

**ESTUDO DA INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA DA PEROXIDASE E
POLIFENOLOXIDASE EM ÁGUA DE COCO TRATADA TERMICAMENTE
EM MICRORREATORES CAPILARES**

Danilo Maia da Silva

Paula Almeida Meira, Jorge Andrey Wilhelms Gut

Mauri Sergio Alves Palma

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo

msapalma@usp.br

Objetivos

Estudar a inativação térmica das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) presentes na água de coco verde, por tratamento térmico em batelada e em microrreator capilar, comparando os métodos.

Métodos e Procedimentos

Extraiu-se a água de 4 cocos verdes higienizados (*Cocos nucifera L.*), que foi misturada e filtrada a baixa pressão, em seguida separada em tubos falcon (50 mL), e congelada a -30 °C.

Para o tratamento térmico em batelada, foram preparadas amostras de água de coco (2,0 mL) em embalagens plásticas finas e reservadas em banho de gelo. Foi inserido um termômetro de fibra óptica (Luxtron 812, LumaSense) e a amostra foi submetida a banho térmico de água (ECO RE 620, Lauda) nas temperaturas e tempos na Tabela 1, acrescidos de 6 s (tempo necessário para o aquecimento até a temperatura de tratamento - *come-up time*). Atingido o tempo, a amostra foi rapidamente submetida a banho de água com gelo, e depois congelada a -30 °C em eppendorfs.

Para o tratamento térmico em microrreator capilar de 250 µL (Syrris, Asia Microreactors), lavou-se o sistema com a amostra por 3 min, ajustou-se as vazões e temperaturas de cada

condição conforme a Tabela 2, resfriando a saída do capilar com algodão embebido em água gelada. Vazões foram calculadas de acordo com os tempos na Tabela 1 como volume/tempo. Após tratamento, congelou-se 2 mL de cada amostra coletada. Amostras não processadas foram também congeladas para referência inicial de atividade enzimática.

Utilizaram-se métodos adaptados de Matsui (2006) para atividade de PPO e POD, que consistem no acompanhamento da absorbância em 420 nm da reação enzimática em um espectrofotômetro (SpectroStar Nano, BMG Labtech) com microplaca de 96 poços. Para PPO o substrato usado foi o Pirocatecol, enquanto o Pirogalol foi o substrato usado para a POD, acrescido de H₂O₂. O branco foi medido usando tampão como amostra. Uma unidade de atividade representa a variação de 0,001 absorbância por mL de amostra por segundo no trecho linear ascendente da curva.

Tabela 1: Variáveis do processo em batelada.

T = 70 °C Tempo (s)	T = 80 °C Tempo (s)	T = 90 °C Tempo (s)
8	8	4
10	10	8
14	14	10
30	20	14
60	40	20
300	60	40
600	150	
	300	
	600	

Tabela 2: Variáveis do processo em microrreator.

T = 70 °C	T = 80 °C	T = 90 °C
Vazão (µL/min)	Vazão (µL/min)	Vazão (µL/min)
1900	1900	3740
1470	1470	1900
1050	1050	1470
500	750	1050
250	376	750
50	250	376
25	100	
	50	
	25	

Resultados

As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados de atividade residual das enzimas POD e PPO ao longo do tempo de processo batelada ou do tempo de residência médio no microrreator, em função das temperaturas. Pode-se notar que a 90 °C as enzimas são rapidamente inativadas. Nas temperaturas de 70 e 80 °C, há um decaimento da atividade ao longo do tempo de processo, com variabilidade. A mudança de cor do substrato após análise de atividade foi perceptível, evidenciando as diferentes taxas de reação de conversão do substrato em relação ao branco. De forma geral, a POD se mostrou mais resistente ao calor do que a PPO.

Para o tratamento a 70 °C em batelada, algumas amostras apresentaram atividade acima de 1, o que indica possível ativação da enzima, fenômeno que pode ocorrer em temperaturas não letais. Já a 80 °C, a PPO foi inativada para tempos maiores do que 10 s. A atividade da POD foi reduzida a cerca de 30% a 70 °C e 10% a 80 °C no processo em batelada. As atividades residuais para tratamento térmico no microrreator foram consistentemente menores do que as obtidas em batelada. Isso significa que a hipótese de que o processo contínuo com tempo de residência médio igual ao tempo do processo batelada confere mesma letalidade não é verdadeira. É possível que esteja ocorrendo aquecimento adicional no percurso antes da entrada do microrreator ou que o resfriamento após o microrreator não esteja sendo rápido o suficiente.

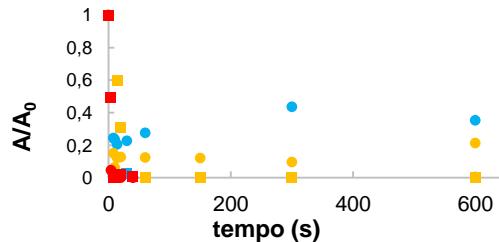


Figura 1: Atividade enzimática residual da POD, para 70 °C (azul), 80 °C (amarelo) e 90 °C (vermelho), em Batelada (●) e microrreator (■).

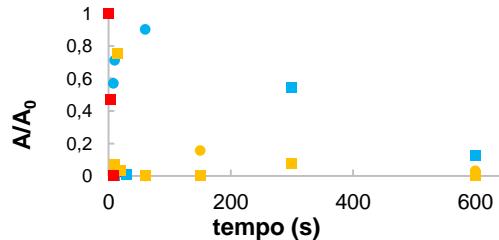


Figura 2: Atividade enzimática residual da PPO, para 70 °C (azul), 80 °C (amarelo) e 90 °C (vermelho), em Batelada (●) e microrreator (■).

Conclusões

Como a enzima POD foi mais resistente do que a PPO, esta pode ser usada como indicadora do processo. Como o tratamento térmico em microrreator se mostrou mais eficiente na inativação, a equivalência com o processo batelada não pode ser assumida. Estudo adicional é necessário para confirmar casos de ativação e para reduzir a variabilidade.

Agradecimentos

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Processos: 2023/16720-4, 2013/07914-8 e 2014/17534-0.

Referências

- CAVALCANTE, T.A.B.B. Tese de doutorado EPUSP São Paulo, 2017. 113 p.
- MATSUI, K.N. Tese de doutorado EPUSP São Paulo, 2006. 123 p.