

EFEITO DA CINÉTICA DE ATIVAÇÃO TÉRMICA DAS ENZIMAS PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE DA ÁGUA DE COCO

EFFECT OF THERMAL KINETIC ACTIVATION OF PEROXIDASE AND POLYPHENOL OXIDASE ENZYMES FOUND IN THE COCONUT WATER

Beatriz Gonçalves ⁽¹⁾

Caroline Kie Ishimoto ⁽¹⁾

Maria Regina de Paula ⁽¹⁾

Vania Battestin ⁽²⁾

RESUMO. A água de coco é uma bebida natural, pouco calórica, com sabor agradável, conhecida mundialmente e muito apreciada em todo o Brasil, principalmente nas regiões litorâneas. O constituinte químico principal da água do coco é o açúcar na forma redutora (glicose e frutose) e não redutora (sacarose). Além de açúcares, a água de coco possui proteínas, vitaminas (ácido ascórbico, ácido nicotínico, biotina, riboflavina e ácido fólico) e minerais (Na, Ca, Fe, K, Mg e P, entre outros). A água de coco se torna imprópria para o consumo poucos dias após a sua retirada do fruto. Sua exposição ao ar atmosférico permite a ação de microrganismos e principalmente das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), que desencadeiam uma série de reações como o escurecimento enzimático, alterações no valor nutritivo, na aparência e no sabor. Devido a suas características nutricionais, sua importância para o controle do processamento da água de coco e as alterações causadas pelas atividades da POD E PPO, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da cinética de inativação térmica dessas enzimas presentes na água de coco. Para verificar o efeito da temperatura na atividade residual da peroxidase e polifenoloxidase da água de coco, foram colocados 5 mL de água de coco (em duplicata), em tubos de ensaio devidamente identificados. Posteriormente, esses tubos foram transferidos para banho-maria com temperaturas de tratamento de 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C durante 180 s. A atividade residual das enzimas peroxidase e polifenoloxidase foram determinadas utilizando-se, respectivamente, guaiacol e catecol como substratos fenólicos. Foi observado que o aumento da inibição enzimática ocorreu com o aumento da temperatura de incubação. A temperatura de tratamento de 70°C apresentou redução da atividade enzimática da POD e PPO de ca. 22,41% e 7,20%, respectivamente. O tratamento térmico a 100°C foi suficiente para a inativação total das enzimas. **Palavras-chave:** Água de coco; enzimas; peroxidase; polifenoloxidase.

ABSTRACT. Coconut water is a natural, low-caloric drink with pleasant taste, known worldwide and highly appreciated throughout Brazil, mainly in the coastal regions. The main chemical constituent of coconut water is the reductive (glucose and fructose) and non-reductive (sucrose) form of the sugar. In addition to sugars, coconut water has proteins, vitamins (Ascorbic acid, Nicotinic Acid, biotin, riboflavin and folate), and minerals (Na, Ca, Fe, K, Mg, and P, for instance). The coconut water becomes unfit for consumption a few days after its removal from the fruit. Its exposure to atmospheric air allows the action of microorganisms and mainly of peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) enzymes, which trigger a series of reactions such as the enzymatic darkening, changes in nutritional value, appearance and flavor. Due to its nutritional characteristics, its importance for the control of the processing of coconut water and the changes caused by the activities of POD and PPO, this study evaluated the effect of thermal inactivation kinetics of enzymes present in the coconut water. To check the effect of temperature on residual activity of coconut water peroxidase and polyphenol oxidase, a 5-mL coconut water (in duplicate) volume was set in test tubes properly identified. Later, these tubes were transferred to a water bath with a temperature of treatment of 50, 60, 70, 80, 90 and 100°C for 180 s. The residual activity of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes was determined with the use, respectively, of guaiacol and catechol as phenolic substrates. It was observed that the increase in enzyme inhibition occurred with increasing incubation temperature. The treatment temperature of 70°C decreased enzymatic activity of POD and PPO approximately 22.41% and 7.20%, respectively. The heat treatment at 100°C was enough for total enzymatic inactivation. **Keywords:** Coconut water; enzymes; peroxidase; polyphenol oxidase.

⁽¹⁾ Graduandas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, campus São Roque - SP. Correspondência: Rod. Prof. Quintino de Lima, 2.100, Paisagem Colonial, São Roque - SP; e-mail: vbattestin@gmail.com

⁽²⁾ Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, campus São José dos Campos.

1 Introdução

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar o processo de tratamento térmico sobre a atividade residual das enzimas polifenoloxidase e peroxidase em água de coco.

1.1 Água de coco

O coco verde contém cerca de 400 mL de água que apresenta propriedades nutritivas, possuindo altos teores de potássio, entre outros minerais. É considerada um repositório de sais e algumas de suas aplicações terapêuticas (como a utilização, na forma de soro oral ou intravenoso, em casos de cólera, problemas intestinais e estomacais) têm sido citadas na literatura. O sabor da água de coco é doce e levemente adstringente, apresentando um valor de pH na faixa de 4,0 a 5,6 que é função, principalmente, da variedade e grau de maturação. O produto sofre mudanças na sua composição durante o desenvolvimento do fruto (MAGALHÃES *et al.*, 2005).

O Brasil produz cerca de 500 milhões de litros de água de coco por ano, sendo que 7% deste total é destinado à exportação. O surgimento de uma coloração rosada durante a estocagem é o grande problema encontrado pelos envasadores e exportadores de água de coco. Este segmento de mercado está em franca ascensão (3,6 milhões L/ano) e justifica o desenvolvimento tecnológico em engenharia e controle de processos (ABREU & FARIA, 2007).

A atividade enzimática na água de coco é um fator de grande relevância, devido às alterações indesejáveis que acarretam, como o desenvolvimento de cor rósea. Há evidências de que a atividade enzimática ocorre com plenitude em frutos com idade de cinco a sete meses, decrescendo com o amadurecimento (MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A água de coco é uma bebida natural, pouco calórica, com sabor agradável, conhecida mundialmente e muito apreciada em todo o Brasil, principalmente nas regiões litorâneas (COSTA *et al.*, 2005). A água de coco é a parte líquida natural extraída do fruto do coqueiro. Ela é tecnicamente definida como o líquido do endosperma e corresponde a aproximadamente 25% do peso de todo o coco. Esta solução aquosa é composta por 93% de água e é formada, desde os primeiros estágios da formação do fruto, em sua cavidade, até que a mesma seja totalmente preenchida (TOCCHINI, 1998 *apud* RESENDE, 2007). Uma das suas principais utilidades atuais no Brasil, com grande perspectiva de uso internacional, é o aproveitamento da água de coco (CARVALHO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2013).

A água do coco verde pode ser consumida tanto na forma *in natura* quanto processada. Os métodos de processamento empregados visam, essencialmente, a inibir a ação enzimática e garantir a estabilidade microbiológica da água de coco após a abertura do fruto, mantendo o quanto possível suas características sensoriais originais (ARAGÃO *et al.*, 2001; ROSA & ABREU, 2002).

Os principais problemas na conservação da água de coco são: o aparecimento de turvação, formação de uma coloração rosada e alteração de sabor, devido à atividade enzimática da PPO e POD e/ou fermentação indesejável, e da incorporação de oxigênio durante o processamento. A presença de enzimas é também responsável por variações nutricionais e sensoriais na água de coco (CARVALHO *et al.*, 2006).

1.2 Enzimas da água de coco

Campos e colaboradores (1996) observaram a presença e atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) na água de cocos verdes cujos nomes sistemáticos são, respectivamente, o-difenol oxigênio oxidoreductase (E.C.1.10.3.1) e hidrogênio peróxido oxidoreductase (E.C.1.11.1.7). A polifenoloxidase (PPO) catalisa reações de oxidação de compostos fenólicos, na presença de oxigênio, cujos produtos se polimerizam, formando compostos de cor escura. A peroxidase (POD) catalisa reações que estão associadas à deterioração de diversos nutrientes como o ácido ascórbico e também com o sabor dos alimentos (ROBINSON & ESKIN, 1991 *apud* CARVALHO, 2006).

A polifenoloxidase é uma enzima do grupo das oxirredutases, contendo cobre como grupo prostético, que oxida difenóis em presença de oxigênio molecular. O nome polifenoloxidase compreende duas enzimas distintas, cuja diferença diz respeito à especificidade aos substratos. A primeira hi-

droxila monofenóis a o-dihidroxfenóis (atividade cresolase), oxidando-os a o-quinonas (atividade catecolase), e é a enzima mais importante para o escurecimento oxidativo de frutas e hortaliças, sendo denominada de tirosinase, polifenoloxidase ou catecol oxidase. A segunda oxida orto e para difenóis às quinonas correspondentes, não possuindo a capacidade de hidroxilar monofenóis como a primeira, sendo denominada de lacase (SOUZA, 2006).

A peroxidase é uma enzima semelhante à polifenoloxidase, também membro do grupo das oxirredutases, e catalisa a oxidação de fenóis (guaiacol, p-cresol), aminas aromáticas (anilina, o-dianisidina) e outros compostos orgânicos na presença de peróxido de hidrogênio (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

1.3 Escurecimento Enzimático

Uma das alterações mais importantes na água de coco é o escurecimento, que pode ser causado pela atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, que agem sobre os compostos fenólicos presentes na água de coco. Esta alteração tem início logo após a extração da água de coco (SOUZA, 2006). A reação do escurecimento prossegue através da condensação das quinonas que reagem, não enzimaticamente, com outros compostos fenólicos e aminoácidos, por exemplo, para produzir pigmentos escuros de estrutura indeterminada (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981; MAYER & HAREL, 1990; MENDONÇA & GUERRA, 2003 *apud* DANESI *et al.*, 2007). A peroxidase é uma enzima semelhante à polifenoloxidase, também membro do grupo das oxirredutases, e catalisa a oxidação de fenóis (guaiacol, p-cresol), aminas aromáticas (anilina, o-dianisidina) e outros compostos orgânicos na presença de peróxido de hidrogênio (VAMOS-VIGYÁZÓ, 1981). Os principais métodos empregados para evitar o escurecimento enzimático são: a inativação da enzima através da redução do pH ou aquecimento, a eliminação do oxigênio e o emprego de agentes químicos que atuam sobre a enzima ou produtos intermediários do processo de formação do pigmento (RODRIGUES, 2002; ABREU, 2005).

2 Material e métodos

2.1 Material empregado

A água de coco foi extraída de cocos verdes da variedade anão, obtidos no comércio local da cidade de São Roque-SP nos meses de abril e maio de 2013. Os mesmos foram previamente higienizados por aspersão com água. Os materiais e equipamentos utilizados foram: balança analítica (Shimadzu – AY 220), pHmetro portátil (TecnoPON. Equip. Especiais Ltda – mPA-210p), tubos de ensaio, béqueres, balão volumétrico, pipetas milimétricas, pipetas de vidro, bastão de vidro, peneira de náilon, faca, banho termostático (Adamo – N 321), banho-maria (Solab – SL 145), espectrofotômetro (FENTO) e máquina de fazer gelo.

2.2 Métodos

2.2.1 Processamento da água de coco verde: A água de coco foi extraída do fruto manualmente, com auxílio de uma faca, sendo imediatamente filtrada em peneira de náilon e transferida para os tubos de ensaio, os quais foram submetidos ao tratamento térmico em banho-maria. As análises foram realizadas no laboratório de Bioquímica de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, *campus* São José dos Campos.

2.2.2 Tratamento térmico dos extratos da peroxidase e polifenoloxidase da água de coco: Para verificar o efeito da temperatura na atividade residual da peroxidase e polifenoloxidase da água de coco, foram colocados 5 mL de água de coco (em duplicata), em tubos de ensaio devidamente identificados. Posteriormente, esses tubos foram transferidos para banho-maria com temperaturas de tratamento de 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C durante 180 s. Após o tratamento térmico, os tubos foram re-

tirados do banho-maria e colocados em banho de gelo para interromper o processo de inativação térmica (ROLING *et al.*, 2000).

2.2.3 Determinação da atividade enzimática de peroxidase: A atividade da enzima peroxidase foi determinada utilizando-se guaiacol como substrato fenólico. Em uma cubeta, foram adicionados 2,3 mL de tampão fosfato (0,2 M) com pH 5,5, levando-se ao banho-maria até atingir 35°C. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de água de coco, 0,2 mL de peróxido de hidrogênio (0,1%) e 0,5 mL de solução alcoólica de guaiacol (0,5%). Essa solução foi agitada e foi feita leitura imediata em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo zero e após dez minutos (CAMPOS *et al.*, 1996).

2.2.4 Determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase: A atividade da enzima polifenoloxidase foi determinada utilizando-se catecol como substrato fenólico. Em uma cubeta, foram adicionados 2,3 mL de tampão fosfato (pH 6,0), 0,7 mL de catecol (0,2 M) e 1 mL de amostra de água de coco, à temperatura ambiente, seguido de leitura de absorvância em espectrofotômetro a 425 nm, no tempo zero e após dez minutos (CAMPOS *et al.*, 1996). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorvância em 0,001 unidades por minuto. Desta forma, a cada aumento de 0,001 na leitura de absorvância, houve correspondência de uma unidade por minuto (ABREU *et al.*, 2007).

3 Resultados e discussão

Atualmente, o uso de aditivos químicos associados ao tratamento térmico tem sido adotado pelas indústrias que processam água de coco com a intenção de aumentar a vida de prateleira dessa água de coco tratada. A inativação dessas enzimas por meio do tratamento térmico é uma alternativa interessante, pois pode contribuir para a economia do processo. O principal problema relacionado ao tratamento térmico deve-se à utilização de altas temperaturas para a inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, podendo, dessa forma, ocasionar alterações organolépticas no produto, inviabilizando a comercialização deste.

Para ambas as enzimas, houve diminuição da atividade enzimática com o aumento da temperatura do tratamento térmico e, portanto, menor foi a velocidade da reação de escurecimento (Tab. 1 e Tab. 2).

Tabela 1. Atividade enzimática da peroxidase após tratamento térmico.

Temperatura	Abs. (470 nm)	Abs. (470 nm)	Atividade (UA/min.mL)
	Tempo zero min.	Tempo 10 min.	
50°C	0,061 ± 0,003	0,117 ± 0,017	2,9
60°C	0,076 ± 0,006	0,120 ± 0,003	2,4
70°C	0,067 ± 0,003	0,114 ± 0,003	2,25
80°C	0,055 ± 0,000	0,085 ± 0,003	1,5
90°C	0,052 ± 0,002	0,053 ± 0,001	0,15
100°C	0,057 ± 0,002	0,054 ± 0,001	0

Observou-se que as duas enzimas (POD e PPO) presentes na água de coco apresentaram termoestabilidade diferentes. PPO mostrou-se mais termorresistente, pois a redução da atividade foi mais lenta conforme aumento da temperatura, tendo uma redução de aproximadamente 50,75% de atividade a 90°C; POD apresentou redução de atividade de aproximadamente 95% a 90°C, devido ao decréscimo mais rápido das atividades com o aumento das temperaturas para a POD.

Para Cursino e colaboradores (1996), foi obtido uma completa inativação de atividade da POD em água de coco verde utilizando-se temperatura de 92°C por seis minutos, mostrando que o tempo a ser utilizado para o tratamento também é uma variável importante para a cinética de inativação enzimática.

Tabela 2. Atividade da polifenoloxidase após tratamento térmico.

Temperatura	Abs. (425 nm)		Atividade (UA/min.ml)
	Tempo zero min.	Tempo 10 min.	
50°C	0,077 ± 0,000	0,244 ± 0,004	16,65
60°C	0,079 ± 0,002	0,237 ± 0,001	15,85
70°C	0,074 ± 0,001	0,229 ± 0,006	15,45
80°C	0,083 ± 0,001	0,211 ± 0,001	12,85
90°C	0,083 ± 0,001	0,167 ± 0,001	8,45
100°C	0,084 ± 0,000	0,075 ± 0,000	0

De acordo aos dados apresentados por Murasaki (2005), para o processo térmico realizado a 90°C, POD e PPO presentes na água de coco apresentaram estabilidades diferentes, sendo que PPO mostrou-se mais termorresistente que POD. Esses resultados corroboram com os dados obtidos neste trabalho, em que se verificou essas diferenças de estabilidade e comportamento distinto das enzimas frente a ação da temperatura.

Em trabalho realizado por Dusoaldo (2007), utilizando o processo de homogeneização a ultra-alta pressão para inibição das enzimas, observou-se que os tratamentos realizados não causaram inativação satisfatória das enzimas presentes na água de coco; entretanto, há evidências de que o tratamento pode ser eficaz se for efetuado em pressões mais elevadas. Observou-se, também, que a peroxidase apresentou maior resistência ao tratamento do que a polifenoloxidase.

A ausência de atividade enzimática, tanto para POD quanto para PPO (à temperatura de 100°C), demonstrou que houve inativação térmica das respectivas enzimas; entretanto, se forem empregadas temperaturas muito altas, poderá haver perdas sensoriais significativas na água de coco. Campos e colaboradores (1996) demonstraram que a partir de 100 segundos de exposição do produto à temperatura de 90°C, já ocorreram problemas sensoriais relacionados a mudanças no aroma e sabor da água de coco.

De acordo com esses dados, para a próxima etapa desta pesquisa será feito um estudo sensorial para verificar a influência do tratamento térmico em relação às propriedades organolépticas dessa água tratada termicamente.

4 Considerações finais

Concluímos que as enzimas PFO e POD apresentaram estabilidades diferentes frente à temperatura de tratamento empregada nesse estudo. A 90°C, a atividade da polifenoloxidase foi de 50,75% comparada à da peroxidase, que foi de 95% de atividade residual.

As enzimas polifenoloxidase e peroxidase foram inativas completamente quando se utilizou tratamento térmico a 100°C. Para alimentos, especificamente para a água de coco, altas temperaturas afetam provavelmente a qualidade sensorial do produto. Mais estudos são necessários para avaliar o impacto do tratamento térmico na estabilidade e alterações organolépticas dessa água de coco tratada.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo pelo incentivo financeiro.

6 Referências

ABREU, L. F. **Avaliação e adaptação de sistema asséptico para obtenção de água de coco (*Cocos nucifera* L.) acondicionada em embalagens plásticas**. Tese (Doutorado). Campinas, UNICAMP/FEA, 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 assepticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, 226-232, 2007.

ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. **Água de coco**. Aracaju: Embrapa CPATC/Tabuleiros Costeiros, 2001 (Série Documentos, 24).

BORDALO, S. N.; FERZIGER, J. H.; KLINE, S. J. The Development of Zonal Models for Turbulence. **Proceedings**. 10th Brazilian Congress of Mechanical Engineering, v. 1, Rio de Janeiro, 41-44, 1989.

CAMPOS, C. F.; SOUZA, P. E. A.; COELHO, J. V.; GLÓRIA, M. B. A. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. **Journal Food Processing and Preservation**, v. 20, 487-500, 1996.

CARVALHO, J. M. C.; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M., JUNIOR, G. A. M. Água de coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Ciências agrárias**, v. 27, 437-452, 2006.

CLARK, J. A. **Private Communication**. University of Michigan: Ann Harbor, 1986.

COIMBRA, A. L. **Lessons of Continuum Mechanics**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1978.

COSTA, L. M. C.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUZA, P. H. M. Avaliação de água de coco obtida por diferentes métodos de conservação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, 1239-1247, nov./dez., 2005.

DUSOALDO, G. L. **Efeito do processo de homogeneização a ultra-alta pressão na redução da carga microbiana e da atividade enzimática da água de coco**. Dissertação (Mestrado). Campinas, Unicamp, 2007.

LEE, Y. B. **Studies on the growth of the frost layer based on heat and mass transfer through porous media**. Tese (Doutoramento - PhD thesis). Coreia do Sul, Seoul National University, Seoul, 2003.

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C. D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, 72-77, 2005.

MAYER A. M.; HAREL, E. Phenoloxidasas and their significance in fruit and vegetables. **Food technology**, Fox, London, Elsevier Ap., v. 1, 373-398, 1990.

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

PEREIRA, E. P. R.; FARIA, J. A. F.; PINTO, U. M. Optimizing the use of potassium sorbate and sodium metabisulphite for the chemical and microbial stability of carbonated coconut water. **Brazilian Journal of Food Technology**, 1516-7275, 2013.

RESENDE, J. M. **Revestimentos biodegradáveis para conservação do coco 'Anão Verde'**. Tese (Doutorado). Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, 2007.

RODRIGUES, R. B. **Aplicação dos processos de separação por membrana para a produção de suco clarificado e concentrado de camu camu (*Myrciaria dubia*)**. Tese (Doutorado). Campinas, Unicamp/FEA, 2002.

ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. Processos convencionais de conservação de água de coco. In: ARAGÃO, W. M. **Coco: pós-colheita**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.

SOUZA, C. R. **Avaliação de processo de produção de água de coco (*Cocos nucifera*) por ultrafiltração e envase asséptico em garrafas de vidro**. Tese (Doutorado). Campinas, Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Unicamp, 2006.

SOVIERO, P. A. O.; LAVAGNA, L. G. M. A Numerical Model for Thin Airfoils in Unsteady Motion, **RBCM. J. of the Brazilian Soc. Mechanical Sciences**, v. 19, n. 3, 332-340, 1997.

SPARROW, E. M. Forced Convection Heat Transfer in a Duct Having Spanwise-Periodic Rectangular Protuberances. **Numerical Heat Transfer**, v. 3, 149-167, 1980.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critic Food Science Nutrition**, v. 15, 49-127, 1981.

Como citar este artigo científico

GONÇALVES, B.; ISHIMOTO, C. K.; DE PAULA, M. R.; BATTESTIN, V. Efeito da cinética de inativação térmica das enzimas peroxidase e polifenoloxidase da água de coco. **Scientia Vitae**, v. 2, n. 7, ano 2, jan. 2015, p. 13-19. Disponível em: <www.revistaispsr.com/v2n7ano2_2015.htm>; acesso em: __/__/__.