



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Natália Maluf Queiroz

Efeitos da ação combinada da alta pressão e temperaturas moderadas e adição de antioxidante sobre água de coco

São José do Rio Preto  
2015

Natália Maluf Queiroz

Efeitos da ação combinada da alta pressão e temperaturas moderadas e  
adição de antioxidante sobre água de coco

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração de Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roger Darros-Barbosa

São José do Rio Preto  
2015

Queiroz, Natália Maluf.

Efeitos da ação combinada da alta pressão e temperaturas moderadas e adição de antioxidante sobre água de coco / Natália Maluf Queiroz. -- São José do Rio Preto, 2015

102 f. : il., tabs.

Orientador: Roger Darros-Barbosa

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Coco - Produtos - Análise. 3. Antioxidantes. 4. Peroxidase. 5. Polifenoloxidase. 6. Pressão alta (Tecnologia) I. Darros-Barbosa, Roger. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664.85:634.616

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Natália Maluf Queiroz

Efeitos da ação combinada da alta pressão e temperaturas moderadas e  
adição de antioxidante sobre água de coco

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração de Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Roger Darros-Barbosa  
UNESP – São José do Rio Preto, SP.  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ellen Silva Lago Vanzela  
UNESP – São José do Rio Preto, SP.

---

Dr<sup>o</sup>. Amauri Rosenthal  
EMBRAPA – Rio de Janeiro, RJ.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sabrina Neves Casarotti  
UNESP – São José do Rio Preto, SP.

---

Dr<sup>o</sup>. Marcelo Cristianini  
UNICAMP – Campinas, SP.

São José do Rio Preto  
06 de outubro de 2015

“Sonhos não envelhecem”.  
Lô Borges

*“Se você for tentar, vá até o fim.  
Senão, nem comece.  
Vá até o fim.  
Isso pode significar perder  
Amores, amigos, empregos e talvez  
Até a cabeça.  
Vá até o fim.  
Isso pode significar três ou  
Quatro dias sem comer.  
Isso pode significar congelar  
No banco de um parque.  
Isso pode significar deboche, Rejeição.  
Solidão.  
Solidão? Pense nela como um  
Presente.  
E em todo o resto como um  
teste à sua persistência.  
O tamanho da sua vontade  
De chegar lá.  
Você vai chegar.  
E vai ser melhor que qualquer  
Coisa que você possa imaginar.  
Vá até o fim.  
Você nunca vai estar sozinho”.*

*Charles Bukowski*

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram a chegar até o fim, minha família, meus amigos e, especialmente àquela que nunca me deixou sozinha, minha mãe Andréia, e ao meu esposo Carlinhos, que permanece e permanecerá comigo, mantendo minha fé e coragem.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e imensamente ao professor Roger pela orientação, pela atenção, pelo carinho e por me ajudar a desenvolver e finalizar este projeto, sempre com disponibilidade e otimismo.

À UNESP pela oportunidade e ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida.

Às professoras Ana Lucia, Maria Aparecida e Ellen, por terem me permitido usar vossos laboratórios, foi fundamental ter sido tão bem recebida. Minha eterna gratidão.

Aos técnicos Ginaldo, Tania, Alana e Luiz, por toda a ajuda que me prestaram, por serem ótimos profissionais, educados e cheios de boa vontade, muito obrigada.

Às amigas que fiz, Ana Maria, Cecília, Flavinha, Katy, Lara, Liara, Sabrina, Patrícia e Vivian, obrigada por todas as vezes que me ajudaram e por torcerem por mim em momentos decisivos da minha vida. Vocês estarão sempre em minhas lembranças.

À Vivian Cruz pela ajuda durante as análises, muito obrigada.

Ao professor Marcelo Cristianini pela cessão e auxílio no processamento a alta pressão realizado na Unicamp e ao doutorando Bruno, que com toda a habilidade e gentileza possíveis, nos auxiliou e acompanhou durante todo o processamento, muito obrigada!

Agradeço a toda minha família, meus pais, avós, esposo, sogra, afilhada, padrinhos, irmãs (de sangue e de alma), primos e amigos (tenho muitos que também são uma família), minha eterna gratidão por exatamente tudo, das críticas às orações, com todo meu amor.

À minha mãe, meu padrasto, minha avó e meu esposo pela ajuda prestada no dia da extração da água de coco; pela companhia, pelo carinho, por enxugarem e muitas vezes evitarem minhas lágrimas e por acreditarem em mim mais do que eu mesma, minha eterna e profunda gratidão. Não sei como (e se) seria minha vida sem vocês.

Aos colegas de viagem Amanda, Bia, Claudia, Eduardo, Inácio, Luana, Maria Emilia, Sonia e Tiago, obrigada por terem tornado a rotina de viajar mais prazerosa, pelos conselhos, caronas e risadas. Torço por vocês.

A Deus, pela vida cheia de saúde e alegria que tenho, por tantas pessoas importantes, que precisavam fazer parte da minha vida e me auxiliar em mais essa conquista. Sigamos com fé Nele e saibamos respeitar Seus planos.

## RESUMO

A água de coco é considerada uma bebida peculiar, com sabor característico e propriedades terapêuticas, como a de promover reposição eletrolítica por ser rica em minerais, em especial o potássio. Porém, apresenta susceptibilidade à atuação das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD), associadas ao desenvolvimento de coloração rósea, sendo este um dos problemas na sua conservação. A inativação enzimática promovida por altas temperaturas é uma alternativa comumente encontrada, entretanto altera o sabor, de forma a justificar o emprego das tecnologias que não necessitam de altas temperaturas, como a alta pressão. O presente estudo teve por objetivos avaliar os efeitos de diferentes combinações da pressão (0,1 a 600 MPa); temperatura (10 a 80°C) e adição de ácido ascórbico (0 a 20 mg/100 mL) sobre a atividade das enzimas PFO e POD, a retenção do ácido ascórbico e a contaminação microbiológica decorrente da extração e preparo da água de coco. Foram determinados pH, sólidos solúveis, acidez total titulável, teor de ácido ascórbico, cor instrumental, atividade enzimática da PFO e da POD, e, contagem de coliformes termotolerantes, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras. Foram obtidas as superfícies de resposta com as equações ajustadas ao modelo estatístico para a atividade residual da POD e teor residual de ácido ascórbico. Os resultados demonstraram que a adição de ácido ascórbico nas proporções de 10 e 20 mg/100 mL resultou em inibição para ambas enzimas estudadas, com atividade residual inferior a 10% em todos os ensaios, independente da pressão e da temperatura. A inibição da POD (atividade residual 4,61%) ocorreu sem a adição de ácido ascórbico à pressão atmosférica e temperatura de 80°C; sob as mesmas condições foi observada a completa inibição da PFO. Nos níveis de pressão investigados e sem adição de ácido ascórbico, a inibição máxima da atividade da enzima PFO foi 59,54%, pela combinação da máxima pressão (600 MPa) e máxima temperatura (80°C), porém com atividade da POD superior à atividade inicial, indicando a ativação desta enzima. As altas pressões, em todas as temperaturas investigadas, foram suficientes para eliminar a contaminação da água de coco, que consistiu somente de bolores e leveduras, com ausência de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. Concluiu-se que nos níveis de pressão e temperatura investigados, a adição de ácido ascórbico foi indispensável para permitir os efeitos benéficos da utilização de alta pressão. Satisfatoriamente, no ponto central (300 MPa, 45°C, 10 mg ácido ascórbico/100 mL) foi observada a total inibição da enzima PFO e inibição média de 98,58% da POD.

Palavras-chave: Água de coco. Peroxidase. Polifenoloxidase. Alta Pressão. Ácido ascórbico.

## ABSTRACT

Coconut water is considered a peculiar drink with distinctive taste and therapeutic properties, such as an electrolyte replacer by being rich in minerals, especially potassium, however, shows susceptibility to the enzymes polyphenol oxidase enzyme (PFO) and peroxidase (POD), associated with the development of pink color, which is one of the problems for its conservation. Enzymatic inactivation by high temperatures is the alternative commonly found, however affecting taste, which justifies the use of other technologies that do not require high temperatures, such as high pressure. This study aimed to evaluate the effects of different combinations of pressure (0.1 to 600 MPa), temperature (10 to 80°C) and addition of ascorbic acid (0 to 20 mg/100ml) on the enzyme activity of PFO and POD, retention of ascorbic acid and microbial contamination which occurs during the extraction and preparation of coconut water. An experimental design was proposed to determine pH, soluble solids, titratable acidity, ascorbic acid content, instrumental color, enzymatic activity of PFO and POD, and thermo tolerant coliforms, *Salmonella* sp. and molds and yeasts counts. The response surfaces with adjusted equations to the statistical model for the residual POD activity and residual ascorbic acid were obtained. The results showed that the addition of ascorbic acid at 10 and 20 mg/100 ml resulted in the inhibition of both enzymes studied, with a residual activity less than 10% in all experiments regardless of pressure and temperature. Inhibition of POD (4.61% residual activity) was obtained without the addition of ascorbic acid at atmospheric pressure and 80°C; under the same conditions it was found complete inhibition of PFO. In the pressure levels studied and without ascorbic acid, the maximum inhibition of PFO enzyme activity was 59.54% for the combination of maximum pressure (600 MPa) and maximum temperature (80°C), but with POD activity higher than the initial activity, indicating the activation of this enzyme. The high pressures at all temperatures investigated were sufficient to eliminate the microbial contamination of the coconut water, which consisted only of molds and yeasts with the absence of thermo tolerant coliforms and *Salmonella* sp. It follows that at the pressure and temperature levels investigated, the addition of ascorbic acid was essential to benefit from the effects of high pressure at low temperatures. Satisfactorily, at the center point (300 MPa, 45°C, 10 mg ascorbic acid/100 ml), a complete inhibition was observed for PFO and an average inhibition of 98.58% for POD.

Keywords: Coconut water. Peroxidase. Polyphenol oxidase. High pressure. Ascorbic acid.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio catalisada por peroxidase. ....	24
Figura 2 - Mecanismo químico para ação da polifenoloxidase.....	26
Figura 3 - Oxidação do ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. ....	29
Figura 4 - Esquema gráfico para processamento a alta pressão, envolvendo as variáveis pressão, temperatura e tempo. ....	35
Figura 5 - Fluxograma das etapas envolvidas para extração e processamento da água de coco. ....	45
Figura 6 - Equipamento para os ensaios sob alta pressão .....	48
Figura 7 - Detalhe da câmara de alta pressão aberta com as sondas para medição da temperatura do fluido de transmissão de pressão. ....	48
Figura 8 - Tela para monitoramento do processo .....	48
Figura 9 - Espectrofotômetro acoplado ao Peltier .....	55
Figura 10 – Perfil de pressão em função do tempo para os tratamentos sob alta pressão. ....	59
Figura 11 - Perfil de temperatura em função do tempo de processo, para os tratamentos sob alta pressão. ....	60
Figura 12: Superfície de resposta do modelo para prever a porcentagem de ácido ascórbico residual, a 45°C, em função da pressão e da dosagem de ácido ascórbico. ....	72
Figura 13 - Diagrama de Pareto para os efeitos significativos na atividade enzimática residual da peroxidase. Nota: (L) = Linear; (Q) = Quadrado. ....	83
Figura 14 - Superfície de resposta para atividade residual de peroxidase (POD) em função da pressão e da temperatura, nas dosagens de ácido ascórbico de (a) 0 mg/100 mL; (b) 10 mg/100 mL e (c) 20 mg/100 mL.....	85
Figura 15 - Atividade residual da peroxidase (POD) em função da temperatura, para pressões de 340 MPa a 540 MPa, para as dosagens de ácido ascórbico de (a) 0 mg/100 mL; e (b) 13 mg/100 mL. ....	86
Figura 16 - Atividade residual de polifenoloxidase em função da pressão, para água de coco sem adição de ácido ascórbico.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas e microbiológicas para água de coco conforme Instrução Normativa nº27 (BRASIL, 2009).....	19
Tabela 2 - Caracterização físico-química da água de coco com 7 meses de maturação.....	20
Tabela 3 - Exemplos de alimentos processados por alta pressão .....	33
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos da água de coco do ensaio preliminar. ....	46
Tabela 5 - Valores dos coeficientes utilizados no cálculo de aquecimento adiabático. ....	49
Tabela 6 - Previsão para aumento de temperatura devido ao aquecimento adiabático. ....	50
Tabela 7 - Temperaturas de condicionamento antes do processamento a alta pressão. ....	50
Tabela 8 - Faixa dos valores codificados e reais para as variáveis do planejamento experimental. ....	51
Tabela 9 - Delineamento experimental proposto para processamento de água de coco.....	52
Tabela 10 - Resumo das condições operacionais do processo sob alta pressão, em função da temperatura e do tempo.....	61
Tabela 11 - Contagem de <i>Salmonella</i> sp., Coliformes termotolerantes e Bolores e Leveduras em água de coco para os diferentes tratamentos e amostras não tratadas.....	64
Tabela 12 – Resultados de pH, acidez titulável e sólidos solúveis para os tratamentos.....	66
Tabela 13 – Resultados da ANOVA para os efeitos lineares, quadráticos e interação nas condições dos tratamentos sobre o teor de ácido ascórbico residual.....	68
Tabela 14 - Resultados da ANOVA e coeficientes de regressão para fatores que apresentaram efeitos significativos sobre pH da água de coco.....	68
Tabela 15 - Teor de ácido ascórbico e porcentagem residual de ácido ascórbico para os tratamentos.....	70
Tabela 16 - Efeitos lineares, quadráticos e de interação das condições dos tratamentos sobre o teor de ácido ascórbico residual.....	71
Tabela 17 – Resultados de cor instrumental para água de coco em função dos tratamentos e resultados da análise estatística para ajuste do modelo.....	74

Tabela 18 - Análise de variância para as respostas do parâmetro $a^*$ para a água de coco em função dos tratamentos.....	75
Tabela 19 - Correlação entre os parâmetros de cor e a atividade residual das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD).....	76
Tabela 20 - Atividade residual das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO) para os diversos tratamentos. ....	78
Tabela 21 – Resultados da análise de variância para a atividade enzimática relativa da peroxidase (POD) em função de pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico. ....	81
Tabela 22 - Coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) entre a taxa de aquecimento e a atividade residual da peroxidase, em função da dosagem de ácido ascórbico. ....	88

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivos Gerais .....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	16
3.1 Água de Coco .....	16
3.2 Parâmetros de Qualidade de Água de Coco .....	18
3.3 Enzimas Presentes na Água de Coco .....	22
3.3.1 Peroxidase .....	23
3.3.2 Polifenoloxidase .....	25
3.3.3 Aspectos tecnológicos para inativação de enzimas .....	27
3.4 Métodos de Conservação da Água de Coco .....	28
3.4.1 Resfriamento .....	28
3.4.2 Congelamento .....	28
3.4.3 Adição de ácido ascórbico .....	29
3.4.4 Tratamento térmico .....	31
3.5 Alta Pressão .....	33
3.5.1 Efeitos da alta pressão sobre enzimas .....	37
3.5.2 Efeitos da alta pressão sobre nutrientes e características físico-químicas .....	41
3.5.3 Efeitos da alta pressão sobre microrganismos .....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	44
4.1 Matéria-prima e Extração de Água de Coco .....	44
4.2 Ensaio Preliminar - Efeito da correção de pH .....	46
4.3 Tratamentos .....	47
4.3.1 Alta pressão .....	47
4.3.2 Temperatura .....	50
4.3.3 Ácido Ascórbico .....	51
4.4 Delineamento Experimental .....	51
4.5 Análises físico-químicas e microbiológicas .....	52
4.5.1 pH .....	52
4.5.2 Sólidos solúveis .....	53
4.5.3 Acidez total titulável .....	53

4.5.4	Ácido Ascórbico.....	53
4.5.5	Cor instrumental.....	54
4.5.6	Atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase.....	55
4.5.7	Microbiológicas.....	57
4.6	Análises Estatísticas.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1	Condições Operacionais Obtidas para os Ensaios em Alta Pressão.....	59
5.2	Resultados das Análises Microbiológicas.....	62
5.3	Resultados para Sólidos Solúveis, pH e Acidez Titulável.....	65
5.4	Resultados para Ácido Ascórbico.....	69
5.5	Resultados para Cor.....	73
5.6	Resultados para Atividade Enzimática.....	76
5.6.1	Peroxidase.....	80
5.6.2	Polifenoloxidase.....	89
6	CONCLUSÃO.....	92
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	93
	REFERÊNCIAS.....	94

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por alimentos saudáveis com características de alimentos frescos e sem alto valor calórico é crescente, tendo a água de coco ganhado destaque neste contexto, especialmente por suas propriedades de reidratação e reposição de eletrólitos. Ademais, pode ser utilizada em áreas que vão além da nutrição, como medicina e biotecnologia, onde é utilizada como meio de cultura para vírus e bactérias, para obtenção de vacinas e para células vegetais, como embriões e pólen (CARVALHO *et al.*, 2006).

A água de coco tem suas características mantidas e se apresenta naturalmente estéril dentro do fruto, sua embalagem natural. Devido ao peso e volume do fruto, o transporte do coco inteiro por longas distâncias acarreta maior custo e, por conseguinte, a água de coco *in natura* é um alimento encontrado com mais facilidade em locais próximos às áreas costeiras. Esses fatores, associados às rápidas alterações que ocorrem a partir da abertura do fruto, viabilizam a industrialização da água de coco (CALVETTE, 2007; ROSA; ABREU, 2000). O maior desafio para sua industrialização é manter as características sensoriais e nutricionais mais próximas às do fruto *in natura*, com vida de prateleira suficiente para comercialização e consumo.

Uma das principais causas da rápida deterioração da água de coco é a atividade enzimática das oxidoredutases, como polifenoloxidase e peroxidase. Para a inativação das enzimas e destruição de microrganismos que podem ser incorporados durante a manipulação do produto, a esterilização, como o processamento à ultra alta temperatura (da sigla em inglês UHT), é uma das formas mais usuais de conservação da água de coco, com uso de embalagens herméticas, adição de açúcares e agentes químicos de preservação. Este método permite a estocagem à temperatura ambiente (ROSA; ABREU, 2000).

Sabe-se que altas temperaturas podem causar grandes alterações de sabor nos produtos e que os consumidores se preocupam bastante com os benefícios oferecidos à saúde. Por essa razão, torna-se vantajosa a utilização de métodos que utilizem temperaturas mais brandas e não sejam adicionados os agentes químicos de preservação.

Tecnologias emergentes como utilização de membranas (microfiltração e ultrafiltração) e tratamento sob alta pressão também têm sido propostas, isoladamente ou associados a outros tratamentos. Dentre eles, pode-se citar a associação com ácido ascórbico

que, em dosagem controlada, tem-se mostrado eficiente na inibição das enzimas, com a vantagem de ser um composto antioxidante, com benefícios para saúde humana.

Com a presente pesquisa, espera-se contribuir para o estudo dos efeitos de parâmetros de processo: alta pressão, temperatura e adição de ácido ascórbico, isoladamente ou combinados em intensidades moderadas, sobre a qualidade físico-química da água de coco, buscando obter um produto com qualidade, associado à utilização de métodos menos severos de conservação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Avaliar os efeitos do tratamento da água de coco por alta pressão associada a temperaturas moderadas e com a adição do antioxidante ácido ascórbico.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar as características físico-químicas (pH, sólidos solúveis e acidez titulável) e contagem microbiológica, além da cor e atividade enzimática da polifenoloxidase e da peroxidase na água de coco, antes e após os processamentos por altas pressões, temperatura e adição de ácido ascórbico.

- Determinar a faixa dos parâmetros pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico mais eficiente para redução de carga microbiana, manutenção de características físico-químicas e inativação/inibição enzimática.

- Determinar a concentração de ácido ascórbico, antes e após os tratamentos, para verificação de degradação do composto e quais as condições de processo mais eficientes para evitar sua degradação.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Água de Coco

O coqueiro é uma palmeira de cultivo extenso e importante pois, além de apresentar todas as partes aproveitáveis (tronco e raiz são utilizados para fabricar materiais de construção), o fruto é matéria-prima para a produção de diversos alimentos como leite de coco, coco ralado e água de coco (ROSA; ABREU, 2000). Segundo Cabral *et al* (2005), o coqueiro é uma das mais importantes palmeiras cultivadas no Brasil.

Entre 2011 e 2016, mais de 350 milhões de reais serão aplicados na cadeia do coco no Brasil, e o foco principal desse investimento será a água de coco, conforme dados do Sindicato Nacional dos Produtores de Coco do Brasil (SINDCOCO, 2013). Segundo a consultoria Nielsen (2015), em pesquisa realizada referente aos anos de 2014 e 2015, o consumo de água de coco aumentou em 18,8%, estando em 9º lugar entre os produtos com maior aumento no consumo, em 6º entre os alimentos, sendo ainda o terceiro maior crescimento na categoria “bebidas não alcoólicas”.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009), água de coco é definida como “bebida não diluída, não fermentada, obtida da parte líquida do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera L.*), por meio de processo tecnológico adequado”.

Segundo Prades *et al.* (2012), as pesquisas sobre água de coco ocorrem nas seguintes proporções: utilizações específicas (10%), composição bioquímica (50%) e técnicas de preservação (40%).

Carvalho *et al.* (2006) cita que a variedade deve ser escolhida de acordo com a finalidade da produção, sendo a variedade “anão” mais utilizada comercialmente para obtenção de água de coco. A análise sensorial realizada com água de coco de frutos da variedade anão verde e anão vermelho colhidos com 7 e 8 meses de maturação confirmou a maior aceitação e preferência da variedade anão verde colhidos no oitavo mês de maturação (AROUCHA, 2014).

Segundo Rosa e Abreu (2000), o período recomendado para a colheita é do quinto ao sétimo mês, sendo geralmente a época em que a água de coco também se encontra com máximo teor de açúcares e mais saborosa. A partir daí, há redução nestes valores até o completo amadurecimento do fruto, no 12º mês, quando geralmente se descarta a água e

utiliza-se o albúmen sólido para fabricação de coco ralado, óleo e leite de coco. Nesse estágio de maturação, o sabor é salgado se comparado ao sabor da água de coco com oito meses de maturação (TAN, 2014).

As fases de crescimento e maturação do fruto do coqueiro envolvem formação de tecidos e mudanças físico-químicas, bioquímicas e sensoriais, que irão desenvolver as características da água de coco, sendo estas influenciadas por diversos fatores como variedade do fruto, formas de cultivo, localização, clima, tipo de solo, insolação e época do ano. Com relação ao rendimento, cada fruto possui 25% do seu peso em água, com o maior volume de água geralmente encontrado quando o fruto atinge de 6 a 7 meses (ARAGÃO et al., 2002; CABRAL et al., 2005).

Segundo Prades et al. (2012), a água de coco apresenta como constituintes açúcares (sacarose, glucose e frutose); minerais (ferro, sódio, potássio, entre outros) representando 0,4 a 1% do volume de líquido, que garantem as propriedades isotônicas da água de coco; vitaminas C (20 a 40 mg/L), B3 (0,64 µg/mL de ácido nicotínico) e B5 (0,52 µg/mL de ácido pantotênico); aminoácidos (alanina, arginina, cisteína e serina) e vários compostos que contribuem para o aroma, como nonanal, nonanol e heptanal. Segundo estudo realizado por Da Fonseca et al. (2009), a água de coco é constituída por aproximadamente 70% em ésteres e cetonas, mas também por aldeídos e álcoois, com cadeias curtas, responsáveis provavelmente por características sensoriais de sabor e aroma. Os principais constituintes identificados no estudo de Da Fonseca et al. (2009) foram 4-hidroxi-4-metilpentano-2-ona, *n*-propiletanoato e furfural. Rosa e Abreu (2000), em estudo com água de coco de frutos da variedade Anão verde colhidos com 7 meses de maturação, apresentou 27,51 kcal em 100 g e os seguintes teores médios para os açúcares e minerais: sacarose (280 mg/100 mL); glucose (2378 mg/100 mL); frutose (2400 mg/100 mL); fósforo (7,40 mg/100 g); cálcio (17,10 mg/100 g); magnésio (4,77 mg/100 mL); manganês (0,52 mg/100 g); ferro (0,04 mg/100 g) e potássio (156,86 mg/100 g).

A capacidade antioxidante da água de coco também tem sido estudada por alguns autores. Da Fonseca et al. (2009), por exemplo, utilizando o método de sequestro dos radicais livres (1,1-difenil-2-picrilhidrazila - DPPH), avaliaram a capacidade antioxidante de extratos do óleo essencial da água de coco em diferentes concentrações (1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/mL) e relataram que as amostras apresentaram potencial como possíveis fontes de antioxidantes naturais (79,4% para uma concentração de 1,0 µg/mL; 76,6%, para 0,50 µg/mL;

64,8% para 0,25 µg/mL; e, 41,2% para 0,125 µg/mL). Mantena e colaboradores (2003) comprovaram que a capacidade antioxidante na água de coco *in natura* é influenciada pelos diversos tratamentos aos quais o produto pode ser submetido, tal como o tratamento térmico. Há, ainda, pesquisas que apontam efeitos antioxidante e anti carcinogênico e que o consumo frequente de água de coco fresca pode trazer efeitos antienvhecimento para a pele (PRADES et al., 2012).

### 3.2 Parâmetros de Qualidade de Água de Coco

A água de coco não é como um suco de fruta comum, apresenta baixa acidez combinada a um conteúdo balanceado de açúcares e à presença de minerais. Alguns dos critérios de qualidade observados para escolha de uma cultivar ou até de um produtor para produção de água de coco são: rendimento (mL), pH, sólidos solúveis totais (g/100 mL), relação entre açúcares redutores e totais e teor de potássio e sódio. Outro aspecto de importância é a relação entre volume de água de coco e peso total do fruto (% v/p), que deve ser a maior possível por influenciar o custo do transporte até a fábrica, o espaço necessário para estocagem da matéria-prima e a prevenção de problemas para o meio ambiente (PRADES et al., 2012).

De acordo com a Instrução Normativa nº 27, do MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009), água de coco pode ser classificada em resfriada, pasteurizada, congelada, concentrada, esterilizada, desidratada e reconstituída. Essa instrução normativa permite a adição de açúcares, exclusivamente para correção e padronização do teor de sólidos solúveis (°Brix) do produto e vitaminas, conforme legislação específica para nutrientes essenciais.

O uso de aditivos em água de coco é regulado pela Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA) com base na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 8, de 06 de março de 2013, sendo permitida a utilização de reguladores de acidez, antioxidantes, sequestrantes e conservadores para água de coco e proibida para a mesma, adição de corantes, estabilizantes e aromatizantes (BRASIL, 2013).

Normalmente se utilizam para padronização de água de coco ácido cítrico para redução do pH, ácido ascórbico como antioxidante e frutose para padronização de teor de sólidos solúveis (ABREU, 2005). O MAPA (BRASIL, 2009) permite a adição de açúcares em quantidade não superior a 1 g/100 mL e, a ANVISA (BRASIL, 2013) permite a adição de

ácido ascórbico (antioxidante) e ácido cítrico (regulador de acidez), ambos em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, desde que não altere a identidade do produto. A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas e microbiológicas para água de coco, conforme a legislação em vigência (BRASIL, 2009).

Segundo Silva e colaboradores (2010), o pH ótimo para o desenvolvimento de bolores e leveduras é próximo a 5,0, embora tenham grande tolerância, sendo pouco afetados por variações de pH de 3,0 a 8,0. Bolores e leveduras apresentam crescimento raro em temperaturas de 45°C, utilizadas como referência para bactérias termotolerantes, e, mesmo em temperaturas mesófilas (35-37°C), seu crescimento é raro, ao contrário do que ocorre sob condições de refrigeração. São microrganismos com temperatura ótima compreendida entre 25 e 28°C (SILVA et al., 2010).

Tabela 1 - Características físico-químicas e microbiológicas para água de coco conforme Instrução Normativa nº27 (BRASIL, 2009).

Parâmetros físico-químicos	Águas de coco resfriada, pasteurizada e congelada		Água de coco esterilizada		Água de coco concentrada		Águas de coco desidratada e reconstituída	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
pH	4,3	4,5	4,6	5,4	-	-	4,3	-
Sólidos solúveis (°Brix, a 20°C)	-	6,7	-	6,7	6,75	-	4,5	6,7
Potássio (mg/100mL)	140	230	140	230	210	-	140	230
Sódio (mg/100mL)	2	30	2	30	3	-	2	30
Características microbiológicas	Todas as águas de coco							
	Mínimo				Máximo			
Soma de bolores e leveduras	-				20 UFC/mL			
Escherichia coli ou coliformes termotolerantes	-				1 UFC/mL			
<i>Salmonella</i> sp.	Ausente em 25 mL							

Rios e Sobrinho (2012) avaliaram os índices de contaminação da água de coco por coliformes totais e termotolerantes, e demonstraram por meio da comparação entre as amostras do produtor e do vendedor que a contaminação ocorre nos pontos de venda, pois mesmo nos frutos sem higienização obtidos diretamente do produtor não foi detectada a contaminação, em comparação com a média de 1221 NMP/mL, obtida de amostras de dois vendedores.

Pode haver uma carga microbiana natural no coco, que, ao ter contato com o solo, folhagens e pela exposição ao vento, pode ser contaminado por patógenos, como *Salmonella* spp.; *Listeria monocytogenes*; *E. coli* enteropatogênica; esporos de *Clostridium botulinum*, *C.*

*perfringes*, *Bacillus cereus*, bolores toxigênicos, protozoários, dentre outros (SCHMIDT et. al., 2004 citado por RIOS; SOBRINHO, 2012).

Rosa e Abreu (2000) apresentam características físico-químicas, pH, acidez e sólidos solúveis (Tabela 2) para água de coco, obtida da variedade anão-verde, colhidos com 7 meses de maturação.

Tabela 2 - Caracterização físico-química da água de coco com 7 meses de maturação

Parâmetro	Valor
Acidez (mg de ácido cítrico/100 mL)	71,06
pH	4,91
Sólidos totais (g/100 g)	5,84
Sólidos solúveis (°Brix)	5,00

Fonte: (ROSA; ABREU, 2000).

Segundo Cecchi (2003), determinações de pH e acidez titulável em alimentos são importantes, pois esses parâmetros estão relacionados à deterioração, atividades de enzimas, sabor, estágio de maturação e manutenção da qualidade. Segundo Santos (2006), o aumento da acidez na água de coco torna-a menos palatável.

Os sólidos solúveis, expressos geralmente em °Brix, indicam a quantidade dos sólidos que se encontram dissolvidos na porção aquosa do fruto. O avanço na maturação faz com que o teor de sólidos solúveis aumente. Além disso, a relação entre sólidos solúveis e acidez titulável é uma forma bastante utilizada para a avaliação do sabor, pois representa o equilíbrio entre esses dois componentes (CHITARRA; CHITARRA, 1990).

Aroucha et al. (2014), em um estudo sobre a influência do estágio de maturação nas características de água de coco proveniente de frutos das variedades anão verde e anão vermelho com sete e oito meses de maturação, observaram que a variedade anão verde apresentou do sétimo para o oitavo mês aumento no pH (de 4,96 para 5,35), redução na acidez (de 89 para 65 mg de ácido cítrico/100 mL) e pequena variação para sólidos solúveis (5,34 para 5,40 °Brix).

Costa et al. (2005) processaram frutos de coqueiros-anões verde colhidos com 6-7 meses de maturação, por meio de processo *hot fill*. Na padronização da água de coco desse processo, foram adicionados ácido cítrico, para promover o abaixamento do pH até 4,5 e elevar a acidez a 0,11 g/100 mL; frutose, para padronizar os sólidos solúveis totais em 7°Brix; ácido ascórbico, com função antioxidativa; e ainda agentes químicos de preservação

(benzoato de sódio e metabissulfito de sódio). A água de coco produzida e denominada “*Hot fill experimental*” foi comparada com quatro amostras de água de coco de marcas comerciais produzidas por métodos diferentes de conservação (refrigeração, congelamento, processamento asséptico e processo *hot fill*). Entre as cinco amostras, os autores observaram variação de acidez total titulável de 60 a 120 mg de ácido cítrico/100 mL; variação do teor de sólidos solúveis de 7,00 a 7,30 °Brix e do pH de 4,32 e 4,93.

A cor é outro parâmetro que influencia bastante na aceitação de um produto. São encontradas dificuldades em manter os alimentos com coloração atrativa e próxima à do alimento natural devido à degradação e alterações de cor que podem ser causadas por processamento e estocagem (AZEREDO, 2012). A cor é percebida de formas diferentes, subdivididas em níveis físico, psicofísico, psicométrico e visual. O modelo CIE, criado pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE – “Comission Intertionale de l’Eclairage”), baseado na percepção das cores pelo sistema visual humano, avançou o estudo da colorimetria, permitindo a padronização da determinação instrumental da cor (LOPES, 2009; MACDOUGALL, 2002). Com base no modelo CIELab, no qual a cor é descrita pelas coordenadas  $L^*$ , que representa a claridade, variando de escuro (0) a claro (100);  $a^*$ , que representa a tonalidade variando do verde (-) ao vermelho (+); e  $b^*$ , que representa a tonalidade variando do azul (-) ao amarelo (+), é possível definir a localização em um espaço uniforme de qualquer cor. A partir dos valores correspondentes a essas coordenadas, podem ser calculados parâmetros derivados, como a variação de cor ( $\Delta E$ ), que avalia a diferença de cor entre duas amostras, importante valor para o estudo da estabilidade de alimentos e comparação entre processos (LOPES, 2009; MACDOUGALL, 2002).

A água de coco apresenta problemas de conservação desde a abertura do fruto. Quando exposta ao ar, as enzimas presentes podem atuar causando o desenvolvimento de uma coloração rosada (CABRAL et al., 2005).

Damar (2006) avaliou a cor de água de coco submetida a três diferentes tratamentos, utilização de dióxido de carbono em fase densa (34,5 MPa, 25°C, 13% CO<sub>2</sub>); pasteurização a 74°C/15 segundos e “controle” (sem tratamento); todos seguidos de carbonatação, envase em garrafas (750 mL) e estocagem sob refrigeração (4°C) por 9 semanas. Os valores para claridade ( $L^*$ ) variaram de 48 a 60 e não apresentaram grandes diferenças entre os tratamentos e o tempo de estocagem. Para a coordenada  $b^*$ , com valores de 1,5 a 3,5; foram observadas pequenas oscilações com o tempo e o tratamento. Os valores de  $a^*$  estavam compreendidos

entre -1 e -2 nas 2 primeiras semanas, porém, na terceira já se apresentaram positivos, exceto pela amostra “controle”. Da quinta à nona semana, todos os valores de  $a^*$  foram positivos (indicando tonalidade rósea), com destaque para a amostra “controle” que apresentou média de 6,8; enquanto as amostras submetidas ao CO<sub>2</sub> em fase densa e pasteurização térmica apresentaram médias de 2,37 e 1,71; respectivamente. A autora observou que estes valores eram esperados, considerando que todas as amostras de água de coco se apresentaram com coloração rósea ao final da estocagem e algumas amostras apresentaram coloração rósea logo após o primeiro dia de estocagem.

### **3.3 Enzimas Presentes na Água de Coco**

A estabilidade das delicadas estruturas das enzimas é mantida por meio de diferentes interações como pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals, ligações covalentes e interações eletrostáticas na cadeia proteica (determinada pela sequência de aminoácidos) e entre a cadeia proteica e o solvente ao redor. Tais interações podem ter seu equilíbrio perturbado por mudanças em fatores externos, como pH, pressão e temperatura, levando a um possível desdobramento e/ou desnaturação da cadeia de peptídeos (HENDRICKX, 1998; TAUSCHER, 1995, MESSENS et al., 1997 citados por CHAKRABORTY et al., 2014).

Segundo Einenmenger; Reyes-de-Corcuera (2009), as mudanças na velocidade de reações catalisadas por enzimas podem ser classificadas em modificações diretas na estrutura enzimática; modificações dos mecanismos de reação e, em modificações nas propriedades físicas (pH, densidade, viscosidade), que afetam a estrutura enzimática.

A atividade de uma enzima pode ser determinada a partir da medição da quantidade de substrato consumido ou de produto formado na reação catalisada, embora haja aumento proporcional do consumo de substrato em relação à formação de produto. Entre os métodos utilizados estão medidas de viscosidade, pH, condutividade, fluorescência e absorvância, sendo esta última amplamente utilizada, pois as transformações químicas geradas na conversão de substratos em produtos catalisadas por enzimas geram mudanças nas propriedades ópticas do sistema. Além disso, análises espectrofotométricas são simples e geram resultados rápidos, além de requererem apenas um equipamento (JOHN, 1993; MATHEWSON, 1998; TIPTON, 1993).

Polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) estão entre as principais enzimas responsáveis pela deterioração da água de coco. Ambas catalisam a oxidação de compostos

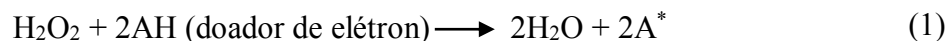
fenólicos naturalmente presentes, sendo os produtos dessas reações responsáveis por alterações na cor e nas características sensoriais e nutricionais (DUARTE et al., 2002; ROSENTHAL et al., 2002). (Campos, 1993) investigou a atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase na água de coco, variando o pH de 3,5 a 8,5. A atividade de cada enzima (PFO e POD) não apresentou alteração em comparação à atividade inicial até pH 5,5 para o qual foi apresentada atividade relativa de  $100 \pm 1,0\%$  para POD e  $94,1 \pm 1,0\%$  para PFO e, em pH 6,0, de  $77,0 \pm 0,2\%$  para POD e  $100,0 \pm 0,3\%$  para PFO, foram então estabelecidos valores de pH ótimo de 6,0 e 5,5, respectivamente, para as enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Para determinação da temperatura ótima o autor (Campos, 1993) investigou temperaturas entre 5 e 70°C, temperatura na qual não foi observada atividade enzimática de PFO e POD na água de coco. As temperaturas consideradas ótimas foram 25°C para PFO e 35°C para POD, enquanto que a 5°C, as atividades enzimáticas observadas em relação à atividade inicial foram  $46,0 \pm 1,5\%$  para PFO e  $39,0 \pm 0,9\%$  para POD.

### 3.3.1 Peroxidase

As peroxidases são enzimas compreendidas no grupo das oxireductases, bastante relacionadas à qualidade de alimentos processados, especialmente devido à sua conhecida disponibilidade e estabilidade. Podem estar presentes em animais, microrganismos e plantas (ROBINSON, 1991; YUAN; JIANG, 2003). A peroxidase de vegetais é classificada como uma hemoproteína (possui grupo prostético heme-protoporfirina IV) glicosilada, monomérica, com peso molecular de 45 a 50 kDa; e utiliza peróxido de hidrogênio para oxidar uma série de compostos orgânicos e inorgânicos, como monofenóis (guaiacol), difenóis e ácido ascórbico (DAMORADAN et al., 2010; ROBINSON, 1991).

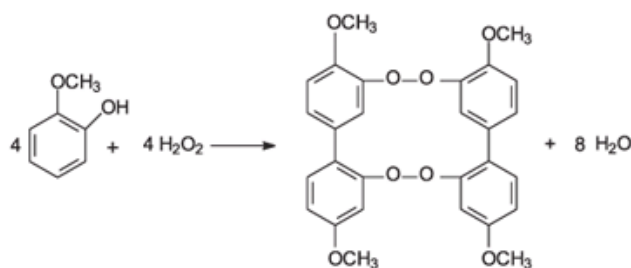
As reação catalisada pelas peroxidases consiste na oxidação de um substrato doador de elétron (AH), cujo agente oxidativo é geralmente o peróxido de hidrogênio, resultando em liberação de água e de radicais livres ( $A^*$ ), que reagem não enzimaticamente, formando diversos compostos, como o tetraguaiacol. Existe uma série de substratos (AH) naturalmente presentes nos tecidos das plantas, facilmente oxidados por pequenas quantidades de  $H_2O_2$ . Os substratos típicos incluem fenóis aromáticos, ácidos fenólicos, indóis, aminas e sulfonatos (ROBINSON, 1991). A Equação 1 apresenta a reação geral de oxirredução catalisada pela enzima peroxidase (DAMORADAN et al., 2010).





Quando o doador de elétron for o ácido ascórbico,  $2\text{A}^*$  será um mol de ácido ascórbico e um mol de ácido dehidroascórbico e, quando AH for guaiacol (incolor), o produto será o tetraguaiacol (composto colorido), formado por meio da polimerização de  $2\text{A}^*$ . A reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio catalisada pela peroxidase está esquematizada na Figura 1, sendo que o composto colorido formado (tetraguaiacol) serve como base para a determinação colorimétrica da atividade da peroxidase (JOHN, 1993).

Figura 1 - Reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio catalisada por peroxidase.



Fonte: (ZERAİK et al., 2008).

De acordo com Yua e Jiang (2003), os primeiros estudos de peroxidase consistiram da associação de guaiacol às mudanças de cor em vegetais, que ocorriam quando se adicionava peróxido de hidrogênio em um extrato vegetal, que, como se sabe, continha peroxidase.

A peroxidase pode existir em cinco estados de oxidação e catalisar uma quantidade indefinida de reações, características que a tornam uma enzima cuja versatilidade não foi superada. Ademais, as peroxidases existem sob a forma de diversas isoenzimas (ROBINSON, 1991). Segundo Damoradan et al. (2010), as isoformas podem ser classificadas em ácidas, neutras ou alcalinas com base no ponto isoelétrico. A peroxidase mais amplamente estudada, por possuir características aplicáveis às demais, é a peroxidase-C neutra de raiz de rábano ou Horseradish peroxidase (HRP), cuja nomenclatura oficial (EC 1.11.1.7, doador:  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidorreductase) é definida pela Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do nome em inglês “International Union of Biochemists and Molecular Biologists).

O pH ótimo das peroxidases depende sempre do substrato e está geralmente compreendido entre 4,0 e 6,0 para peroxidase de plantas. A temperatura ótima varia entre 40 e 55°C, porém a estabilidade térmica é elevada, característica geralmente atribuída a propriedades como o grupo prostético heme, as pontes dissulfeto e a presença de dois moles de  $\text{Ca}^{2+}$  que participam das pontes salinas. O aumento da força iônica e a redução do pH em intervalos de 3 a 7 causam a redução da estabilidade térmica, porém, em intervalos de pH de 5,5 a 8,0, há a regeneração da peroxidase após processamento térmico por curtos períodos, como em branqueamento. Aquecimentos por períodos maiores evitam a regeneração devido a reações covalentes e mudanças conformacionais mais extensas, mas ainda assim, as peroxidases são um problema, pois o grupo heme liberado na inativação pode participar das reações oxidativas não enzimáticas, processo relacionado à causa de sabores indesejáveis nos vegetais enlatados (DAMORADAN et al., 2010).

O estudo da presença de enzimas em água de coco teve em Campos (1993) um dos trabalhos pioneiros, que estudou a influência de diferentes tratamentos térmicos e químicos (como ácido cítrico e ascórbico em diferentes concentrações), determinando os níveis em que a redução máxima da atividade enzimática de polifenoloxidase e peroxidase pudesse ser alcançada sem alteração da aceitação sensorial, por meio de escala hedônica, com pontuação de 1 a 7, para o grau de perda de sabor em relação à amostra *in natura*. Estudos de cinética da inativação enzimática da peroxidase (FONTAN, 2012) também foram realizados indicando forte resistência térmica desta enzima, porém estudos cinéticos envolvendo as duas enzimas encontraram maior resistência térmica da polifenoloxidase (MURASAKI, 2005; TAN, 2014). Por outro lado, a enzima peroxidase apresentou maior resistência ao processo de homogeneização a alta pressão quando comparada à polifenoloxidase (DOSUALDO, 2005).

### **3.3.2 Polifenoloxidase**

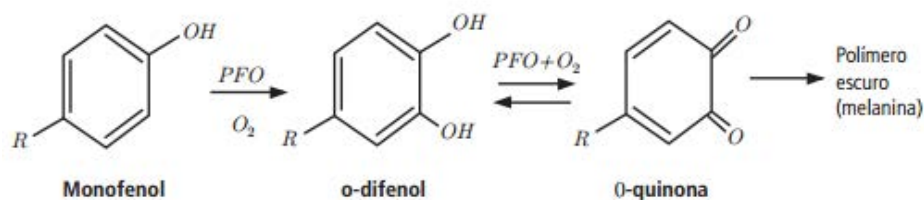
As polifenoloxidases (PFO), principais enzimas responsáveis pelo escurecimento enzimático em frutas, catalisam a oxidação dos fenóis naturalmente presentes formando quinonas (TORALLES et al., 2008).

Polifenoloxidase é uma enzima do grupo das oxiredutases, contendo cobre como grupo prostético, inicialmente descoberta em cogumelos em 1856. O termo polifenoloxidase é genérico, tendo recebido diversas outras denominações como cresolase, catecol oxidase/catecolase, *o*-difenoil oxidase e tirosinase (DAMORADAN et al., 2010). A

variabilidade com respeito à nomenclatura deve-se, em grande parte, à mistura da ação catalítica deste grupo de enzimas, podendo ser encontradas em plantas (cresolase), animais (tirosinase) e microrganismos (lacase) e usar diferentes substratos, os quais determinam sua forma de atuação (ANISZEWSK et al, 2008 citado por VANZELA et al., 2014).

As monofenoloxidasas, comumente representadas pelas cresolases, atuam por meio da hidroxilação de monofenóis (*p*-cresol) a difenóis (catecol). Os difenóis são então oxidados e formam-se as quinonas (atividade catecolase). As enzimas que realizam essas duas reações (tirosinase) são as mais importantes, visto que algumas (lacase) apenas oxidam os difenóis às quinonas correspondentes. Por sua vez, as quinonas condensam-se e reagem não enzimaticamente com outros compostos, como aminoácidos ou compostos fenólicos, para produzir polímeros escuros (CARVALHO et al., 2006; DAMORADAN et al., 2010; VANZELA et al., 2014; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981 citado por TORALLES et al., 2008). As etapas do mecanismo de ação da polifenoloxidase estão representadas esquematicamente na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo químico para ação da polifenoloxidase



Fonte: (ESCURECIMENTO, 2015)

O substrato (catecol) está presente nos vacúolos enquanto a enzima (catecolase) está no citoplasma, sendo sua ação catalítica desencadeada, geralmente devido a danos mecânicos nos vegetais, que a expõem ao contato com oxigênio e substratos (WEEMAES et al., 1998; VANZELA et al., 2014). Na água de coco, o contato com o oxigênio se inicia a partir da abertura do fruto, pois a água de coco possui enzimas e substratos, além de entrarem em contato com as fibras provenientes da casca que possuem taninos, podendo ocorrer reações indesejáveis (ROSA, ABREU; 2000).

Weemaes et al. (1998) extraíram polifenoloxidase de maçãs, abacates, uvas, peras e ameixas para a caracterização e avaliação da cinética de inativação térmica, considerando

temperaturas entre 60 e 85°C. A maior atividade de polifenoloxidase foi observada para abacate, seguidas de atividade de ameixas, maçãs, uvas e peras. Para todos os extratos, a máxima atividade da polifenoloxidase ocorreu em pH neutro (pH 6-7). Cinética de primeira ordem para a inativação térmica foi observada em todos os extratos, sendo a resistência da polifenoloxidase à inativação térmica dependente de sua origem, a exemplo da polifenoloxidase de uva, mais sensível ao calor. Para abacate e ameixa, os autores encontraram isoenzimas, com pontos isoelétricos, respectivamente, entre 4,6 e 4,7; e entre 4,8 e 5,2.

### **3.3.3 Aspectos tecnológicos para inativação de enzimas**

Visando à obtenção de produtos saudáveis, seguros e com qualidade sensorial, diversos estudos têm sido realizados buscando encontrar as melhores técnicas para inativação das enzimas presentes em frutas e produtos de frutas, pois estas são as principais responsáveis por sua vida útil reduzida, como no caso da água de coco, que pode apresentar escurecimento imediatamente após a extração (MAGALHÃES, 2005; FONTAN, 2012).

As condições utilizadas para cada processo quando se objetiva inativação enzimática dependem do tipo de produto. A primeira consideração deve ser sobre as condições ótimas em que as enzimas atuam, principalmente pH e temperatura. O pH depende do substrato e para as enzimas consideradas pode variar entre 4,0 e 7,0; a temperatura ótima de ação da peroxidase e da polifenoloxidase varia de 25 a 55°C, mas a inativação completa pode requerer exposição por vários minutos a 80-100°C, principalmente devido à estabilidade térmica da peroxidase, que pode ainda ter o contato entre enzima e substrato facilitado pelo aumento da temperatura (DAMORADAN et al., 2010). Fontan e colaboradores (2012) estudaram a resistência da peroxidase a tratamentos térmicos, verificando que para a inativação da peroxidase de água de coco a energia de ativação foi de 332,3 kJ/mol na faixa de temperatura estudada (75 a 95°C). Demonstraram, ademais, que o aumento da temperatura, de 75 para 95°C, acarretou na redução do tempo necessário para a inibição enzimática em 90%, respectivamente, de 833,3 para 1,63 minutos.

O escurecimento enzimático pode ser prevenido pelo uso de diversas técnicas, como tratamento térmico (amplamente utilizado em sucos de frutas), remoção de oxigênio, acidificação (quando aceitável para o produto e suas características sensoriais), utilização de ácido ascórbico e sulfitos. Também se utilizam quitosana, ciclodextrinas e polivinil

pirrolidona (PVP) com o intuito de complexar compostos fenólicos, limitando a disponibilidade de substrato (DAMORADAN et al., 2010; RAMÍREZ et al., 2003).

### **3.4 Métodos de Conservação da Água de Coco**

Entre os métodos mais comuns para conservação de água de coco encontram-se a pasteurização, a esterilização, o resfriamento e o congelamento, porém o desenvolvimento de técnicas que mantenham as características nutricionais e sensoriais na industrialização da água de coco revela grande importância para garantir o mercado (CARVALHO et al., 2006). Com o objetivo de reduzir a dependência do calor como método de conservação, novos processos têm sido propostos visando manter as características próximas às dos alimentos naturais e vida de prateleira suficiente para distribuição e armazenamento doméstico antes do consumo, como aquecimento dielétrico, processamento com alta pressão, ultrassom, embalagem em atmosfera modificada, microfiltração, embalagem ativa e ozônio (FELLOWS, 2006).

#### **3.4.1 Resfriamento**

Por definição do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009), água de coco resfriada é o “produto envasilhado logo depois de ser extraído e, sem descontinuidade, submetido a um processo adequado de resfriamento”. Para obtenção de água de coco refrigerada, após as etapas básicas como extração (manual ou com dispositivos a vácuo), filtração (para remover resíduos principalmente provenientes da casca) e pré-resfriamento (à temperaturas entre 5 e 10°C), o envase é realizado em garrafas plásticas de polipropileno ou PET (polietileno tereftalato), seguido da armazenagem sob refrigeração (4 a 8°C). Nestas condições, a vida de prateleira deste produto é de cerca de 3 a 5 dias (CABRAL et al., 2005).

#### **3.4.2 Congelamento**

O congelamento, geralmente realizado em câmaras frigoríficas a -20/-18°C, por 8 a 12 horas, permite um aumento na vida de prateleira da água de coco para 3 a 6 meses, devido à sua capacidade de reduzir a velocidade das reações, retardando a atuação de enzimas naturalmente presentes, e o crescimento de possíveis microrganismos provenientes de condições inadequadas durante o tratamento. Para garantir maior segurança ao produto, a

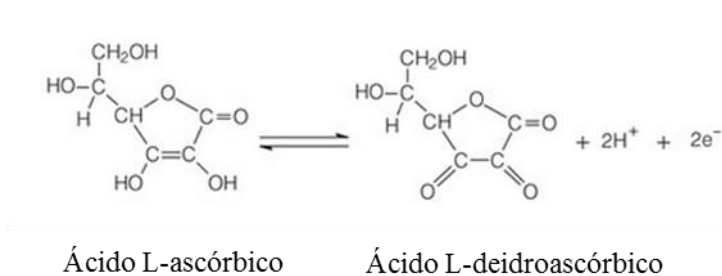
pasteurização tem sido recomendada associada ao congelamento, visto que este apenas retarda as reações (ROSA; ABREU, 2000).

Em estudo realizado por Naozuka (2004) sobre influência de processos de conservação na distribuição de espécies elementares em água de coco, amostras de água de coco foram submetidas a congelamento a  $-30^{\circ}\text{C}$ , estocadas por 0, 30 e 120 dias; e, para tais períodos, foram analisadas com relação aos seguintes elementos minerais: Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn. A autora observou diferenças com relação à distribuição de todos os elementos após 30 e 120 dias de estocagem sob congelamento, com aumento de alguns elementos (Al, Cu e Fe) e redução dos demais. A possível explicação para essas alterações foi atribuída à ruptura das membranas celulares e desnaturação de proteínas, com exposição dos sítios ativos que podem interagir ou liberar elementos minerais (TRESSLER et al., 1968 citado por NAOZUKA, 2004).

### 3.4.3 Adição de ácido ascórbico

A adição do ácido ascórbico, comum na indústria de processamento de frutas, ocorre com diversos objetivos, entre eles, de restabelecer o valor nutricional perdido durante processamento e de melhorar a cor e a palatabilidade, por meio da prevenção ou inibição do escurecimento provocado pela oxidação, seja ela provocada ou não por enzimas (TORALLES et al., 2008). O potente efeito antioxidante do ácido ascórbico decorre da ação direta e competitiva com o oxigênio que seria utilizado para demais reações oxidativas, como a oxidação enzimática. O produto formado da oxidação do ácido L-ascórbico é o ácido dehidroascórbico (ARAÚJO, 2006 citado por DAIUTO, 2011), com mecanismo apresentado esquematicamente na Figura 3.

Figura 3 - Oxidação do ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico.



Fonte: (FOGAÇA, 2014)

O ácido ascórbico é muito susceptível à oxidação, sendo esta catalisada por íons metálicos de transição, como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . O produto da degradação do ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico (DHAA), apresenta atividade de vitamina C, sendo por isso determinado nas análises de vitamina C mais gerais, como por titulação com 2,6-dicloroindofenol (DCFI). O DHAA, no entanto, pode ser hidrolisado, ocorrendo formação de ácido 2,3 dicetogulônico; bem como pode sofrer oxidação e polimerização, formando pigmentos escuros (DAMORADAN et al., 2010).

A importância da adição de ácido ascórbico em água de coco foi comprovada por Campos (1993), que demonstrou a completa inibição das enzimas polifenoloxidase e peroxidase presentes na água de coco por meio de adição de ácido ascórbico (20 mg/100 mL), sem alteração da aceitação sensorial (CAMPOS, 1993). Segundo a FAO (2000), citado por Sousa (2006), para evitar o desenvolvimento de coloração rósea da água de coco submetida ao processo de ultrafiltração, recomenda-se a dosagem de 15 mg/100 mL.

Purkayastha et al. (2012) utilizaram o processo de microfiltração para água de coco associado com a adição de ácido ascórbico e armazenamento a 4°C por 28 dias, e observaram que as amostras com adição de ácido ascórbico na proporção de 25 mg/100 mL apresentaram média de notas de 7,20 para a aceitação global, determinada por análise sensorial baseada em escala hedônica de 9 pontos (de “desgostei extremamente” a “gostei extremamente”); a nota obtida foi inferior à nota atribuída para a água de coco sem adição de ácido ascórbico, para a qual a média foi de 8,80. No entanto, por não ter sido observada diferença estatisticamente significativa, os autores consideraram que a aceitação sensorial não foi prejudicada e mantiveram a dosagem de ácido ascórbico em 25 mg/100mL, devido aos benefícios proporcionados como o de ter sido possível retardar por 21 dias a variação de cor. Apesar dos efeitos benéficos com relação à variação de cor, a adição de ácido ascórbico não apresentou efeito para a estabilidade microbiológica da água de coco.

Em pesquisa realizada por Abreu e Faria (2007), os resultados mostraram que a adição de ácido ascórbico (20 mg/ 100 mL) contribuiu para o maior consumo do oxigênio dissolvido em água de coco, prevenindo reações oxidativas, inclusive as enzimáticas. Sem adição de ácido ascórbico, a água de coco, mesmo após ter sido submetida ao tratamento térmico entre 138 e 144 °C por 10 segundos, apresentou coloração rosada. Abreu (2005) observou que para água de coco tratada em temperaturas de 135 a 144°C por 10 segundos e estocada a temperatura ambiente durante 120 dias, a amostra na qual a degradação de ácido ascórbico foi

mais acentuada (de 130,29 para 1,84 mg de ácido ascórbico/100 mL), também houve pequena redução de pH (de 5,05 para 5,03) e aumento de acidez (de 59,86 para 64,66 mg de ácido cítrico/100 mL), fenômenos os quais o autor relacionou com a formação dos compostos ácidos (ácidos oxálico, tartárico e furóico) resultantes da hidrólise do ácido dehidroascórbico.

#### **3.4.4 Tratamento térmico**

O processamento térmico, um dos métodos de preservação mais utilizados devido à sua capacidade de inativar microrganismos e enzimas (AGUIAR et al., 2012), exerce grande influência sobre as características sensoriais e, por essa razão, muito se tem pesquisado sobre a cinética de inativação térmica, tanto enzimática quanto microbiana, em busca de determinação de níveis de temperatura e tempo que promovam o efeito microbiológico e bioquímico desejado sem alterar o sabor do produto. O conhecimento das características das enzimas presentes e composição do produto é necessário para que sejam determinados parâmetros adequados de tratamento térmico, evitando o aquecimento excessivo e aumento de custo de produção (TAN, 2014).

Campos (1993) verificou que o tratamento térmico necessário para inativar as enzimas presentes na água de coco afeta a qualidade sensorial do produto, visto que os valores de tempo e temperatura encontrados pelo autor, sem comprometer a aceitação sensorial do sabor, não foram suficientes para inibição enzimática; a 90°C, a partir de 130 segundos de tratamento houve redução significativa da aceitação sensorial, porém foram necessários tempos de 550 e 300 segundos para inativação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente, demonstrando a necessidade dos tratamentos auxiliares, como o químico, a exemplo da adição de ácido ascórbico. No mesmo trabalho, a combinação de tratamento térmico (90°C/45 segundos) com adição de ácido ascórbico (10 mg/100 mL) e metabissulfito de potássio (2,5 mg/100 mL) resultou em completa inibição enzimática de ambas enzimas, além de haver mantido a aceitação sensorial em comparação à amostra de água de coco não tratada.

Murasaki-Aliberti e colaboradores (2009) avaliaram a cinética de inativação térmica para polifenoloxidase e peroxidase de água de coco variando a temperatura em três níveis (75, 80 e 85°C), com oito tempos de retenção diferentes (20, 40, 60, 80, 100, 200, 350 e 500 segundos). A água de coco não processada apresentou atividade para peroxidase variando de  $4,97 \cdot 10^{-7}$  a  $2,34 \cdot 10^{-5} \text{ U s}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ }^\circ\text{Brix}^{-1}$  e para polifenoloxidase, de  $5,61 \cdot 10^{-7}$  a  $1,32 \cdot 10^{-5} \text{ U s}^{-1}$



mL<sup>-1</sup> °Brix<sup>-1</sup>; com teor de sólidos solúveis médio de 4,4 ±1,2°Brix. Para cada uma das enzimas estudadas, os autores encontraram duas isoenzimas, sendo uma fração termossensível e outra fração termorresistente. Para polifenoloxidase, o tempo de redução decimal à temperatura de referência (D<sub>86,9°C</sub>) foi de 6,0 segundos na fração termossensível (88%), com aumento para 11,32 minutos na fração (12%) termorresistente. Os autores (MURASAKI-ALIBERTI et al., 2009) encontraram menor termorresistência para a enzima peroxidase da água de coco, para a qual a fração termossensível representou 95% do total da enzima, com D<sub>86,9°C</sub> de 8,6 segundos e a fração termorresistente (5%), apresentou D<sub>86,9°C</sub> de 26,3 minutos. Diante dos parâmetros cinéticos obtidos, os autores consideraram que, a 86,9°C e pequeno tempo de retenção (máximo 8,6 segundos), foi possível inibir pelo menos 90% das enzimas presentes na água de coco.

Murasaki (2005) estudou o efeito do processamento térmico contínuo a 90°C e diferentes tempos de retenção (80, 120, 180 e 200 segundos) sobre a atividade residual das enzimas polifenoloxidase e peroxidase de água de coco, posteriormente estocada em duas condições diferentes, sob refrigeração (10°C) e sob congelamento (-30°C). A máxima inibição enzimática observada foi 90 e 97%, respectivamente, para polifenoloxidase e peroxidase, a 90°C/200 segundos. A autora sugere a enzima polifenoloxidase como indicador da eficiência do processamento da água de coco, pois foram observadas tanto a maior resistência ao processamento térmico quanto a menor estabilidade durante a estocagem sob congelamento.

No estudo de Murasaki (2005), a coloração rosada foi observada no 3º dia de estocagem sob refrigeração da água de coco processada a 90°C/120 segundos, com atividade da polifenoloxidase de 74% e da peroxidase de 136%, relativas à atividade inicial. As amostras de água de coco submetidas a processamento térmico contínuo a 90°C por 200 segundos e estocadas sob refrigeração em garrafas não completamente cheias, apresentaram coloração rosada a partir do 6º dia de estocagem; enquanto que em garrafas completamente cheias a coloração rosada não foi observada até o 22º dia de estocagem.

Ao analisar as diferentes formas de conservação de água de coco, sugere-se a esterilização como a forma mais adequada de processamento para estocagem à temperatura ambiente, visto que o pH natural possibilita crescimento de esporos bacterianos anaeróbios. O processo UHT (*ultra high temperature*), no qual temperaturas na faixa de 140°C são empregadas, em torno de 10 segundos, garante uma condição de esterilidade comercial (ROSA; ABREU, 2000; ABREU; FARIA, 2007). Por outro lado, deve-se ressaltar que,

apesar da segurança microbiológica e extensão da vida útil proporcionadas por processos térmicos como o de esterilização a ultra alta temperatura (UHT), esses também são relacionados a alterações indesejáveis em propriedades nutricionais e sensoriais, como cor, aroma, textura e sabor. Estes efeitos têm atraído a atenção dos fabricantes para que mantenham as características naturais de produtos como a água de coco (DAMAR, 2006; TAN, 2014). Neste contexto, o uso de métodos físicos, como a aplicação da alta pressão, apresenta grande potencial por atender à busca dos consumidores por produtos tratados em condições mais brandas (HENDRICKX; KNORR, 2001).

### 3.5 Alta Pressão

Embora tenha sido inicialmente investigada há mais de um século, a utilização do processamento por alta pressão no processamento de alimentos tem sido observada de forma mais efetiva nos últimos anos. Em 1990, inicialmente no Japão, passaram a ser comercializados produtos processados por alta pressão, tecnologia que se mostrou bem aceita pelos consumidores, com rápida expansão para Europa e Estados Unidos (LEWARD, 1995; ROSENTHAL et al., 2014). Em maio de 2001, a Comissão Europeia autorizou o uso de preparações de frutas pasteurizadas por tratamento sob alta pressão após a comprovação por parte da comissão de que o tratamento não trazia efeito negativo à saúde da população. A primeira avaliação reportada por tal autoridade concluiu que o tratamento sob alta pressão (800 MPa por 6 minutos a 20°C) poderia ser seguramente utilizado, eventualmente substituindo o processo de pasteurização térmica geralmente empregado (CULLEN et al., 2012). Em 2010, a indústria de alimentos reportou uma produção anual de mais de 200.000 toneladas de produtos submetidos à alta pressão, em que produtos vegetais, sucos e bebidas somam 45% (ORTEGA-RIVAS, 2012). Na Tabela 3 estão dispostos alguns exemplos de alimentos, os países em que eram produzidos e ano em que foram lançados.

Tabela 3 - Exemplos de alimentos processados por alta pressão

País	Ano	Produto
Japão	1993	Vinho de arroz
México	2000	Sucos cítricos e smoothies
Líbano	2001	Sucos de frutas
República Tcheca	2004	Sucos de cenoura, maçã, brócolis e beterraba
Estados Unidos	2005	Sucos de maçã, morango e gengibre
Nova Zelândia	2009	Colostro

Fonte: (TORNELLO, 2011 citado por GUPTA; BALASUBRAMANIAM, 2011).

Segundo Campos, F. et al. (2003), quando se emprega a tecnologia de alta pressão, dois métodos podem ser utilizados: o método contínuo (direto), também denominado homogeneização (HAP-Homogeneização à Alta Pressão) e o método por batelada, denominado alta pressão hidrostática (APH), no qual um fluido transfere a pressão ao alimento previamente acondicionado, preferencialmente utilizando-se água como meio de transmissão de pressão.

A utilização do método de alta pressão hidrostática concentra a maior parte dos estudos e possui como grande vantagem o risco mínimo de contaminação pós-processamento, uniformidade de tratamento em todo o alimento e fácil limpeza por não haver contato direto entre produto e equipamento. Como principais limitações, apresenta a pequena flexibilidade para escolha da embalagem, que deve ser flexível ou semi-rígida e, o elevado custo do equipamento e processamento por batelada (FELLOWS, 2006).

Azeredo (2012) apresenta como uma das limitações ao uso de alta pressão a maior resistência dos esporos (alguns até 1200 MPa), estando o *Clostridium botulinum* entre os mais resistentes e pode apresentar ainda a limitação da atividade residual de enzimas, que pode comprometer a qualidade e a vida útil. No caso de pressões que desnaturam proteínas, podem ocorrer alterações desejáveis e/ou indesejáveis na textura em certos níveis de pressão. Essas limitações incorrem na necessidade da utilização de outros métodos combinados com a alta pressão.

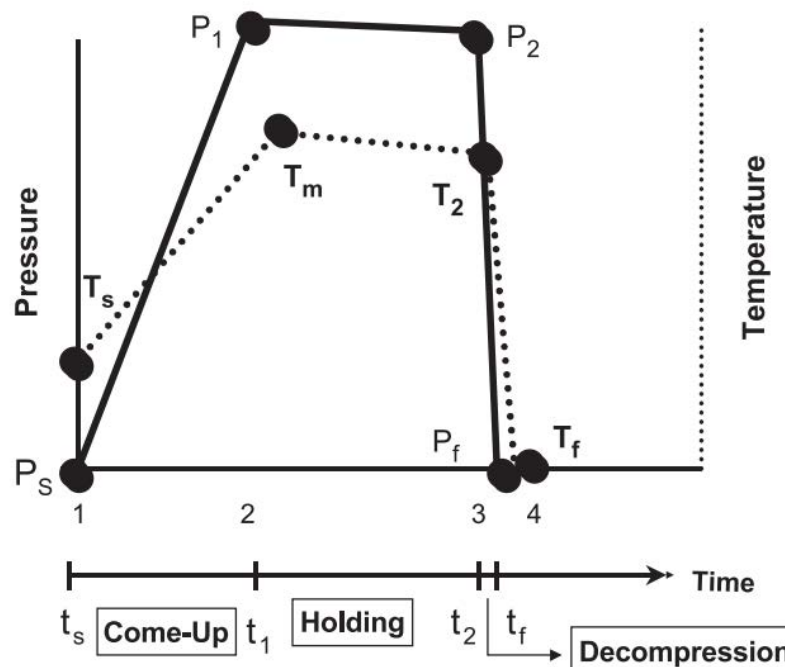
Por outro lado, à temperatura constante, o grau de ordenação das moléculas aumenta com o aumento da pressão, por esta razão deve-se considerar a possibilidade de reações sinérgicas ou antagônicas quando o processamento de alimentos combina pressão e aquecimento, visto que uma vez alcançada, a pressão desejada pode ser mantida por um longo período de tempo sem necessidade de fornecer qualquer energia adicional (HEREMANS, 1995 citado por GUPTA, BALASUBRAMANIAN; 2011).

Segundo Ortega-Rivas (2012), o processamento sob alta pressão hidrostática pode ser especificado por três parâmetros, temperatura, pressão e tempo de retenção ou exposição, que oferecem uma grande variabilidade para o delineamento do processo. A sequência da operação de um equipamento de alta pressão inicia-se com a introdução do alimento (pré acondicionado) a ser processado no vaso de pressão, seguido de pressurização do meio e do produto até o valor desejado. Após atingir a pressão desejada, esta permanece por tempo pré-

estabelecido, sofrendo, posteriormente, a despressurização, que representa o final do ciclo (GUPTA, BALASUBRAMANIAN; 2011).

Conforme observado esquematicamente na Figura 4, o processamento tem início sob pressão atmosférica ( $P_s$ ), a uma temperatura inicial ( $T_s$ ) que deve considerar o aumento de temperatura ( $T_m$ ) provocado durante o intervalo ou “come-up-time” ( $t_s-t_1$ ) de pressurização ( $P_s-P_1$ ). A pressão de processo é mantida ( $P_1-P_2$ ) em temperatura preferencialmente constante ( $T_m-T_2$ ) durante o tempo pré-estabelecido ( $t_1-t_2$ ) ou “holding time”; após esse período ocorre a despressurização ( $P_2-P_f$ ) com temperatura final ( $T_f$ ) inferior à observada durante o processamento. A despressurização (“decompression”) ocorre mais rapidamente ( $t_2-t_f$ ) do que a pressurização. Nos equipamentos comerciais típicos, geralmente, a pressurização ocorre a uma taxa de 5 MPa/s e a despressurização/descompressão acontece em torno de 20 MPa/s. A diferença entre a temperatura final ( $T_f$ ) e a inicial ( $T_s$ ) indica a perda de calor do processo, considerando o curto intervalo da despressurização (BALASUBRAMANIAM et al., 2004).

Figura 4 - Esquema gráfico para processamento a alta pressão, envolvendo as variáveis pressão, temperatura e tempo.



Fonte: (BALASUBRAMANIAM et al., 2004).

O tempo de retenção sob pressão de um alimento depende do tipo de alimento, da temperatura utilizada e do objetivo, como inativação enzimática, destruição de

microrganismos e alterações na textura. Produtos de frutas como geleias, caldas, sobremesas e sucos, a 20°C, geralmente são processados a pressões de 120 a 400 MPa, com tempos de retenção de 2 (para suco de tangerina por exemplo) a 30 minutos (PALOU et al., 1999). Por razões econômicas e para minimizar os efeitos da temperatura na qualidade dos alimentos, o tempo recomendado é de até 10 minutos (GUPTA, BALASUBRAMANIAM; 2011).

Segundo Campos, F. et al. (2003), são considerados dois princípios para o estudo da alta pressão hidrostática: princípio de Le Chatelier e o princípio isostático.

- princípio de Le Chatelier: estabelece que, quando um sistema em estado de equilíbrio dinâmico for perturbado por alguma força externa, ele será deslocado para uma nova posição de equilíbrio para minimizar o efeito desta força. Em se tratando de pressões elevadas, que favorecem mudanças que reduzem o volume geral do sistema ou vice versa, estas alteram o equilíbrio das reações na direção do menor volume (CHEFTEL, 1995 citado por CAMPOS, F. et al., 2003; COELHO, 2002; ORTEGA-RIVAS, 2012). No caso de biopolímeros, o desdobramento de suas cadeias dá origem a um volume livre, o qual espera-se que seja reduzido com o aumento da pressão (HEREMANS et al., 1999).

– princípio isostático: há uma distribuição uniforme e quase instantânea da pressão no material ou produto pré-acondicionado sendo processado. Essa distribuição ou pressurização independe da forma e do volume da amostra, o que não ocorre em tratamentos térmicos (CHEFTEL, 1995 citado por CAMPOS, F. et al., 2003; DARROS-BARBOSA, 2003). Os efeitos da temperatura ocorrem através de um aumento de energia cinética, que depende da forma e composição do produto, bem como através do volume livre; assim, há mais facilidade em interpretar os efeitos da pressão do que os efeitos da temperatura. A energia armazenada na compressão de uma dada quantidade de água líquida a 1000 MPa, por exemplo, é muito menor do que no aquecimento a 100°C (HEREMANS et al., 1999).

Há, ainda, uma terceira consideração sobre o processamento em altas pressões, o aquecimento causado pela compressão ou aquecimento adiabático, efeito explicado pela Primeira Lei da Termodinâmica, que consiste em variação de temperatura provocada pelo aumento da energia interna em um sistema fechado (representado pela câmara de compressão). O aquecimento adiabático da água varia de 2 a 5°C a cada aumento de 100 MPa na pressão (HEREMANS et al., 1999). O aquecimento adiabático é um efeito inevitável no

processamento a alta pressão e, por esse motivo, pode ser utilizado como coadjuvante para inativação enzimática e para a destruição de microrganismos (BUZRUL et al., 2008).

Segundo Buzrul et al. (2008), para se determinar o aquecimento associado com a compressão de uma amostra pré-acondicionada, a medida da temperatura do líquido no interior da embalagem pode resultar em diferentes valores de aquecimento devido à compressão da amostra na embalagem e do fluido de transmissão de pressão, considerando as diferentes propriedades físicas dos dois líquidos. Porém, os fluidos alimentícios estudados pelo autor (suco de laranja e leite) apresentam elevado conteúdo de água e o comportamento térmico sob pressão foi bastante similar ao da água, sugerindo que as propriedades termodinâmicas da água podem ser usadas com boa aproximação para se estimar o aumento de temperatura de alimentos com alto teor de água.

### **3.5.1 Efeitos da alta pressão sobre enzimas**

O conhecimento mais aprofundado dos efeitos da alta pressão nas moléculas de proteína pode auxiliar a compreensão sobre seus efeitos na inativação enzimática. A estrutura biologicamente ativa de uma determinada proteína se mantém estável em condições específicas de temperatura, pressão e composição de solvente; fora dessas condições, pode ocorrer desdobramento ou desnaturação, que podem, ainda, dar lugar a uma agregação ou formação de gel (HEREMANS et al., 1999).

Da mesma forma que são encontrados diversos microrganismos e enzimas termorresistentes, também existem as barorresistentes (HENDRICKX et al., 1998). Os estudos sobre enzimas barofílicas aumentaram após descoberta do vulcão de Galápagos há aproximadamente quarenta anos, pois nesse vulcão foram encontrados ecossistemas inteiros em condições extremas (até 120 MPa, 2 a 100°C, ausência de luz solar e escassez de nutrientes orgânicos). Foram, então, possibilitadas descobertas de diversas aplicações de alta pressão na modificação e indução de enzimas (ABE; HORIKOSHI, 2001; EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009).

Sob alta pressão, a atividade das enzimas pode sofrer inativação ou ativação, dependendo da pressão aplicada e das propriedades dos alimentos. Embora o alto potencial da tecnologia de alta pressão tenha sido comprovado no contexto da inativação de enzimas em sucos e purês de frutas, prever ou generalizar o grau de inativação de uma enzima é muito difícil (BERMÚDEZ-AGUIRRE; BARBOSA-CÁNOVAS, 2011). Segundo os autores, não

há uma teoria geral que explique o fenômeno da inativação ou ativação enzimática. O que se sabe é que, com a utilização de alta pressão, ocorrem modificações nas membranas celulares e na interação enzima-substrato, que podem aumentar a estabilidade das enzimas.

Sob o ponto de vista termodinâmico, a pressão afeta as reações catalisadas por enzimas alterando as constantes de equilíbrio e de velocidade (LUDIKHUYZE et al., 2003) e, na maioria dos casos, o efeito da pressão nas taxas de reação obedece ao princípio de Le Chatelier. A Equação 2 descreve o efeito da pressão sobre a constante de velocidade de reação (EYRING; MAGEE, 1942 citado por EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009).

$$\ln k_0 = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT}P + \ln k_{P_0} \quad (2)$$

onde:  $k_0$  é a constante de velocidade de reação na pressão de referência ( $P_0$ );  $P$  é a pressão,  $T$ , a temperatura absoluta;  $R$ , a constante de gases ideais e  $\Delta V^\ddagger$  é o volume de ativação (que representa a dependência da taxa de reação com a pressão) e  $k$  é a constante de velocidade de reação.

Comparada à catálise química, para a reação enzimática é mais difícil fornecer um significado preciso para o volume de ativação, pois a pressão influencia diversos fatores que incluem a conformação enzimática, interações enzimáticas (interações iônicas, com o meio, com outras proteínas e com a água). Dependendo da reação ou modificação conformacional da enzima (que são dependentes da faixa pressão-temperatura), o  $\Delta V^\ddagger$  pode ser positivo, negativo ou eventualmente desprezível (MICHELS; CLARK, 1992 citado por EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009).

Proteínas desnaturadas por pressão e por temperatura apresentam diferenças que não se aplicam apenas à conformação das cadeias polipeptídicas, mas também às interações intermoleculares; as proteínas desnaturadas por temperatura apresentam extensivas pontes de hidrogênio, que por sua vez não são observadas na maioria das proteínas desnaturadas por pressão (HEREMANS et al., 1999). Considerando a habilidade dos grupos funcionais das proteínas em interagir com a água, em um estágio inicial da inativação térmica, a proteína perderia algumas moléculas de água essenciais e passaria por um rearranjo estrutural. Sob alta pressão, esse processo seria dificultado por meio do fortalecimento da hidratação, que protegeria a estrutura da proteína, prevenindo a inativação (MOZHAEV et al., 1996 citado por EISENMENGER, REYES-DE-CORCUERA, 2009). Em resumo, conforme exposto por

Heremans et al. (1999), em altas temperaturas, a pressão pode estabilizar a proteína contra a desnaturação térmica e, em baixas temperaturas, o aumento da temperatura pode estabilizar a proteína contra a desnaturação causada pela pressão.

O rompimento de membranas é um mecanismo também sugerido para explicar o efeito da alta pressão que provoca desnaturação de proteínas e destruição de microrganismos (CAMPOS, F. et al., 2003). A aplicação da pressão pode induzir a desnaturação, reversível ou irreversivelmente, com desdobramento parcial ou completo da estrutura nativa da enzima. Essa ação, eventualmente, conduz a alterações na atividade enzimática, visto que a especificidade da enzima está relacionada à estrutura de seu sítio ativo (CHAKRABORTY et al., 2014).

A alta pressão causa dissociação iônica das moléculas de água, conseqüentemente reduzindo o pH, e sabe-se que este parâmetro influencia fenômenos como crescimento de microrganismos, ativação enzimática e gelatinização (CHEFTEL, 1995; HOOVER et al., 1989, citado por GUPTA, BALASUBRAMANIAM; 2011).

Não apenas o nível de pressão do processamento, mas também o tempo de pressurização e de processamento podem influenciar a atividade enzimática, conforme demonstrado por Chakraborty et al. (2015) em um estudo sobre cinética de inativação de polifenoloxidase e peroxidase em purê de abacaxi, utilizando pressões de 200 a 600 MPa, temperaturas de 30 a 70°C e tempos de 1 segundo a 20 minutos. A máxima inibição térmica alcançada foi de 51,4% para polifenoloxidase e 53,3% para peroxidase, a 70°C/20 minutos. A elevação da pressão até 600 MPa, a 70°C/20 minutos, reduziu a atividade residual das enzimas a níveis próximos a 20% e manteve maior estabilidade de flavonoides e do ácido ascórbico. Os autores demonstraram que a estabilidade das enzimas é afetada pela despressurização e pelo tempo de alcance (CUT, da sigla em inglês “come-up-time”) da temperatura. Segundo Chakraborty et al. (2015), o aumento no tempo de pressurização aumenta a extensão da inativação, visto que o tempo de exposição da enzima ao estresse causado é maior. O aquecimento causado pela compressão auxilia a exposição/abertura da conformação enzimática iniciada pela pressão, o que pode resultar em um efeito sinérgico de pressão e temperatura na inativação enzimática.

Em ordem crescente de dificuldade de inativação, são apresentadas as seguintes enzimas: lipoxigenase, lactoperoxidase, pectinaesterase, lipase, fosfatase, catalase, polifenoloxidase e peroxidase (RASTOGI et al., 2007 citado por GUPTA;



BALASUBRAMANIAM, 2012). Estudos sugerem que, em decorrência da alta pressão, a atividade de enzimas monoméricas (massa molecular entre 13 e 50 kDa) seja estimulada enquanto para as oligoméricas (80-100 kDa) há uma inibição (DAMORADAN et al., 2010; PENNISTON, 1971 citado por EISENMENGER, REYES-DE-CORCUERA, 2009). As polifenoloxidasas são oligoméricas e as peroxidases monoméricas, conforme comprovou o estudo realizado por Duarte e colaboradores (1999) para determinação do peso molecular das enzimas oxidativas presentes na água de coco, obtendo o peso molecular de 73,8 kDa para a polifenoloxidase e, para a peroxidase, o valor estimado foi de 49,2 kDa. O peso molecular da peroxidase de água de coco foi também confirmado por Calvette (2007), após purificação e caracterização da enzima, que apresentou peso molecular entre 41 e 42 kDa.

Porém, há enzimas diméricas e tetraméricas reportadas como ativadas por pressão (MORILD, 1981 citado por EISENMENGER, REYES-DE-CORCUERA, 2009), como a polifenoloxidase de cogumelo reportada em estudo realizado por Gomes; Ledward (1996), com atividade residual de 140% (em relação à amostra não tratada), decorrente do tratamento a 400 MPa por 10 minutos e, mesmo após 800 MPa por 10 minutos, apresentou 60% de atividade residual. Essa fraca influência da pressão sobre a polifenoloxidase de cogumelo, com peso molecular de 119,5 kDa, foi recentemente confirmada por Yi et al. (2015), em estudo com pressões variando de 100 a 1600 MPa durante um minuto à 20°C, no qual foi obtida atividade residual próxima a 80% para pressão de 800 MPa. A menor atividade residual (0,8%) foi alcançada após a utilização da máxima pressão (1600 MPa). O aquecimento adiabático em pressões superiores a 1000 MPa foi considerado o principal fator da inativação.

Calvette (2007) estudou os efeitos do processamento de água de coco à alta pressão sobre as enzimas polifenoloxidase e peroxidase, variando a pressão em quatro níveis (0,1; 300; 500 e 800 MPa); a temperatura, em três níveis (20, 40 e 60°C) e o tempo, também em três níveis (30, 60 e 90 minutos). O uso de alta pressão a temperatura ambiente foi ineficaz para inativação de ambas enzimas. A inativação total da peroxidase (POD) ocorreu submetendo o produto a 800 MPa e 50°C, durante 30 min; e, para polifenoloxidase, as mesmas condições de temperatura e pressão foram aplicadas, porém o tempo necessário foi de 90 minutos para a inativação total.

### 3.5.2 Efeitos da alta pressão sobre nutrientes e características físico-químicas

Sánchez-Moreno et al. (2009) destacam haver efeitos positivos de tratamentos sob alta pressão para manutenção do conteúdo de nutrientes, sendo a vitamina C (ácido ascórbico e dehidroascórbico) frequentemente estudada para avaliar o efeito da alta pressão sobre nutrientes. A utilização de pressões de 400 a 900 MPa em fatias de peras resultou em uma retenção máxima de 82% do ácido ascórbico presente no ensaio a 900 MPa/20°C/5-10 minutos (QUAGLIA et al., 1996 citado por SÁNCHEZ-MORENO et al. 2009).

Em tratamento sob alta pressão (400-600 MPa/15 min/20°C), a capacidade antioxidante, o teor de ácido ascórbico e de carotenoides em purês de tomate e cenoura foram mais preservados se comparados ao tratamento térmico (70°C/2 minutos) (PATRAS et al., 2009 citado por GUPTA; BALASUBRAMANIAM, 2011).

Em pesquisa realizada por Keenan et al. (2012) com bebidas do tipo *smoothies* de frutas (morango, maçã, laranja e banana), foram avaliados dois tratamentos à alta pressão (450 MPa/5 minutos/20°C e 600 MPa/10 minutos/20°C) e um tratamento térmico (70°C/10 minutos). Os resultados indicaram que o teor de fenólicos totais (mg ácido gálico/100g) para os períodos de estocagem de 0,5 a 5 horas foi maior para o tratamento a 450 MPa em comparação com os demais tratamentos (amostra controle, amostra processada a 600 MPa e amostra submetida a tratamento térmico), demonstrando maior degradação dos compostos fenólicos em decorrência do tratamento térmico e da maior pressão. Segundo Dörnenburg; Knorr (1998) citado por Bermúdez-Aguirre e Barbosa-Cánovas (2011), a alta pressão promove permeabilização da célula podendo ocasionar em escurecimento enzimático quando o estresse promovido na célula for suficiente para liberar compostos fenólicos, os autores reforçam que a concentração de compostos fenólicos apresenta maior influência sobre o escurecimento enzimático do que a própria concentração de enzima polifenoloxidase,

### 3.5.3 Efeitos da alta pressão sobre microrganismos

O efeito da alta pressão sobre os microrganismos é comparável ao da pasteurização térmica e ambos são capazes de promover maior vida útil aos alimentos quando estes são mantidos sob refrigeração (DE HEIJ, 2003).

A capacidade da alta pressão em destruir microrganismos foi inicialmente demonstrada há mais de 100 anos; e poucos anos depois a estabilidade microbiológica de

leite, carne e produtos de frutas foi alcançada por meio da utilização de alta pressão (ROGER, 1895, HITE et al., 1899, 1914 citados por DARROS-BARBOSA, 2003).

Os mecanismos de ação da alta pressão na inativação de microrganismos são classificados em alterações nas membranas celulares, em efeitos nos processos bioquímicos e fisiológicos e em efeitos nos mecanismos genéticos (ORTEGA-RIVAS, 2012).

Estudos demonstraram que a alta pressão causa alterações na permeabilidade da membrana celular, acompanhadas de uma redução do seu volume interno. Assim, a utilização do processo isostático promove reduções de até 6 ciclos logarítmicos, a 410 MPa por 2 minutos, dependendo da natureza do microrganismo, sendo as leveduras particularmente sensíveis à alta pressão (BIGNON, 1997, citado por CAMPOS, F. et al., 2003).

Para estudar o efeito da alta pressão sobre microrganismos, no trabalho de Fonberg-Broczek et al. (1999) foram inoculadas soluções salinas tamponadas com diversos microrganismos, isoladamente, com população inicial de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/ mL. O tratamento a 500 MPa/10 minutos/20°C causou completa redução (6 a 7 ciclos logarítmicos) em *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Para esporos de *Bacillus cereus*, foi necessário o aumento de temperatura e pressão, uma vez que tratamentos a 800 MPa/10 minutos/20°C e 1000 MPa/10 minutos/20°C somente reduziram a população de microrganismos em um ciclo logarítmico. A completa redução da carga microbiana foi alcançada a 800 MPa/50°C/10 minutos.

Dosualdo (2007) avaliou o efeito do processo de homogeneização à alta pressão na redução da carga microbiana de água de coco, por meio de inoculação de culturas bacterianas (*Lactobacillus fructivorans*) até níveis máximos entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC/mL; e de inoculação de leveduras (*Saccaromyces cerevisiae*) até um nível entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/mL; as faixas estudadas de pH (4,5 a 6,0) e pressão (100 a 300 MPa) apresentaram, segundo o autor, alta eficiência na eliminação de leveduras, com reduções de mais de 5 ciclos logarítmicos para leveduras, em pressões entre 200 e 300 MPa e pH entre 4,5 a 6,0. Para as bactérias, foram obtidas contagens inferiores a 1 UCF/mL para os tratamentos em pressões de 250 e 300 MPa, indicando praticamente total destruição.

Para investigar o efeito da alta pressão sobre a flora microbiana natural da polpa de abacaxi, Marcellini (2006) realizou vários ensaios variando a pressão (300, 400 e 500 MPa), a temperatura (25, 30 e 35°C) e o tempo (5, 10 e 15 minutos), nos quais verificou que os parâmetros utilizados foram capazes de eliminar os microrganismos deteriorantes a níveis não

detectáveis nos maiores tempos, temperatura e pressão ou aceitáveis em condições intermediárias (300 MPa/25°C/5 min e 300 MPa/35°C/5 min). Nos testes de aceitação realizados, as amostras de suco obtidas a partir da polpa “in natura” e a partir da polpa tratada por alta pressão apresentaram média de aceitação significativamente ( $p < 0,05$ ) superior às amostras comerciais e sem diferença ( $p > 0,05$ ) entre si.

Chen et al. (2015), a partir de um delineamento composto central com três níveis de pressão (300, 400 e 500 MPa), temperatura (45, 55 e 65°C) e tempo (10, 15 e 20 minutos), foram realizados 17 ensaios visando avaliar a melhor condição para destruição do microrganismo *Bacillus subtilis* inoculado em suco de melão, com uma contagem inicial de  $1,25 \cdot 10^7$  a  $2,86 \cdot 10^7$  UFC/mL. A melhor condição encontrada de acordo com o modelo de superfície de resposta foi a redução de seis ciclos logarítmicos a 464 MPa/54,61°C/12,8 minutos.

De modo geral, os alimentos ácidos ( $\text{pH} < 4,5$ ) são os mais indicados ao processamento por alta pressão devido à inibição da germinação de esporos bacterianos resistentes à alta pressão (FARR, 1990 citado por CAMPOS, F. et al., 2003). Para processamento de alimentos fluidos como sucos de frutas e bebidas, geralmente com alta acidez e atividade de água, à temperatura ambiente ou sob resfriamento, podem ser aplicadas pressões entre 400 e 600 MPa por 10 minutos visando à redução da carga microbiana e eliminação de microrganismos patogênicos (CHEFTEL, 1995; HOOVER et al., 1989, citados por GUPTA, BALASUBRAMANIAM; 2011).

No entanto, segundo Bermúdez-Aguirre; Barbosa-Cánovas (2011), um dos maiores desafios em aplicação de alta pressão é a esterilização de alimentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ) por meio da combinação entre elevação da pressão (600-800 MPa) e temperaturas moderadas (30-90°C), em curtos tempos de processamento (inferiores a 5 min). Esse tipo de processamento, aprovado pela FDA em 2009 para esterilização comercial, foi denominado “pressure-assisted thermal sterilization – PATS”, ou “esterilização térmica assistida por pressão”.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Matéria-prima e Extração de Água de Coco

Cocos (*Cocos nucifera* L.) da variedade anão verde foram adquiridos em uma propriedade rural situada em Cedral, região de São José do Rio Preto, colhidos com 6 a 7 meses, período de maturação recomendado para obtenção de água de coco com maior rendimento e teor de açúcares (ROSA; ABREU, 2000). A colheita dos frutos foi realizada no dia da aquisição dos mesmos, em março de 2015. A seleção dos frutos foi realizada ainda na propriedade, enquanto a colheita era acompanhada, selecionando-se os frutos sem injúrias, livres de manchas escuras e, mantendo-se o pedúnculo e o cálice floral, estruturas que, segundo Resende et al. (2002) formam barreira natural contra a entrada de fungos e bactérias. Outros frutos foram utilizados em estudos preliminares coletados em outras condições.

Os frutos foram transportados até a planta piloto do Departamento de Engenharia e Tecnologia de alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Unesp – São José do Rio Preto) e armazenados em câmara fria (4 a 8°C) por 24 horas antes da extração.

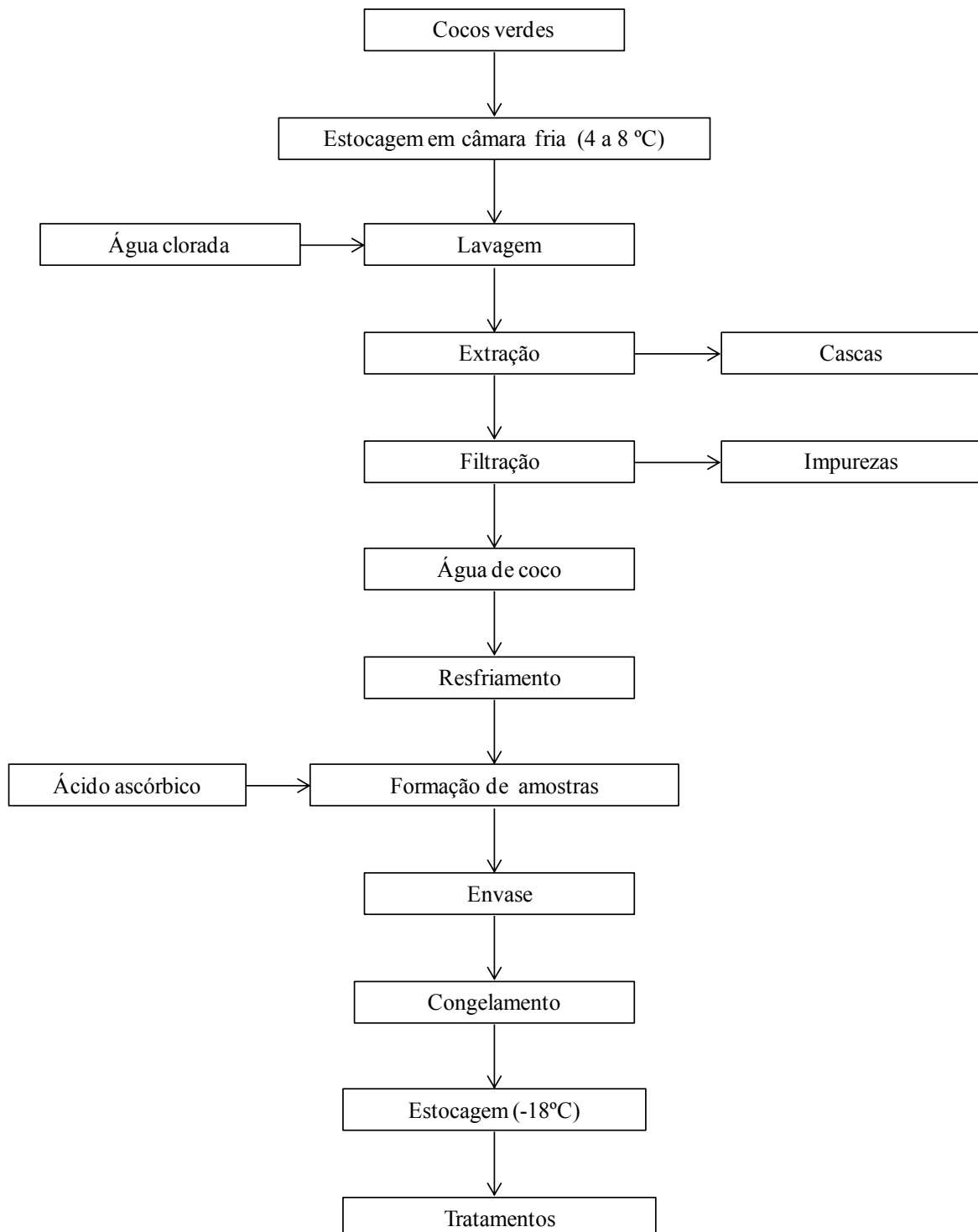
A Figura 5 representa o fluxograma com as etapas envolvidas para obtenção de água de coco. As etapas de lavagem, extração e filtração foram realizadas conforme recomendado por Rosa e Abreu (2000). A lavagem iniciou-se pela retirada de sólidos grosseiros em água corrente, seguida da imersão dos cocos em água clorada com concentração de 100 ppm de cloro ativo, por 15 minutos, e enxague em água potável. Ao final da etapa de lavagem, os cocos foram deixados em bancada limpa e sanitizada com álcool 70°GL para secar até o momento da extração.

Para a extração da água de coco, primeiramente o cálice floral foi retirado manualmente, com faca, e os frutos perfurados com o auxílio de um furador manual de aço inoxidável, introduzido na parte superior dos frutos. Após a abertura, o coco foi vertido em recipiente de aço inox dotado de filtro de nylon (50 µm) para remoção de partículas maiores, eventualmente provenientes da casca. Este recipiente foi mantido em banho de gelo até a extração de todos os frutos e formação de um lote homogêneo.

O lote homogêneo de água de coco foi subdividido em três sub lotes: um lote com água de coco sem adição de ácido ascórbico, outro lote com adição de 10 mg de ácido ascórbico/100 mL e um terceiro lote com adição de 20 mg de ácido ascórbico/100 mL. As amostras foram identificadas, conforme a quantidade de ácido ascórbico (Ácido ascórbico L (+) PA, Dinâmica, Diadema, SP) adicionado, envasadas em frascos plásticos, completamente

cheios, evitando a presença de ar, tampados, e imediatamente submetidos ao congelamento em câmara a  $-18^{\circ}\text{C}$ , na qual permaneceram por 24 horas. As amostras congeladas foram retiradas dos frascos e embaladas a vácuo, devidamente identificadas para os tratamentos.

Figura 5 - Fluxograma das etapas envolvidas para extração e processamento da água de coco.



## 4.2 Ensaio Preliminar - Efeito da Correção de pH

Visando determinar a procedência ou não da correção de pH com ácido cítrico, foi realizado um experimento preliminar com o objetivo de avaliar o efeito da correção de pH para o valor máximo de 4,5; tal qual preconizado pela instrução normativa nº27 de 2009 (BRASIL 2009), enquanto a instrução normativa nº 39, de 2002, estabelecia um mínimo de 4,3, porém sem valor máximo, para águas de coco em geral.

Foram utilizados frutos adquiridos de produtor da região (conforme item 4.1). Os procedimentos de extração, homogeneização e congelamento foram os mesmos descritos no item 4.1 (Figura 5), com diferença apenas para a subdivisão das amostras após a homogeneização, em duas porções, sem correção de pH (também identificada como *in natura*) e com correção de pH (4,5) com ácido cítrico. As amostras de água de coco formuladas foram analisadas em termos de pH, sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável (mg de ácido cítrico/100mL) e atividade de polifenoloxidase (PFO) e de peroxidase (POD).

Os valores obtidos para pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis e atividade enzimática residual de polifenoloxidase e peroxidase são apresentados na Tabela 4. Como era esperado, os maiores valores de acidez e menores valores de pH foram observados nas amostras com adição de ácido cítrico para a correção de pH. Observou-se que a redução do pH não causou inibição da atividade enzimática da peroxidase, e para a polifenoloxidase apresentou uma pequena redução com relação à atividade da amostra *in natura*.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos da água de coco do ensaio preliminar.

	In natura	pH corrigido
pH	5,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,32 ± 0,03 <sup>b</sup>
Acidez titulável (g ácido cítrico/100 mL)	0,09 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>
Sólidos solúveis (°Brix)	5,08 ± 0,14 <sup>a</sup>	5,07 ± 0,11 <sup>a</sup>
PFO (U/ mL)	2,06 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,10 <sup>b</sup>
POD (U/ mL)	19,83 ± 1,98 <sup>a</sup>	24,43 ± 6,87 <sup>a</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 5% de significância (Teste Tukey).

Com base nos resultados obtidos nos experimentos preliminares (Tabela 4), a eventual correção do pH da água de coco (para 4,5) com ácido cítrico não proporcionou efeitos significativos quanto a atividade enzimática. Campos (1993) observou atividade residual de polifenoloxidase de 82,5% para água de coco com pH corrigido para 4,5 e de 91,2% para água

de coco com pH corrigido para 5,0; a atividade residual da peroxidase foi de 82,5% para água de coco com correção do pH para 4,5 e de 91,3% para água de coco com pH corrigido para 5,0.

Considerando o fraco efeito inibitório do ácido cítrico sobre a atividade residual das enzimas POD e PFO e que a correção de pH está geralmente associada à adição de açúcares (correção do teor de sólidos solúveis, conforme Tabela 1) para melhoria da aceitação sensorial, optou-se por avaliar somente os efeitos das variáveis pressão, temperatura e adição de ascórbico, sem a correção do pH da água de coco.

### **4.3 Tratamentos**

As variáveis para os tratamentos propostos foram pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico, em três níveis cada. Os níveis de pressão foram 0,1; 300 e 600 MPa para a pressão; 10; 45 e 80°C para a temperatura e dosagem de 0; 10 e 20 mg de ácido ascórbico/100 mL de água de coco.

#### **4.3.1 Alta pressão**

O processamento sob alta pressão foi realizado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Unicamp, em equipamento (Figura 6) fabricado pela empresa Avure Technologies Inc., modelo QFP 2L-700 (Columbus, Ohio, USA), com sistema computadorizado para programação e monitoramento do processo (Figura 8). O equipamento é dotado de câmara (Figura 7) de 2 litros de volume útil, na qual foram inseridas as amostras previamente acondicionadas (filme plástico sob vácuo) e imersas em água, utilizada como fluido de transmissão de pressão. Foram monitoradas a pressão e a temperatura, medida em duas posições (uma superior e outra intermediária) no interior da câmara, com frequência de leitura a cada minuto.

O tempo sob condições de alta pressão foi fixado em 10 minutos, estabelecido com base em trabalhos anteriores realizados por Gupta; Balasubramaniam (2011), Keenan et al. (2012) e Abid et al. (2014). Imediatamente após o processamento sob alta pressão, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo e posteriormente mantidas sob congelamento (-18°C).



Figura 6 - Equipamento para os ensaios sob alta pressão



Figura 7 - Detalhe da câmara de alta pressão aberta com as sondas para medição da temperatura do fluido de transmissão de pressão.



Figura 8 - Tela para monitoramento do processo

STOP		HOLD		Ver. 06.02.20.00		SYSTEM OVERVIEW				Monday, March 16, 2015 11:39:36 AM	
Status:	RUN	Temperature Setpoint		Temperature (C)				Pressure (Mpa)			
Segment:	2	Recipe	0	TOP	5.9	Reservoir	8.9	Actual	297.9		
Left:	00:08:37	Operator	0	MID	3.7	Coolant	20.8	Seg. Spt	300		
Total:	00:02:41										
CONTROL		Soak						STATUS			
Segment Jump								RECIPE:100K90C			
Temperature								Vessel Closed			

Para todos os tratamentos sob pressão foi considerado o aquecimento adiabático, buscando-se compensar a variação da temperatura devido a este efeito. A temperatura de início de processamento foi calculada de forma que o produto se mantivesse nas condições pré-estabelecidas de pressão e temperatura durante o tempo de exposição, sem a elevação da temperatura acima do valor desejado. Os ensaios nas pressões mais elevadas precederam aqueles com menores pressões, para cada temperatura, considerando o acréscimo de temperatura devido ao aquecimento adiabático. A Equação 3 foi utilizada para prever o efeito do aquecimento adiabático do líquido sob compressão, em função da concentração de sólidos solúveis e da variação de pressão (DARROS-BARBOSA, 2003).

$$\Delta T = a_1 (\Delta P)^{a_2} \exp(a_3 C^n) \quad (3)$$

onde:

$\Delta T$  = variação de temperatura (aquecimento adiabático) em °C

$\Delta P$  = variação de pressão (compressão) em MPa

C = concentração em sólidos solúveis da solução (%)

$a_1, a_2, a_3$ : coeficientes de regressão linear de acordo com a solução e temperatura de referência (entrada)

n: 1, 2 ou 3, dependendo do soluto e da temperatura de referência.

Para a estimativa do comportamento da água de coco sob compressão, foram utilizados os valores de a e n (Tabela 5) para solução de sacarose a 5% (média de sólidos solúveis da água de coco).

Tabela 5 - Valores dos coeficientes utilizados no cálculo de aquecimento adiabático.

T (°C)	$a_1$	$a_2$	$a_3$	n
10	0,01988	1,02791	$-4,30 \cdot 10^{-09}$	3
20	0,03246	0,97297	$-1,83 \cdot 10^{-06}$	2
30	0,04743	0,93205	$-1,44 \cdot 10^{-06}$	2

A Tabela 6 apresenta os resultados calculados para aquecimento adiabático. Para temperaturas iniciais de 10 a 30°C utilizou-se a Equação 3; acima de 30°C, baseou-se em gráficos apresentados para aquecimento adiabático para água pura (Harvey et al., 1996), a partir das pressões aplicadas nos ensaios. As amostras foram condicionadas e as temperaturas iniciais consideradas para os ensaios, para cada condição de pressão e temperatura são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 6 - Previsão para aumento de temperatura devido ao aquecimento adiabático.

Temperatura de referência (°C)	Varição de Pressão (MPa)	Aumento total de temperatura (°C)	Temperatura final (°C)	Taxa de aquecimento (°C/ 100 MPa)
10	300	7,0	17,0	2,3
	600	14,3	24,3	2,4
20	300	8,3	28,3	2,8
	600	16,4	36,4	2,7
30	300	9,7	39,7	3,2
	600	18,4	48,4	3,1
40	300	10,2	50,2	3,4
	600	20,4	60,4	3,4
50	300	11,1	61,1	3,7
	600	22,8	72,8	3,8
60	300	11,4	71,4	3,8
	600	24,0	84,0	4,0

Tabela 7 - Temperaturas de condicionamento antes do processamento a alta pressão.

Pressão de Operação (MPa)	Temperatura do delineamento (°C)	Temperatura inicial determinada (°C)
300	10	0 a 5
	45	30 a 35
	80	65 a 70
600	10	-5 a 0
	45	25 a 30
	80	55 a 60

#### 4.3.2 Temperatura

A faixa de temperatura do ensaio foi estabelecida de forma a abranger temperaturas da ordem de refrigeração (10°C), com o objetivo de não se aproximar da temperatura ambiente, na qual reações enzimáticas e microbiológicas poderiam ocorrer; e também temperaturas próximas à de pasteurização, como a temperatura máxima de 80°C, recomendada também como máxima para o equipamento para os ensaios sob alta pressão.

Além de não sobrecarregar o equipamento, a temperatura também foi determinada baseando-se em estudos anteriores de inativação térmica das enzimas polifenoloxidase e peroxidase da água de coco, nos quais a temperatura de 90°C foi recomendada (CAMPOS, 1993; MURASAKI, 2005). Outros critérios utilizados foram no sentido de se empregar uma

faixa mais ampla do que 20 a 60°C, utilizada por Calvette (2007) em seu estudo de alta pressão isostática aplicada em água de coco, e para seguir sugestão de Dosualdo (2007), no sentido de combinar alta pressão e temperaturas mais elevadas.

### 4.3.3 Ácido Ascórbico

A determinação das faixas utilizadas para dosagem de ácido ascórbico se deu a partir de estudos anteriores que demonstraram a inibição enzimática por meio de dosagens de 20 mg/100 mL de ácido ascórbico (CAMPOS, 1993; ABREU, 2005). Este valor foi recomendado por Campos et al. (1996) para que não haja alteração na aceitação sensorial.

### 4.4 Delineamento Experimental

As Tabelas 8 e 9 apresentam os parâmetros dos tratamentos utilizados com base em um delineamento experimental Composto Cúbico de Face Centrada com 3 repetições do ponto central (MONTGOMERY, 1996). A sequência para realização dos tratamentos foi em ordem crescente de temperatura, devido ao período de tempo necessário para o resfriamento inicial do fluido de transmissão de pressão, no caso iniciado pela temperatura mais baixa (10°C).

Tabela 8 - Faixa dos valores codificados e reais para as variáveis do planejamento experimental.

Variável		Nível		
Real	Codificada	-1	0	1
Pressão (MPa)	$x_1$	0,1	300	600
Temperatura (°C)	$x_2$	10	45	80
Ácido Ascórbico (mg/ 100 mL)	$x_3$	0	10	20

Tabela 9 - Delineamento experimental proposto para processamento de água de coco.

Ensaio	Seqüência da realização	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
		x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Ácido Ascórbico (mg/ 100mL)
1	1°	-1	-1	-1	0,1	10	0
2	4°	-1	1	-1	0,1	80	0
3	7°	1	-1	-1	600	10	0
4	15°	1	1	-1	600	80	0
5	2°	-1	-1	1	0,1	10	20
6	5°	-1	1	1	0,1	80	20
7	6°	1	-1	1	600	10	20
8	16°	1	1	1	600	80	20
9	8°	0	-1	0	300	10	10
10	3°	-1	0	0	0,1	45	10
11	17°	0	1	0	300	80	10
12	9°	1	0	0	600	45	10
13	14°	0	0	1	300	45	20
14	10°	0	0	-1	300	45	0
15	11°	0	0	0	300	45	10
16	12°	0	0	0	300	45	10
17	13°	0	0	0	300	45	10

#### 4.5 Análises físico-químicas e microbiológicas

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, antes e após os tratamentos. As amostras eram descongeladas, homogeneizadas transferidas para um béquer de 100 mL, sendo mantidas em banho de gelo até o momento das análises.

##### 4.5.1 pH

As medidas de pH foram realizadas diretamente, em medidor de pH de bancada, modelo TEC-11 (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil). O pHmetro foi calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), em temperatura ambiente (25°C).

#### 4.5.2 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi medido por meio de refratômetro digital, modelo HI96801 (HANNA instruments, USA), com compensação automática de temperatura para a faixa de 10 a 40°C. A calibração foi realizada com água destilada e o resultado da leitura realizada em temperatura ambiente foi expresso em °Brix à 20°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 4.5.3 Acidez total titulável

A acidez titulável foi determinada por titulação de 10 mL de amostra acrescida de 100 mL de água destilada e indicador fenolftaleína, com NaOH 0,1 N. Após o aparecimento de coloração rósea persistente por 30 segundos, era realizada a leitura do volume gasto de NaOH. O cálculo foi realizado conforme a Equação 4 e o resultado expresso como mg ácido cítrico por 100 mL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$\frac{V F M P M}{P n} 100 = \text{mg de ácido cítrico/ 100 mL} \quad (4)$$

onde:

V= volume de hidróxido de sódio gasto na titulação em mL

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio (0,1 M)

P = volume de amostra em mL (10 mL)

PM = peso molecular do ácido correspondente em g (para ácido cítrico PM = 192 g/ mol)

n = número de hidrogênios ionizáveis (para ácido cítrico n = 3)

F = fator de correção da solução de hidróxido de sódio (F = 1,00267)

#### 4.5.4 Ácido Ascórbico

O teor de ácido ascórbico foi determinado com dois objetivos, para caracterização da água de coco a ser processada e para verificação da degradação do ácido ascórbico durante o processo. A determinação foi realizada pelo método titulométrico (AOAC, 1997) que se baseia na redução de 2,6-diclorofenolindofenol-sódio (DCFI) pelo ácido ascórbico. O DCFI em meio básico ou neutro é azul, em meio ácido é rosa e sua forma reduzida é incolor. O ponto final de titulação é detectado pela viragem da solução, de incolor para rosa, quando a primeira gota de solução do DCFI é introduzida no sistema, com todo ácido ascórbico já consumido. As etapas para a análise do ácido ascórbico foram realizadas com base na metodologia nº22 descrita pelo MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(BRASIL, 2005), conforme a sequência abaixo, com cálculo do teor de ácido ascórbico (AA) conforme a Equação 5.

$$AA = \frac{5 n'}{nP} 100 = \text{mg de ácido ascórbico por 100 mL de amostra} \quad (5)$$

onde:

AA = Teor de ácido ascórbico em mg/ 100 mL

n' = Volume de DCFI gastos na titulação da amostra (mL)

n = Volume de DCFI gastos na padronização (mL)

P = Volume de amostra utilizado (20 mL)

A Equação 6 foi utilizada para determinar o teor de ácido ascórbico residual após cada tratamento, com base no teor de ácido ascórbico inicial, e, expresso em porcentagem.

$$AA_{residual} = \frac{AA}{AA_0} 100 \quad (6)$$

onde:

AA = Teor de ácido ascórbico após tratamento (mg/100 mL)

AA<sub>0</sub> = Teor de ácido ascórbico da amostra inicial (mg/100 mL), em função do nível da dosagem de ácido ascórbico do ensaio, sendo AA<sub>0</sub> (0 mg/100 mL) = 2,65 ±0,54; AA<sub>0</sub> (10 mg/100 mL) = 10,04 ±0,80 e, AA<sub>0</sub> (20 mg/100 mL) = 21,97 ±1,07.

#### 4.5.5 Cor instrumental

A determinação da cor foi realizada em colorímetro Hunter Lab, modelo CX 2318 (Hunter Lab, Virgínia, EUA), com ângulo de observação de 10° e iluminante D 65. Foram medidos os parâmetros L\*, que representa a claridade numa escala de 0 (preto) a 100 (branco); a\* que representa a escala de tonalidades de vermelho (+) a verde (-), e, b\* de amarelo (+) a azul (-). Os parâmetros L\*, a\* e b\* foram medidos por meio da técnica estabelecida pela CIE (Comission Internationale de l'Eclairage) na qual um perfil cromático do material analisado pode ser obtido a partir dos estímulos causados pelas três cores primárias (azul, vermelho e amarelo). A partir das leituras de L\*, a\* e b\* foram calculados a variação global de cor (ΔE), conforme Equação 7.

Para a determinação, aproximadamente 20 mL de amostra foram adicionados ao copo transparente de 2,5 polegadas de diâmetro, com disco de cerâmica fixado em anel de borracha, de forma que o líquido (água de coco) estivesse totalmente coberto. Utilizou-se tampa preta para cobrir o copo contendo a amostra. Foram utilizados padrões de cor preto e

branco para calibração. Como valores iniciais de referência ( $L_o^*$ ;  $a_o^*$ ;  $b_o^*$ ) foram utilizadas as médias dos parâmetros da amostra inicial de referência (controle).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (7)$$

onde:

$$\Delta L^* = (L^* - L_o^*) = (L^* \text{ amostra} - L^* \text{ inicial de referência})$$

$$\Delta a^* = (a^* - a_o^*) = (a^* \text{ amostra} - a^* \text{ inicial de referência})$$

$$\Delta b^* = (b^* - b_o^*) = (b^* \text{ amostra} - b^* \text{ inicial de referência})$$

#### 4.5.6 Atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase

A determinação da atividade das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) seguiu metodologia proposta por Campos (1996), modificada por Abreu e Faria (2007) e, com adaptações para a presente pesquisa. Para análise das amostras de água de coco recém-extraídas, essas foram mantidas refrigeradas (4-6°C) até o momento de realização das análises. As amostras de água de coco após os tratamentos foram mantidas a -18°C, descongeladas e mantidas em banho de gelo até o momento da análise. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro dotado de um controlador de temperatura Peltier (Figura 9), modelo UV mini 1240 (Shimadzu, Quioto, Japão).

Figura 9 - Espectrofotômetro acoplado ao Peltier



A temperatura e o pH ótimos foram baseados no trabalho realizado por Campos (1993), sendo temperatura de 25°C e pH 6,0 para polifenoloxidase; e temperatura de 35°C e pH 5,5 para peroxidase.

Para a determinação da atividade da polifenoloxidase, em uma cubeta de 5 mL foram adicionados 2,3 mL de solução tampão fosfato (0,2 M) com pH 6,0 e termostatizada em



banho a 25°C. Em seguida, foi adicionado 1 mL da amostra de água de coco e 0,7 mL de solução catecol (0,2 M). Em seguida, a cubeta foi colocada no espectrofotômetro acoplado a um controlador de temperatura Peltier para estabilização da temperatura a 25°C. As leituras de absorbância foram realizadas em comprimento de onda de 425 nm a cada minuto durante 10 minutos.

Para análise da atividade da peroxidase, adicionou-se 2,3 mL de solução tampão fosfato (0,2 M) com pH 5,5 a uma cubeta de 5 mL submetida ao banho termostático em 35°C. Em seguida, foram adicionados à cubeta 1 mL de amostra de água de coco, 0,5 mL de solução alcoólica de guaiacol 0,5% e 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 0,1%. A cubeta foi colocada no espectrofotômetro, com controlador de temperatura Peltier para estabilização da temperatura a 35°C, com as leituras realizadas a 470 nm a cada minuto durante 10 minutos.

Em ambos os casos, o branco consistiu na substituição da água de coco pelo mesmo volume em água destilada, com leitura da absorbância no tempo zero e aos 10 minutos.

Foram preparadas no dia da análise as soluções de catecol (Pirocatecol PA 99%, Vetec, Duque de Caxias, RJ) 0,2 M, guaiacol (Guaiacol puro, Dinâmica, Diadema, SP) 0,5% e peróxido de hidrogênio (Peróxido de hidrogênio 35%-130 vol PA) 0,1%, considerando possível degradação com o tempo. Precauções foram tomadas durante a análise, como manter estes substratos sob refrigeração e protegê-los da exposição à luz.

A principal modificação com relação à metodologia utilizada por Abreu e Faria (2007) consistiu na utilização do controlador de temperatura Peltier, que possibilitou a leitura da absorbância a cada minuto, mantendo a amostra na temperatura desejada na câmara de leitura do espectrofotômetro, sem necessidade de retornar a amostra ao banho termostático entre as leituras. Como a solução tampão possui maior volume de reação, esta foi colocada primeiramente no banho termostático para que a água de coco permanecesse o menor tempo possível na temperatura ótima (25°C para PFO e 35°C para POD) antes da adição dos demais reagentes, considerando que a água de coco naturalmente contém compostos fenólicos, os quais podem ser utilizados como substratos pelas enzimas presentes (KWIATKOWSKI, 2011).

A atividade enzimática foi expressa em [Unidade mL<sup>-1</sup>], sendo uma Unidade a atividade equivalente à quantidade de enzima capaz de proporcionar o aumento de 0,001 na absorbância por minuto por mL de amostra, calculada conforme a Equação 8:

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{(AF_{amostra} - AI_{amostra}) - (AF_{branco} - AI_{branco})}{(0,001)(t)} \quad (8)$$

onde:

$AF_{amostra}$  = absorvância final da amostra (10 minutos).

$AI_{amostra}$  = absorvância inicial da amostra (0 minuto).

$AF_{branco}$  = absorvância do branco aos (10 minutos).

$AI_{branco}$  = absorvância inicial do branco (0 minuto).

t = tempo total = 10 minutos.

A atividade relativa ou residual foi definida como a atividade enzimática da amostra após o tratamento, dividida pela atividade da água de coco não processada, como mostra a Equação 9, baseada nas pesquisas de Dosualdo (2007), Calvette (2007) e Abid (2014).

$$\% \text{ AE} = \frac{AE_{\text{final}}}{AE_{\text{inicial}}} 100 \quad (9)$$

onde:

%AE: Atividade residual da enzima (%).

$AE_{\text{inicial}}$ : Atividade enzimática antes do tratamento.

$AE_{\text{final}}$ : Atividade enzimática após o tratamento.

#### 4.5.7 Microbiológicas

Conforme recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009), as análises microbiológicas para a água de coco envolvem a contagem de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. As análises foram realizadas por métodos rápidos, em duplicata, utilizando placas prontas, Compact Dry (Verus Madasa, São Paulo, SP), nas amostras antes e após os tratamentos.

Para a contagem de *Escherichia coli* utilizou-se as placas EC. Inoculou-se 1 mL da amostra diretamente na placa, sem diluição. As placas foram incubadas em posição invertida, em estufa termostatizada a 45°C, para avaliar a presença de coliformes termotolerantes (COMPACT, 2009).

A análise de *Salmonella* sp. foi realizada em duas etapas. Primeiramente, realizou-se o pré-enriquecimento da amostra com Água Peptonada Tamponada (BWP), na proporção de 25 mL de amostra em 225 mL de caldo de pré-enriquecimento. A amostra enriquecida foi incubada a 37°C por 24 horas. A inoculação em placa com o meio específico seguiu duas etapas, conforme recomendado pelo fabricante, inoculando-se 0,1 mL de amostra pré-

enriquecida à 1 cm da borda da placa e em seguida 1 mL de água estéril na região oposta à região em que a amostra foi aplicada. As placas foram incubadas a 42°C por 24 horas, em posição invertida, em estufa termostaticada (COMPACT, 2009).

Para análise de bolores e leveduras, inoculou-se 1 mL de amostra em placa com meio de cultura específico (YM, Compact, 2009) e estas foram incubadas em posição normal, a 30°C, por três dias.

#### 4.6 Análises Estatísticas

Para a análise estatística foi utilizado o software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, EUA) para determinar os efeitos significativos ao nível de confiança de 95% e as o ajuste das respostas dos efeitos ao modelo proposto (Equação 10).

Para avaliar o ajuste do modelo foi realizada análise de variância (ANOVA) e determinados os coeficientes de regressão, sendo o modelo considerado adequado, para descrever as respostas estudadas, se a falta de ajuste não fosse significativa ( $p > 0,05$ ). A Equação 10 representa a regressão múltipla que descreve os efeitos lineares, quadráticos e as interações consideradas para avaliar a influência das variáveis independentes sobre a variável dependente (resposta), expressa pela cor instrumental, atividade enzimática (para a peroxidase e para a polifenoloxidase) e teor de ácido ascórbico.

$$y = \beta_0 + \beta_1(P) + \beta_2(T) + \beta_3(AA) + \beta_{11}(P^2) + \beta_{22}(T^2) + \beta_{33}(AA^2) + \beta_{12}(P)(T) + \beta_{13}(P)(AA) + \beta_{23}(T)(AA) + \varepsilon \quad (10)$$

onde:

y = resposta: cor instrumental, atividade enzimática, ácido ascórbico residual

P = Pressão (0,1 a 600 MPa)

T = Temperatura (10 a 80°C)

AA = Dosagem de ácido ascórbico (0 a 20 mg/100 mL)

$\beta$  = coeficientes da regressão de ajuste do modelo

$\varepsilon$  = erro.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Condições Operacionais Obtidas para os Ensaio em Alta Pressão

As Figuras 10 e 11 apresentam os perfis, respectivamente, de pressão (300 e 600 MPa) e de temperatura (10°C, 45°C e 80°C) em função do tempo. Observou-se excelente estabilidade da pressão de operação durante o período de exposição à pressão desejada, em todos os ensaios. O tempo médio para pressurização foi de 1,32 minutos para os ensaios à 300 MPa e 2,37 minutos para os ensaios à 600 MPa. O maior tempo para pressurização ocorreu para o ensaio a 600 MPa/80°C (2,78 min) e o menor para 300 MPa/ 45°C (1,15 min). De modo geral, o tempo total médio do processo (incluindo pressurização e descompressão) foi de 11,5 minutos para 300 MPa e 12,5 min a 600 MPa.

Figura 10 – Perfil de pressão em função do tempo para os tratamentos sob alta pressão.

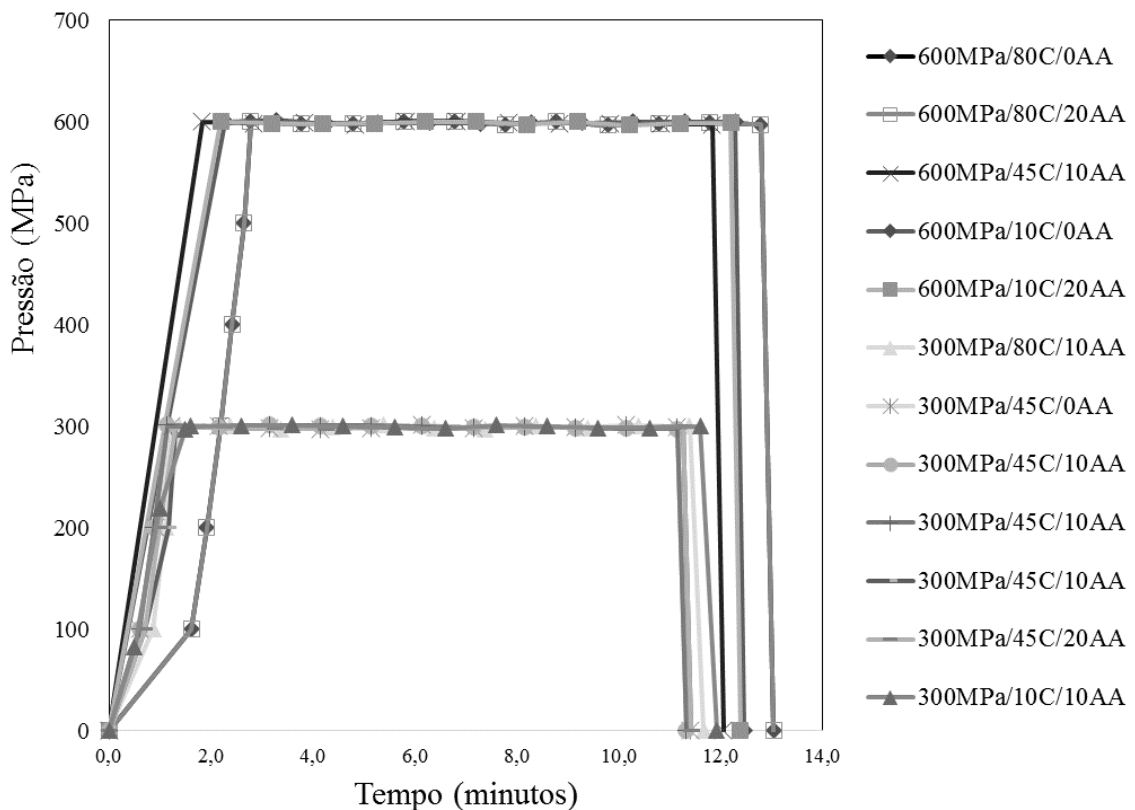
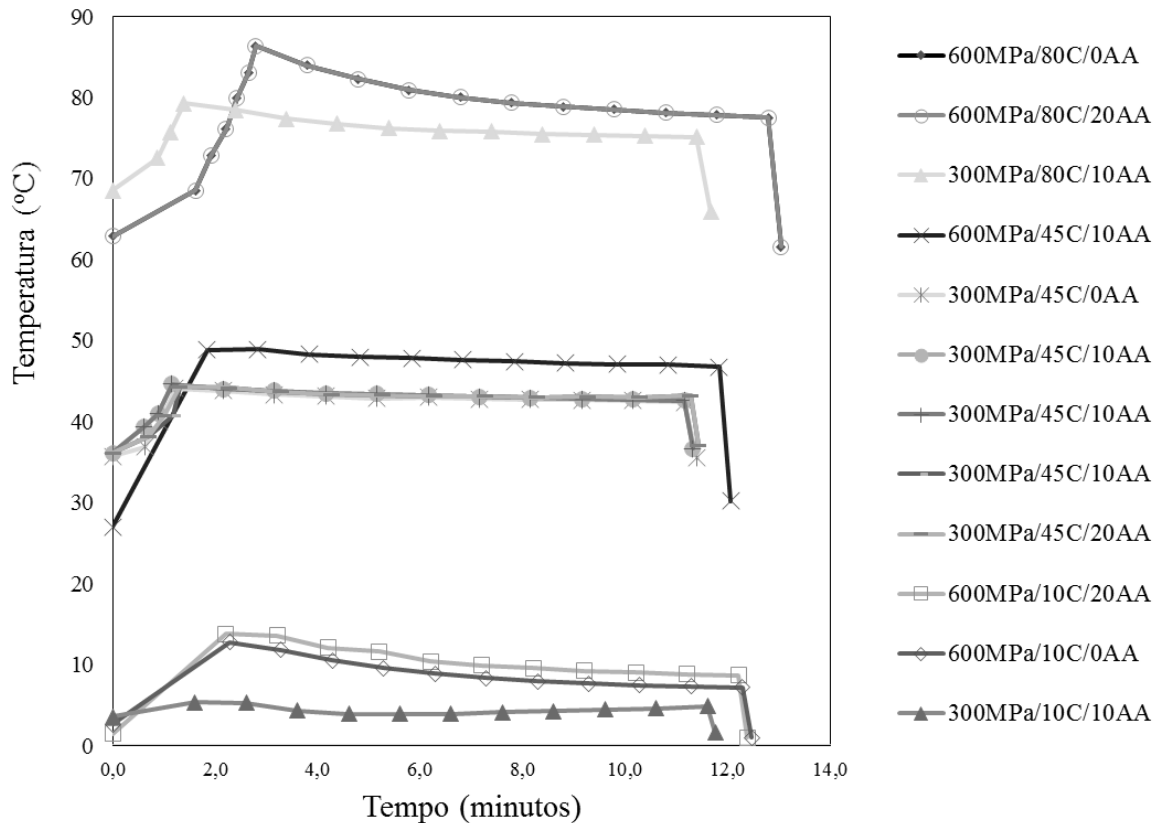


Figura 11 - Perfil de temperatura em função do tempo de processo, para os tratamentos sob alta pressão.



As variáveis pressão e temperatura de processo foram coletadas e registradas em função do tempo para todos os ensaios realizados para permitir o monitoramento das condições dos ensaios e também permitir calcular as taxas de pressurização e de descompressão e a taxa de aquecimento adiabático. Em trabalho dos efeitos da alta pressão combinada com temperatura sobre a estabilidade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em polpa de abacaxi, Chakraborty et al., (2015) obtiveram resultados interessantes sobre a perda de estabilidade destas enzimas em função do período de pressurização e também pelo efeito do aquecimento adiabático, dados que podem auxiliar na interpretação dos efeitos observados sobre a inibição enzimática no presente estudo, analisada ao final deste capítulo.

A Tabela 10 apresenta as médias dos tempos e das taxas para pressurização e descompressão, além das taxas de aquecimento, considerando os ensaios realizados sob alta pressão, nos três níveis de temperatura do delineamento. No presente estudo, a média para a taxa de aquecimento adiabático foi de  $2,8 \pm 1,2^\circ\text{C}/100 \text{ MPa}$ , valor compreendido entre as taxas de aquecimento estimadas. A temperatura média durante o processamento por altas

pressões também se manteve próxima aos valores estimados (Tabelas 6 e 7), entretanto observou-se que a 600 MPa as temperaturas iniciais para os ensaios a 10 e a 80°C foram relativamente maiores do que as calculadas.

Tabela 10 - Resumo das condições operacionais do processo sob alta pressão, em função da temperatura e do tempo.

Ordem	Ensaio	P (MPa)	T (°C)	AA (mg/100mL)	t <sub>p</sub> (min)	t <sub>d</sub> (min)	TP (MPa/min)	TD (MPa/min)	TA (°C/100 MPa)
1	7	600	10	20	2,20	0,22	272,73	2769,23	2,05
2	3	600	10	0	2,30	0,18	260,87	3272,73	1,70
3	9	300	10	10	1,60	0,15	187,50	2000,00	0,58
4	12	600	45	10	1,80	0,22	333,33	2769,23	3,64
5	14	300	45	0	1,20	0,20	250,00	1500,00	2,80
6	15	300	45	10	1,20	0,17	250,00	1800,00	2,67
7	16	300	45	10	1,20	0,17	250,00	1800,00	2,73
8	17	300	45	10	1,27	0,15	236,84	2000,00	2,73
9	13	300	45	20	1,27	0,15	236,84	2000,00	2,73
10	4	600	80	0	2,78	0,22	215,59	2769,23	3,91
11	8	600	80	20	2,78	0,22	215,59	2769,23	3,91
12	11	300	80	10	1,38	0,20	216,92	1538,46	3,60

Notas: P = Pressão do delineamento; T = Temperatura do delineamento; AA = dosagem de ácido ascórbico; t<sub>p</sub> = tempo de pressurização; t<sub>d</sub> = tempo de descompressão; TP = taxa de pressurização; TD = taxa de descompressão TA = Taxa de aquecimento adiabático devido à compressão.

A taxa de compressão variou entre 3,8 MPa.s<sup>-1</sup> e 4,4 MPa.s<sup>-1</sup>, respectivamente, para os ensaios à 300 e 600 MPa; para os quais, as menores pressões observadas foram de 297,2 MPa e 596,6 MPa; e as maiores pressões foram de 301,4 MPa e 600,7 MPa, comprovando a excelente estabilidade (Figura 10). Bisconsin Junior (2013) obteve taxa de compressão de 7,0 MPa.s<sup>-1</sup> e tempo de descompressão inferior a 10 segundos em estudo de tratamento de suco de laranja sob alta pressão. A taxa de pressurização apresentada por Chakraborty et al. (2015) foi de 5,0 MPa.s<sup>-1</sup> e a descompressão ocorreu em 10 segundos, valores próximos aos obtidos no presente estudo, embora os autores tenham utilizado modelos diferentes de equipamentos.

Nos ensaios conduzidos à temperatura de 10°C, as amostras foram inseridas em temperaturas próximas ao ponto de congelamento na câmara de compressão, para compensar o aquecimento adiabático, e após atingir a pressão desejada (600 MPa) foi observada uma leve redução da temperatura ao longo do processo (Figura 11), efeito atribuído à troca térmica

entre a água de coco e o fluido de transmissão de pressão. Após a decompressão, o líquido retorna ao seu estado físico e temperatura inicial, como observado no presente estudo, no qual as amostras de água de coco estavam congeladas no momento de sua retirada da câmara de compressão.

Foram observadas maiores taxas de aquecimento adiabático devido à compressão para os ensaios em maiores temperaturas, com a menor taxa de aquecimento ( $0,8^{\circ}\text{C}/100\text{ MPa}$ ) para o ensaio na temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ , enquanto que a maior taxa de aquecimento ( $3,9^{\circ}\text{C}/100\text{ MPa}$ ) ocorreu no ensaio à maior temperatura ( $80^{\circ}\text{C}$ ). A taxa de aquecimento adiabático devido à compressão ( $2,8^{\circ}\text{C}/100\text{ MPa}$ ) da pressão atmosférica até  $300\text{ MPa}$ , a uma taxa de pressurização de  $260,8\text{ MPa}/\text{minuto}$  e temperatura inicial de  $36^{\circ}\text{C}$ , foi bastante próxima à obtida por Buzrul et al. (2008), que obtiveram  $3,2\text{ }^{\circ}\text{C}/100\text{ MPa}$ , para água inicialmente a  $35^{\circ}\text{C}$ , com taxa de compressão de  $200\text{ MPa}/\text{min}$  para a mesma pressurização ( $0,1$  a  $300\text{ MPa}$ ).

Bisconsin Junior (2013) obteve um aumento de  $2,8$  a  $3,5\text{ }^{\circ}\text{C}/100\text{ MPa}$ , para suco de laranja, em um delineamento experimental envolvendo pressões de  $100$  a  $600\text{ MPa}$  e temperaturas entre  $30$  e  $60^{\circ}\text{C}$ , valores próximos aos obtidos na presente pesquisa, considerando as diferentes temperaturas dos ensaios. No presente estudo, foi observado que quanto maior a temperatura inicial, maior a taxa de elevação da temperatura a cada  $100\text{ MPa}$ , conforme observado também por Buzrul et al. (2008), para temperaturas iniciais de  $5$  a  $35^{\circ}\text{C}$ , em um amplo estudo realizado para determinação das taxas de compressão e de aquecimento adiabático.

## 5.2 Resultados das Análises Microbiológicas

A Tabela 11 apresenta os resultados das análises microbiológicas para *Salmonella* sp., coliformes termotolerantes e bolores e leveduras, em função dos ensaios e das amostras iniciais não tratadas. Não foi observada a presença de *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes e, mesmo após não terem sido detectados na água de coco *in natura*, foram realizadas as análises para todos os ensaios, a fim de confirmar a inocuidade das amostras de água de coco tratadas com relação a estes microrganismos.

Rios e Sobrinho (2012) em pesquisa experimental com água de coco, indicaram que em havendo controle de higienização dos frutos e das superfícies que entram em contato com o coco, pode-se diminuir consideravelmente o índice de contaminação de cocos armazenados por cinco dias. Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram essas indicações, considerando que o período de armazenamento ( $24$  horas) dos cocos sob refrigeração

associado à higienização dos frutos e dos utensílios permitiram que não fosse detectada a presença de coliformes ou *Salmonella* na água de coco recém extraída e, conseqüentemente, na água de coco tratada, considerando que não houve manipulação posterior à extração.

A análise de bolores e leveduras foi importante, primeiramente, para avaliar o efeito da alta pressão, mas também por não ter sido considerada em estudos anteriores com água de coco, para os quais (AMARAL et al., 2012; PURKAYASTHA et al., 2014) foi considerada somente a detecção e contagem de coliformes. Purkayastha e colaboradores (2014) avaliaram a presença de coliformes em água de coco após tratamento por microfiltração, para a qual os autores observaram crescimento exponencial para coliformes totais durante os 21 dias de estocagem sob refrigeração e, ausência de coliformes fecais durante todo o período de estocagem.

Os resultados obtidos no presente estudo para bolores e leveduras, superiores a 20 UFC/mL, demonstraram contaminação inicial superior à apresentada por Sousa (2006), que obteve 12,0 UFC/mL como contagem inicial, valor próximo ao apresentado por Costa e colaboradores (2005) em água de coco conservada por diferentes métodos (resfriamento, congelamento e tratamento térmico). Esses autores obtiveram valores inferiores aos máximos estabelecidos na legislação vigente, tanto para bolores e leveduras quanto para aeróbios mesófilos, neste caso com contagens inferiores a 10 UFC/mL e contagens de coliformes termotolerantes inferiores a 0,3 NMP/mL, além da ausência de *Salmonella* sp.

Dosualdo (2007) observou que a carga microbiana da levedura *Saccaromyces cerevisiae* inoculada ( $4,4 \cdot 10^5$  UFC/mL) em água de coco foi completamente eliminada em pressões de 250 a 300 MPa, com temperatura inicial de 10°C, em experimentos conduzidos em equipamento de homogeneização a alta pressão.

Os resultados para bolores e leveduras (Tabela 11) para água de coco *in natura* indicam que a mesma se apresentava inadequada para comercialização e consumo, conforme a legislação vigente (BRASIL, 2009), que estabelece o máximo aceitável de 20 UFC/ mL. Ademais, a adição de ácido ascórbico não reduziu a contaminação, conforme resultados da análise estatística (ANOVA), com valores *p* de 0,70. Entretanto, após os tratamentos, somente em dois dos dezessete ensaios foi observada a presença de bolores e leveduras, ambos à pressão atmosférica (0,1 MPa) e temperatura de 10°C, com contagens microbiológicas de  $26 \pm 4,24$  e de  $9,19 \pm 0,30$  UFC/mL, respectivamente, em amostras com dosagens de ácido ascórbico de 0 (Ensaio 1) e de 20 mg /100 mL (Ensaio 5).



Os resultados indicaram a baixa sensibilidade térmica dos bolores e leveduras. Embora não resistam à temperatura de 45°C, a influência da utilização da alta pressão sobre os mesmos pode ser confirmada pelos ensaios à 10°C, nos quais, à pressão atmosférica, houve crescimento, enquanto que nos tratamentos à 300 e 600 MPa nenhuma colônia foi detectada. Ademais, para a realização dos ensaios a 600 MPa/45°C (Ensaio 12), o produto foi submetido a temperaturas próximas à do ambiente e, mesmo assim, não foi observado crescimento.

Tabela 11 - Contagem de *Salmonella sp.*, Coliformes termotolerantes e Bolores e Leveduras em água de coco para os diferentes tratamentos e amostras não tratadas.

Amostra inicial				<i>Salmonella sp.</i> (Ausente em 25 mL)	Coliformes Termotolerantes (UFC/mL)	Bolores e Leveduras (UFC/mL)
0 mg ácido ascórbico/100 mL				Ausente	n.d	23,5 ±10,61
10 mg ácido ascórbico/100 mL				Ausente	n.d	12,73 ±0,40
20 mg ácido ascórbico/100 mL				Ausente	n.d	27,00 ±0,05
Ensaio						
Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	AA (mg/ 100mL)	<i>Salmonella sp.</i> (Ausente em 25 mL)	Coliformes Termotolerantes (UFC/mL)	Bolores e Leveduras (UFC/mL)
1	0,1	10	0	Ausente	n.d	26 ±4,24
2	0,1	80	0	Ausente	n.d	n.d
3	600	10	0	Ausente	n.d	n.d
4	600	80	0	Ausente	n.d	n.d
5	0,1	10	20	Ausente	n.d	30,50 ±9,19
6	0,1	80	20	Ausente	n.d	n.d
7	600	10	20	Ausente	n.d	n.d
8	600	80	20	Ausente	n.d	n.d
9	300	10	10	Ausente	n.d	n.d
10	0,1	45	10	Ausente	n.d	n.d
11	300	80	10	Ausente	n.d	n.d
12	600	45	10	Ausente	n.d	n.d
13	300	45	20	Ausente	n.d	n.d
14	300	45	0	Ausente	n.d	n.d
15	300	45	10	Ausente	n.d	n.d
16	300	45	10	Ausente	n.d	n.d
17	300	45	10	Ausente	n.d	n.d

n.d: não detectados

Embora a água de coco apresente condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, como alta atividade de água e presença de nutrientes, no presente estudo foi observado que com as devidas precauções higiênico-sanitárias, como cuidados com higiene

peçoal e manutenção da água de coco em baixa temperatura durante a extração, foi possível evitar a contaminação de *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes, considerando ainda que as enzimas apresentam maior resistência térmica para serem inativadas do que as células vegetativas dos microrganismos investigados (HENDRICKX et al., 1998; FONTAN, 2012).

### 5.3 Resultados para Sólidos Solúveis, pH e Acidez Titulável

A água de coco recém extraída e sem a adição de ácido ascórbico apresentou pH 5,37  $\pm$ 0,03; acidez titulável de 39,86  $\pm$ 2,82 mg ácido cítrico/100 mL e teor de sólidos solúveis de 5,33  $\pm$ 0,06°Brix. A Tabela 12 apresenta os valores médios e o desvio padrão para pH, acidez titulável e sólidos solúveis da água de coco processada. A boa homogeneidade dos resultados para os 17 ensaios realizados foi confirmada pelos baixos coeficientes de variação (1,02% para pH, 10,20% para acidez titulável e 3,76% para sólidos solúveis).

Para todos os ensaios realizados o pH manteve-se entre 5,33 e 5,42 nas amostras sem adição de ácido ascórbico, sendo observada discreta redução do pH para as dosagens de ácido ascórbico de 10 e de 20 mg/100 mL, com variação de pH entre 5,23 e 5,32. Tal qual esperado, os efeitos da adição do ácido ascórbico foram mais relacionados com sua atividade antioxidante e não como redutor de pH, por ser um ácido fraco, possuindo apenas um hidrogênio ionizável. Resultados semelhantes relacionados à discreta influência do ácido ascórbico sobre o pH foram obtidos por Sousa (2006) em seu estudo com água de coco ultrafiltrada, no qual para as amostras *in natura* sem adição de ácido ascórbico o pH foi de 5,00 e as amostras com adição de 20 mg de ácido ascórbico/100 mL apresentaram pH 4,87. Purkayastha e colaboradores (2012), em estudo com água de coco submetida à microfiltração, também não observaram redução significativa para o pH da água de coco, inicialmente de 4,91  $\pm$ 0,09, e, reduzido para 4,84  $\pm$ 0,03 após a adição de ácido ascórbico na proporção de 25 mg/100 mL, redução não significativa ao nível de 5%, conforme demonstrado pelos autores.

Magalhães e colaboradores (2005) trabalharam com frutos colhidos com aproximadamente 7 meses, para os quais foram encontrados valores de pH (5,00) e teor de sólidos solúveis (4,78 °Brix) comparáveis aos obtidos no presente estudo para a água de coco *in natura* (0 mg de ácido ascórbico/100 mL). Tan et al. (2014) avaliaram propriedades de água de coco em função do estágio de maturação em cocos colhidos entre 5 e 6 meses; 8 e 9 meses e com mais de 12 meses, tendo obtido valores médios de pH de 4,78 para 5 e 6 meses, 5,34 para 8 e 9 meses e 5,71 para mais de 12 meses; para sólidos solúveis em função do estágio de maturação obtiveram, respectivamente, 5,6; 6,15 e 4,85°Brix. Kwiatkowski (2011),

para água de coco de frutos colhidos no verão com 7 meses de maturação, obteve pH de 5,23; acidez titulável de 78 mg ácido cítrico/100 mL e sólidos solúveis de 6,86°Brix. Considerando que no presente estudo, os frutos apresentavam entre 6 e 7 meses de maturação, os valores para pH foram próximos e, para sólidos solúveis, inferiores aos trabalhos de Tan et al. (2014) e Kwiatkowski (2011). As comparações entre os estudos demonstraram que há um padrão médio para o pH, em torno de 5,0, sendo esta uma das peculiaridades da água de coco em relação aos produtos derivados de frutas, a exemplo do suco de maçã (ABID, 2014) e do purê de abacaxi (CHAKRABORTY, 2015) para os quais o pH obtido, respectivamente, foi de 3,77 e 3,48, bastante inferiores ao da água de coco. Considerando o alto pH da água de coco, foram observados nos ensaios 4 e 14 valores limites para classificar a água de coco como esterilizada (Tabela 1), sendo ambos ensaios sem adição de ácido ascórbico, demonstrando que, mesmo para a esterilização, é necessária a utilização de acidulante ou até mesmo de ácidos mais fracos, como o ácido ascórbico, que promove discreta redução no pH.

Tabela 12 – Resultados de pH, acidez titulável e sólidos solúveis para os tratamentos.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	AA (mg/100 mL)	pH	Acidez Titulável (mg ácido cítrico/100 mL)	Sólidos Solúveis (°Brix)
1	0,1	10	0	5,34 ±0,02	43,01 ±2,31	5,73 ±0,12
2	0,1	80	0	5,33 ±0,01	37,87 ±3,90	5,53 ±0,06
3	600	10	0	5,35 ±0,01	44,08 ±0,74	5,00 ±0,00
4	600	80	0	5,42 ±0,07	45,36 ±0,74	5,50 ±0,00
5	0,1	10	20	5,24 ±0,01	48,57 ±0,37	5,53 ±0,06
6	0,1	80	20	5,26±0,01	48,57 ±1,62	5,40 ±0,00
7	600	10	20	5,32 ±0,01	49,00 ±1,34	5,20 ±0,00
8	600	80	20	5,27 ±0,02	53,71 ±0,74	5,13 ±0,06
9	300	10	10	5,23 ±0,02	51,78 ±0,74	5,40 ±0,00
10	0,1	45	10	5,28 ±0,01	49,00 ±0,98	5,20 ±0,00
11	300	80	10	5,26 ±0,00	48,36 ±1,96	5,30 ±0,00
12	600	45	10	5,27 ±0,01	52,42 ±0,98	5,40 ±0,00
13	300	45	20	5,27 ±0,01	53,28 ±0,64	5,20 ±0,00
14	300	45	0	5,41 ±0,05	40,65 ±1,62	5,80 ±0,00
15	300	45	10	5,30 ±0,01	51,35 ±0,64	5,33 ±0,12
16	300	45	10	5,31 ±0,00	49,11 ±6,81	5,27 ±0,06
17	300	45	10	5,32 ±0,01	43,65 ±0,64	5,17 ±0,06

A acidez titulável para água de coco pode ser expressa de diferentes maneiras, em unidades de volume (mL) de NaOH 0,1N/100 mL consumido (FARIA, 2005); em mg de

ácido cítrico/100 mL (SOUSA, 2006; BENASSI, 2006), e também em mg ácido málico/100 mL (TAN, 2014). Esta última forma para expressar a acidez titulável é mais comumente encontrada em trabalhos que foram realizados em outros países. Nos trabalhos nacionais, a expressão da acidez em mg de ácido cítrico/100 mL atribui-se ao que se estabelece pela legislação vigente até 2009 (BRASIL, 2002), a qual preconizava acidez titulável de 0,03 a 0,18 g de ácido cítrico/100 mL. Na nova legislação (BRASIL, 2009) nenhuma exigência foi feita com relação à acidez titulável.

O teor de sólidos solúveis da água de coco *in natura* ( $5,33 \pm 0,06$ ) foi comparável aos valores observados por Benassi (2006) para água de coco *in natura* de frutos colhidos com idade entre 8 ( $5,13^\circ\text{Brix}$ ) e 8,5 meses ( $5,59^\circ\text{Brix}$ ). Benassi (2006) realizou estudo com água de coco a partir de frutos colhidos na região de Bebedouro (SP), entre 5 e 12,5 meses e observou que os teores de sólidos solúveis aumentaram com a idade dos frutos, atingindo valor máximo ( $6,94^\circ\text{Brix}$ ) em 10 meses, e, decrescendo após este período.

A Tabela 13 apresenta os resultados da análise estatística para avaliar os efeitos das variáveis independentes (pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico) sobre pH, acidez titulável e teor de sólidos solúveis. Considerando os valores  $p$  para falta de ajuste e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos, observa-se que tanto as variações do pH quanto da acidez titulável foram adequadamente descritas pelo modelo proposto, embora com coeficientes de determinação em torno de 0,60, valor considerado relativamente baixo; entretanto, os efeitos da pressão, da temperatura e da dosagem de ácido ascórbico não foram significativos ( $p > 0,05$ ) sobre a acidez titulável da água de coco.

Para o teor de sólidos solúveis, a variação ( $5,00$  a  $5,80^\circ\text{Brix}$ ) observada não pode ser explicada pelo modelo proposto ( $R^2 = 0,00226$ ), apesar da falta de ajuste não significativa ( $p > 0,05$ ). Entre os 17 ensaios realizados, o valor mínimo ( $5,0^\circ\text{Brix}$ ) e o máximo ( $5,8^\circ\text{Brix}$ ) foram observados para o mesmo nível de dosagem (0 mg/100 mL) de ácido ascórbico, respectivamente, nos Ensaios 3 e 14, além de uma pequena oscilação observada também entre os pontos centrais.

Embora o efeito da adição de ácido ascórbico não tenha sido significativo ( $p > 0,05$ ) sobre a acidez titulável, observou-se que esta foi gradativa e discretamente elevada com a elevação da dosagem de ácido ascórbico, de 0, para 10 e para 20 mg/100 mL, variando, respectivamente para cada dosagem de AA, de 37,87 a 45,36; 43,65 a 52,42 e 48,57 a 53,71 mg/100 mL.

Observou-se que o efeito linear da pressão e o efeito quadrático da temperatura foram marginalmente significativos para pH, indicando fraca influência. Para melhor ajuste dos dados obtidos para pH, foram ignorados os efeitos não significativos dos resultados da análise de variância (Tabela 13) e uma nova análise foi realizada. A Tabela 14 apresenta os resultados da ANOVA e, os coeficientes e valores  $p$  obtidos da análise de regressão, considerando somente os efeitos significativos sobre o pH. Observou-se que para o ajuste da equação de regressão, a variável temperatura não foi significativa e, portanto, não deve ser considerada para estimar o valor de pH, conforme demonstrado pelo coeficiente de regressão nulo (Tabela 14).

Tabela 13 – Resultados da ANOVA para os efeitos lineares, quadráticos e interação nas condições dos tratamentos sobre pH, acidez titulável e sólidos solúveis.

	pH		Acidez Titulável (mg ácido cítrico/100 mL)		Sólidos solúveis (°Brix)	
	Valor $p$	Significância	Valor $p$	Significância	Valor $p$	Significância
Pressão	0,046521	*	0,296360	ns	0,133532	ns
(Pressão) <sup>2</sup>	0,672892	ns	0,843215	ns	0,565458	ns
Temperatura	0,274453	ns	0,856607	ns	0,999952	ns
(Temperatura) <sup>2</sup>	0,044606	*	0,971317	ns	0,902852	ns
AA	0,006043	*	0,078129	ns	0,146712	ns
(AA) <sup>2</sup>	0,015611	*	0,317001	ns	0,273436	ns
Pressão x Temperatura	0,672503	ns	0,425370	ns	0,213103	ns
Pressão x AA	0,796475	ns	0,814222	ns	0,732772	ns
Temperatura x AA	0,093319	ns	0,524801	ns	0,360592	ns
Valor $p$ para falta de ajuste	0,085600		0,858158		0,312323	
R <sup>2</sup>	0,596		0,59888		0,00226	

AA: Ácido ascórbico adicionado (0, 10 e 20 mg/100 mL);

(\*): Valores diferem significativamente ao nível de 5%.

(ns): não significativo.

Tabela 14 - Resultados da ANOVA e coeficientes de regressão para fatores que apresentaram efeitos significativos sobre pH da água de coco.

	Valor $p$ (ANOVA)	Coefficiente de regressão	$p$ (Regressão)
Média		5,351567	0,000002
Pressão	0,046522	0,000057	0,046525
(Temperatura) <sup>2</sup>	0,037174	0,000000	0,725908
AA	0,006043	-0,012597	0,009748
(AA) <sup>2</sup>	0,014436	0,000387	0,023030
Valor $p$ para falta de ajuste	0,136935		
R <sup>2</sup>	0,714	0,60957	

AA: Ácido ascórbico adicionado (0, 10 e 20 mg/100 mL).

Observou-se que somente o coeficiente do efeito linear da variável dosagem de ácido ascórbico foi negativo (-0,0126), e, portanto, efetivo para a redução do pH. A Equação 11 pode ser utilizada para prever o pH em função das variações dos parâmetros significativos (pressão e dosagem de ácido ascórbico).

$$\text{pH} = 5,351567 + 5,700 \cdot 10^{-5}(P) - 1,260 \cdot 10^{-2}(AA) + 3,870 \cdot 10^{-4}(AA^2) \quad (11)$$

Com base na Equação 11 e na constante obtida (5,351567), observa-se pequena variação do pH da água de coco, por esta razão, embora com ajuste significativo, não foi necessário determinar uma faixa de parâmetros que melhor se ajustasse ao pH desejado; ademais, entre os níveis considerados no presente estudo, nenhuma das combinações possíveis para pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico, possibilitaria a redução do pH a valor igual ou inferior à 4,5; conforme exigido pela legislação vigente (BRASIL, 2009).

De uma comparação das características físico-químicas (pH, acidez titulável e teor de sólidos solúveis) observadas no presente estudo (Tabela 12) com as mesmas observadas em estudos realizados por outros autores, observa-se que, para uma melhor interpretação das variações entre os valores encontrados para pH, acidez titulável e sólidos solúveis, devem também ser considerados outros fatores, como época de colheita, clima, região, formas de cultivo, tempo e temperatura da estocagem após a colheita, além da metodologia analítica empregada.

#### **5.4 Resultados para Ácido Ascórbico**

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos para o teor (mg/100 mL) de ácido ascórbico e o residual de ácido ascórbico (%), calculado conforme Equação 5 e 6 (item 4.5.4), respectivamente, em função da dosagem nas proporções de 0; 10 e 20 mg/100 mL. Os teores de ácido ascórbico observados no presente estudo (1,74 a 2,65 mg/100 mL) para água de coco sem adição de ácido ascórbico foram relativamente próximos aos encontrados na literatura, a exemplo de Benassi (2006), o qual apresentou valor máximo de 2,57 mg de ácido ascórbico/100 mL para água de coco de frutos com dez meses de idade; enquanto para 7 meses o valor encontrado foi 1,78 mg de ácido ascórbico/100mL. A composição de nutrientes e minerais sofre influência da variedade, do clima, da estação do ano e da forma de cultivo (BENASSI, 2006).

Foi observada uma pequena variação e pequena degradação do ácido ascórbico para o presente estudo. A redução máxima foi de 34% no tratamento sem adição de ácido ascórbico,

a 600 MPa/80°C (Tabela 13). Em outros casos foi observado um aumento do teor de ácido ascórbico, com o aumento máximo de 13% em relação ao teor inicial em um dos pontos centrais do delineamento à 300 MPa, 45°C e dosagem de 10 mg ácido ascórbico/100 mL. A relativa estabilidade observada para o ácido ascórbico pode ser atribuída às precauções operacionais adotadas no presente estudo, como o enchimento completo das embalagens e uso de vácuo, reduzindo a presença de oxigênio e conseqüentemente minimizando a eventual degradação do ácido ascórbico.

A retenção do ácido ascórbico para o nível de dosagem de 20 mg/100 mL foi de 97% com relação à água de coco *in natura*, maior do que a apresentada por Abreu (2005), o qual obteve retenção aproximada entre 72 e 79%, a partir da dosagem 20 mg/100 mL de ácido ascórbico em amostras de água de coco, inicialmente com 0,55 e 0,73 mg de ácido ascórbico/100 mL, para as quais o autor observou teores, respectivamente, de 14,86 a 16,33 mg de ácido ascórbico/100 mL após a adição considerada.

Tabela 15 - Teor de ácido ascórbico e porcentagem residual de ácido ascórbico para os tratamentos.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	AA (mg/100mL)	Teor de ácido ascórbico (mg/100 mL)	Ácido ascórbico residual (%)
1	0,1	10	0	2,65 ±0,54	100,00 ±20,20
2	0,1	80	0	1,89 ±0,54	71,43 ±20,20
3	600	10	0	1,86 ±0,59	70,00 ±22,22
4	600	80	0	1,74 ±0,75	65,71 ±28,28
5	0,1	10	20	21,97 ±1,07	100,00 ±4,88
6	0,1	80	20	21,21 ±4,29	96,55 ±19,51
7	600	10	20	19,70 ±4,29	89,66 ±19,51
8	600	80	20	19,70 ±2,14	89,66 ±9,75
9	300	10	10	10,61 ±1,07	105,66 ±10,67
10	0,1	45	10	8,71 ±0,54	86,79 ±5,34
11	300	80	10	10,98 ±0,54	109,43 ±5,34
12	600	45	10	9,09 ±1,07	90,57 ±10,67
13	300	45	20	22,73 ±2,14	103,45 ±9,75
14	300	45	0	2,08 ±0,27	78,57 ±10,10
15	300	45	10	11,17 ±0,80	111,32 ±8,00
16	300	45	10	10,80 ±0,80	107,55 ±8,00
17	300	45	10	11,36 ±1,07	113,21 ±10,67

Os resultados do teor de ácido ascórbico residual foram analisados pela ANOVA, à 95% de probabilidade, para o delineamento cúbico de face centrada. A Tabela 16 apresenta os efeitos das condições de processamento sobre o residual de ácido ascórbico, com os

coeficientes de regressão obtidos para o ajuste ao modelo proposto e valores  $p$ . Os valores para a relação  $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$  para a regressão e para a falta de ajuste (Tabela 16) demonstraram a validade do modelo proposto. O efeito na redução do ascórbico residual causado pela elevação da pressão de 0,1 para 600 MPa, em temperatura de 10°C, foi maior para a água de coco com a dosagem de ácido ascórbico ao nível 0 mg/100 mL (Ensaio 1 e 3 - redução de 30%) do que para a água de coco em dosagem de 20 mg/100 mL (Ensaio 5 e 7 - redução de 10,44%); relação essa associada ao efeito negativo da alta pressão, e ao efeito positivo da dosagem de ácido ascórbico (Tabela 16).

Ainda que não tenha sido observada interação significativa entre as variáveis pressão e dosagem de AA, a redução do ácido ascórbico residual com a elevação da pressão foi menor para maiores dosagens de ácido ascórbico. Para o efeito da temperatura, considerado marginalmente significativo, foi obtido valor  $p$  de 0,07; próximo, portanto, do nível de significância (0,05) considerado na análise estatística.

Tabela 16 - Efeitos lineares, quadráticos e de interação das condições dos tratamentos sobre o teor de ácido ascórbico residual

	Coefficiente de regressão	Valor $p$ (ANOVA)	Significância
Média	98,75230		*
Pressão	0,05650	0,032671	*
(Pressão) <sup>2</sup>	-0,00016	0,014797	*
Temperatura	-0,63156	0,070260	ns
(Temperatura) <sup>2</sup>	0,00372	0,122615	ns
AA	2,62869	0,009343	*
(AA) <sup>2</sup>	-0,11982	0,020911	*
Pressão x Temperatura	0,00033	0,076602	ns
Pressão x AA	0,00077	0,151397	ns
Temperatura x AA	0,01050	0,068951	ns
Valor $p$ para falta de ajuste		0,099303	
R <sup>2</sup>		0,744	
Fcal/Ftab (Regressão)		1,67	
Fcal/Ftab (Falta de ajuste)		0,48	

AA: Ácido ascórbico adicionado (0, 10 e 20 mg/100 mL);

(\*): Valores diferem significativamente ao nível de 5% de significância;

(ns): não significativo.

Com os fatores significativos (Tabela 16), foi realizada nova análise de variância (ANOVA), a partir da qual foram obtidos valores de  $p$  (0,098) para falta de ajuste e valores de R<sup>2</sup> (70%) que possibilitaram gerar a Equação 12. A Figura 12 apresenta a superfície de resposta gerada pela Equação 12, para predizer o valor para residual do ácido ascórbico (%)



em função das variações da pressão e da dosagem de ácido ascórbico, à temperatura fixada em 45°C (ponto central). Observou-se que em pressões na faixa de 200 a 400 MPa e dosagem de ácido ascórbico entre 10 e 20 mg/100 mL, não há redução no teor de ácido ascórbico residual.

$$AA_{residual} = 79,499 + 6,875 \cdot 10^{-2}(P) - 1,419 \cdot 10^{-4}(P^2) + 3,023(AA) - 1,044 \cdot 10^{-1}(AA^2) + 0 \quad (12)$$

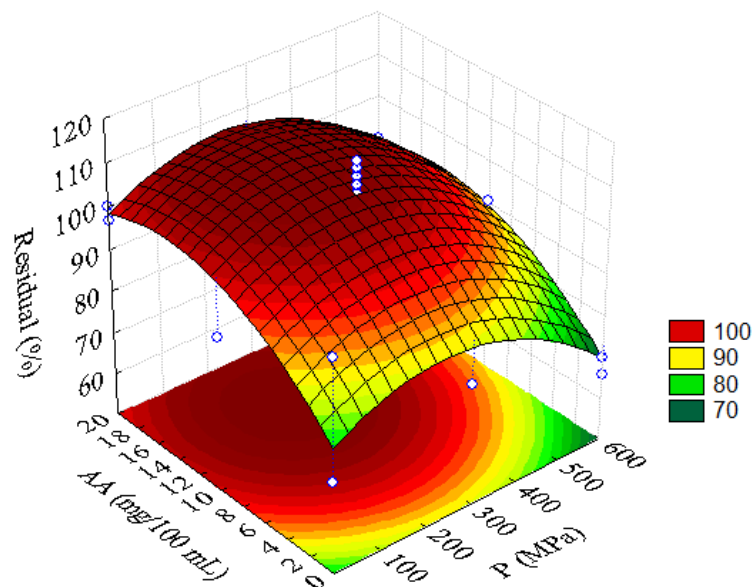
onde:

$AA_{residual}$  = Ácido ascórbico residual predito (%)

P = pressão (0,1 a 600 MPa)

AA = dosagem de ácido ascórbico (0 a 20 mg/100 mL)

Figura 12: Superfície de resposta do modelo para prever a porcentagem de ácido ascórbico residual, a 45°C, em função da pressão e da dosagem de ácido ascórbico.



Os efeitos quadráticos negativos (Equação 12) tanto para dosagem de ácido ascórbico quanto para pressão, indicam que houve uma faixa de pressão e de dosagem de ácido ascórbico em que se observa um residual máximo, dentro dos limites considerados para estes parâmetros, conforme representado pela curvatura com concavidade voltada para baixo (Figura 12).

Sousa (2006) observou reduções de 6,7 a 9,15% no teor de ácido ascórbico da água de coco, em um estudo com ultrafiltração, para o qual a dosagem considerada foi de 20 mg de ácido ascórbico/100 mL; segundo a autora, essas reduções ocorreram provavelmente devido a uma aeração indesejável em decorrência da turbulência do processo. No presente estudo, considerando o nível de dosagem de 20 mg/100 mL, a maior redução (10,36%) observada como efeito da elevação de pressão (0,1 a 600 MPa) ocorreu para os Ensaio 5 e 7, a 10°C; enquanto que comparando os Ensaio 6 e 8, ambos a 80°C e dosagem de AA de 20 mg/100 mL, a redução foi de 6,89% para a elevação na pressão de 0,1 a 600 Mpa. Entretanto, para os tratamentos à pressão atmosférica (Ensaio 5 e 6), foi observado menor teor de AA residual a 80°C (Ensaio 6) do que a 10°C (Ensaio 5), ilustrando o discreto efeito negativo observado para a temperatura (Tabelas 15 e 16).

Abid e colaboradores (2014) avaliaram o efeito da alta pressão no teor de ácido ascórbico em suco de maçã submetido às pressões de 250, 350 e 450 MPa, durante 10 minutos e à temperatura ambiente. Foram observadas reduções de 2,3 e 4,9%, respectivamente, a 350 e 450 MPa, e nenhuma alteração a 250 MPa. Os autores também observaram que para a combinação da alta pressão com ultrassom (25 kHz/70% amplitude/20°C/60 min), a retenção de ácido ascórbico foi ainda maior, pois o teor de ácido ascórbico aumentou em relação ao do suco de maçã não processado.

O aumento detectado no teor de ácido ascórbico em relação ao inicial para alguns ensaios (Tabela 15 – Ensaio 9, 11 e 13) pode estar relacionado tanto a desvios analíticos quanto à formação de ácido dehidroascórbico, que também pode ser detectado na análise titulométrica realizada, e, ainda, relacionado à liberação de ácido ascórbico inicialmente não detectado. A oxidação do ácido ascórbico pela enzima peroxidase formando uma molécula de ácido ascórbico e uma molécula de ácido dehidroascórbico (DAMORADAN et al., 2010) pode ser uma das formas consideradas para explicar o aumento do teor de ácido ascórbico.

## 5.5 Resultados para Cor

Foram observadas para a água de coco não submetida (referência) aos tratamentos, médias para a claridade ( $L_o^*$ ) de  $73,59 \pm 0,47$ ; para o parâmetro  $a_o^*$  de  $-0,60 \pm 0,01$  (tons esverdeados); e o parâmetro  $b_o^*$  de  $2,73 \pm 0,16$  (tons amarelados). A água de coco *in natura* apresentou valores para o parâmetro  $a^*$ (-0,60) e  $b^*$ (2,73) comparáveis aos resultados apresentados por Sousa (2006), o qual obteve médias de  $a^*$  (-0,02) e  $b^*$ (2,56) muito próximas às do presente estudo. A Tabela 17 apresenta os resultados para os parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e

b\*) em função dos tratamentos, os valores  $p$  da falta de ajuste e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), para cada variável investigada. Em nenhum dos casos houve falta de ajuste das respostas ao modelo, porém os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) indicaram que as variações das respostas para  $L^*$ ,  $b^*$  e  $\Delta E$  não foram explicadas de forma satisfatória pelo modelo proposto. Os parâmetros de cor apresentaram pequena variação em relação aos tratamentos, com claridade ( $L^*$ ) média variando de 72,82 a 74,15; parâmetro  $a^*$  médio variando de -0,70 a -0,53 e parâmetro  $b^*$  médio de 2,51 a 3,03, os quais compreendem as regiões de tons esverdeados (valores negativos para  $a^*$ ) e de tons amarelados (valores positivos para  $b^*$ ). Valores positivos de  $\Delta a^*$  [= ( $a^* - a_0^*$ )] observados apenas nos ensaios 1, 2 e 3, foram considerados como a tendência de alteração do parâmetro  $a^*$  para a região de tonalidade avermelhada. A maior variação total de cor ( $\Delta E = 0,78 \pm 0,04$ ) foi observada para a água de coco após ter sido tratada sob pressão de 300 MPa; temperatura de 80°C e dosagem de ácido ascórbico de 10 mg /100 mL (Ensaio 11); para a qual foi observada também a menor claridade ( $L^* = 72,82 \pm 0,04$ ) entre os 17 ensaios, inferior à da amostra inicial de referência.

Tabela 17 – Resultados de cor instrumental para água de coco em função dos tratamentos e resultados da análise estatística para ajuste do modelo.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	AA (mg/ 100mL)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta a^*$	$\Delta E$
1	0,10	10	0	73,05 ±0,06	-0,53 ±0,01	2,63 ±0,05	0,07 ±0,01	0,55 ±0,05
2	0,10	80	0	73,25 ±0,25	-0,57 ±0,03	2,87 ±0,04	0,03 ±0,03	0,43 ±0,16
3	600	10	0	72,85 ±0,11	-0,59 ±0,01	2,51 ±0,06	0,01 ±0,01	0,75 ±0,13
4	600	80	0	73,12 ±0,14	-0,58 ±0,03	2,79 ±0,11	0,02 ±0,03	0,48 ±0,14
5	0,10	10	20	73,98 ±0,10	-0,67 ±0,04	2,79 ±0,11	-0,07 ±0,04	0,46 ±0,17
6	0,10	80	20	74,02 ±0,06	-0,68 ±0,02	2,98 ±0,13	-0,08 ±0,02	0,46 ±0,06
7	600	10	20	73,97 ±0,04	-0,68 ±0,02	2,79 ±0,10	-0,08 ±0,02	0,40 ±0,02
8	600	80	20	73,64 ±0,06	-0,67 ±0,02	2,80 ±0,10	-0,07 ±0,02	0,12 ±0,10
9	300	10	10	73,93 ±0,04	-0,67 ±0,03	2,79 ±0,11	-0,07 ±0,03	0,43 ±0,14
10	0,10	45	10	73,78 ±0,06	-0,64 ±0,04	3,03 ±0,12	-0,04 ±0,04	0,24 ±0,11
11	300	80	10	72,82 ±0,04	-0,63 ±0,04	2,62 ±0,08	-0,03 ±0,04	0,78 ±0,04
12	600	45	10	73,33 ±0,06	-0,63 ±0,01	2,73 ±0,08	-0,03 ±0,01	0,29 ±0,02
13	300	45	20	74,15 ±0,10	-0,70 ±0,01	2,85 ±0,06	-0,10 ±0,01	0,58 ±0,09
14	300	45	0	73,67 ±0,08	-0,65 ±0,06	2,74 ±0,06	-0,05 ±0,06	0,14 ±0,00
15	300	45	10	73,30 ±0,04	-0,67 ±0,05	2,76 ±0,11	-0,07 ±0,05	0,30 ±0,03
16	300	45	10	73,59 ±0,14	-0,65 ±0,06	2,74 ±0,11	-0,05 ±0,06	0,15 ±0,00
17	300	45	10	73,95 ±0,03	-0,67 ±0,04	2,80 ±0,07	-0,07 ±0,04	0,38 ±0,05
Valor $p$ para falta de ajuste				0,511	0,308	0,069	0,308	0,201
$R^2$				0,347	0,823	0,291	0,823	0,000

Notas:  $L^*$ : claridade ;  $a^*$ : verde (-) a vermelho (+);  $b^*$ : azul (-) a amarelo (+);  $\Delta a^*$ : variação para o parâmetro  $a^*$ ;  $\Delta E$ : variação total de cor devido aos tratamentos.

Os resultados da análise de variância realizada para os diversos efeitos das variáveis (pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico) sobre a resposta para o parâmetro de cor  $a^*$  estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Análise de variância para as respostas do parâmetro  $a^*$  para a água de coco em função dos tratamentos.

Fator	valor $p$	Significância
Média	0,000073	*
Pressão	0,260456	ns
(Pressão) <sup>2</sup>	0,052381	ns
Temperatura	0,833286	ns
(Temperatura) <sup>2</sup>	0,179445	ns
AA	0,007997	*
(AA) <sup>2</sup>	0,529664	ns
Pressão x Temperatura	0,202302	ns
Pressão x AA	0,202302	ns
Temperatura x AA	0,506803	ns

AA: Ácido ascórbico adicionado (0, 10 e 20 mg/100 mL);

(\*) valores diferem significativamente ao nível de 5%;

(ns): não significativo.

A dosagem de ácido ascórbico apresentou efeito significativo para a coordenada  $a^*$ . O efeito quadrático da pressão foi marginalmente significativo (valor  $p$  0,052), indicando que esta apresenta pequena influência sobre o parâmetro de cor  $a^*$ . Observa-se que quanto maior a dosagem de ácido ascórbico, menor o valor da coordenada  $a^*$  e, portanto, mais distante da tonalidade rosada para a água de coco.

Purkayastha e colaboradores (2012) em trabalho com água de coco microfiltrada e armazenada sob refrigeração obtiveram valores positivos para  $a^*$  (0,094 sem adição de ácido ascórbico e 0,033 com adição de ácido ascórbico) enquanto no presente estudo todos os valores de  $a^*$  foram negativos, mas para ambos, a adição de ácido ascórbico reduziu os valores que representam a coordenada  $a^*$ , ou seja, a adição de ácido ascórbico pode inibir a formação da coloração rósea, usualmente atribuída à atividade enzimática, entretanto seria necessário um estudo de estocagem para confirmar a efetividade do ácido ascórbico e o nível de dosagem ideal.

O parâmetro de cor  $a^*$  foi considerado importante para o estudo com água de coco, considerando que além do problema da formação de coloração rosada, o menor valor para o parâmetro  $a^*$  ( $-0,70 \pm 0,01$ ) foi obtido para a mesma amostra (ensaio 13) na qual a claridade foi maior ( $L^* = 74,15 \pm 0,10$ ), demonstrando que o tratamento a 300 MPa; temperatura de 45°C

e dosagem de ácido ascórbico de 20 mg/100 mL foi o ensaio que resultou em maior aumento da claridade e menor tendência ao desenvolvimento de uma coloração rosada para a água de coco em relação à amostra inicial de referência (água de coco *in natura*). As atividades residuais (Tabela 20) das enzimas polifenoloxidase (inibição completa) e peroxidase ( $3,47\% \pm 0,77$ ) também foram satisfatórias nesses mesmos níveis de pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico, fato este que permite inferir em uma possível correlação entre o parâmetro de cor  $a^*$  e as atividades enzimáticas residuais. A Tabela 19 apresenta os coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) obtidos entre as variáveis de cor estudadas e as atividades residuais das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD).

Tabela 19 - Correlação entre os parâmetros de cor e a atividade residual das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD).

Parâmetros de cor	Coeficiente de correlação ( $r$ )	
	POD residual	PFO residual
$L^*$	-0,43	-0,42
$a^*$	0,55	0,59
$b^*$	-0,30	-0,52
$\Delta E$	0,15	0,10

Observada a fraca correlação entre os fatores, visto que a correlação só é considerada significativa para coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) maiores que 0,70. A correlação observada para a coordenada  $a^*$  consistiu no valor de  $r$  mais próximo a 0,70 dentre os parâmetros de cor, sugerindo uma possível influência do aumento da atividade enzimática sobre o aumento do valor observado para a coordenada de cor  $a^*$ . Comparando os diversos coeficientes de correlação de Pearson, observa-se ser positivo somente para  $a^*$  em relação à atividade enzimática da POD e PFO, sendo possível constatar, embora discretamente, que o aumento da atividade da polifenoloxidase e da peroxidase, resultaria em aumento do valor do parâmetro  $a^*$ , e, por outro lado, ainda que em menor grau, reduziria os valores de  $L^*$  e  $b^*$ ; em outras palavras, a água de coco se tornaria mais escura ( $L^*$  mais baixo) e com coloração nas regiões de comprimentos de onda compreendendo o vermelho ou neutro ( $a^*$  positivo ou próximo de zero) e azul ou neutro ( $b^*$  negativo ou próximo de zero).

## 5.6 Resultados para Atividade Enzimática

A água de coco (*in natura*) não tratada (controle ou atividade inicial) apresentou valores de  $7,94 \pm 0,10$  U/mL para atividade de peroxidase (POD) e  $1,55 \pm 0,05$  U/mL para

atividade de polifenoloxidase (PFO), a partir dos frutos colhidos entre 6 e 7 meses, conforme mencionado anteriormente.

Kwiatkowski e colaboradores (2012) investigaram a atividade enzimática da polifenoloxidase e da peroxidase em água de coco a partir de frutos colhidos nas quatro estações do ano e em cinco estádios de desenvolvimento diferentes, variando de 5 a 9 meses; a partir dos resultados foram propostas equações ajustadas para cada estação do ano, com o estádio de desenvolvimento como variável independente e a atividade enzimática como resposta. Utilizando as equações propostas pelos autores, as atividades enzimáticas previstas para frutos colhidos no verão e com 6 meses de maturação foram 20,35 e 2,99 U/mL, respectivamente, para peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO); esta última (PFO), inferior à atividade da POD, como geralmente encontrado em estudos de água de coco (CAMPOS, 1993; SOUSA, 2006; DOSUALDO, 2007) e também observado no presente estudo.

Abreu e Faria (2007), em estudo sobre tratamento térmico da água de coco obtiveram atividade enzimática de 12,23 U/mL para a POD e 2,33 U/mL para a PFO em água de coco *in natura*, valores similares aos encontrados no presente estudo e, também com atividades enzimáticas maiores para peroxidase (POD) do que para a polifenoloxidase (PFO). Campos (1993) encontrou 114,3 e 32,2 U/mL, respectivamente, para POD e PFO, enquanto Sousa (2006) apresentou atividades de 8,35 e 2,60 U/mL para POD e PFO, ambos para água de coco *in natura*. Em todos os estudos citados (ABREU; FARIA, 2006; CAMPOS, 1993; SOUSA, 2006), a metodologia consistiu em análises espectrofotométricas (por reação com os substratos fenólicos guaiacol e catecol), nos mesmos comprimentos de onda (470 nm para POD e 425 nm para PFO), para determinar a atividade enzimática da polifenoloxidase e da peroxidase, tal qual no presente trabalho, resultando em maior atividade para POD do que para PFO. No entanto, Duarte e colaboradores (2002) determinaram a atividade das mesmas enzimas em água de coco, também por análise espectrofotométrica, mas em diferentes comprimentos de onda (405 nm para peroxidase e 350 nm para polifenoloxidase), para as quais a atividade observada para peroxidase (0,3 U/ mL) foi menor do que para polifenoloxidase (5,0 U/mL), comportamento este contrário ao obtido no presente trabalho e também em relação aos demais trabalhos citados.

Da análise dos resultados para atividade enzimática do presente estudo e de estudos anteriores (ABREU; FARIA, 2006; CAMPOS, 1993; SOUSA, 2006; DUARTE et al., 2002) pode-se concluir que o método de determinação utilizado também pode influenciar no resultado da atividade enzimática, justificando a utilização de atividade residual, para

minimizar esta influência. A Tabela 20 apresenta a atividade residual calculada para as enzimas (Equação 9) peroxidase e polifenoloxidase, para os diversos tratamentos realizados. Os efeitos dos tratamentos sobre cada enzima estudada são discutidos mais detalhadamente nos itens 5.4.1 e 5.4.2, na sequência deste trabalho.

À pressão atmosférica, foi observado que somente a adição de ácido ascórbico contribuiu significativamente para a redução da atividade enzimática, porém os outros benefícios da utilização de alta pressão combinada com o uso de temperaturas moderadas devem ser considerados, como a destruição de microrganismos, motivando o estudo da associação entre pressão e dosagem de ácido ascórbico, em temperaturas que não comprometam o sabor dos alimentos, por esta razão a importância de ter sido utilizada uma ampla faixa de temperatura.

Tabela 20 - Atividade residual das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO) para os diversos tratamentos.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Ácido Ascórbico (mg/100mL)	Residual POD (%)	Residual PFO (%)
1	0,1	10	0	93,40 ±1,09	88,94 ±5,55
2	0,1	80	0	4,61 ±0,43	n.d
3	600	10	0	104,30 ±0,87	65,44 ±3,32
4	600	80	0	272,64 ±9,12	41,46 ±7,23
5	0,1	10	20	0,64 ±0,54	n.d
6	0,1	80	20	0,05 ±0,02	n.d
7	600	10	20	2,33 ±0,54	n.d
8	600	80	20	3,72 ±0,55	n.d
9	300	10	10	2,39 ±0,33	n.d
10	0,1	45	10	0,002 ±0,00	n.d
11	300	80	10	0,63 ±0,22	n.d
12	600	45	10	4,62 ±0,43	7,70 ±2,77
13	300	45	20	3,41 ±0,77	n.d
14	300	45	0	128,64 ±4,46	98,07 ±4,91
15	300	45	10	1,07 ±0,18	n.d
16	300	45	10	1,76 ±0,20	n.d
17	300	45	10	1,26 ±0,09	n.d

\*n.d: atividade não detectada

A efetividade do ascórbico adicionado na água de coco para a inibição da atividade enzimática é unânime entre os diversos estudos, porém a dosagem recomendada varia entre os diversos trabalhos científicos. Campos (1993) observou redução em 99,1% da atividade da enzima polifenoloxidase e em 73,7% da atividade da peroxidase com adição de 10 mg/100 mL de ácido ascórbico, enquanto que com a dosagem de 20 mg/100 mL, o mesmo autor observou que a inibição foi completa para ambas enzimas. No mesmo trabalho, o autor informa ter obtido redução de 26,9% em média para as notas atribuídas para o atributo “sabor” da água de coco, sendo 20 mg/100 mL a dosagem máxima sugerida pelo autor para não comprometer a aceitação sensorial da água de coco. Purkayastha et al. (2014) estudou os efeitos do processo de microfiltração de água de coco e verificou que a adição de ácido ascórbico na proporção de 25 mg/100 mL não prejudicou a aceitação sensorial e nesta dosagem foi observada completa inibição da atividade enzimática para a peroxidase e para a polifenoloxidase.

Calvette (2007) verificou inativação total da POD e PFO da água de coco em pressão de 800 MPa, temperatura de 50°C, tendo observado a necessidade de 30 minutos para completa inativação da POD; em contraposição, para a completa inativação da PFO foram necessários 90 minutos, tendo sido considerado pela autora o tempo como um fator significativo para a inativação da polifenoloxidase. No presente estudo, o tempo de exposição nas condições dos tratamentos foi fixado considerando a combinação de pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico.

Um aspecto importante a ser destacado é a possível influência de compostos fenólicos naturalmente presentes na água de coco, considerando que a metodologia empregada para a determinação da atividade enzimática (item 4.5.6) envolve a medição de produtos da reação catalisada pelas enzimas a partir de compostos fenólicos, os quais também são adicionados (guaiacol no caso da peroxidase e catecol no caso da polifenoloxidase). Chang e Wu (2011) relataram a presença em água de coco da catequina (0,344 mg/L) e epicatequina (0,242 mg/L); enquanto a zeatina, a quinetina e a ortotopolina foram relatadas por Ge et al (2006). Tan et al. (2014), em pesquisa sobre a influência do estágio de maturação do coco, encontrou redução no teor de compostos fenólicos totais (expressos em ácido gálico) ao longo da maturidade, 54,00 mg/L na água de cocos colhidos com 5 a 6 meses, 42,59 mg/L (6 a 8 meses) e 25,70 mg/L (> 12 meses).

Pesquisas indicam que a retenção ou perda de compostos fenólicos depende do produto (fruta de origem) e das condições do tratamento. Keenan et al. (2012) relatou 15%



maior retenção de compostos fenólicos totais à 450 MPa/5 min/20-22°C em relação ao tratamento de bebida mista à base de frutas (morango, maçã, banana e laranja) tratada à 600 MPa/10 min/ 20-22°C. Em trabalho desenvolvido por Jayachandran et al (2015) com bebida à base de lichia, água de coco e limão, os resultados mostraram que em pressões mais elevadas, mais compostos fenólicos são extraídos a partir das frutas e tornam-se prontamente susceptíveis aos efeitos da degradação por altas temperaturas (60 e 70°C) com o aumento do tempo de retenção (de 5 a 20 minutos). Os autores concluem que a combinação de alta pressão e temperaturas mais elevadas (como 70°C) resultou em aumento da degradação dos compostos fenólicos totais nas amostras das bebidas da mistura das frutas (água de coco, lichia e limão).

O tempo transcorrido entre a extração da água de coco, incluindo os tratamentos e a realização de todas as análises foi de 6 dias, durante o qual não foi observado o desenvolvimento de coloração rósea para qualquer dos tratamentos. Esta coloração somente foi observada três meses após a realização do estudo e ainda, somente em amostras em que o nível de dosagem de ácido ascórbico foi de 0 mg/100 mL (resultado não apresentado).

É conhecido o fato de que durante a estocagem sob congelamento, há alteração no teor de elementos minerais (NAOZUKA, 2004) e também devido ao fato de determinados metais catalisarem reações enzimáticas. Além da água de coco ter sido estocada sob condições de congelamento, os tratamentos sob alta pressão também podem ter exposto o sítio ativo das enzimas, o qual interage com os elementos minerais, ou liberam os mesmos, que catalisam diversas reações, como a degradação de ácido ascórbico, esta por sua vez catalisada por íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  (DAMORADAN et al., 2010), fenômeno também observado por Naozuka (2004), com aumento para ambos os íons em água de coco estocada por 30 dias sob congelamento. Dessa forma, a forte resistência que as enzimas da água de coco apresentam, em especial a peroxidase, quando comparadas aos sucos de frutas e até quando comparada às enzimas comerciais (CALVETTE, 2007), pode estar relacionada também ao elevado teor de elementos minerais presentes na água de coco.

### **5.6.1 Peroxidase**

Os resultados para a atividade residual da enzima peroxidase (Tabela 20) mostraram variação entre os diversos tratamentos. Utilizando-se o delineamento composto cúbico de face centrada, foi determinada a falta de ajuste (erro puro) para a inadequação do modelo proposto,

à 5% de nível de significância. Devido à grande amplitude de variação da atividade enzimática, foram calculados os logaritmos dos valores da atividade de peroxidase. Para avaliar os fatores com efeitos significativos sobre a variável dependente/resposta, foi realizada a análise de variância e a determinação dos coeficientes ajustados ao modelo de regressão.

A Tabela 21 apresenta os valores  $p$  para avaliar o efeito das variáveis independentes (pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico) sobre atividade da peroxidase (POD). Valores  $p$  inferiores a 0,05 indicam influência significativa do fator, que pode ser linear ou quadrática. A falta de ajuste (valor  $p$  falta de ajuste = 0,025) foi significativa, porém próxima a 5%; ademais, o coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,7897$ ) do modelo foi considerado satisfatório, visto que as variáveis independentes explicam 78,97 % da variação da atividade residual da peroxidase. O valor  $p$  da regressão ( $p = 0,002$ ) também demonstrou que os dados poderiam ser ajustados a uma regressão múltipla, e, por essa razão optou-se em prosseguir com a metodologia de superfície de resposta proposta.

Tabela 21 – Resultados da análise de variância para a atividade enzimática relativa da peroxidase (POD) em função de pressão, temperatura e dosagem de ácido ascórbico.

Fator	Valor $p$	Significância
Pressão (Linear)	0,002094	*
Pressão (Quadrática)	0,005862	*
Temperatura (Linear)	0,020952	*
Temperatura (Quadrática)	0,076580	ns
Ácido ascórbico (Linear)	0,001429	*
Ácido ascórbico (Quadrática)	0,002118	*
Pressão x Temperatura	0,010435	*
Pressão x Ácido ascórbico	0,189828	ns
Temperatura x Ácido ascórbico	0,969805	ns
Falta de ajuste	0,025493	*

(\*): Valores diferem significativamente ao nível de 5%;

(ns): não significativo.

Para melhor ajuste dos dados, foram ignorados os efeitos não significativos dos resultados da análise de variância (Tabela 21) e uma nova análise foi realizada, a qual resultou em menor falta de ajuste, com valor  $p$  (0,038) mais próximo a 5% e em coeficiente de determinação também superior ao inicial ( $R^2 = 84,11$ ).

A inibição da enzima peroxidase na água de coco sem adição de ácido ascórbico somente foi observada à pressão atmosférica e na temperatura de 80°C (Tabela 20 – Ensaio 2). Fontan et al. (2012) avaliaram a cinética de inativação da peroxidase em água de coco por

meio de combinações de tempo (1 a 30 minutos) e temperaturas (75 a 95°C), para a qual apresentaram atividades residuais de 97% e 52%, respectivamente, a 75 e 85°C, ambos por 10 minutos, com base na equação ajustada proposta pelos autores para cada temperatura. No presente estudo, a atividade residual da peroxidase após tratamento da água de coco à temperatura de 80°C/10 minutos foi de  $4,61 \pm 0,43\%$  (Ensaio 2). Esta diferença pode ser explicada por uma maior atividade enzimática inicial (30,23 U/mL) encontrada pelos autores (FONTAN et al., 2012), em contraposição a atividade inicial ( $7,94 \pm 0,10$  U/mL) mais baixa para a enzima peroxidase no presente estudo.

Em alguns ensaios, inclusive nos níveis centrais de pressão (300 MPa) e de temperatura (45°C), a atividade residual da peroxidase foi maior para a dosagem de 20 mg/100 mL de ácido ascórbico do que a atividade da mesma enzima no nível de 10 mg/100 mL; contrapondo afirmações de estudos anteriores (CAMPOS et al., 1996; PURKAYASTHA, 2012) os quais descrevem redução de atividade proporcional ao aumento de ácido ascórbico adicionado, para água de coco *in natura*. Contudo no presente estudo, em ambas dosagens (10 e 20 mg/100 mL) de ácido ascórbico, a redução foi superior a 95% não sendo possível assim afirmar que o aumento do teor de ácido ascórbico adicionado aumenta a atividade residual. Os tratamentos no nível intermediário (ponto central) de pressão (300 MPa), temperatura (45°C) e adição de ácido ascórbico (10 mg/100 mL) resultaram em inibição próxima a 98% da atividade da enzima peroxidase, demonstrando a efetividade da combinação dos três fatores em condições moderadas.

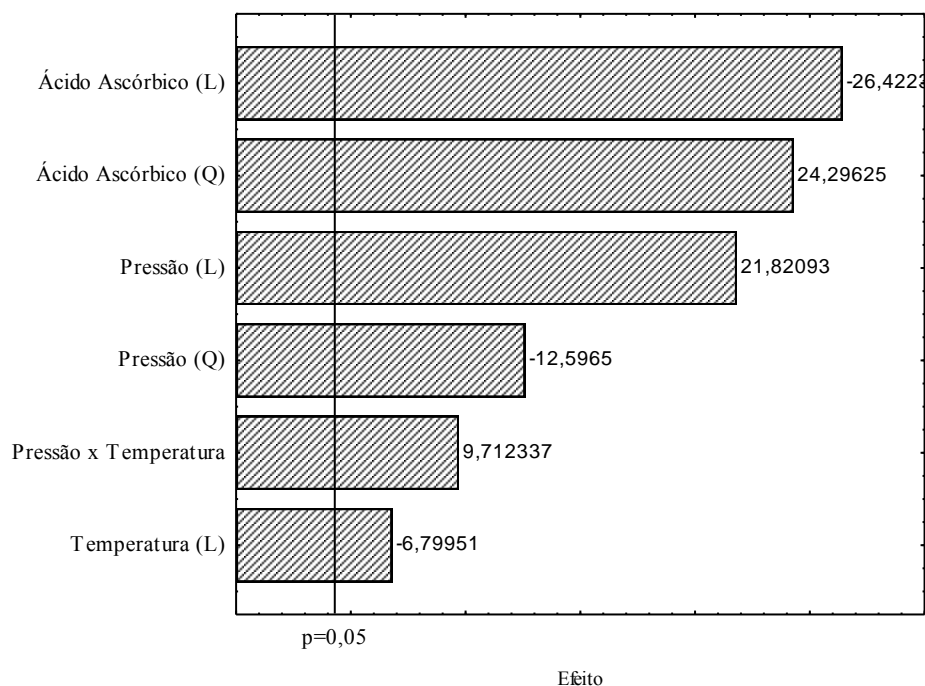
Em ordem decrescente de influência, a Figura 13 apresenta o gráfico de Pareto para a análise dos efeitos significativos apresentados na Tabela 21. É importante observar que a adição de ácido ascórbico não apresentou interação significativa com os demais fatores, demonstrando que atua de forma independente na inibição enzimática. A pressão foi o único fator a apresentar os três efeitos, linear, quadrático e de interação com a temperatura; esta, quando avaliada isoladamente, atuou na inibição; porém, em interação com a pressão, acarretou em aumento da atividade residual da peroxidase, conforme representado pelos efeitos com sinais negativos para a temperatura e positivos para a interação entre temperatura e pressão.

A peroxidase é conhecida por ser uma enzima resistente à pressão (GUPTA; BALASUBRAMANIAM, 2012), associada ainda ao fato de ser considerada uma enzima monomérica (DUARTE et al., 1999), que por sua vez pertence à classe de enzimas possivelmente ativadas por altas pressões (DAMORADAN et al., 2010), por esses motivos a

alta pressão deve ser combinada com outros fatores quando o objetivo for inibir a ação da POD. Em um estudo empregando homogeneização sob alta pressão (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 MPa) de água de coco, Dosualdo (2007) sugeriu a utilização de pressões mais elevadas e de tecnologias combinadas (pressão aliada a temperatura ou agentes químicos) para inativação enzimática, considerando que o autor observou redução muito baixa, de 9,3% e 4,0%, respectivamente, na atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, para tratamentos com pressão de 300 MPa.

Para o cálculo da atividade residual da peroxidase (em escala logarítmica) em função das três variáveis independentes (P: pressão; T: temperatura e AA: dosagem de ácido ascórbico) foi realizado a análise de regressão múltipla, e o resultado expresso pela Equação 13. A Figura 14 apresenta as superfícies de resposta para a atividade residual da enzima POD em função da pressão e da temperatura, para valores fixados da dosagem de ácido ascórbico, respectivamente, em (a) 0; (b) 10 e (c) 20 mg de ácido ascórbico/100 mL, conforme Equação 13. Pode-se observar que a atividade residual para a enzima peroxidase aumenta com o aumento da pressão e com o aumento da temperatura para água de coco sem adição de ácido ascórbico (Figura 14-a); enquanto que para as dosagens de 10 e 20 mg/100 mL de ácido ascórbico, observa-se haver certa limitação para este aumento.

Figura 13 - Diagrama de Pareto para os efeitos significativos na atividade enzimática residual da peroxidase. Nota: (L) = Linear; (Q) = Quadrado.



$$\log(POD_{res}) = 1,710 + 6,240 \cdot 10^{-3}(P) - 9,000 \cdot 10^{-6}(P^2) - 1,765 \cdot 10^{-2}(T) - 4,002 \cdot 10^{-1}(AA) + 1,540 \cdot 10^{-2}(AA^2) + 3,600 \cdot 10^{-5}(P)(T) + \varepsilon \quad (13)$$

onde:

POD<sub>res</sub> = atividade residual da peroxidase (%)

P = pressão (0,1 a 600 MPa); T = temperatura (10 a 80°C); AA = dosagem de ácido ascórbico (0 a 20 mg/100 mL)

ε (erro para AA = 0 mg/100 mL) = 0; ε (erro para AA = 10 mg/100 mL) = -2,4582; ε (erro para AA = 20 mg/100 mL) = -1,8435.

Considerando que para o delineamento proposto foram encontrados valores positivos e valores negativos para a resposta (logaritmo da atividade residual da POD), foi observado um ponto de sela para o delineamento, ao invés de um ponto de máximo ou de mínimo. O ponto de sela foi obtido em torno de 440 MPa; 50°C e 13 mg/100 mL; condições nas quais a atividade residual da peroxidase seria de 0,998%. Quando a superfície de resposta tem um ponto de sela ao invés de um ponto de máximo ou de mínimo, uma das alternativas é considerar o ponto de sela como ponto de máximo ou mínimo, no qual, com base nos resultados apresentados (Tabela 20), foram estimados valores da atividade residual da peroxidase em torno do ponto de sela obtido, para temperaturas entre 30 e 70°C e pressões entre 340 e 540 MPa, conforme apresentado na Figura 15, para a qual foram consideradas as dosagens de ácido ascórbico nos níveis de (a) 0 mg/100 mL e de (b) 13 mg/100 mL, para fins de comparação. A atividade residual estimada (Figura 15) variou entre 227,77% (540 MPa/30°C) e 363,92% (440 MPa/70°C) sem a adição de ácido ascórbico e, entre 0,79% (340 MPa/70°C) e 1,00 % (440 MPa/50°C) para a dosagem de 13 mg/100 mL de ácido ascórbico.

A Figura 15-a, que apresenta os valores estimados para atividade residual de POD na dosagem de ácido ascórbico de 0 mg/100 mL ilustra a resistência apresentada pela enzima peroxidase à alta pressão. À pressão de 340 MPa, observa-se redução próxima a 40% na atividade residual da POD com o aumento da temperatura de 30°C para 50°C, sendo esta atividade residual mantida à temperatura de 70°C. À 440 MPa, observa-se redução da atividade residual da POD para um aumento da temperatura de 30 para 50°C, no entanto, entre 50 e 70°C, observa-se novo aumento da atividade enzimática, retornando ao valor inicialmente estimado (próximo a 350%), indicando o efeito sinérgico, a 440 MPa/70°C, de pressão e temperatura no aumento da atividade enzimática.

O efeito de aumento da atividade residual com aumento da temperatura foi mais pronunciado à 540 MPa, pressão sob a qual a atividade residual da água de coco seria mantida

entre 30 e 50°C e, aumentaria em aproximadamente 50% para o aumento da temperatura de 50 a 70°C. Independentemente dos efeitos observados, o aumento da atividade residual da POD foi muito acentuado para água de coco sem adição de ácido ascórbico, demonstrando a inviabilidade do processamento sem a adição de ácido ascórbico nas faixas de pressão e temperatura investigadas no presente estudo.

Figura 14 - Superfície de resposta para atividade residual de peroxidase (POD) em função da pressão e da temperatura, nas dosagens de ácido ascórbico de (a) 0 mg/100 mL; (b) 10 mg/100 mL e (c) 20 mg/100 mL.

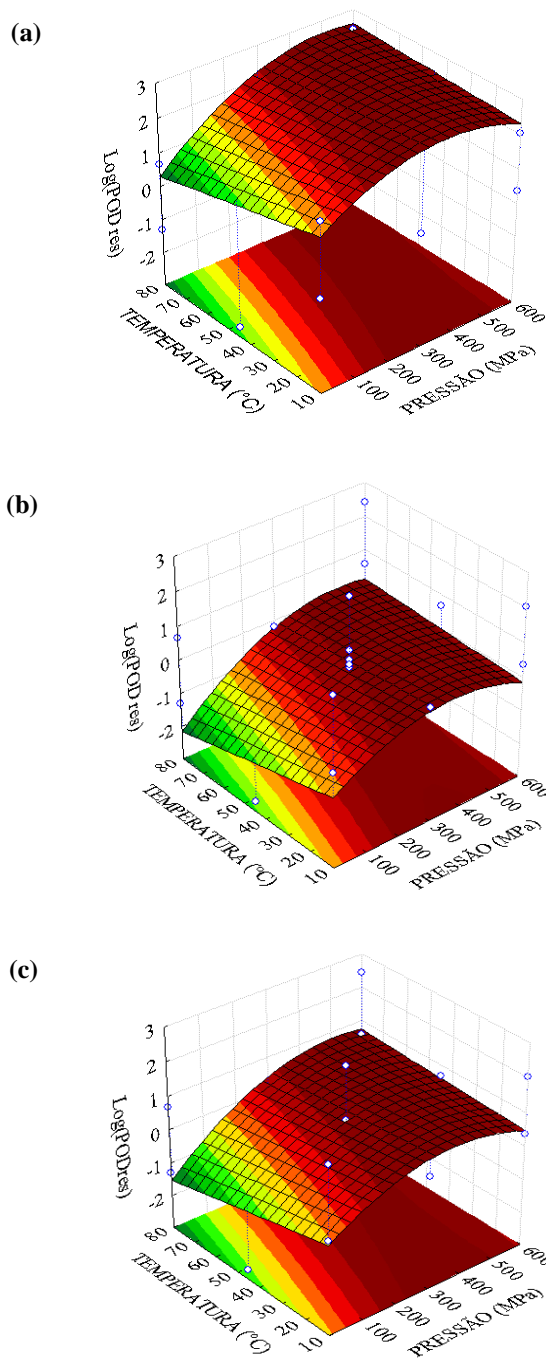
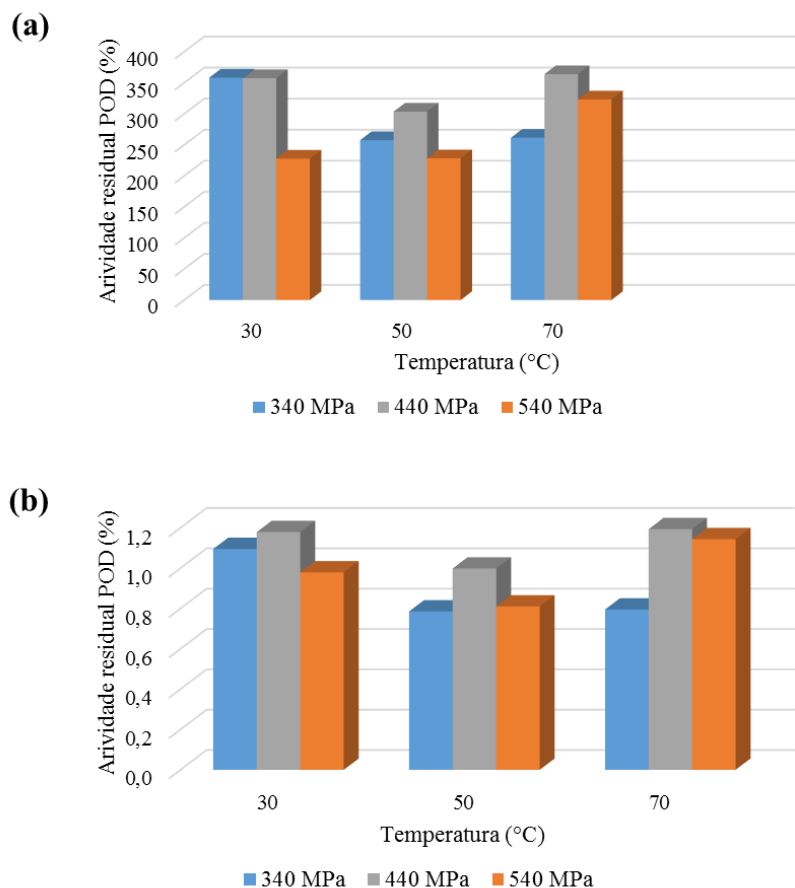


Figura 15 - Atividade residual da peroxidase (POD) em função da temperatura, para pressões de 340 MPa a 540 MPa, para as dosagens de ácido ascórbico de (a) 0 mg/100 mL; e (b) 13 mg/100 mL.



Considerando a adição de ácido ascórbico na proporção de 13 mg/100 mL (Figura 15-b), a atividade residual máxima estimada foi em torno de 1%, portanto, todas as combinações consideradas apresentaram efeito inibitório sobre a atividade residual da POD. Observou-se ainda, que para todas as pressões consideradas nesta análise (340, 440 e 540 MPa), com o aumento de temperatura de 30 para 50°C houve redução da atividade enzimática, enquanto que com o aumento de temperatura de 50 para 70°C, um aumento da atividade enzimática foi observado, ilustrando assim que a temperatura de referência considerada para o presente estudo foi de 50°C; combinada com pressões entre 340 e 540 MPa.

A ativação da enzima peroxidase em decorrência da utilização da alta pressão ocorreu provavelmente por modificações da conformação enzimática, expondo o seu sítio ativo ou liberando isoformas, pois acredita-se que o método analítico incluía isoformas da enzima, que podem ter sido ativadas durante a pressurização. Ademais, a alta pressão pode ter causado ruptura de ligações liberando oxigênio e assim foram desenvolvidas as condições ideais para

atuação da enzima (EISENMENGER, REYES-DE-CORCUERA, 2009). O efeito sinérgico entre pressão e temperatura para a ativação da enzima peroxidase pode também ter ocorrido devido ao aumento da atividade de peroxidase durante a pressurização, como relatado em estudo realizado por Calvette (2007) durante a pressurização da água de coco até 300 MPa, empregando equipamento dotado de janela ótica de safira, que permite medidas espectrofotométricas durante a operação de pressurização, para o qual a autora observou a elevação na atividade da peroxidase em seis vezes a 40°C e em duas vezes a 25°C.

Considerando o estudo de Cavette (2007) sobre a ativação da peroxidase durante a pressurização, no presente estudo foi observada forte correlação entre taxa de aquecimento adiabático devido à compressão e a atividade enzimática residual da peroxidase. A Tabela 22 apresenta os coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) para a atividade enzimática em função da taxa de aquecimento. O valor  $r$  é um índice compreendido entre  $-1.0$  e  $1.0$  que indica o grau de dependência linear entre duas variáveis, sendo estas consideradas como estando correlacionadas quando o valor de  $r$  for igual ou maior que  $0,7$ .

Nos ensaios para água de coco com dosagens de ácido ascórbico de 0 e de 20 mg/100 mL, foi observada correlação positiva, enquanto para o nível intermediário da dosagem de ácido ascórbico (10 mg/100 mL) e de pressão (300 MPa), foi observada uma correlação negativa com fator de  $-0,91$ , o que significa que a 300 MPa, a taxa de aquecimento auxilia no efeito de inibição enzimática, enquanto que a 600 MPa, mesmo com a máxima dosagem (20 mg/100 mL) de ácido ascórbico, há um efeito contrário, de elevação da ativação enzimática relacionada ao aumento da taxa de aquecimento. Ainda considerando a água de coco com dosagem de ácido ascórbico de 10 mg/100 mL, o tratamento a 600 MPa/45°C (Ensaio 12), com taxa de aquecimento de 3,6°C/100 MPa (Tabela 10), para o qual foi observada média de atividade enzimática residual de 4,63% (Tabela 20) confirma a ativação da enzima POD proporcionada pela pressão de 600 MPa, pois além de ter apresentado a maior atividade residual neste nível de dosagem de ácido ascórbico (10 mg/100 mL), a taxa de aquecimento foi igual à do tratamento a 300 MPa/80°C, para o qual a média da atividade residual foi de 0,63%.

O tratamento a alta pressão de suco de maçã realizado por Abid et al. (2014), com pressões de 250, 350 e 450 MPa por 10 minutos à temperatura ambiente apresentou redução da atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase. A menor atividade residual tanto da polifenoloxidase (46,13%) quanto da peroxidase (51,22%) ocorreu pelo tratamento a 450



MPa, evidenciando a sensibilidade das enzimas em suco de maçã à elevação de pressão, contrariamente ao obtido no presente estudo com água de coco.

Tabela 22 - Coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) entre a taxa de aquecimento e a atividade residual da peroxidase, em função da dosagem de ácido ascórbico.

AA (mg/100 mL)	P (MPa)	T (°C)	TA (°C/100 MPa)	POD <sub>res</sub> (%)	Valor $r$ (300-600 MPa)	Valor $r$ (600 MPa)	Valor $r$ (300 MPa)
0	600	10	1,7	104,30	0,926	1	na
	300	45	2,8	128,64			
	600	80	3,9	272,64			
10	300	10	0,6	2,39	0,050	na	-0,906
	300	45	2,7	1,07			
	300	45	2,7	1,76			
	300	45	2,7	1,26			
	300	80	3,6	0,63			
	300	80	3,6	4,62			
	600	45	3,6	4,62			
20	600	10	2,1	2,33	0,896	1	na
	300	45	2,7	3,41			
	600	80	3,9	3,72			

TA = Taxa de aquecimento adiabático (°C/100 MPa)

POD<sub>res</sub>=Atividade residual da enzima Peroxidase (POD)

na = não aplicável

Chakraborty e colaboradores (2015) realizaram experimentos com purê de abacaxi à pressão atmosférica, tanto para polifenoloxidase quanto para peroxidase, foi observada a redução da atividade residual com o aumento da temperatura, em tratamentos realizados por 10 minutos, sendo que para polifenoloxidase e para peroxidase, a 30°C, a atividade residual foi próxima a 95%; e a 70°C obteve-se entre 75 e 80%. No presente estudo, o aumento da temperatura à pressão atmosférica também reduziu a atividade residual, como no caso da peroxidase, com atividade residual prevista (Equação 13) de 6,78 % a 70°C/10 minutos no nível de dosagem de ácido ascórbico de 0 mg/100 mL.

A intensa ativação da enzima peroxidase com o aumento da pressão é uma característica da água de coco, a qual merece estudos mais aprofundados. Calvette (2007) investigou o comportamento de enzima peroxidase comercial (HRP), para a qual o aumento da pressão apresentou efeito linear e negativo, não havendo ativação nas mesmas condições de pressão (0,1 a 800 MPa) experimentadas para a mesma enzima naturalmente presente na água de coco, reforçando a complexidade do fenômeno de inativação ou ativação enzimática em água de coco.

### 5.6.2 Polifenoloxidase

Dos 17 tratamentos realizados, 5 apresentaram atividade residual de polifenoloxidase (PFO) detectável pela metodologia utilizada, havendo inibição completa da enzima em mais de 70% dos ensaios realizados, fato este que dificultou o ajuste das respostas ao modelo estatístico, uma vez que no ponto central (com três repetições) não foi detectada atividade da enzima polifenoloxidase (Tabela 20). O efeito inibitório da adição de ácido ascórbico foi ainda mais significativo para a PFO, sendo que para esta enzima somente em um ensaio (Ensaio 12 – 600 MPa, 45°C, 10 mg/100 mL) foi observada atividade residual de 7,70 ±2,77%, fato este que sugere que a adição de ácido ascórbico na dosagem de 10 mg/100 mL não foi suficiente para superar a ativação enzimática provocada pela alta pressão (600 MPa), visto que este foi o único tratamento realizado na condição de máxima pressão, na dosagem de ácido ascórbico considerada (10 mg/100 mL). Para este mesmo ensaio, observa-se que a temperatura inicial registrada antes do tratamento, de 27°C era, portanto mais próxima à temperatura ótima (25°C) da enzima PFO em água de coco (CAMPOS, 1993).

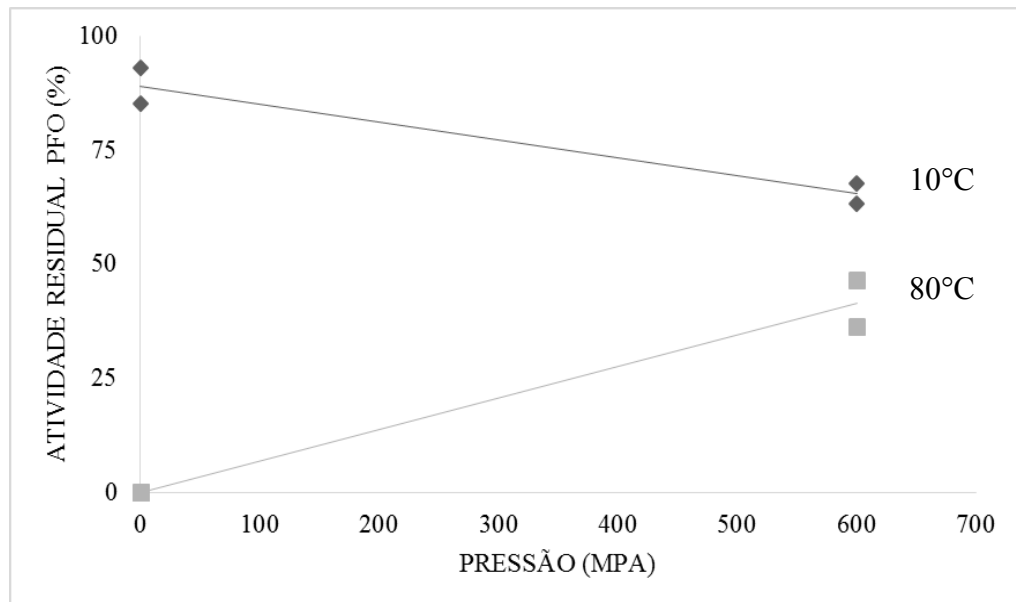
Apesar da maior sensibilidade da enzima polifenoloxidase (PFO) da água de coco aos tratamentos empregados, foram observadas respostas de atividade residual em relação aos fatores pressão e temperatura, pois apesar da atividade enzimática ter sido inibida com a adição de ácido ascórbico nas proporções de 10 mg/100 mL e 20 mg/100 mL à pressão atmosférica, é conhecido o fato de que o ácido ascórbico pode ser facilmente oxidado (TORALLES, 2008), além de ser recomendado um tratamento complementar ou combinação de tratamentos que envolvam também a eliminação de microrganismos, como é o caso da temperatura e/ou pressão.

Nos tratamentos submetidos a alta pressão e sem adição de ácido ascórbico, a maior atividade residual (98,07%) para polifenoloxidase foi obtida para o tratamento em condições intermediárias (300 MPa/45°C). A 600 MPa e sem adição de ácido ascórbico, foi observada uma redução marginalmente significativa ( $p = 0,0508$ ) da atividade residual da PFO em decorrência do aumento da temperatura de 10°C para 80°C. A Figura 16 apresenta o efeito do aumento de pressão em duas temperaturas (10 e 80°C), ainda no nível de adição de ácido ascórbico de 0 mg/100 mL. Foram observados efeitos inversos; a 80°C e pressão atmosférica (0,1 MPa), com a completa inibição da enzima; na mesma temperatura, sob pressão de 600 MPa, foi observada aumento da atividade residual da PFO para 41,46%; enquanto que a 10°C, a elevação da pressão resultou em redução da atividade enzimática residual em 23,5%. Assim

como foi observado para a peroxidase, a pressão de 600 MPa foi prejudicial para a inibição enzimática quando comparada à pressão de 300 MPa.

Nos ensaios realizados sem adição de ácido ascórbico, observou-se a completa inibição resultante da elevada temperatura (80°C /0,1 MPa), conforme esperado. Em estudo realizado por Campos (1993) as enzimas (polifenoloxidase e peroxidase) da água de coco foram inativadas por meio de tratamento térmico a 90°C, provocando, contudo, prejuízos à qualidade sensorial da bebida, mesmo com tempo (300 segundos empregado pelo autor) inferior ao utilizado no presente estudo (10 minutos).

Figura 16 - Atividade residual de polifenoloxidase em função da pressão, para água de coco sem adição de ácido ascórbico.



De maneira geral, a polifenoloxidase é considerada uma enzima termolábil, sofrendo inativação em processos de branqueamento e pasteurização. Exceção a esta regra foi o trabalho de Murasaki (2005), o qual realizou estudo de otimização dos fatores tempo e temperatura no processamento térmico contínuo da água de coco, visando avaliar o comportamento das enzimas PFO e POD, por meio do qual observou que a PFO presente na água de coco apresentou maior termoestabilidade do que a POD quando a temperatura aplicada foi de 90°C, e que esta temperatura por mais que 200 segundos não proporcionou redução significativa da atividade da enzima polifenoloxidase. Ainda assim, é necessário um rigoroso controle e planejamento, considerando ainda que o aumento de temperatura pode possibilitar maior interação entre enzimas e substratos, eventualmente podendo promover ativação enzimática (DAMORADAN et al., 2010).

Com base nos resultados do presente estudo, os quais indicam ter havido inibição completa em mais de 70% dos tratamentos realizados, e, nos demais tratamentos, a atividade residual desta enzima foi inferior a 100%, portanto trata-se de uma enzima de menor resistência aos tratamentos sob pressão, temperatura e ácido ascórbico. Desta forma, a peroxidase, considerada mais resistente aos tratamento, foi classificada como a enzima de referência para avaliar a efetividade dos tratamentos realizados.

## 6 CONCLUSÃO

As combinações das variáveis nas faixas de pressão (0,1 a 600 MPa), temperatura (10 a 80°C) e dosagem de ácido ascórbico (0 a 20 mg/100 mL) investigadas no presente estudo não causaram alterações significativas nas características físico-químicas de pH, acidez titulável e teor de sólidos solúveis da água de coco.

No presente estudo, o efeito da adição de ácido ascórbico foi satisfatório sobre a inibição da atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase, entretanto, sobre a destruição de bolores e leveduras inicialmente presentes, não apresentou efeito algum, tendo-se obtidos resultados satisfatórios para a redução da carga microbiana com a combinação com pressão e temperatura.

De forma geral, a combinação dos níveis intermediários de pressão (300 MPa), temperatura (45°C) e ácido ascórbico (10 mg/100 mL) mantiveram as características físico-químicas, com inibição das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em níveis entre 98 e 100%, e destruição total de microrganismos inicialmente presentes.

A combinação entre a pressão de 600 MPa e a temperatura de 80°C resultou na maior ativação observada para a peroxidase, que parece estar relacionada com o aumento da taxa de aquecimento adiabático devido à compressão. Temperaturas acima de 70°C não devem ser combinadas com altas pressões para inibição das enzimas presentes na água de coco. A enzima peroxidase deve ser considerada como referência para o tratamento de água de coco em altas pressões, por se mostrar termoresistente e baroresistente.

Devido à ampla faixa estudada para os parâmetros pressão e temperatura, foi difícil determinar um comportamento uniforme que explicasse os efeitos destas variáveis sobre a atividade enzimática. Por meio de ajuste das respostas para atividade enzimática residual da peroxidase em modelo de superfície de resposta, recomenda-se a combinação da pressão na faixa de 340 a 540 MPa, com temperaturas próximas a 50°C e dosagem de ácido ascórbico em 13 mg/100 mL, a qual se mostrou eficiente para se prever uma atividade residual máxima de 1%. A água de coco apresenta peculiaridades que justificam demais pesquisas sobre as alterações em decorrência seu processamento por altas pressões.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Sugere-se a realização de pesquisas considerando as melhores combinações obtidas neste estudo (e próximas), a saber: dosagens de ácido ascórbico entre 10 e 15 mg/100 mL; pressões em torno de 400 MPa e temperaturas em torno de 50°C, porém com correção de pH, para avaliar a aceitação sensorial e estocagem sob refrigeração.
- Sugere-se o estudo sobre os efeitos do tempo de tratamento a alta pressão, combinada ou não com outros métodos, sobre a composição da água de coco em termos dos elementos minerais e compostos fenólicos e a influência desses sobre a atividade enzimática na água de coco.
- Sugere-se ainda aprofundar o estudo do desenvolvimento da coloração rosada e sua relação com a atividade enzimática e com a composição da água de coco, isolando seus compostos fenólicos e enzimas e analisando os elementos minerais

## REFERÊNCIAS

- ABID, M. et al. Synergistic impact of sonication and high hydrostatic pressure on microbial and enzymatic inactivation of apple juice. **Lebensmittel wissenschaft und technologie = Food science and technology = Science et technologie alimentaire**, Amsterdam, v. 59, p. 70-76, 2014.
- ABREU, L. F. **Avaliação e adaptação de sistema asséptico para obtenção de água de coco (*Cocos nucifera* L.) acondicionada em embalagens plásticas**. 2005. 219 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- ABREU, L. F.; FARIA, J.A.F. Influência da temperatura e do ácido ascórbico sobre a estabilidade físico-química e atividade enzimática da água de coco (*Cocos nucifera* L.) acondicionada asépticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 226-232, abr./jun. 2007.
- AGUIAR, H. D. F.; YAMASHITA, A. S.; WILHELMS G. J. A. Development of enzymatic time-temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. **Food science and technology**, Amsterdam, v. 47, p. 110–116, 2012.
- AMARAL, D. S. et al. Elaboração de água de coco congelada e avaliação das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. **Revista Verde**, Mossoró, v. 7, n. 1, p. 177-181, 2012.
- ARAGÃO, W. M et al. Fruto do coqueiro para consumo natural. In: \_\_\_\_\_ . **Coco pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA, 2002. cap. 3, p. 19-25. (Série frutas do Brasil, 29).
- AROUCHA, E. M. M. Análise físico-química e sensorial de água de coco em função de estágio de maturação das cultivares de coco anão verde e vermelho. **ACSA: Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Patos, v. 10, n. 1, p. 33-38, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Gaithersburg, 1997.
- AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2012.
- BALASUBRAMANIAM, V. M. et al. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 5, p. 299-306, 2004.
- BENASSI, A. C. **Caracterizações biométrica, química e sensorial de frutos de coqueiro variedade anã verde**. 2006. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. An update on high hydrostatic pressure, from the laboratory to industrial applications. **Food Engineering Reviews**, New Yoirk, v. 3, p. 44–61, 2011.

BISCONSIN JUNIOR, A. **Impacto da tecnologia de alta pressão hidrostática sobre a qualidade do suco de laranja**. 2013. 123 f. Tese (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 8, de 6 de março de 2013. Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 ago. 2006. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1cac3e004edacb17a9e8ab8a610f4177/RDC+N+08++2013+Aditivos+frutas+e+vegetais.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, de 8 de setembro de 2005. Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Decreto 5.351, de 21 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13576>>. Acesso em 18 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 39, de 28 de maio de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Água-de-Coco. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 maio 2002. Seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=9190>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 31, de 13 de agosto de 2009. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Estabelece os procedimentos mínimos de controle higiênico-sanitário, padrões de identidade e características mínimas de qualidade gerais para a água de coco. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 ago. 2009. Seção 1. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/..%5Cpontofocal%5Ctextos%5Cregulamentos%5CBRA\\_320\\_ADD\\_2.htm](http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/..%5Cpontofocal%5Ctextos%5Cregulamentos%5CBRA_320_ADD_2.htm)>. Acesso em: 20 maio 2013.

BUZRUL, S. et al. Compression heating of selected pressure transmitting fluids and liquid foods during high hydrostatic pressure treatment. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 58, n. 3, p. 466-472, 2008.

CABRAL, L. M. C.; PENHA, E. M.; MATTA, V. M. **Água de coco verde refrigerada**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

CALVETTE, Y. M. A. **Enzimas da água de coco: caracterização da peroxidase e emprego de alta pressão hidrostática para inativação das enzimas deteriorantes**. 2007.



209 f. Tese (Doutorado em Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

CAMPOS, C. F. et al. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation of flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 20, n. 6, p. 487-500, 1996.

CAMPOS, C. F. **Desenvolvimento de processos térmico e químico para inativação enzimática e preservação do sabor da água de coco verde (*Cocos nucifera* L.)**. 1993. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.

CAMPOS, F. P. et al. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology = Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 351-357, jul./dez., 2003.

CARVALHO, J. M. et al. Água-de-coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 27, n.3, p. 437-452, jul. /set. 2006.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. Campinas: Ed. da Unicamp. 2003

CHAKRABORTY, S. et al. High-pressure inactivation of enzymes: a review on its recent applications on fruit purees and juices. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 13, p. 578–596, 2014.

CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S.; MISHRA, H. N. Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 27, p. 57–68, 2015.

CHANG, C. L.; WU, R. T. Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut water by LC–MS. **Food Chemistry**, London, v. 126, p. 710-717, 2011.

CHEN, J. et al. Optimization of effective high hydrostatic pressure treatment of *Bacillus subtilis* in Hami melon juice. **Lebensmittel wissenschaft und technologie = Food science and technology = Science et technologie alimentaire**, Amsterdam, v. 60, p. 1168-1173, 2015.

CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 1990.

COMPACT DRY. **Placas prontas para identificação e contagem de micro-organismos**. Nissui Pharmaceutical, Tokyo, 2009.

COSTA, L. M. C. et al. Avaliação de água-de-coco obtida por diferentes métodos de conservação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1239-1247, 2005.

- CULLEN, P. J.; TIWARI, B. K., VALDRAMIDIS, V. P. **Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods**. London: Elsevier, 2012.
- DA FONSECA, A.M. et al. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 1b p. 193–198, 2009.
- DAIUTO, E. R. Avaliação sensorial do guacamole com adição de  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico conservado pelo frio. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n.2, p. 140-148, 2011.
- DAMAR, S. **Processing of coconut water with high-pressure carbon dioxide technology**. 2006. 176 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - University of Florida, Gainesville, 2006.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DARROS- BARBOSA, R. **High pressure and temperature dependence of thermodynamic properties of model food solutions obtained from in situ ultrasonic measurements**. 2003. 264 f. Dissertation (Doctor of Philosophy). University of Florida, Gainesville, 2003.
- DE HEIJ, W. B. C. et al. High-pressure sterilization: maximizing the benefits of adiabatic heating. **Food Technology**, Chicago, v. 57, n. 3, p. 37-41, 2003.
- DOSUALDO, G. L. **Efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na redução da carga microbiana e da atividade enzimática da água de coco**. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- DUARTE, A. C. P.; COELHO, M. A. S.; LEITE, S. G. F. Identification of peroxidase and tyrosinase in green coconut water. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, Abingdon, v. 3, n. 5, p. 266- 270, 2002.
- EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New Yoirk, n. 45, p. 331–347, 2009.
- ESCURECIMENTO enzimático em alimentos. **Química Alimentar**, jun.2015. Disponível em: <<http://www.quimicalimentar.com.br/escurecimento-enzimatico-em-alimentos>>. Acesso em: 2 jul.2015.
- FELLOWS, P. J. **Processamento e tecnologia de alimentos: princípios e prática**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- FOGAÇA, J. R. V. Ácido ascórbico da vitamina C como agente redutor. **Química presente em alimentos**. Disponível em: <<http://www.mundoeducacao.com/quimica/acido-ascorbico-vitamina-c-como-agente-redutor.htm>>. Acesso em: 12 set. 2014.

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

FONBERG-BROCZEK, M. et al. High-pressure treatment of fruit, meat, and cheese products-equipment, methods and results. In: OLIVEIRA, F. A. R. **Processing foods: quality optimization and process assessment**. New York: CRC Press, 1999. Ch. 16, p. 281-300.

GE, L. et al. Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1133, p. 322-331, 2006.

GOMES, M. R. A; LEDWARD, D. A. Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. **Food Chemistry**, London, v. 56, p. 1-5, 1996.

GUPTA, R.; BALASUBRAMANIAM, V.M. High-pressure processing of fluid foods. In: CULLEN, P. J.; TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P. **Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods**. Amsterdam: Elsevier, 2012. Ch. 5. 109-133 p.

HENDRICKX, M. E. G.; KNORR, D. **Ultra high pressure treatments of foods**. New York: Kluwer Academic, 2001.

HENDRICKX, M. et al. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge v. 9, p. 197-203, 1998.

HEREMANS, K. et al. A comparison between pressure and temperature effects on food constituents. In: OLIVEIRA, F. A. R; OLIVEIRA, J. C. **Processing foods: Quality Optimization and Process Assessment**. New York: CRC Press, 1999. Ch. 15, p.269-280.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo, 2008. Disponível em: <[http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=20](http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=20)>. Acesso em: 18, ago 2013.

JAYACHANDRAN, L. E.; CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 28, p. 1-9, 2015.

JOHN, R. A. Photometric assays. In: EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. **Enzymes assays: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1993. Ch. 2, p. 59-92.

KEENAN, D. F. V et al. Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. **Lebensmittel wissenschaft und technologie =Food science and technology = Science et technologie alimentaire**, Amsterdam, v. 45, p. 50-57, 2012.

KWIATKOWSKI, A. **Características pós-colheita de cocos verdes, em diferentes estádios de desenvolvimento e estações climáticas**. 2011. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

LEWARD, D. A. High pressure processing: the potential. In: \_\_\_\_\_ et al. **High pressure processing of foods**. Ch. 1. p. 1 – 5. Nottingham: Nottingham University Press, 1995.

LOPES, L. C. **Controle metrológico da cor aplicado à estamperia digital de materiais têxteis**. 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado em Metrologia, Qualidade e Inovação) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LUDI KHUYZE, L. et al. Effects of combined pressure and temperature on enzymes related to quality of fruits and vegetables: from kinetic information to process engineering aspects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton v. 43, n. 5, p. 527–86, 2003.

MACDOUGALL, D. B. **Colour in food**. New York: CRC Press, , 2002.

MAGALHÃES, M. P. et al. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 72-77, 2005.

MANTENA, S.K. In vitro evaluation of antioxidant properties of *Cocos nucifera* Linn. Water, **Nahrung: chemie, biochemie, mikrobiologie, technologie, ernahrung**, Berlin, v. 47, n. 2, p. 126–131, 2003.

MARCELLINI, A. M. B. **Desenvolvimento de suco de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril) através da tecnologia de alta pressão hidrostática aplicada à polpa do fruto**. 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado em alimentos e nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MATHEWSON, P. R. **Enzymes**. Minnesota: Eagan Press, 1998.

MINITAB. Minitab for Windows: versão 15. State College, 2008.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc 1996

MOZHAEV, V. V. et al. Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 52, p. 320 -331, 1996.

MURASAKI, N. C. **Cinética da inativação térmica da peroxidase e da polifenoxidase presentes na água de coco verde por processo térmico contínuo**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MURASAKI-ALIBERTI, N. C. et al. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in green coconut (*Cocos nucifera*) water. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, p. 2662-2668, 2009.

NAOZUKA, J. **Estudo da influência de processos de conservação na distribuição de espécies elementares em água de coco**. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIELSEN. **Cestas Nielsen**: categorias com maiores crescimentos. 2015. Disponível em: <<http://www.nielsen.com/br/pt/top10s/baskets.html>>. Acesso em: 8 nov. 2015.

NUEVA bebida para el deporte: agua de coco. **Enfoques**: Revista da FAO, Rome, 1998. Disponível em: <[www.fao.org/ag/esp/revista/9810/spot3.htm](http://www.fao.org/ag/esp/revista/9810/spot3.htm)>. Acesso em: 22 set. 2013.

ORTEGA-RIVAS, E. **Non-thermal food engineering operations**. New York: Springer, 2012.

PALOU, E. et al. High-pressure treatment in food preservation. In: RAHMAN, M. S. **Handbook of food preservation**. New York: Marcel Dekker, 1999, 2 ed. ch. 19. p. 533-576.

PENNISTON J. T. High hydrostatic pressure and enzymic activity: inhibition of multimeric enzymes by dissociation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, n. 142, p. 322-332, 1971.

PRADES, A. et al. Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, Paris, v. 67, p. 87-107, 2012.

PURKAYASTHA, M. D. et al. Effect of L-ascorbic acid addition on the quality attributes of micro-filtered coconut water stored at 4 °C. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 16, p. 69-79, 2012.

RAMÍREZ, E. C. R. et al. Polyphenol oxidase. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. Ch. 39. p. 509-523.

RESENDE, J. M. Colheita e mManuseio pós-colheita. In: ARAGÃO, W. M. (Ed.). **Coco pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA, 2002. cap. 5, p. 35-41. (Série frutas do Brasil, 29).

RIOS, A. S.; SOBRINHO, R. S. Segurança alimentar da água de coco verde: estudo comparativo do produtor e vendedor. In: **International Congress on University-Industry Cooperation**, n. 4., 5-7 dez., Taubaté, 2012.

ROBINSON, D. S. Peroxidases and catalases in foods. In: \_\_\_\_\_; ESKIN, N. A. M. **Oxidative enzymes in foods**. London: Elsevier Applied Science, Ch. 1, p. 1-47, 1991.

ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. **Água de coco**: métodos de conservação. Fortaleza: Embrapa. Ceará. 2000.

ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; TORREZAN, R. **Ultra alta pressão**. Brasília: Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em:

<[www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CONT000fl6kj9pt02wyiv80ispcrrs1jd6x3.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fl6kj9pt02wyiv80ispcrrs1jd6x3.html)>. Acesso em: 13 abr. 2014.

ROSENTHAL, A. et al. Effect of pressure, temperature, time and storage on peroxidases and polyphenol oxidase from pineapple. In: HAYASHI, R. (Ed.) **Trends in high pressure bioscience and biotechnology**. London: Elsevier Science, p.525-532, 2002.

SANTOS, M. E. C. F. **Qualidade e conservação pós-colheita de frutos de seis cultivares de coqueiro anão**. 2006. 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2006.

SCHMIDT, F. L. et al. Boas práticas de fabricação e aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle no processamento de água de coco. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 121, p. 65-76.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SINDICATO NACIONAL DOS PRODUTORES DE COCO DO BRASIL. Cocosfruit aposta em fórmulas funcionais sem a adição de conservantes e apoia produtores do Ceará. Disponível em: <<http://www.sindcoco.com.br>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

SOUSA, C. R. **Avaliação de processo de produção de água de coco (*Cocos nucifera*) por ultrafiltração e envase asséptico em garrafas de vidro**. 2006. 159 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TAN, T. C. et al. Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly - mature coconut. **Food Chemistry**, London, v. 142, p. 121–128, 2014.

TIPTON, K. F. Principles of enzyme assay and kinetic studies. In: EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. **Enzymes assays: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1993. Ch. 2, p. 1-58.

TORALLES, R. P. et al. Determinação das constantes cinéticas de degradação do ácido ascórbico em purê de pêssogo: efeito da temperatura e concentração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p. 18-23, 2008.

TRESSLER, D. K.; ARSDEL, W. B. V.; COPLEY, M. J. **The freezing preservation of foods**. Westport: The Avi Publishing, 1968.

VANZELA, E. S. L. et al. Phenolic compounds in grapes and wines: chemical and biochemical characteristics and technological quality. In: CÂMARA, J. S. **Grapes: production, phenolic composition and potential biomedical effects**. New York: Nova Biomedical, 2014. Ch. 3, p. 47-106.

WEEMAES, C. A. et al. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. **Food Science and Technology**, London, v.31, p. 44–49, 1998.

WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003.

YI, J. et al. Effect of high-hydrostatic-pressure on molecular microstructure of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase. **Lebensmittel wissenschaft und technologie = Food science and technology = Science et technologie alimentaire**, Amsterdam, v. 60, p. 890–898, 2015.

YUA, Z. Y.; JIANG, T. J. Horseradish peroxidase. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. Ch. 28. p. 403-410.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

## **Natália Maluf Queiroz**

Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Unifeb (2007) e pós-graduação lato sensu em Qualidade e Segurança de Produtos Alimentícios para o Mercado Externo (2011), pela Unifeb. Ingressou em 2013 no Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da UNESP, campus de São José do Rio Preto, nível mestrado, área de concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para desenvolver pesquisa sobre os efeitos da ação combinada da alta pressão e temperaturas moderadas e adição de antioxidante sobre água de coco, sob orientação do Prof. Dr. Roger Darros-Barbosa. Durante o mestrado, participou de congressos sobre processamento de alimentos, nos quais apresentou os trabalhos realizados com água de coco durante a execução do projeto de pesquisa. Atuou em indústria sucroalcooleira e de laticínios, nas quais desenvolveu trabalhos relacionados à produção de açúcar cristal e requeijão culinário, sendo responsável pela programação da produção diária e controle de estoque de produtos acabados, havendo total interação com as áreas de logística, expedição, suprimentos e comercial, além de atuação direta junto à Pesquisa e Desenvolvimento e Controle de Qualidade.



Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura