071, 1996.

RODRIGUES, Eliseu *et al.* Compostos fenólicos e atividade antioxidante de cultivares de mirtilo produzidas no Brasil. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 911–917, 2011.

ROMANO, C. M. **Características físico-químicas e de cocção do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) CV. Guapo brilhante decorrentes de secagem estacionária e de tempo de armazenamento convencional**. 2006. Universidade Federal de Pelotas, RS, 2006.

ROUSE, A.; ATKINS, C. Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. **Food Technology**, v. 6, n. 8, p. 291–294, 1952.

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

RUPA, T. R.; ASOKAN, S. Effect of rind pigments and juice colorants on juice claribility, settling time and mud volume of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 10, n. 2, p. 109–113, 2008.

SAMARANAYAKE, Chaminda P.; SASTRY, Sudhir K. Effect of moderate electric fields on inactivation kinetics of pectin methylesterase in tomatoes: The roles of electric field strength and temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 186, p. 17–26, 2016. a.

SAMARANAYAKE, Chaminda P.; SASTRY, Sudhir K. Effects of controlled-frequency moderate electric fields on pectin methylesterase and polygalacturonase activities in tomato homogenate. **Food chemistry**, v. 199, p. 265–72, 2016. b.

SAMPEDRO, J. G. *et al.* Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1544, n. 1–2, p. 64–73, 2001.

SANT'ANNA, Voltaire *et al.* Kinetic modeling of the thermal inactivation of bacteriocin-like inhibitory substance p34. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3147–52, 2010.

SANT'ANNA, Voltaire *et al.* Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. **Dyes and Pigments**, v. 8, n. 3, p. 601–608, 2013.

SASTRY, S. Ohmic Heating and Moderate Electric Field Processing. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 5, p. 419–422, 2008.

SASTRY, S. K. A model for heating of liquid - particle mixtures in a continuous flow ohmic heater. **Journal of Food Process Engineering**, v. 15, n. 4, p. 263–278, 1992.

SAXENA, J.; AHMAD MAKROO, H.; SRIVASTAVA, B. Effect of ohmic heating on Polyphenol Oxidase (PPO) inactivation and color change in sugarcane juice. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 3, 2017.

SAXENA, Juhi; MAKROO, Hilal Ahmad; SRIVASTAVA, Brijesh. Optimization of time-electric field combination for PPO inactivation in sugarcane juice by ohmic heating and its shelf life assessment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 329–338, 2016.

SCHWARTZ, S. J.; VON ELBE, J. H.; GIUSTI, M. M. Corantes. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. (Eds.). **Química de Alimentos de Fennema**. 4 Ed. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010. p. 900.

SCIALABBA, A.; BELLANI, L. M.; DELL'AQUILA, A. Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **European Journal of Histochemistry**, v. 46, n. 4, p. 351–358, 2002.

SENSOY, Ilkay; SASTRY, Sudhir K. Ohmic blanching of mushrooms. **Journal of Food Process Engineering**, v. 27, n. 1, p. 1–15, 2004.

SINGH, A. *et al.* Phytochemical profile of sugarcane and its potential health aspects. **Pharmacognosy Reviews**, v. 9, n. 17, p. 45–54, 2015.

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.

SMITH, Norman H. Inhibition of enzymatic browning in cane sugar processing. **International Sugar Journal**, v. 78, n. 933, 1976.

SMITH, P.; PATON, N. H. Sugarcane flavonoids. **Sugar Technology Review**, v. 12, p. 117–142, 1986.

SOCOL, C. R.; SCHWAB, A.; KATAOKA, C. E. Avaliação microbiológica do caldo de cana (garapa) na cidade de Curitiba. **Boletim CEPPA**, Curitiba, PR, p. 116–125, 1990.

SOUNG, S. K.; DONG, J. L. Purification and characterization of a cationic peroxidase Cs in *Raphanus sativus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 6, p. 609–617, 2005.

SPIEGEL, Murray Ralph. **Manual de fórmulas e tabelas matemáticas**. São Paulo, SP: McGraw-Hill, 1981.

SREEDEVI, P.; JAYACHANDRAN, L. E.; RAO, P. S. Browning and bioactive composition of sugarcane juice (*Saccharum officinarum*) as affected by high hydrostatic pressure processing. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 3, p. 1962–1971, 2018.

STEVEN, F. S.; PODRAZKY, V. Evidence for the inhibition of trypsin by thiols. The mechanism of enzyme-inhibitor complex formation. **Eur. J. Biochem.**, v. 83, p. 155–161, 1978.

STUPIELLO, J. P. A Cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S. B. (Ed.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. v. 2 ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 761–804.

SUBRAMANIAN, N. *et al.* Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2571–2578, 1999.

SUZART, C. A. G. *et al.* Caracterização de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) para a produção de caldo de cana: rendimento de caldo e valor de brix. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS 2007, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte, MG

TANG, L. *et al.* Comparative analysis of peroxidase profiles in Chinese kale (*Brassica alboglabra* L.): Evaluation of leaf growth related isozymes. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 632–635, 2013.

TEREFE, Netsanet Shiferaw *et al.* Blueberry polyphenol oxidase: Characterization and the kinetics of thermal and high pressure activation and inactivation. **Food Chemistry**, v. 188, p. 193–200, 2015.

TIMASHEFF, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 22, p. 67-97, 1993.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stability of Protein Structure by Solvents. In: CREIGHTON, T. E. (Ed.). **Protein Structure: A Practical Approach**. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 1989.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2008.

TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; ESPÍN, Juan Carlos. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. In: JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE 2001, **Anais...** [s.l.: s.n.]

UNICAMP. **TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. Campinas, 2011.

VAMOS-VIGYÁZÓ, L.; HAARD, N. F. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in Fruits and Vegetables. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 49–127, 1981.

VAN LOEY, A. *et al.* Inactivation of enzymes: from experimental design to kinetic modeling. In: WHITAKER; VORAGEN; WONG (Eds.). **Handbook of food enzymology'**. New York: Marcel Dekker, Inc,

2003. p. 49–58.

VAN LOEY, A.; VERACHTERT, B.; HENDRICKX, M. Effects of high electric field pulses on enzymes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 3–4, p. 94–102, 2001.

VASCONCELOS, J. N. Derivados da cana-de-açúcar. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 16–18, 2002.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249–259, 2004.

VILA, F. C. **Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2006.

WALKER, J. R. L. Expression and Measurement of Enzyme Activity. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. p. C4.1.1-C4.1.15.

WANG, Wei-Chi; SASTRY, Sudhir K. Effects of moderate electrothermal treatments on juice yield from cellular tissue. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 4, p. 371–377, 2002.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2002. p. Supplement 6.

WEEMAES, C. A. *et al.* Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. **Biotechnology and bioengineering**, v. 60, n. 3, p. 292–300, 1998.

WHORLD. **No Title**. 2016. Disponível em: <<http://whorld.org/help.php?topic=Help/Patches/Patches.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2016.

WILKESMAN, J. *et al.* Guaiacol peroxidase zymography for the undergraduate laboratory. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 42, n. 5, p. 420–426, 2014.

WILLIAMS, Christine A.; HARBORNE, Jeffrey B.; CLIFFORD, H. Trevor. Negatively charged flavones and tricin as chemosystematic markers in the palmae. **Phytochemistry**, v. 12, n. 10, p. 2417–2430, 1973.

YANG, Jun; MARTINSON, Timothy E.; LIU, Rui Hai. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 332–339, 2009.

YUAN, Z. Y.; JIANG, T. J. Horseradish peroxidase. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. F. J.; WONG, D. W. S. (Eds.). **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. p. 403–411.

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

ZAID, A. *et al.* **Glossary of Biotechnology and Genetic Engineering**: FAO Research and Technology Paper. Roma, 1999.