

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

EFEITO DAS IMPUREZAS VEGETAIS NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE NO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

MARCIELI OLIVEIRA GUIDELLI

Orientador: Prof. Dr. Marcos Omir Marques

Coorientador: MSc. Hélio Francisco da Silva Neto

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno

Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de Tecnólogo em Biocombustíveis.

Guidelli, Marcieli Oliveira

G946e Efeito das impurezas vegetais na atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase no caldo de cana-de-açúcar / Marcieli Oliveira Guidelli.— Jaboticabal: Fatec, 2012.

67f.

Orientador: Profº Drº Marcos Omir Marques

Coorientador: MSc. Hélio Francisco da Silva Neto

Coorientador: Profº Drº Leonardo Lucas Madaleno

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2012.

1. Catalisadores. 2. Compostos fenólicos oxidados. 3 Oxirredutases.
4. Sacarose. I. Marques, M.O. II Dr.

CDU 664.111

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITO DAS IMPUREZAS VEGETAIS NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE NO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

AUTOR: MARCIELI OLIVEIRA GUIDELLI
ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS OMIR MARQUES
COORIENTADOR: MSc. HÉLIO FRANCISCO DA SILVA NETO
COORIENTADOR: Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

MARCOS OMIR MARQUES

FÁBIO CAMIOTTI

MARIANA CARINA FRIGIERI

Data da apresentação: 22 de Junho de 2012.

Presidente da Comissão Examinadora
Marcos Omir Marques

Dedico este trabalho...

...À DEUS, por ter me dado a vida, saúde e por sempre iluminar o meu caminho.

...À minha família, por todos os momentos de convivência e palavras de apoio e incentivo, e que sempre foi e será modelo de justiça e honestidade.

...Ao meu esposo Gesiel Fernando Guidelli, que soube tão bem compreender os meus momentos de ausência em função deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a princípio a Deus, que me permitiu a inteligência.

Ao meu orientador Dr. Marcos Omir Marques, pelas orientações precisas em todos os momentos solicitados e pela oportunidade de estágio no Departamento de Tecnologia de Açúcar e Etanol.

Aos meus coorientadores MSc. Hélio Franscisco da Silva Neto e Dr. Leonardo Lucas Madaleno, por todo apoio, dedicação e orientação.

À professora Mariana Carina Frigieri e ao professor Fábio Camilotti por aceitarem fazer parte da minha banca examinadora.

Aos meus parceiros do Laboratório, Wladimir, Taciana, Raphaela, Daiane e Jéssica, pelo auxílio e empenho na realização dos experimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
GLOSSÁRIO	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Cana-de-açúcar.....	17
3.1.1 Histórico.....	18
3.1.2 Ocorrência e produção	18
3.1.3 Aspectos botânicos.....	19
3.1.4 Composição química e propriedades.....	20
3.1.5 Produtos e sub-produtos.....	21
3.1.6 Qualidade da matéria-prima para seu processamento	22
3.1.6.1 Impurezas	22
3.1.6.2 Deteriorações e reações no caldo.....	23
3.2 Enzimas	25
3.2.1. Importância e aplicações das enzimas.....	26

3.2.2 Enzimas presentes nos vegetais.....	27
3.2.2.1 Atividade enzimática da PPO e POD	27
3.2.2.2 Polifenoloxidase	28
3.2.2.3 Peroxidase.....	31
3.2.3 Variáveis que afetam a cinética enzimática	33
3.2.3.1 Temperatura.....	34
3.2.3.2 pH	35
3.2.3.3 Pressão	35
3.2.3.4 Substratos fenólicos	36
3.2.3.5 Agentes químicos	37
3.2.3.6 Modificação genética.....	38
3.2.3.7 Alteração na concentração de enzimas	39
3.2.4 Prós e contras da PPO e POD nos vegetais	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Caracterização da área experimental.....	40
4.1.2 Características do solo.....	40
4.1.3 Cultivar.....	41
4.2 Tratamentos utilizados	42
4.3 Coleta dos colmos de cana	43
4.4. Tratamento do caldo extraído.....	46
4.4.1 Soluções para a análise.....	47
4.4.2. Análise química da atividade da PPO	47
4.4.3. Análise química da atividade da POD.....	51
4.5 Delineamento experimental.....	53
4.6 Estatística	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

APG	Angiosperm Phylogeny Group - Grupo de Filogenia das Angiospérmicas
APH	Alta Pressão Hidrostática
C	Cultivar
C ₄	Quatro carbonos
CO ₂	Dióxido de Carbono
Cu	Cobre
CV	Coefficiente de Variação
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FCAVJ	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal
Fe	Ferro
FEPP	Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção
FV	Folha verde
FS	Folha seca
g	Gramma
ha	Hectare
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUB	Internacional Union of Biochemistry
IV	Impureza vegetal
Lvef	Latossolo Vermelho Eutroférico
M	Molaridade
μmol	Micromol

ml	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	Mega Pascal
N - P - K	Frações de Nitrogênio – Fósforo – Potássio
NS	Não significativo
nm	Nanômetro
o-difenol	Orto-difenol
O ₂	Oxigênio molecular
P	Partes
p-difenol	Para-difenol
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
S	<i>Saccharum</i>
Kg/ha	Quilo por hectare
t	Tonelada
UE	Unidade de Atividade Enzimática
UNESP	Universidade Estadual Paulista
ÚNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Cana-de-açúcar	20
FIGURA 2. Atividade monoxigenase e difenoloxidase da PPO	29
FIGURA 3. Mecanismo geral de reação da PPO	30
FIGURA 4. Grupo prostético da PPO	30
FIGURA 5. Grupo prostético das POD	32
FIGURA 6. Mecanismo de ação das POD	33
FIGURA 7. Morfologia do cultivar CTC 15	42
FIGURA 8. Corte dos colmos	43
FIGURA 9. Retirada dos colmos.....	43
FIGURA 10. Carregamento da cana.....	43
FIGURA 11. Descarregamento da cana.	43
FIGURA 12. Remoção das folhas secas.....	44
FIGURA 13. Remoção das folhas verdes.....	44
FIGURA 14. Colmo.	44
FIGURA 15. Folha verde.	44
FIGURA 16. Folha seca.	44
FIGURA 17. Balança eletrônica.....	44
FIGURA 18. Prensa hidráulica.....	44
FIGURA 19. Colmos e impurezas na prensa	45
FIGURA 20. Caldo extraído.....	45
FIGURA 21. Algodão hidrófilo.....	46
FIGURA 22. Filtração do caldo.	46
FIGURA 23. Caldo acondicionado à temperaturas baixas.....	46

FIGURA 24. Pipetas automáticas.....	48
FIGURA 25. Agitador de tubos.....	48
FIGURA 26. Visão detalhada do agitador.....	48
FIGURA 27. Banho-maria.....	48
FIGURA 28. Tubos no Banho-maria.	48
FIGURA 29. Banho de gelo.	49
FIGURA 30. Adição de ácido perclórico.	49
FIGURA 31. Repouso de 10 minutos.....	49
FIGURA 32. Tranferência da amostra do tubo para a cubeta.	50
FIGURA 33. Espectrofotômetro.....	50
FIGURA 34. Espectrofotômetro à 395 nm.....	50
FIGURA 35. Béquer contendo gelo.	51
FIGURA 36. Adição de meta-bissulfito.	51
FIGURA 37. Repouso de 10 minutos.....	52
FIGURA 38. Espectrofotômetro à 450 nm.....	52
FIGURA 39. Efeito da interação obtida entre impurezas e níveis para os valores da PPO. ...	56
FIGURA 40. Desdobramento obtido entre impurezas e níveis para os valores da POD.	57

GLOSSÁRIO

Fatores extrínsecos: Fatores correlacionados ao material estranho no colmo.

Orto-difenol: O prefixo orto representa a localização 1,2 , ou seja, carbono 1 e carbono 2.

Para-difenol: O prefixo orto representa a localização 1,4, ou seja, carbono 1 e carbono 4.

POD em múltiplas isoformas: POD com diferentes seqüências de aminoácidos.

Resíduos de histidina: Quando a histidina sofreu ligação peptídica.

Redox: Reação de redução-oxidação.

RESUMO

A colheita da cana-de-açúcar efetuada tanto mecanicamente quanto manualmente, sempre implica na inclusão de impurezas vegetais no momento da extração do caldo de cana, causando assim um aumento de cor do caldo, e por consequência, afetando a qualidade dos cristais de açúcar. Como a atividade enzimática ocasiona alteração de cor no caldo de cana, o presente trabalho teve por objetivo analisar a atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase da cana-de-açúcar em relação à impureza vegetal oriunda da própria cana. O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Etanol da FCAV/UNESP. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4, com três repetições. O primeiro fator foi constituído pelo tipo de impureza (cana + folha verde; cana + folha seca; cana + folha verde + folha seca), e o segundo fator pelos diferentes níveis de impurezas (0; 2,5; 5 e 10%). A análise estatística dos resultados foi realizada por meio da análise de variância (Teste F). Quando houve significância, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em relação à quantidade de impurezas presentes, o aumento da atividade das enzimas PPO e POD é influenciado pela presença de impurezas vegetais, seja ela formada por folhas secas, verdes ou folhas secas e folhas verdes. O aumento dos níveis de impurezas provocou acréscimo linear para a atividade enzimática da PPO. Para a enzima POD o aumento da atividade ocorreu até o nível de 5% de impurezas. Esses resultados permitem inferir que haverá maior coloração do caldo quando houver presença de impurezas vegetais, prejudicando assim a qualidade do açúcar que será produzido.

Palavras-chave: Catalisadores; Compostos fenólicos oxidados; Oxirredutases; Sacarose.

ABSTRACT

The harvest of cane sugar made both mechanically and manually, always implies the inclusion of vegetable impurities at the extraction of sugarcane juice, thus causing an increase in juice color, and consequently affecting the quality of the sugar crystals. As the enzymatic activity causes color change in the sugar cane juice, this study aimed to analyze the activity of the enzyme polyphenol oxidase and peroxidase of sugar cane in relation to impurity coming from the plant sugarcane itself. The experiment was conducted at the Laboratory of Technology of Sugar & Ethanol FCAV / UNESP. The experimental design was completely randomized in a 3x4 factorial design with three replications. The first factor was composed of the type of impurity (cane + green leaf, cane + dry leaf, cane + green leaf + dry leaf), and the second factor by different levels of impurities (0, 2.5, 5 and 10%). The statistical analysis was performed by analysis of variance (Test F). When significance was found, means were compared by Tukey test at 5% probability. Regarding the amount of impurities, the increase in enzyme activity PPO and POD is influenced by the presence of vegetable impurities, whether formed by dry sheet, green or dried leaves and green leaves. The increased levels of impurities caused an increase linear for the enzymatic activity of PPO. Pod for the enzyme activity was increased up to a level of 5% impurities. These results allow us to infer that there will be greater staining of the broth when vegetables presence of impurities, thus impairing the quality of the sugar to be produced.

Keywords: Catalysts; Oxidized phenolic compounds; Oxidoreductases; Sucrose.

1. INTRODUÇÃO

A importância da cana-de-açúcar decorre de sua múltipla utilidade, além de ser empregada, em larga escala, como matéria-prima para a produção de açúcar e etanol (CAPUTO *et al.*, 2008; MENDES, 2006).

No processo de fabricação do açúcar, a cor do produto final é um indicativo de qualidade. Dentre os fatores que definem o índice de cor do caldo e, conseqüentemente, do açúcar, a atividade enzimática se destaca (KELLY e BROWN, 1978).

As enzimas responsáveis pelo escurecimento do caldo de cana-de-açúcar são as polifenoloxidasas (PPO) e peroxidases (POD), sendo que as polifenoloxidasas apresentam maior atividade enzimática em relação às peroxidases (SUZART *et al.*, 2007). Estas enzimas se encontram nos tecidos vegetais, sofrendo influências das características de cada cultivar, da idade da cultura e do estágio de maturação, em virtude da composição química presente, como a concentração de compostos fenólicos e enzimas (QUDSIEH *et al.*, 2002)

Assim, quando o caldo é extraído, ocorre o escurecimento natural em decorrência destas enzimas que, em presença de substratos fenólicos e oxigênio, oxidam e formam ortoquinonas, que por sua vez, se polimerizam rapidamente formando as melaninas e pigmentos de cor escura (FENNEMA, 1993), que causam modificações sensoriais, nutricionais e escurecimento enzimático (ARAÚJO, 2001b).

As impurezas vegetais, presentes na matéria-prima, em grande parte, têm origem na própria cana, podendo, portanto, influenciar na qualidade do caldo. Assim, a crescente adoção do corte mecanizado pode criar um novo cenário em que as expectativas são de maiores dificuldades em se produzir açúcar de qualidade, isso porque este tipo de colheita proporciona maior teor de impureza carreada no processo industrial (BENEDINE *et al.*, 2010).

2. OBJETIVO

Analisar a atividade das enzimas polifenoxidase e peroxidase da cana-de-açúcar em relação à impureza vegetal oriunda da própria cana.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta da família das Poaceae (SEGATO *et al.*, 2006), e seu cultivo é muito difundido em regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo todo o território nacional.

Esta cultura apresenta uma significativa contribuição para o setor econômico brasileiro, já que é uma matéria-prima com viabilidade econômica e muito versátil, pois além de se produzir produtos principais, como o açúcar e o etanol, é possível converter os resíduos gerados durante os processos de transformação dos produtos, em subprodutos (DEMATTÊ, 2004).

Muitas modificações têm sido implantadas no processo produtivo canavieiro, refletindo assim em uma significativa expansão em áreas cultivadas e em maior produtividade, e entre estas modificações, se destaca a utilização de maturadores químicos, cultivares geneticamente modificados, tratamentos fitossanitários e corretivos, uso de fertilizantes e práticas culturais (SEGATO *et al.*, 2006).

3.1.1 Histórico

Em relação à origem da cana-de-açúcar, não se sabe ao certo, mas acredita-se que provém do território asiático, já que as regiões mais citadas por diversos autores são o Norte da Índia, Nova Guiné e Ilhas do Arquipélago da Polinésia (DINARDO-MIRANDA, VASCONCELOS e LANDELL, 2008). Durante os séculos XI e XII, a cultura se espalhou por toda Europa e África. Na América foi introduzida por Colombo em São Domingos, em 1494. No Brasil, seu plantio iniciou-se em 1532, em São Vicente, trazida por Martin Afonso de Souza (MARQUES *et al.*, 2001), sendo utilizada primeiramente como recurso forrageiro na alimentação dos ruminantes (PEIXOTO, 1986, citado por AZEVEDO *et al.*, 2003). Nesta época seu plantio se localizava apenas na faixa litorânea do território nacional (MEDEIROS, 1990, citado por SILVA e DINIZ, 2009), até que no século XVII, a indústria açucareira expandiu com a ajuda dos holandeses. No século XVIII, houve um declínio decorrente da forte concorrência exercida pelo mercado europeu. Já nos séculos XIX e XX, a agroindústria canavieira passou por períodos de oscilações, em decorrência de outros mercados. Na década de 70, o Brasil tornou-se vulnerável no campo energético, devido à alta do preço do petróleo no mercado internacional, implicando na inserção de um projeto denominado Proálcool, com a finalidade de produzir o etanol para substituir a gasolina, para reequilibrar a balança comercial e assim alavancar o setor canavieiro (MARQUES *et al.*, 2001).

3.1.2 Ocorrência e produção

A cana-de-açúcar é uma cultura ideal para ser cultivada na maioria das regiões tropicais, devido sua adaptação às condições ambientais, já que necessita de um período quente e úmido para se desenvolver e outro seco e frio para acumular sacarose (SEGATO *et al.*, 2006).

Na safra de 2010/2011, as unidades produtoras da região Centro-Sul do Brasil, desde abril até outubro, processaram 459,56 milhões de toneladas de cana. O destaque coube à produção de etanol anidro, que totalizou 7,49 bilhões de litros, e a produção acumulada de

açúcar somou 29,23 milhões de toneladas. Na segunda quinzena de outubro, a fabricação de açúcar totalizou 1,47 milhão de toneladas, enquanto a produção de etanol alcançou 961,72 milhões de litros, sendo 564,01 milhões de litros de etanol hidratado e 397,71 milhões de litros de etanol anidro (ÚNICA, 2011, citado por ALVARENGA, 2011).

De acordo com a nova estimativa, as exportações de açúcar deverão atingir 21,20 milhões de toneladas na safra 2011/2012, queda de 13,96%. Já as exportações de etanol devem apresentar uma retração de 6,62% em relação ao volume exportado no último ano, totalizando 1,65 bilhão de litros (ÚNICA, 2011, citado por ALVARENGA, 2011).

Aproximadamente 20 milhões de hectares (ha) de cana-de-açúcar são cultivados em todo o mundo, sendo principalmente na América Latina, Índia e Extremo Oriente. Muitos países da África cultivam pequenas áreas individualmente. Entre os países que cultivam mais de um milhão de ha, estão Brasil, Índia, China, Tailândia e Paquistão. A cana-de-açúcar é produzida em quase todo o País, sendo 60% em São Paulo e 40% da produção no Paraná, Triângulo Mineiro e Zona da Mata Nordestina. Na última década, a produção mundial de cana de açúcar aumentou em 25%, para mais de 1,5 bilhão de toneladas. Isso pode ser atribuído a um aumento de 13% na área colhida e uma melhoria de 9% no rendimento. Entre os principais países, a produção de cana-de-açúcar vem crescendo mais no Brasil, China e Colômbia (FAO, 2007).

Entretanto, no Brasil em 2010, a área plantada foi de 9.080.769 ha, com uma produção de 719.156.742 t e um rendimento médio de 79, 2 t/ha, mas houve uma queda em 2011, já que a área plantada foi 670.370 ha, com uma produção de 680.052.778 t e um rendimento médio de 78,4 t/ha (IBGE, 2011).

3.1.3 Aspectos botânicos

A cana-de-açúcar pertence à Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Liliopsida*, Subclasse *Commelinidae*, Ordem *Poales*, antigamente denominada *Gramineae* (1789) e *Cyperales* (1981), Família *Poaceae*, Tribo *Andropogoneae*, Subtribo *Saccharininae* e gênero *Saccharum* (APG, 1998; MARQUES *et al.*, 2001; ARAÚJO, 2010a), sendo este gênero composto principalmente, pelas espécies *S. officinarum* L. (conhecida como cana-nobre, por

apresentar elevado teor de açúcar), *S. spontaneum* L., *S. robustum*, *S. sinense*, *S. Barbieri*.

Em relação à morfologia da cana-de-açúcar, a planta se desenvolve na forma de touceira. Divide-se em duas partes, sendo a aérea formada pelos colmos, folhas, inflorescências e frutos e a parte subterrânea por raízes e rizomas. O colmo é responsável pela sustentação das folhas e das panículas, e apresenta formato cilíndrico e composto por nós bem marcados e entrenós distintos (Figura1) (SEGATO *et al.*, 2006).

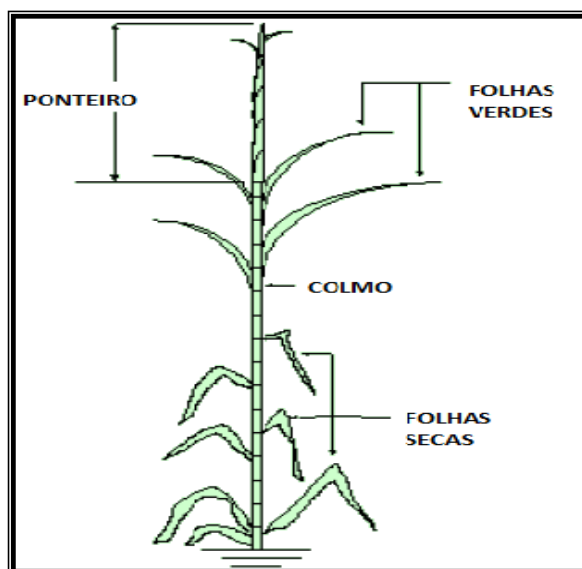


FIGURA 1. Cana-de-açúcar (Valsechi, 2008).

3.1.4 Composição química e propriedades

A composição química da cana-de-açúcar é muito variável, sendo impossível quantificar e definir números que representem uma composição universal, e esta variação oscila devido à diversos fatores, como condições climáticas, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, o tipo de cultivo, o cultivar, o estágio de maturação, a idade, a sanidade, a temperatura, a umidade, a precipitação pluvial, a adubação e planejamento agrícola.

Da sua composição, 99% são devidos aos elementos hidrogênio, oxigênio e carbono, e 1% a outros elementos, sendo que tais elementos são distribuídos ao longo do colmo, e em

média, 74,5% é de água, 25% é de matéria orgânica e 0,5% é de matéria mineral, e estes constituintes não são distribuídos proporcionalmente nas diferentes partes do colmo (OLIVEIRA, 2009).

A cana-de-açúcar é constituída por fibra e caldo. A fibra é formada principalmente de celulose, lignina e pentosanas, sendo definida como o conjunto de substâncias insolúveis em água, e seu teor varia de 8 - 18%. O caldo é uma solução impura e diluída da sacarose, constituído por água (75-82%) e sólidos solúveis (18-25%). Os sólidos solúveis são classificados em açúcares (15,5-27%) e não-açúcares (2-2,5%). Os açúcares são denominados de sacarose (12-18%), glicose (0,2-1%) e frutose (0-0,5%). Os não-açúcares se dividem em orgânicos e não orgânicos, sendo que os orgânicos (0,8-1,8%) são constituídos de gorduras, ceras, pectinas, ácidos, matérias corantes e aminoácidos, e os não-açúcares inorgânicos (0,2-0,7%) são as cinzas, e têm como componentes principais a sílica, potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, alumínio, cloro e outros (OLIVEIRA, 2009).

Em relação às propriedades, uma das mais importantes é a fotossíntese, e neste quesito, a cana-de-açúcar apresenta elevada taxa fotossintética, e conseqüentemente, uma alta eficiência quanto à utilização e resgate do CO₂ (Dióxido de Carbono) da atmosfera, sendo assim classificada como uma planta C₄. Sendo que, plantas que participam deste tipo de ciclo, aproveitam melhor as condições ambientais e metabolizam mais açúcares (SEGATO *et al.*, 2006).

3.1.5 Produtos e sub-produtos

A cana-de-açúcar pode ser utilizada *in natura* sob forma de forragem para alimentação animal, ou como matéria-prima para diversas finalidades, desde o consumo do caldo de cana (garapa), incluindo a rapadura e o melaço, até seu processo de industrialização para a produção de açúcar, álcool, plástico biodegradável, aguardente, e com estes processos geram resíduos que podem ser reutilizados, ou seja, se tornando subprodutos (MENDES, 2006), e entre eles se destacam a utilização da vinhaça como fertilizante, bagaço para cogeração de energia, melaço para produção de etanol, torta de filtro como ração animal, levedura prensada para panificação e antibióticos, cinzas para cimento, óleo fúsel para extração de álcoois com

diversos graus de pureza e para obtenção de outras substâncias químicas (solventes), levedura seca para composição de rações animais, proteínas, metano, cera bruta (resinas e óleos), carvão ativado, proteína unicelular, alimento de gado confinado, furfural, papel, entre outros (ALCARDE, 2007).

3.1.6 Qualidade da matéria-prima para seu processamento

A qualidade da matéria-prima é um dos fatores essenciais para a obtenção de um produto final com características satisfatórias, e para alcançar esta respectiva satisfação no processo de industrialização do açúcar a partir da cana, é necessário que os colmos apresentem estágio de maturação adiantado, sadios, recém-colhidos, despontados e livres de matéria estranha, entretanto, tais fatores sofrem oscilações devido a ocorrência de impurezas vindas do campo, como pragas, doenças, empregos de resíduos e produtos químicos, deteriorações fisiológicas, microbiológicas e tecnológicas, tipos de manuseio pós-colheita e industrialização (STUPIELLO, 1987).

3.1.6.1 Impurezas

O conceito de impureza da cana-de-açúcar refere-se a tudo o que não é colmo que acompanha a matéria-prima, podendo ser dividida em dois tipos, sendo uma em função de sua natureza: Impureza vegetal, que provêm da própria cultura e se constitui de folhas verdes, folhas secas, cartuchos, palmitos e plantas daninhas, e a proveniente do solo: Impureza mineral, como pedras e terras (MARQUES *et al.*, 2008).

O teor e o tipo da impureza dependem de diversos fatores, mas aqueles que se destacam são: as características do cultivar e do solo, as condições de cultivo, a qualidade da queima e o tipo de máquina empregada na colheita (STUPIELLO e FERNANDES, 1984). Um fator muito importante é a colheita mecanizada, pois as impurezas são carregadas com a cana-de-açúcar nas fases de corte até o carregamento, sendo que alguns levantamentos

efetuados mostravam valor médio de matéria estranha para o semi-mecânico de 5% e no mecânico de 16% (OLIVEIRA, 2009), entretanto, a gradativa redução de queima prévia dos canaviais proposta pela Lei 11.241 em março de 2003, tem conduzido à crescente mecanização da colheita da cana-de-açúcar, e tal fator implica na redução da qualidade da matéria-prima a ser enviada para a unidade industrial (D.O.E., 2003; SEGATO *et al.*, 2006).

Alto teor de impurezas implica em alterações na composição tecnológica do caldo, pois aumenta a quantidade de substâncias insolúveis, e ocasionam reduções da capacidade de moagem e em extração do açúcar contido na matéria-prima, além de prejudicar a indústria por desgastes, entupimentos, incrustações, o que faz reduzir a vida útil dos equipamentos, afetando negativamente na industrialização, como perdas de sacarose e maior coloração do açúcar (MARQUES *et al.*, 2008).

Visando rendimentos operacionais ou qualidade da matéria-prima, o contínuo aperfeiçoamento das colhedoras de cana tem conduzido a redução dos custos operacionais sem aumento significativo do teor de impurezas. A limpeza da cana-de-açúcar colhida também tem contribuído, e esta por sua vez pode ser executada por meio de água ou ar, sendo dispensado a lavagem quando a cana apresentar impurezas minerais ao redor de 0,5-0,6% (5-6 kg t⁻¹ de cana), e maior utilização de ventiladores para a limpeza “a seco” (SEGATO *et al.*, 2006).

Segundo Furlani *et al.* (1980) e Tambosco *et al.* (1977), a quantidade de folhas presente nos carregamentos representam aproximadamente 1,8 a 2,4% em cana crua e 1,1 a 1,4% em cana queimada, para colheita manual com carregamento mecânico.

Segundo Manechine (2011) os parâmetros para classificação em impurezas vegetais são de baixa (<0,3%) média (0,3 a 0,6%) e alta (>0,6%) e para impurezas minerais de baixa (<3%), média (3 a 6%) e alta (>6%).

3.1.6.2 Deteriorações e reações no caldo

O caldo de cana-de-açúcar é definido como uma solução diluída de Sacarose (MOLINA *et al.*, 2007), e possui características que o torna perecível, ou seja, possui vida útil curta entre sua extração e seu consumo ou processamento.

Especialmente a partir do momento em que se efetua a colheita da cana-de-açúcar, as

deteriorações começam a progredir, e as reações enzimáticas também, já que as principais enzimas que afetam a qualidade do caldo de cana-de-açúcar são as oxirredutases, ou seja, na presença de oxigênio, começam a oxidar (OLIVEIRA, 2009).

Dentre os tipos de deterioração tecnológica, fisiológica e microbiológica, a mais importante é a microbiológica, por causa dos problemas que ocasiona nos processos industriais (OLIVEIRA, 2009), e tal ocorre devido à rica composição química do caldo de cana-de-açúcar, pois há várias quantidades de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH entre 5,0 e 5,5 e temperatura aproximadamente de 25 à 30° C, o que a torna um ótimo substrato para o crescimento de uma grande diversidade microbiota (GALLO e CANHOS, 1991). Em relação à deterioração fisiológica, se destacam a respiração, o ressecamento, a brotação e o florescimento, e a deterioração tecnológica está associada ao manejo e às condições de cultivo (VASECHI, 2008).

As reações enzimáticas que ocorrem no caldo extraído provocam alterações nas características sensoriais após 24 horas de sua extração (YUSOF *et al.*, 2000). Isso é um problema, pois os processos de industrialização de produtos alimentícios visam obter produtos com características sensoriais e nutricionais mais próximas àquele in natura (GAVA, 1985). A cor do caldo de cana implica diretamente na cor do açúcar produzido, entretanto, à medida que a cor do caldo aumenta, a cor dos cristais vai adquirindo coloração mais escura, apresentando valor menor e tornam-se menos competitivos no mercado. A cor do açúcar é importante tanto ao consumo geral, já que a coloração mais escura influencia na decisão de compra do consumidor, quanto à exportação e aplicação do mesmo na fabricação de vários produtos alimentícios, que exigem ausência de cor, como é o caso de algumas bebidas claras, balas, doces e produtos farmacêuticos. Para a elaboração desses produtos industriais se utiliza o açúcar líquido, que é obtido pela dissolução do açúcar cristal em água, e esses cristais possuindo coloração mais intensa têm menos competitividade com açúcares com índice de cor menor, porque implicará em menos gasto com insumos para o refino (MAGALHÃES, 2009).

O aparecimento da cor do açúcar pode surgir de duas maneiras, sendo uma por pigmentos provenientes da cana-de-açúcar e a outra por compostos coloridos formados durante seu processamento na indústria (KELLY e BROWN, 1978). No primeiro caso, há somente um fator, que corresponde ao escurecimento enzimático, que provém da própria planta, na qual ocorrem reações oxidativas de compostos fenólicos. No segundo caso, há três fatores que contribuem para a coloração, sendo esses ocasionados por erros durante o

processo industrial: a Reação de Maillard, que é provocada pela presença de açúcares redutores e aminoácidos no caldo, a caramelização, que é provocada por elevadas temperaturas no processo, ocasionando degradação térmica e reações de condensação de açúcares, e por fim a degradação alcalina, que é a redução de açúcares redutores (BUCHELI e ROBINSON, 1994). Dentre os fatores que provocam a coloração do caldo, o escurecimento causado por erros no processo deve ser evitado, já que o enzimático é mais difícil, caso contrário, os custos para refinar o açúcar serão mais elevados (JIMENEZ e SAMANIEGO, 1981).

3.2 Enzimas

As enzimas são proteínas denominadas catalisadores complexos por acelerarem a velocidade das reações que ocorrem nos sistemas biológicos (LEHNINGER *et al.*, 1995), sendo extremamente importante para o controle dos processos vitais (TORTORA *et al.*, 2005). Apresentam maior eficiência catalítica que os catalisadores sintéticos, ou seja, têm uma ótima eficiência catalítica, além de possuir em relação ao substrato um alto grau de especificidade e atuar em soluções aquosas à condições brandas de pH e temperatura (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Toda enzima possui um centro ativo, local onde se processam as reações com determinados substratos. Esse centro ativo é geralmente constituído por alguns resíduos de aminoácidos da cadeia protéica e um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

Algumas enzimas são inteiramente protéicas e outras podem possuir outros grupos ligados, como os íons metálicos ou moléculas orgânicas, sendo chamados de cofatores ou coenzimas, e neste caso, se classificam como apoenzima e haloenzima (TORTORA *et al.*, 2005). Há também as isoenzimas, que são enzimas que apresentam função catalítica semelhante, mas têm estruturas e parâmetros catalíticos distintos e são codificados por genes diferentes (TAIZ e ZEIGER, 2009). A classificação das enzimas é definida em função das reações que cada enzima catalisa, e esta padronização foi feita pela Comissão de Nomenclatura e Classificação de Enzimas da International Union of Biochemistry. A toda

enzima se atribui um código com quatro números, sendo que o primeiro representa a classe, o segundo representa a subclasse, o terceiro a sub-subclasse e quarto é o número de série da enzima dentro de sua sub-subclasse, sendo que para a polifenoxidase, o código é 1.10.3.1, e para a peroxidase é 1.11.1.7 (RICHARDSON e HYSLOP, 1993b).

3.2.1. Importância e aplicações das enzimas

A importância prioritária das enzimas se deve ao seu papel fundamental na sobrevivência e proliferação das células, portanto, na manutenção da vida

Como as enzimas apresentam poder catalítico e alta seletividade, tais vêm sendo cada vez mais empregadas com diferentes propósitos, abrangendo áreas como a medicina, agricultura, tecnologia de alimentos e estudos ambientais, na indústria química são usadas para a produção de biossensores para quantificação de compostos fenólicos, detergentes para branqueamento, tratamento de efluentes, procedimentos enzimáticos de análise, medicamentos e análises clínicas para o tratamento de doenças, como a leucemia, indústria têxtil, para fazer ajustes das características do amido dos tecidos, em curtumes para quebrar colágeno, na produção de antibióticos, como penicilina, tratamento de polpa de papel (LEHNINGER *et al.*, 1995; NETO, 2001; FATIBELO-FILHO e VIEIRA, 2002). No processamento de alimentos são usadas para auxiliar no processo de cura, melhorar da textura, clarificar sucos e vinhos, produzir cervejas, vinhos, bebidas destiladas, pães, a cura de queijo, amaciar carnes, produzir dextrose, liquefazer doces, alterar cor, sabor e aroma dos alimentos e para aumentar a vida de prateleira e o valor nutricional (REED, 1975; WHITAKER *et al.*, 2003). Uma outra aplicação seria no monitoramento da vida útil e qualidade dos produtos hortícolas (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Há enzimas imprescindíveis para a saúde humana, assim como a peroxidase, que no organismo possui função antioxidante, impedindo que o peróxido de hidrogênio gere radicais livres, o que implica em menor risco de desenvolver patologias, como câncer e doenças no sistema nervoso e cardiovascular (ANESINI *et al.*, 2006).

3.2.2 Enzimas presentes nos vegetais

A quantidade e o tipo de enzimas presentes nos vegetais variam de planta para planta (SCANDALIOS, 1993). As enzimas responsáveis pela deterioração da qualidade dos produtos hortícolas são denominadas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), as quais podem causar modificações sensoriais e nutricionais nos produtos (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Em relação ao sensoramento, estas enzimas estão associadas ao escurecimento enzimático, decorrente da ação das mesmas que utilizam compostos fenólicos como substratos (ROBARDS *et al.*, 1999), e a intensidade deste efeito pode ser variável durante o crescimento, desenvolvimento e maturação dos vegetais (SILVA, 2000). A localização dessas enzimas no tecido celular pode se manifestar de forma oculta em algumas espécies, dependendo da idade e do estágio de maturação, apesar da localização exata estar associada a mecanismos de construção da parede celular dos vegetais.

Além das PPO's e POD's serem encontradas em tecidos vegetais, principalmente em frutas e hortaliças, também podem ser encontradas em alguns animais e em microrganismos, principalmente em fungos (MENDONÇA e GUERRA, 2003).

Nos tecidos vegetais, as POD's são encontradas em múltiplas isoformas (HAMED *et al.*, 1998).

3.2.2.1 Atividade enzimática da PPO e POD

A atividade de uma enzima é medida através da velocidade em que a reação ocorre, sendo determinada em condições experimentais. A atividade é expressa em unidades de atividade, e segundo a IUB (Internacional Union of Biochemistry), uma unidade de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um μmol de substrato por minuto em condições de ensaio definidas (LIMA *et al.*, 2001).

A atividade da PPO e POD no tecido vegetal é menor em produtos hortícolas imaturos (DAWSON e TARPLEY, 1951; DAWSON e MAGEE, 1955). A atividade das enzimas está relacionada com a formação de ligações cruzadas e complexas entre grupos fenólicos em proteínas, pectinas e outros polímeros de parede (TAIZ e ZEIGER, 2009).

A atividade da POD apresenta certa limitação em plantas, e isso porque a concentração interna de peróxido de hidrogênio é pequena, assim, seu envolvimento é mais encontrado em processos lentos, como o escurecimento interno de frutas (SUBRAMANIAN *et al.*, 1999).

3.2.2.2 Polifenoloxidase

As polifenoloxidases (PFO ou PPO – Polyphenol oxidase) são representadas cientificamente pelo código (PFO, E.C. 1.10.3.1), e são caracterizadas como oxidorreduzases por realizarem reações que oxidam os compostos fenólicos, como a oxidação de monofenóis a difenóis, e difenóis a benzoquinonas (FATIBELO-FILHO e VIEIRA, 2002), sendo conhecidas também como tirosinases, catecolases, odifenoloxidases, monofenoloxidases, polifenolases, fenolases, catecol oxidases, cresolases e catecolases (SCOTT, 1975; FATIBELO-FILHO e VIEIRA, 2002). Estas denominações são atribuídas conforme o tipo de substrato utilizado na reação, mas atualmente, a enzima é denominada polifenoloxidase, devido à sensibilidade que o substrato apresenta durante sua ação (CHLAMTAC, 1955; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

A primeira descoberta ocorreu no ano de 1856 por Schoenbein, em cogumelos. Em 1896, Bourquelot e Bertrand observaram o aparecimento de um composto escuro no cogumelo na presença de tirosina, e por este motivo atribuiu-se o nome tirosinase (SCOTT, 1975; FATIBELO-FILHO e VIEIRA, 2002; RAMÍREZ *et al.*, 2003).

É possível encontrá-la em vegetais, animais (especificamente no tecido de invertebrados) e em alguns microrganismos (principalmente em fungos). Está presente em altas concentrações nos cogumelos, tubérculos de batata, pêssegos, maçãs, bananas, erva-mate, grãos de café e folhas de tabaco (TAUBER, 1949; REED, 1975; EISENMENGER e REYES-DE-CORCUERA, 2007).

As PPO's catalisam três tipos de reações na presença do oxigênio molecular, hidroxilação de monofenóis a o-difenóis (atividade monoxigenase ou cresolase, E.C. 1.14.18.1), a oxidação de o-difenóis a o-quinonas (atividade difenoloxidase ou catecolase, E.C. 1.10.3.1), e a oxidação de p-difenóis a p-quinonas (atividade lacase, E.C. 1.10.3.2) (Figura 2) (ZAWISTOWSKI, BILIADERIS e ESKIN, 1991).

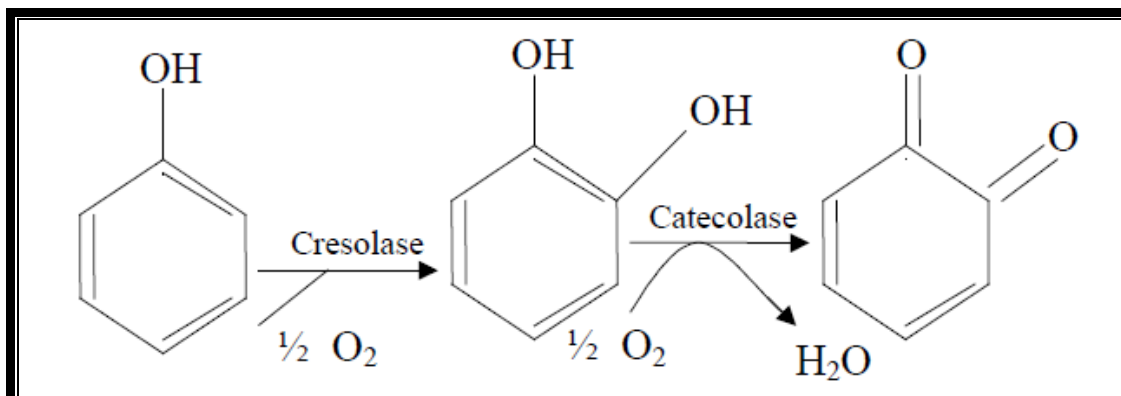


FIGURA 2. Atividade monooxigenase e difenoloxidase da PPO (Adaptado por MATHEIS e WHITAKER (1984), citado por PRIGENT (2005) e SANTOS, (2009)).

Dentre as reações, a atividade monooxigenase se destaca como a mais importante, pois ela é a responsável pelo escurecimento oxidativo dos tecidos vegetais (MENDONÇA e GUERRA, 2003).

O mecanismo de ação da PPO é demonstrado na Figura 4, sendo que próximo ao centro ativo da enzima, há dois íons Cu^+ acoplados antiferromagneticamente, e os campos de ligação contêm quatro resíduos de histidina, sendo dois para cada íon (Figura 3). Em relação à sequência em que ocorrem as reações, a enzima se liga primeiro ao oxigênio, formando um complexo dioxigênio-dicobre, e depois ao monofenol, e a mudança que ocorre na valência dos íons cobre (Cu^+ para Cu^{++}), provoca a formação de um complexo enzima-substrato, no qual a ligação O – O fica tão polarizada que ocorre a hidroxilação, seguida da formação de um o-difenol, e por fim ocorre a oxidação do o-difenol a o-quinona.

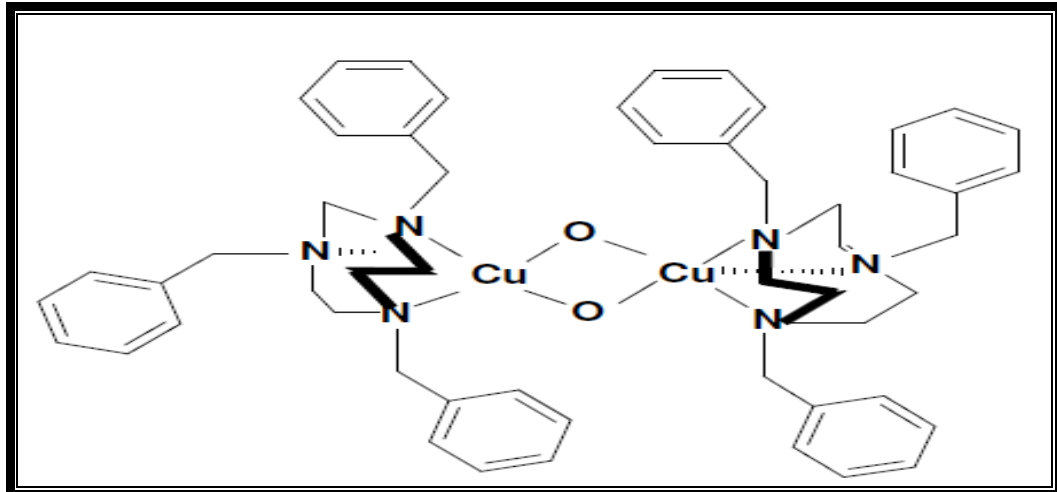


FIGURA 3. Grupo prostético da PPO (PRIMO, 2006).

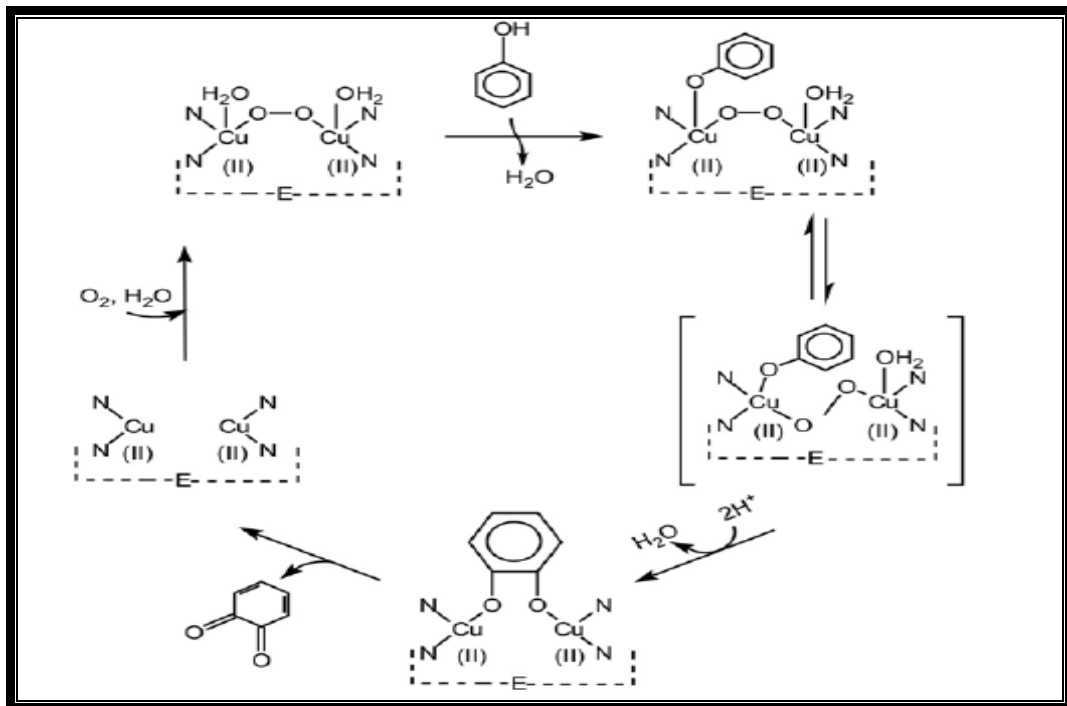


FIGURA 4. Mecanismo geral de reação da PPO (BELITZ e GROSCH, 1997, citado por SILVA, 2009)

As quinonas são compostos amarelados, instáveis e reativos que podem reagir entre si, formando polímeros com alta massa molecular de cor escura, chamados de melaninas e formam complexos com aminoácidos, além de oxidar compostos com baixo potencial de oxido redução (NICOLAS *et al.*, 1994).

Não há uma definição completa da sua estrutura, principalmente pelas dificuldades

inerentes à purificação e à multiplicidade que elas exibem (BURTON, 1994).

3.2.2.3 Peroxidase

As peroxidases são representadas cientificamente pelo código (POD, E.C. 1.11.1.7), e são caracterizadas como enzimas oxidases que catalizam a oxidação de um variado grupo de compostos orgânicos e inorgânicos de monofenóis, difenóis, polifenóis, aminofenóis, através da utilização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

A primeira descoberta foi observada em plantas por Schöbein, em 1855, onde notou-se a formação de um composto de coloração intensa quando os extratos de plantas reagem com peróxido de hidrogênio e guaiacol (um composto orgânico de ocorrência natural), e em 1898, Linossier isolou a enzima e a nomeou (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; YUAN e JIANG, 2003).

Está envolvida em diversas reações e ligações de polissacarídeos, assim como a oxidação de fenóis e do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos e regulação da elongação de células, entre outras atividades (KAO *et al.*, 1997). É conhecida como uma enzima termoestável, já que pode ter sua atividade regenerada após o tratamento térmico (BANCI, 1997; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

As peroxidases podem ser classificadas de acordo com a superfamília a que pertence. A superfamília de vegetais apresenta uma relação evolutiva e foram divididas em três classes:

- Classe I: inclui as peroxidases intracelulares que incorporam a citocromo C, tais como a peroxidase de levedura (CCP) e a cloroperoxidase (CPO);
- Classe II: inclui as peroxidases fúngicas extracelulares, tais como a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium* (MnP) e outras que degradam ligninas provenientes de basidiomicetos;
- Classe III: inclui as peroxidases vegetais extracelulares, tais como a peroxidase de raiz forte (HRP—horseradish peroxidase).

As enzimas das classes I e II contêm sinal peptídico, pontes dissulfeto e cálcio estrutural.

O grupo prostético da maioria das peroxidases vegetais é o Ferroprotoporfirina IX, e

cada peroxidase apresenta ao menos cinco diferentes estados de oxidação do grupo prostético, sendo que cada oxidação recebe uma denominação específica, assim como *hemin* para Ferro (III) e *heme* para Ferro (II), mas para simplificar, nomeia-se de heme, independente do seu estado de oxidação (DUNFORD, 1999).

O grupo prostético é caracterizado por um átomo de ferro centralizado, ligado à quatro átomos de nitrogênio (Figura 5).

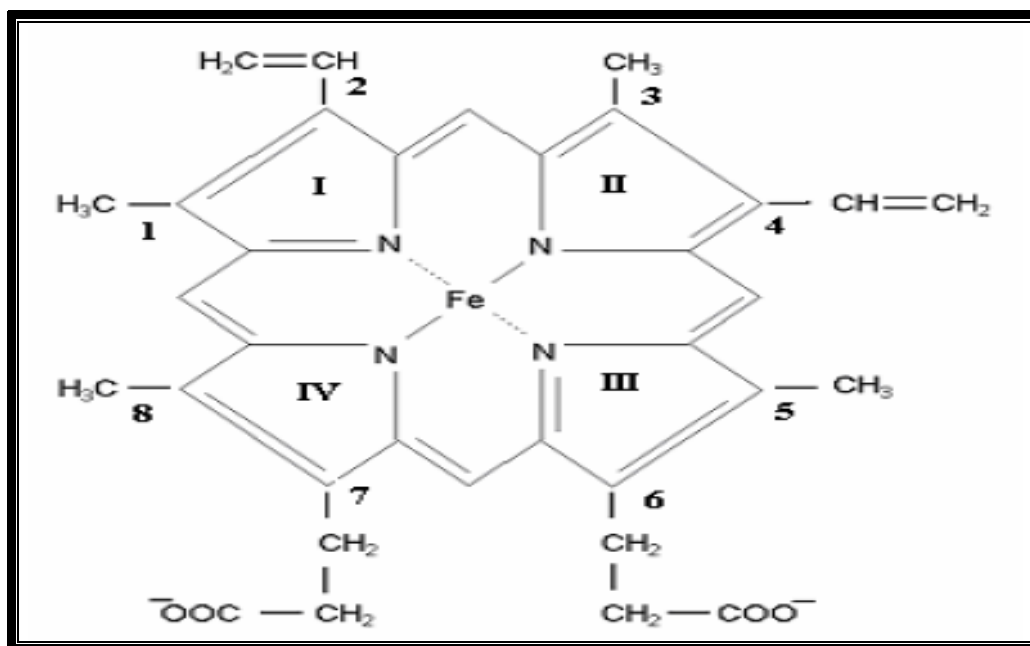


FIGURA 3. Grupo prostético das POD (PRIMO, 2006).

O mecanismo de ação da POD é baseado na catalisação de reações redox, onde se formam complexos enzima-doador hidrogênio, sendo que tanto o peróxido de hidrogênio quanto o oxigênio são utilizados como aceptores de hidrogênio (CHITARRA e CHITARRA, 2005), e o doador de elétrons pode ser o ascorbato, as aminas e outros compostos orgânicos, tais como os fenóis (RICHARDSON e HYSLOP, 2000a).

No sítio catalítico da heme peroxidase Figura (6), há um átomo de ferro (Fe), que apresenta número de oxidação $+3$ (1). Em relação à sequência em que ocorrem as reações, primeiro o peróxido se decompõe, gerando água (H_2O) (2) e oxidando o íon férrico (Fe^{3+}) em (Fe^{4+}) (3), o que resulta na formação do complexo Porphirina-Ferro-OXO [$(Fe^{4+})=O$], denominado composto 1, representado por [$Fe(IV^+)=O$], o qual transfere o átomo de oxigênio para o substrato (b). O composto I de peroxidases oxida um uma grande variedade de

substratos através de duas oxidações sequenciais “um-elétron”, formando primeiro o intermediário composto II (a) reduzido e, então, o estado férrico fundamental (1) (DU e LOEW, 1992, citado por PRIMO, 2006). Se a sequência prosseguir sem oxidar o substrato, então o oxigênio que forma o complexo Fe-oxeno (a) é reduzido gerando o composto II. Nestas condições uma nova redução é eminente à geração de uma molécula de H₂O, reduzindo o estado (Fe⁴⁺) para (Fe³⁺) (1) (VELDE *et al.*, 2001, citado por PRIMO, 2006).

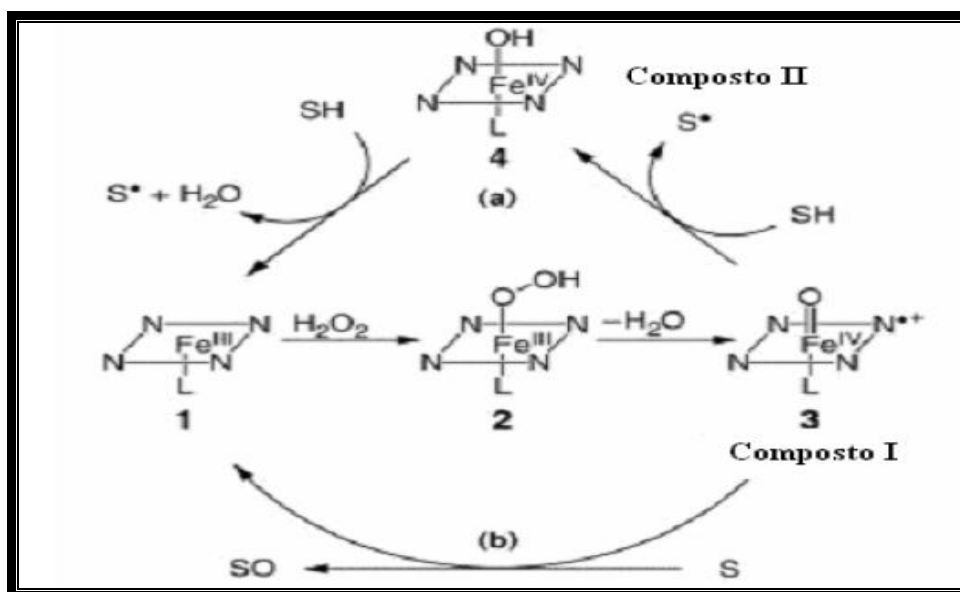


FIGURA 4. Mecanismo de ação das POD (PRIMO, 2006).

3.2.3 Variáveis que afetam a cinética enzimática

As variáveis que interferem na ação das enzimas são, a temperatura, o pH, a pressão, a presença de inibidores, a concentração e tipo dos substratos e a concentração das enzimas

Para alterar as propriedades catalíticas da enzima, é necessário um tratamento que modifique a sua conformação, para que interfira na fixação do substrato sobre a enzima ou que modifique a estrutura do sítio ativo (LIMA *et al.*, 2001; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

3.2.3.1 Temperatura

A variação da atividade enzimática em função da temperatura resulta de dois efeitos opostos, sendo um pelo aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura, aumentando a frequência das colisões reativas entre o substrato e a enzima por unidade de tempo, e outro pela desnaturação da proteína, modificando as estruturas da proteína, o que faz a enzima passar de uma conformação ativa para uma conformação desprovida de atividade. Na desnaturação das enzimas pelo aumento de temperatura, o que se considera é o binômio tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico (LIMA *et al.*, 2001).

Portanto, à medida que a temperatura aumenta, as colisões entre enzima e substrato faz com que a velocidade da reação também aumente, mas em contrapartida, tal reação é minimizada devido ao aumento da velocidade de desnaturação (LEHNINGER e NELSON, 1995).

O tipo de substrato interfere na faixa de temperatura na qual o fenômeno de desativação enzimática ocorre de forma predominante, e isso porque o substrato na maioria das vezes protege a enzima da desnaturação pelo calor, através da estabilidade que a ligação com o substrato fornece à estrutura tridimensional da enzima (SANTOS, 2009).

As baixas temperaturas (0 - 4°C) estão longe do ponto ótimo para as enzimas PPO e POD, o que dificulta o acoplamento enzima-substrato pela diminuição da energia cinética das moléculas (LEE *et al.*, 1995).

O congelamento lento dos tecidos causa a formação de cristais de gelo capazes de romper as células vegetais, possibilitando o contato entre a PPO ou a POD com os compostos fenólicos e o oxigênio, provocando o escurecimento (embora de forma mais lenta) mesmo em baixas temperaturas (CANO, MARIN e FOSTER, 1990).

O tratamento hidrotérmico suave pode regular a síntese de compostos fenólicos ou mesmo das enzimas no período de armazenamento.

A POD é mais resistente ao processamento térmico que a PPO (HENDRICKX *et al.*, 1998).

3.2.3.2 pH

O efeito do pH na ação e estabilidade da enzima deve-se às oscilações no estado de ionização dos componentes do sistema. Os sítios ativos das enzimas frequentemente apresentam em sua composição grupos ionizáveis, e esses grupos devem permanecer na forma iônica apropriada para manter a conformação do sítio ativo da enzima, reconhecer os substratos e catalisar a reação (LEHNINGER e NELSON, 1995; CORNISH-BOWDEN, 1995), assim, o papel dos grupos dissociáveis na estabilidade da estrutura tridimensional da enzima, são os responsáveis em deixar a enzima com pH ideal para que catalise uma reação (SANTOS, 2009).

Quando há estabilidade da enzima, ou seja, a proteína encontra-se em seu pH ótimo, existirão grupos carregados e neutros que ajam em conjunto de forma a manter a conformação da enzima estável. Com a mudança de pH, podem se tornar neutros os grupos que anteriormente eram carregados, causando a perda da contribuição destas ligações, e também aqueles grupos dissociáveis que eram neutros podem ficar carregados, provocando uma repulsão dentro da molécula. Entretanto, mudanças no grau de ionização geralmente são reversíveis, menos em condições extremas de mudança de pH, pois pode afetar a estabilidade dos substratos (RICHARDSON e HYSLOP, 2000a).

O pH depende de vários fatores, como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de íons metálicos contaminantes, concentração da enzima, concentração de vários conservantes, concentração de cofatores da enzima ou substratos e estado de ionização do substrato (ARAÚJO, 1995d; MCCORD e KILARA, 1983; PRIGENT, 2005).

O pH ótimo da PPO e da POD depende da fonte e do substrato disponível (VAROUQUAX e WILEY, 1997; LAURILA, *et al.*, 1998; EVANGELISTA, 2001).

3.2.3.3 Pressão

A Alta Pressão Hidrostática (APH) tem a capacidade de ativar ou inativar enzimas. Com este tratamento, as proteínas são desnaturadas ou modificadas, interrompendo assim as

reações catalíticas (BUTZ e TAUSCHER, 2002).

A pressão aplicada e o tempo de aplicação dependem do tipo do produto a ser tratado e do produto final desejado, sendo que geralmente são submetidos a pressões acima de 100 MPa, mas em sistemas comerciais, as pressões utilizadas enquadram-se na faixa de 400 a 700 MPa (CARVALHO, 2008).

A atividade da PPO de alguns vegetais é altamente estável à pressão, sendo necessário aplicar uma pressão entre 800 e 900 MPa, enquanto a ação da PPO de outras frutas é mais sensível à pressão, sendo necessário aplicar entre de 100 à 600 MPa, já a POD tem se mostrado bastante resistente à pressão (GOMES *et al.*, 1996; ESHTIAGHI *et al.*, 1998; JOLIBERT *et al.*, 1998; AMATI *et al.*, 1996; citado por CARVALHO, 2008).

Um dos fatores que implica na inativação induzida por pressão, é o pH, pois tem sido relatado que a PPO é inativada mais rapidamente a baixos pH (JOLIBERT *et al.*, 1998, citado por CARVALHO).

3.2.3.4 Substratos fenólicos

Os compostos fenólicos são considerados metabólitos secundários, e são amplamente distribuídos no reino Plantae. A estrutura dos compostos fenólicos apresenta um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas, ligado à outros substitutos. A composição fenólica dos vegetais varia de acordo com a espécie, cultivo, grau de amadurecimento e condições ambientais de desenvolvimento e de armazenamento (MARSHALL *et al.*, 2000, citado por SILVA *et al.*, 2009).

Entre os compostos que mais afetam a coloração dos vegetais, estão os fenólicos e flavonóides, pois são responsáveis por aproximadamente 68% na alteração da cor, (SMITH e PATON, 1985), assim o escurecimento enzimático é afetado diretamente pelo tipo e pela concentração do substrato fenólico (MARTÍN-BELLOSO e SOLIVA-FORTUNY, 2006, citado por SILVA *et al.*, 2009).

Os fenóis que foram encontrados na cana-de-açúcar, são compostos por derivados do ácido cinâmico (ácidos cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e clorogênico) e benzóico (ácido hidroxibenzóico) (SMITH e PATON, 1985).

A maioria das enzimas envolve dois substratos, podendo ser os compostos fenólicos e

o outro substrato, em muitos casos, a água ou o oxigênio molecular. Nestas situações, é possível investigar o efeito da concentração de um substrato na velocidade, a partir do outro substrato mantido em concentrações constantes (DORAN, 1995).

3.2.3.5 Agentes químicos

A aplicação de inibidores da atividade enzimática em alimentos é restrito devido à toxicidade que podem causar dependendo da concentração empregada, além do efeito negativo que tais acarretam, tanto nas características sensoriais e nutricionais, como nos custos. Os inibidores químicos de escurecimento enzimático são classificados de acordo com seu modo de ação, como os agentes antioxidantes, acidulantes, quelantes e complexantes, atuando diretamente nas enzimas, nos substratos ou ainda nos produtos de reação (MARSHALL *et al.*, 2000, citado por SILVA *et al.*, 2009).

No Brasil, ainda não há legislação específica para os produtos processados, estabelecendo os tipos de inibidores de escurecimento permitidos e os limites de aplicação (SILVA *et al.*, 2009).

O agente redutor previne o escurecimento enzimático, pois reduz a o-quinona à difenol (MARSHALL *et al.*, 2000, citado por SILVA *et al.*, 2009).

Os sulfitos e seus derivados agem diretamente nas enzimas pela diminuição do número de pontes dissulfeto no centro catalítico ou nos compostos de reação, formando sulfonatos sem coloração ou reduzindo-os aos fenóis precursores (SAYAVEDRA-SOTO *et al.* 1988; WALKER e FERRAR, 1998; WONG, 1995; ARAÚJO, 1999c).

O ácido ascórbico apresenta ação redutora, e junto com seus sais neutros compõe um dos principais grupos de antioxidantes. A reação ocorre de duas maneiras, agindo diretamente na enzima, e reduzindo as quinonas a sua forma anterior de fenóis (SAPERS e MILLER, 1998).

A cisteína conjugada com o-quinonas, forma compostos sem cor, ou reduz as o-quinonas aos compostos fenólicos precursores (CILLIERS e SINGLETON, 1990).

Os agentes acidulantes são geralmente utilizados em alimentos para manter o pH do meio abaixo do ótimo para as enzimas, são eles, os ácidos cítrico, málico e fosfórico (ZEMEL *et al.*, 1990).

Os agentes quelantes removem os metais que compõem o grupo prostético da PPO e da POD, ou seja, o cobre e o ferro, através de ácido sórbico, etileno diamino tetraacético (EDTA) e policarboxílicos (como o málico e o tartárico) (MARSHALL *et al.*, 2000, citado por SILVA *et al.*, 2009).

Soluções de sais de cálcio auxiliam na manutenção da parede celular, pois os íons de cálcio ligam-se às cadeias de pectina, formando pontes entre elas, aumentando sua força e formando pectato de cálcio (POOVAIAH, 1986; RENSBURG *et al.*, 1986), o que faz reduzir a respiração do produto e inibir o escurecimento enzimático (MARTÍN-DIANA *et al.*, 2005).

O uso da irradiação em vegetais podem causar alterações quanto à textura e coloração (POTTER e HOTCHKISS, 1998), e baseia-se na exposição a uma fonte de radiação ionizante suficiente para criar cargas positivas e negativas, por meio do uso de raios gama produzidos geralmente por radioisótopos de cobalto-60 ou césio-137 (OLSON, 1998). A radiação gama pode afetar diretamente as enzimas, alterando a sua conformação estrutural ou modificando o seu centro ativo, especificamente pela redução do íon metálico (BEAULIEU *et al.*, 2002), e também indiretamente, quando doses maiores de radiação alteram a permeabilidade das membranas celulares, causando maior entrada de oxigênio molecular no citoplasma e descompartimentação dos compostos fenólicos, provocando efeito simultâneo da oxidação desses por via enzimática e não enzimática (SILVA *et al.*, 2009).

3.2.3.6 Modificação genética

Uma alternativa para minimizar os efeitos que estas enzimas proporcionam nos vegetais, é produzir cultivares menos propensos ao escurecimento, por meio da modificação genética (VAUGHN *et al.*, 1988; MARTINEZ e WHITAKER, 1995). Através da biologia molecular, é possível modificar o processo de formação da enzima ativa, por meio da manipulação genética, onde se caracteriza e inativa os genes que codificam a enzima, implicando na diminuição da atividade da PPO e da POD, e conseqüentemente nas reações de escurecimento (MARSHALL *et al.*, 2000, citado por SILVA *et al.*, 2009).

3.2.3.7 Alteração na concentração de enzimas

Uma das alternativas para se controlar o efeito enzimático, é utilizar algum meio para promover alterações nas concentrações das enzimas, assim como o polímero sintético, que ao ser adicionado ao solo, altera a concentração da enzima polifenoloxidase (RAMPAZO, 2010).

3.2.4 Prós e contras da PPO e POD nos vegetais

A PPO e a POD são enzimas de extrema importância para os vegetais, pois as quinonas formadas pela ação destas enzimas possuem ação antimicrobiana e os polímeros podem atuar como inibidores do ataque de alguns insetos, além de formarem complexos com proteínas, resultando em uma barreira física contra a entrada de patógenos. Ao oxidar os compostos fenólicos para quinonas, há formação de produtos mais tóxicos que o fenol para os microrganismos, sendo assim consideradas como potentes bactericidas e fungicidas (CAMPOS e SILVEIRA, 2003).

A PPO possui uma característica importante no desenvolvimento do sabor e cor dos alimentos, pois reduz o amargor e a adstringência de alguns (MAHANTA *et al.*, 1993; MOTODA, 1979; YOSHIYAMA e ITO, 1996).

A POD está relacionada com processos de cicatrização como, por exemplo, a lignificação (CANTOS *et al.*, 2002).

O aspecto indesejável atribuído à estas enzimas, está diretamente relacionado ao escurecimento dos produtos vegetais após sua fase pós-colheita, e este efeito se percebe quando a maioria dos vegetais são amassados, cortados ou triturados, pois há formação de pigmentos escuros, o que resulta em insatisfação em relação às propriedades organolépticas (cor, textura e sabor) dos produtos, além da redução da qualidade nutritiva, o que proporciona perdas econômicas significativas.

No caso da cana-de-açúcar, a partir do momento que o caldo é extraído, inicia as reações que provocam uma maior coloração, implicando em aumento do índice de cor do açúcar (ARAÚJO, 2001a).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área experimental

A cana-de-açúcar utilizada no experimento pertence à espécie *Saccharum* spp. e foi coletada na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção (FEPP) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, localizada no município de Jaboticabal, pertencente à macro-região de Ribeirão Preto, interior de São Paulo, especificamente ao norte do estado.

As coordenadas geográficas de Jaboticabal são definidas como: Paralelos, latitude sul 21° 15' 22" S, e Meridianos, longitude oeste 48° 18' 58" WG, e em relação ao nível do mar, esta apresenta uma altitude média de 575 metros. A FEPP fica situada às margens da Via de Acesso Prof. Donato Castellane, no sentido Jaboticabal – Barrinha.

Segundo a classificação de Koppen-Geiger, o tipo do clima é CWA - subtropical-mesotérmico, com verão úmido e inverno seco, apresentando uma pluviometria média de 1.442 mm por ano, sendo que o período das chuvas e altas temperaturas ocorrem entre os meses de outubro e março, e o período de seca entre os meses de maio e agosto.

4.1.2 Características do solo

A matéria-prima utilizada no experimento foi plantada em um Latossolo Vermelho

Eutroférico Típico (LVef) (EMBRAPA, 1999).

4.1.3 Cultivar

O cultivar de cana-de-açúcar estudado foi o CTC 15, nas condições de cana planta. O CTC 15 possui um ciclo de maturação média e tardia e foi desenvolvido pela empresa Centro de Tecnologia Canavieira. Em relação às características agrônômicas, este cultivar destaca-se por ser resistente ao estresse hídrico, desenvolvimento rápido, ampla adaptabilidade, alta produtividade em todos os cortes, mas possui um aspecto indesejável em relação ao florescimento.

Quanto à morfologia, este cultivar apresenta um perfilhamento médio à alto, suas touceiras têm hábito de crescimento levemente decumbente, os colmos possuem comprimento e diâmetro médios, com formato cilíndrico, seção transversal oval, sem rachaduras. Os entrenós são de cor roxo-esverdeada ao sol e amarelo-esverdeada sob a palha. O comprimento e o diâmetro são médios, com formato cilíndrico, seção transversal oval, sem rachaduras. Apresentam ziguezague suave, aspecto liso e pouca cera. As canaletas são ausentes. Nos nós, o anel de crescimento é de cor amarelo-esverdeada, largura média, sem enraizamento aéreo. A zona cerosa é pequena. As gemas são médias, pentagonais, com média saliência, não ultrapassando o anel de crescimento, com posição sub-apical do poro germinativo, pêlos no ápice e almofada média. A copa foliar tem volume regular e tonalidade intermediária a escura. As folhas têm as pontas curvas, largura do limbo média a larga, poucos pêlos e com serrilhamento médio. A lígula é crescente, as aurículas são assimétricas, sendo uma lanceolada de tamanho pequeno; a bainha tem joias dorsais em pouca quantidade. O palmito apresenta fraca presença de cera, de cor arroxeadas, de tamanho longo e com seção transversal oval (Figura 7) (CTC, 2012).



FIGURA 5. Morfologia do cultivar CTC 15 (CTC, 2012).

4.2 Tratamentos utilizados

Foram utilizados diferentes níveis de impurezas vegetais: 0, 2,5, 5 e 10% para cada um dos tratamentos (folha verde, folha seca e folha verde+folha seca). Cada modalidade de impureza vegetal foi adicionada na cana desintegrada de forma a obter os 500 g para então, o material a ser encaminhado à prensa hidráulica, de acordo com a Tabela 1, sendo que esta quantidade em gramas é um padrão utilizado em todas as análises sucroalcooleiras.

TABELA 1. Tratamentos utilizados.

Tratamentos	Cana desintegrada (g)	Impureza Vegetal (g)
Cana limpa	500	0
Cana + 2,5% de I.V.	487,5	12,5
Cana + 5% de I.V.	475	25
Cana + 10% de I.V.	450	50

I.V. : Impureza vegetal (constituída por folhas secas ou folhas verdes ou folhas secas + folhas verdes).

4.3 Coleta dos colmos de cana

A coleta das amostras de cana-de-açúcar foi realizada no mês de maio de 2012, aos 10 meses e 15 dias nas condições de cana planta. Neste momento, foi coletado um feixe de cana contendo 10 colmos industrializáveis, retirados em sequência na linha de plantio, que foi encaminhado ao Laboratório de Tecnologia de Açúcar e Etanol da FCAV/UNESP (Figuras 8, 9, 10 e 11) para posterior análise.



FIGURA 6. Corte dos colmos



FIGURA 7. Retirada dos colmos



FIGURA 8. Carregamento da cana.



FIGURA 9. Descarregamento da cana.

No laboratório foi realizada a remoção das folhas verdes e folhas secas, de acordo com seu respectivo tratamento (Figuras 12 e 13).

A remoção das impurezas vegetais dos colmos foi feita manualmente, sendo que cada tipo de impureza foi separada e identificada em recipientes diferentes.



FIGURA 12. Remoção das folhas secas. **FIGURA 13.** Remoção das folhas verdes.

Em seguida a cana limpa e as impurezas vegetais (folhas secas e folhas verdes) foram encaminhadas para o desintegrador (Figuras 14, 15 e 16).



FIGURA 14. Colmo. **FIGURA 15.** Folha verde. **FIGURA 16.** Folha seca.

Cada material desintegrado foi pesado na balança eletrônica (Figura 17), de acordo com seu respectivo tratamento.



FIGURA 17. Balança eletrônica.

Neste processo, os colmos de cana e as impurezas já desintegradas e pesadas foram transferidos para a prensa hidráulica (Figuras 18 e 19) (de acordo com seu respectivo tratamento), a qual exerce uma pressão de 250 kg cm^{-2} por minuto, onde se obteve o caldo extraído (Figura 20).



FIGURA 18. Prensa hidráulica.



FIGURA 19. Colmos e impurezas na prensa.



FIGURA 20. Caldo extraído.

4.4. Tratamento do caldo extraído

Após sua extração, o caldo foi filtrado (Figura 21) em algodão hidrófilo (Figura 22), através de um funil, e imediatamente submetido à temperaturas baixas, para preservar a ação das enzimas até o momento de realizar o procedimento (Figura 23).



FIGURA 21. Algodão hidrófilo.



FIGURA 22. Filtração do caldo.

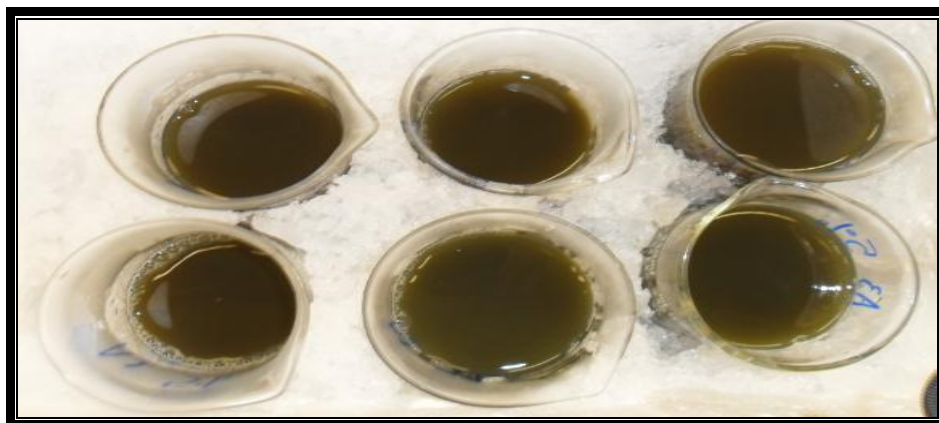


FIGURA 23. Caldo acondicionado à temperaturas baixas.

4.4.1 Soluções para a análise

Para analisar a atividade da PPO e da POD, foi necessário o preparo de soluções específicas por meio dos reagentes pyrocatecol, ácido perclórico, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, guaiacol, peróxido de hidrogênio, ácido cítrico e dissulfito de sódio, sendo que estas soluções foram armazenadas em geladeira, e ao iniciar cada experimento, transferiu-se tais para béqueres gelados, e para fazer a transferência para cada amostra em quantidades precisas, utilizou-se pipetas automáticas (P1000, P200 e P10ml) (Figuras 24).



FIGURA 24. Pipetas automáticas.

4.4.2. Análise química da atividade da PPO

No caldo extraído foram realizadas as determinações das atividades da PPO por meio do método proposto por Ponting e Joslyn em 1948, citado por Campos *et al.* em (1996).

Cada amostra a ser analisada foi preparada em tubo de ensaio gelado, e desse modo, foi adicionado 3,6 mL de solução tampão fosfato 0,05M; 1 mL de extrato enzimático (1 mL de caldo diluído em 10 ml de solução tampão fosfato); 0,1 mL de catecol 0,1M como substrato fenólico;

A amostra foi misturada por um agitador de tubos convencional (Figuras 25 e 26).

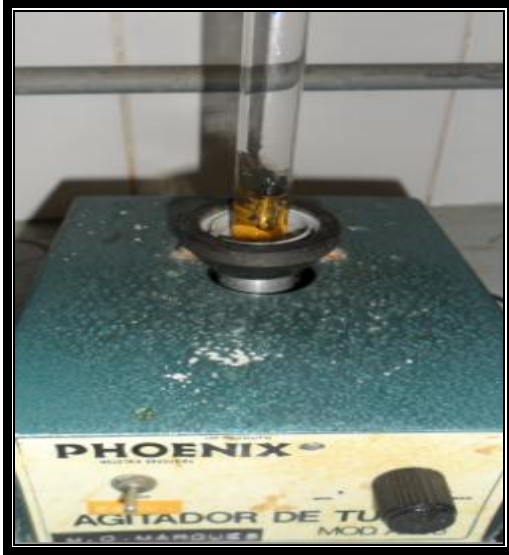


FIGURA 25. Agitador de tubos.



FIGURA 26. Visão detalhada do agitador.

Transferiu-se a amostra para o banho-maria a 30°C, e manteve-a durante 30 minutos (Figuras 27 e 28).



FIGURA 27. Banho-maria.



FIGURA 28. Tubos no Banho-maria.

Após os 30 minutos, colocou o tubo em bquer contendo gelo e adicionou-se 0,2 mL de ácido perclórico a 1,4% (Figuras 29 e 30);

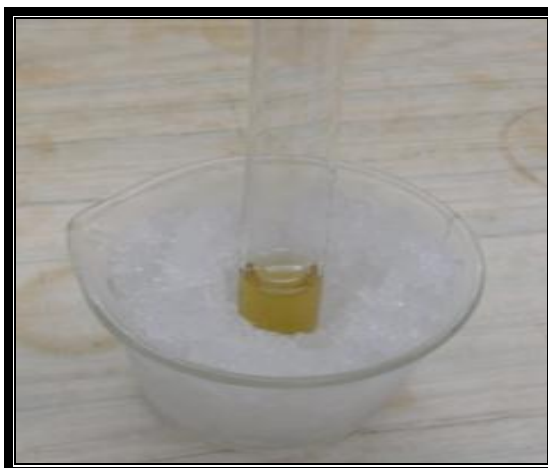


FIGURA 29. Banho de gelo.



FIGURA 30. Adição de ácido perclórico.

Após nova agitação, o tubo ficou em repouso durante 10 minutos (Figura 31).

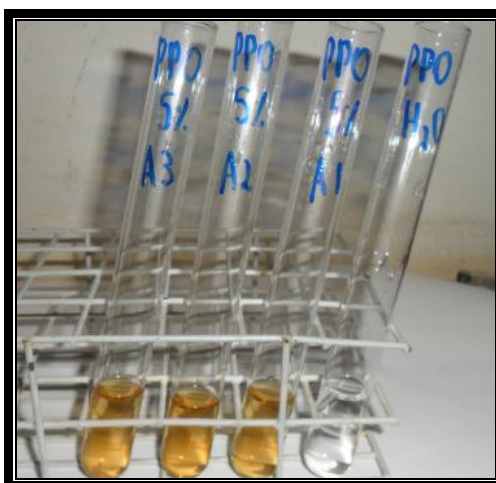


FIGURA 31. Repouso de 10 minutos.

A amostra foi transferida do tubo de ensaio para uma cubeta de 10 mm de diâmetro (Figura 32), para determinar a absorvância à 395 nm, em espectrofotômetro visível (Figuras 33 e 34), entretanto, antes de colocá-la no aparelho para possível leitura, utilizou-se o branco para zerá-lo, e este corresponde ao mesmo procedimento, exceto o extrato enzimático, onde tal foi substituído por água destilada.

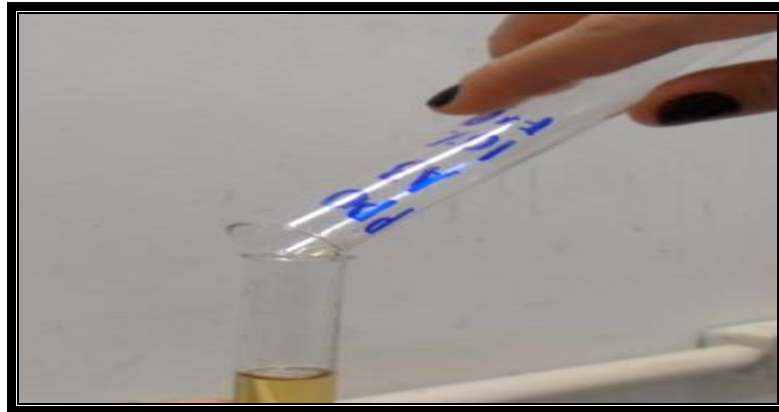


FIGURA 32. Transferência da amostra do tubo para a cubeta.



FIGURA 33. Espectrofotômetro.



FIGURA 34. Espectrofotômetro à 395 nm.

Foi realizado então o cálculo pra determinação da unidade de atividade enzimática (UE).

4.4.3. Análise química da atividade da POD

Para a POD utilizou-se o método proposto por Ferrhramann e Diamond em 1967, citado por Campos *et al.* em (1996).

Da mesma forma que a PPO, cada amostra a ser analisada foi preparada em tubo de ensaio gelado, e desse modo, foi adicionado 2,5 mL de solução tampão fosfato-citrato 0,05M; 1,5 mL de extrato enzimico (caldo puro); 0,25 mL de guaiacol 0,1M como substrato fenólico;

A amostra foi misturada por um agitador de tubos convencional. Adicionou-se 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 3%, e foi agitada novamente; Transferiu-se a amostra para o banho-maria a 30°C, e manteve-a durante 15 minutos. Após os 15 minutos, colocou o tubo em béquer contendo gelo (Figura 35); Adicionou-se 0,25 mL de solução meta-bissulfito de sódio 2% (Figura 36);



FIGURA 35. Béquer contendo gelo.



FIGURA 36. Adição de meta-bissulfito.

Após nova agitação, o tubo ficou em repouso durante 10 minutos (Figura 37).



FIGURA 37. Repouso de 10 minutos.

A amostra foi transferida do tubo de ensaio para uma cubeta de 10 mm de diâmetro, para determinar a absorvância à 450 nm, em espectrofotômetro visível (Figura 38), entretanto, da mesma forma que PPO, antes de colocá-la no aparelho para possível leitura, utilizou-se o branco para zerá-lo, e este corresponde ao mesmo procedimento, exceto o extrato enzimático, onde tal foi substituído por água destilada.



FIGURA 38. Espectrofotômetro à 450 nm.

Foi realizado então o cálculo pra determinação da unidade de atividade enzimática (UE).

4.5 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4, com três repetições. O primeiro fator foi constituído por (folha verde; folha seca; e folha verde + folha seca), e o segundo fator pelos diferentes níveis de impurezas (0; 2,5; 5 e 10%).

4.6 Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de variância (Teste F), e quando houve significância procedeu-se a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios da atividade da PPO e POD para os tratamentos analisados, além da análise estatística. Para o fator impureza, não houve diferença para nenhuma das enzimas. Entretanto, para os níveis de impurezas houve diferença tanto para a PPO quanto para a POD. Na interação entre as variáveis (Impureza X Nível), não houve diferença para nenhuma das enzimas.

Mesmo com diferença não significativa entre as impurezas, podemos observar na Tabela 2 que os maiores valores obtidos pela folha verde podem indicar uma maior ação enzimática em comparação à folha seca e à folha verde + folha seca, tanto para a PPO quanto para a POD. No entanto, maiores estudos precisam ser realizados para confirmar ou não isso.

Quanto aos níveis das impurezas, observa-se que a adição de impureza vegetal proporciona aumento da atividade enzimática em relação à cana livre de impurezas. Porém, entre os tratamentos que continham impurezas não foi observado diferença. Sendo assim, podemos constatar a interferência da impureza na atividade enzimática, sendo que a ela pode ocasionar maior coloração do açúcar além de prejudicar a indústria por desgastes, entupimentos, incrustações, o que faz reduzir a vida útil dos equipamentos, afetando assim negativamente na industrialização (MARQUES *et al.*, 2008).

Tais resultados vão ao encontro dos apresentados por Caldas (2011) que relatou que a que a palha da cana aumenta a cor do caldo por ação da PPO. Neste sentido, Ivin e Doyle (1989) também observaram que as impurezas vegetais aumentaram a coloração do caldo, e assim como os resultados relatados por Bovi e Serra (1999), o aumento da presença de folhas verdes, há redução do Brix, Pol e Pureza, além de causar a elevação dos açúcares reductores e cinzas no caldo.

Porém, de modo contrário, segundo Manechine (2011), os teores desejáveis de impurezas no processo são aqueles menores que 3%, pois valor maior que este implicará em efeito qualitativo negativo sobre as variáveis de qualidade tecnológica do caldo. No presente estudo foi observado que o nível de impureza de 2,5% já ocasiona aumento da atividade enzimática do caldo, e assim prejudica a qualidade do caldo.

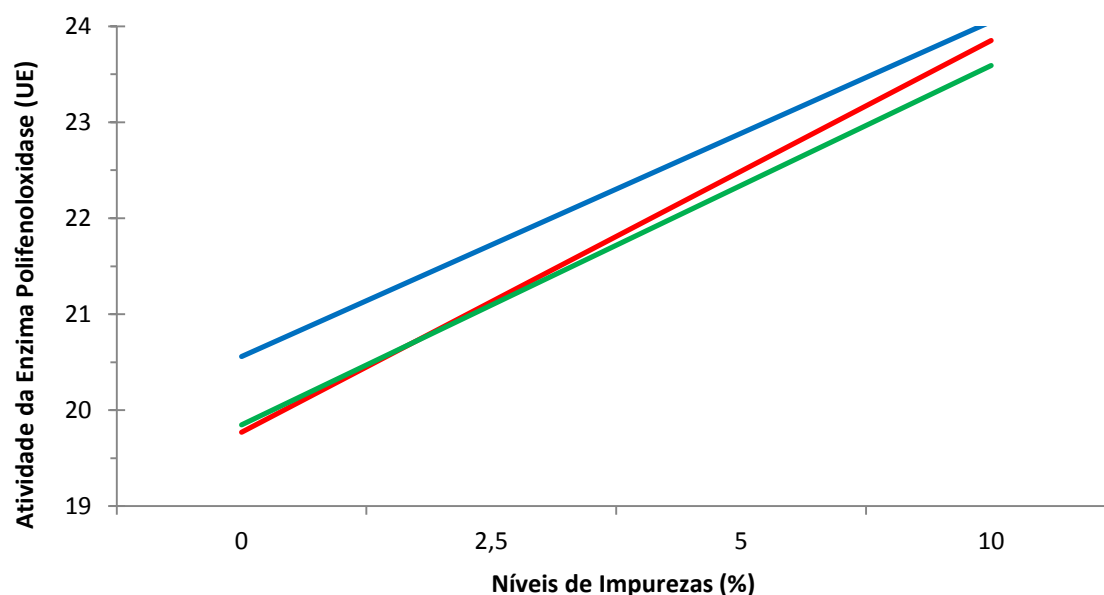
TABELA 2. Valores médios de atividade da PPO e POD para impurezas vegetais e níveis de impurezas vegetais, além de dados estatísticos.

Causas de Variações	PPO	POD)
Impurezas (I)	(UE)	(UE)
FV	22,30	86,73
FS	21,81	86,14
FV + FS	21,72	86,47
DMS (5%)	1,20	0,9978
Níveis (N)		
0%	19,54 b	83,31 b
2,5%	22,20 a	87,19 a
5%	22,38 a	87,62 a
10%	23,67 a	87,66 a
DMS (5%)	1,53	1,27
Estatística (Teste F)		
Impurezas	0,85 ^{NS}	1,08 ^{NS}
Níveis	19,60 ^{**}	41,60 ^{**}
Interação I x N	0,15 ^{NS}	1,00 ^{NS}
C.V.%	5,35	1,13

Médias seguidas de letra distintas, na coluna, para cada atributo, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FV – folha verde. FS – folha seca. ** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade. NS – não significativo. DMS – Diferença mínima significativa. CV – coeficiente de variação. UE: Unidade de atividade enzimática.

Na figura 39 é apresentado o desdobramento da interação (IMPUREZAS x NÍVEIS) para os valores de atividade da polifenoloxidase (PPO). O aumento da unidade de atividade enzimática ocorreu em função da adição de qualquer impureza vegetal (FV, FS ou FV + FS), ou seja, quanto maior a concentração destas, maior será a UE. Dessa forma, todas as impurezas se encaixaram no modelo de regressão linear, evidenciando assim o aumento da atividade enzimática com o acréscimo dos níveis de impurezas.

Portanto, quanto mais impurezas forem carreadas para o processo de fabricação do açúcar, maior será a atividade enzima do caldo de cana e assim, poderá ocorrer caldo mais escuro, dificultando a produção de açúcar branco.



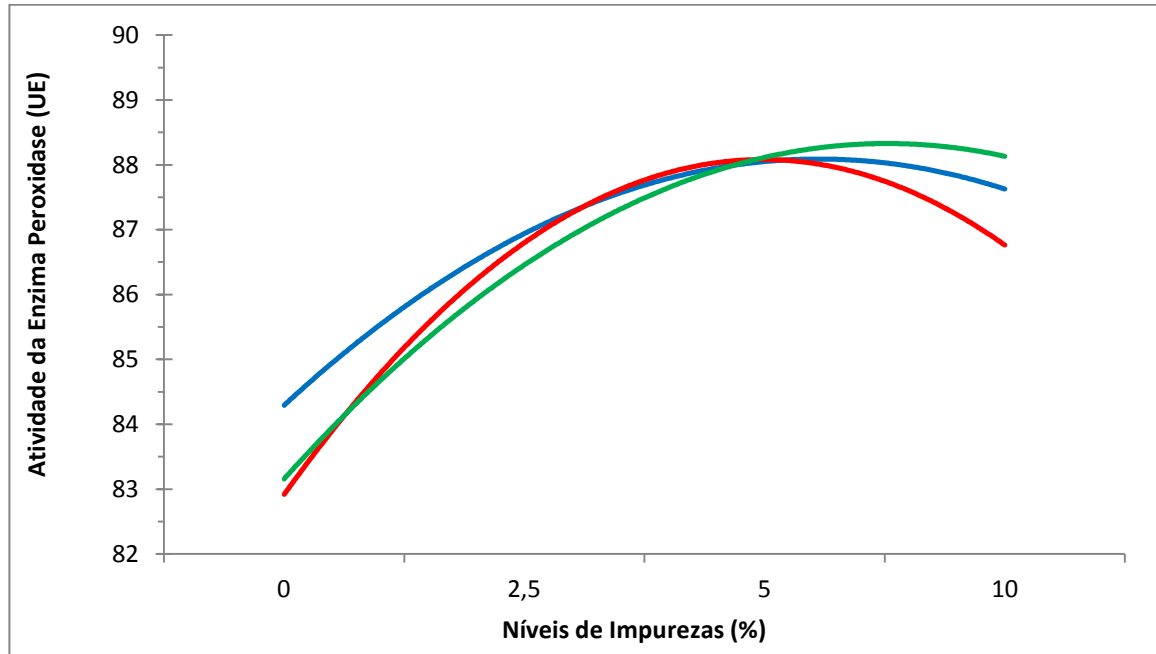
Impurezas	Teste F	R ²	Equação
FV	13,27**	0,68	$y = 20,8432000 + 0,33404952x$
FS	18,99**	0,90	$y = 20,0643333 + 0,39967619x$
FV + FS	15,76**	0,83	$y = 20,1299800 + 0,36415124x$

FIGURA 39. Efeito da interação obtida entre impurezas e níveis para os valores da PPO. FV – folha verde. FS – Folha seca. UE - Unidade de atividade enzimática

Na figura 40 é apresentada a interação obtida entre impurezas e níveis para os valores de atividade da peroxidase. Para ambas as impurezas, a unidade de atividade enzimática obteve aumento nos valores em função da adição dos níveis de impurezas até a proporção de 5%.

Em relação entre as duas enzimas, pode-se dizer que o acréscimo observado na POD apenas até o nível de 5% de impurezas, sustenta a hipótese citada por Suzart *et al.* (2007), de que a PPO tem uma ação mais ativa que a POD. E por sua vez, esta confere com a afirmação de Alvarenga (2011), que ao comparar as duas enzimas, relatou que a PPO apresenta maior

sensibilidade que a POD, ou seja, a PPO apresenta maior participação no processo de formação de cor no caldo de cana-de-açúcar.



Impurezas	Teste F	R ²	Equação
FV	10,18**	0,92	$y = 84,3922121 + 1,14462424x - 0,08136970x^2$
FS	24,94**	0,86	$y = 83,0936152 + 1,65231697x - 0,12733212x^2$
FV + FS	15,37**	0,99	$y = 83,2132727 + 1,49307879x - 0,09995152x^2$

FIGURA 40. Desdobramento obtido entre impurezas e níveis para os valores da POD. FV – folha verde. FS – Folha seca. UE- unidade de atividade enzimática.

6. CONCLUSÃO

O aumento da atividade das enzimas PPO e POD é influenciado pela presença de impurezas vegetais, seja ela formada por folha secas, verdes ou folhas secas e folhas verdes.

O aumento dos níveis de impurezas provocou acréscimo linear para a atividade enzimática da PPO. Para a enzima POD o aumento da atividade ocorreu até o nível de 5% de impurezas.

Esses resultados permitem inferir que haverá maior coloração do caldo quando houver presença de impurezas vegetais, podendo assim prejudicar a qualidade do açúcar a ser produzido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCARDE, A.R. **Cana-de-açúcar: Outros produtos**. Agência de informação EMBRAPA, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG0110822122006154841.html>. Acesso em: 15 abr. 2012.

ALVARENGA, T.C. **Atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase em caldos de três cultivares de cana-de-açúcar, extraídos de diferentes partes do colmo**. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Tecnologia, Jaboticabal, 2011.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. **Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis***. Food Chem. 97, 2006, p. 459–464.

APG - Angiosperm Phylogeny Group. **Uma classificação ordinal para as famílias de plantas com flores**. Ann. Missouri Bot. Gard. 85, 1998, p. 531–553.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001a. 416p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999b, p. 319-329.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1995c, 247p.

ARAÚJO, M. **Reino Plantae: Família Poaceae**. Infoescola, navegando e aprendendo, 2010. Disponível em: <http://www.infoescola.com/plantas/familia-poaceae/>. Acesso em: 25 mar 2012.

AZEVEDO, J.A.G.; PEREIRA, J.C.; CARNEIRO, P.C.S.; QUEIROZ, A.C.; BARBOSA, M.H.P.; FERNANDES, A.M.; RENNÓ, F.P. **Avaliação da divergência nutricional de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Revista Brasileira de Zootecnia. vol.32 n.6 Viçosa Nov./Dec. 2003.

BANCI, L. **Structural properties of peroxidases**. Journal of Biotechnology, 53, 1997, p. 253-263.

BEAULIEU, M.; D'APRANO, G.; LACROIX, M. **Effect of dose rate of gamma irradiation on biochemical quality and browning of mushrooms *Agaricus bisporus***. Radiation Physics and Chemistry, v. 63, n. 3-6, 2002, p. 311-315.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2ª ed. Zaragoza, Acribia, 1997, 1087p.

BENEDINI, M. S.; BROD, F. P. R.; PERTICARRARI, J. G. **Perdas de cana e impurezas vegetais e minerais na colheita mecanizada**. CTC, 2010. Disponível em: http://www.coplana.com/gxpsites/..%5Cgxpfiles%5Cws001%5Cdesign%5CDownload%5CCi rculares%5CPerdas_na_colheita_mecanizada.pdf. Acesso em: 03 fev. 2012.

BOVI, R.; SERRA, G. E. **Impurezas fibrosas da cana-de-açúcar e parâmetros tecnológicos do caldo extraído**. Scientia agricola. vol.56 n.4. Piracicaba Out./Dez. 1999.

BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. **Contribution of enzymatic browning to color in sugarcane juice**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 42, n.2, 1994, p. 257-261.

BURTON, S.G. **Biocatalysis with polyphenoloxidase: a review**. Catalysis Today, 22, , 1994, p. 459-487.

BUTZ, P.; TAUSCHER, B. **Emerging Technologies: chemical aspects**. Food Research International, v. 35, n. 2, 2002 p. 279-284.

CALDAS, C. **Controle de qualidade da cana para sua industrialização**. Congresso Nacional STAB, 2011. Disponível em: http://www.gemea.com.br/media/downloads/Qualidade_da_Materia_Prima_GEMEA.pdf. Acesso em: 21 mar. 2012.

CAMPOS, A. D. ; SILVEIRA, E. M da L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa, 2003. Comunicado Técnico, 87.

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

CANO, P.; MARIN, M. A.; FOSTER, C. **Freezing of banana slices**. Influence of maturity level and thermal treatment prior to freezing. J. Food Sci., v. 55, n. 4, 1990, p. 1070-1072.

CANTOS, E.; TUDELA, J.A.; GIL, M.I.; ESPÍN, J.C. **Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes**. J. Agric. Food Chem., v.50, p., 2002, 3015-3023.

CAPUTO, M. M.; BEAUCLAIR, E. G. F.; SILVA, M. A.; PIEDADE, S. M. S. **Respostas de genótipos de cana-de-açúcar à aplicação de indutores de maturação**. Bragantia, Campinas, v.67, n.1, 2008, p.15-23.

CARVALHO, M.G. **Tecnologia de alta pressão no processamento de alimento**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza/CE, 2008. Disponível em: <<http://br.monografias.com/trabalhos2/alta-pressao/alta-pressao2.shtml>>. Acesso em: fev. 2012.

CHITARRA, M. I. F. ; CHITARRA, A. B. **Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças**. 2° ed. UFLA- Universidade Federal de Lavras, 2005, p. 688.

CHLAMTAC, E.B. **Açúcares do mate**. Boletim del Instituto de Quimica Argentina, v.38, 1955, p.17 – 24.

CILLIERS, J. J. L.; SINGLETON, V. L. **Caffeic acid autooxidation and the effects of thiols**. J. Agric. Food Chem., v. 38, 1990, p. 1789-1796.

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of Enzyme Kinetics**. Port land Press Ltda, London, 1995.

CTC - CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Características do cultivar CTC 15**. 2012. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/index.php?option=comcontent&view=article&id=161 & Itemid =974>>. Acesso em 3 abr. 2012.

DAWSON, C. R.; Magee, R. J.; **Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase)**. In Methods in Enzymology; Colowick, S. P.; Kaplan, N. O.; Eds.; Academic Press; New York, vol.II, 1955, p. 817-826.

DAWSON, C. R.; Tarpley, W. B.; **Copper Oxidases**. In The Enzymes Chemistry and Mechanism of Action, Sumner, J. B.; Myrback, K.; Eds.; Academic Press; New York, vol.II, 1951, p. 455-491.

DEMATTE, J. L. I. **Modernizada, canicultura é líder em produção**. Visão Agrícola, Piracicaba, n. 1, 2004, p. 60-67.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G .A. **Cana-de-açúcar**. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, v.1. 2008, 882 p.

D.O.E., GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. **Legislação: Resolução SMA Nº 15**. 2003. Disponível em: < http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/estadual/resolucoes/2003_Res_SMA15.pdf>. Acesso em 12 jun. 2012.

DORAN, P. M.; **Bioprocess Engineering Principles**; Academic Press, 1995.

DUNFORD, H.B. **Heme peroxidases**. In: John Wiley and Sons, 1ª ed., New York, 1999, p.18-25.

EISENMENGER, M.J.; REYES-DE-CORCUERA, J.I. **High pressure enhancement of enzymes: A review**. Enzyme and Microbial Technology, v. 45, 2007, p. 331-347.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa. Produção de Informação/Embrapa Solos, 1999, 412p.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 273, 274.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Cultivo da cana de açúcar**. FAO, Banco de dados estatísticos, 2007. Disponível em: <<http://paraquat.com/portugues/banco-de-conhecimentos/produ%C3%A7%C3%A3o-e-prote%C3%A7%C3%A3o-da-lavoura/cultivo-da-cana-de-a%C3%A7%C3%BAcar>>. Acesso em: 14 mar. 2012.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. **Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática**. Química Nova, v. 25, n. 3, 2002, p 455-464.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Editorial Acribia S. A. Zaragoza (España), 1993, 1095 p.

FURLANI NETO, V.L.; FERNANDES, J.; MIALHE, L.G. **Avaliações nas cargas de cana-de-açúcar colhidas mecanicamente**. Brasil Açucareiro, v.96, n.3, 1980, p.25-30.

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

GAVA, A.J. **Processamento asséptico de suco de frutas. Alimentação**. São Paulo, v. 76, n. 1, 1985, p.32–37.

HAMED, R.R.; MAHAREM, T.M.; FATAH, A.M.M.; MOHAMED, M.A.; ATAYA, F. **Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots**. *Phytochemistry*, 48 (8), 1998, 1291–1294.

HENDRICKX, M.; LUDI KHUYZE, L.; VAN den BROECK, I; WEEMAES, C. **Effects of High pressure on enzymes related to food quality (review)**. Trends in Food Science & Technology, v. 9, n.5, p.197-203, 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola**. Setembro de 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201109.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2012.

IVIN, P.C.; DOYLE, C.D. **Some measurements of the effect of tops and trash on cane quality**. In: AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE, 11., Brisbane, 1989. Proceedings. Brisbane: Watson Ferguson, 1989, p.1-7.

JIMENEZ, P.O; SAMANIEGO, R. L. **Enzymic browning in cane juice**. Crystallizer, v. 4, 1981, p. 10-11.

KAO, F.J.; EKHORUTOMWEN, A.S.; SAWAN, S.P. **Residual stability of lipase from *Candida rugosa* in hexane, supercritical CO₂, and supercritical SF₆**. Biotechnology Techniques, 11, 1997, p. 849-852.

KELLY, F. H. C.; BROWN, D. W. **Thermal Decomposition and Colour Formation in Aqueous Sucrose Solutions**. Sugar Technology Reviews, Amsterdam, v. 6, n.1, 1978 , p. 1-48.

LAURILA, E.; KERVINEN, R. Y.; AHVENAINEN, R. **The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits**. Postharvest News and Information, v. 9, n. 4, 1998, p. 53-66.

LEE, L.; ARUL, A.; LENCKI, R.; CASTAIGNE, F. **A review on modified atmosphere packaging and preservation of fresh fruits and vegetables: physiological basis and practical aspects**. Packag. Tecnol. Sci., v. 8, 1995, p. 315-331.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed., São Paulo : Editora Sarvier, Cap. 8, 1995, p. 147-177.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnology Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3, 1ª ed., São Paulo, Edgard Blucher Ltda, 2001, 594 p.

MAGALHÃES, A.C.M. **Fabricação do açúcar**. Universidade Federal de Uberlândia, 2009. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/ufu>. Acesso em: 29 abr. 2012.

MAHANTA, P. K.; BORUAH, S. K. ; BORUAH, H. K.; KALITA, J.N. **Changes of polyphenol oxidase and peroxidase activities and pigment composition of some manufactured black tea (Camellia sinensis L.)**. American Chemical Society. v. 41, 1993, p. 272-276.

MANECHINE, C. **Impurezas e qualidade de cana-de-açúcar**. STAB – Canoeste, 2011. Disponível em: < <http://stab.org.br/impurezas/Celio%20Manechini.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2012.

MARQUES, M.O.; MARQUES, T.A.; TASSO JÚNIOR, L.C. **Tecnologia do Açúcar. Produção e Industrialização**. Jaboticabal: FUNEP - Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina veterinária e Zootecnia da Cana-de-açúcar, 2001, 170 p.

MARQUES, M. O.; MUTTON, M. A.; NOGUEIRA, T. A. R.; TASSO JÚNIOR, L.C.; NOGUEIRA, G.A.; BERNARDI, J.H. **Tecnologias na Agroindústria Canavieira**. Jaboticabal: FCAV, 2008, p. 9 – 12.

MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. **The biochemistry and control of enzymatic browning**. Trends Food Sci. Technol., v. 6, 1995 p. 195-200.

MARTIN-DIANA, A. B.; RICO, D.; BARRY-RYAN, C.; MULCAHY, J.; FRIAS, J.; HENEHAN, G. T. M. **Calcium lactate washing treatments for salad-cut iceberb lettuce: effect of temperature and concentracion on quality retention parameters**. Food Res. Int., v. 38, n. 7, 2005, p. 729-740.

MATHEIS, G.; WHITAKER, J.R. **Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products.** Journal of Food Biochemistry, v. 8, 1984, p. 137-162.

MCCORD, J.D.; KILARA, A. **Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*).** Journal Food Science, v. 48, 1983, p. 1479-1483.

MENDES, L.C. **Eficiência nutricional de cultivares de cana-de-açúcar.** 2006.. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2006, p.62.

MENDONÇA, S. C.; GUERRA, N. B. **Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais.** Boletim SBCTA, Campinas, v. 37, n. 2, 2003, p. 113-116.

MOLINA, G.; SUZART, C. A. G.; BERGARA, S.; QUEIROZ, T.; DAISUKE, M.; MORETTI, R. H. **Caracterização de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) para a produção de caldo de cana: pH e acidez titulável.** In: Congresso Brasileiro de ciências e tecnologia de alimentos, Belo Horizonte. XXI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2007.

MOTODA, S. **Formation of aldehydes from amino acids by polyphenol oxidase.** Journal of Fermentation Technology. v.57, n.5, 1979, p. 395-399.

NETO, J.A. **Algumas aplicações de enzimas.** In: LIMA, E.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo (SP): Edgard Blucher, 3v., 2001.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. **Enzymatic browning reaction in apple and apple products.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v. 34, 1994, p. 109-157.

OLIVEIRA, T.V. **Matérias-primas agropecuárias: cana-de-açúcar.** Universidade Federal de Viçosa–MG, 2009. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABRjgAA/cana-acucar>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

OLSON, D. G. **Irradiation of food.** Food Technol., v. 52, n. 1, jan. 1998, p. 56-62.

POOVAIAH, B. W. **Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables.** Food Technol., v. 40, 1986, p. 86-89.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. **Food science.** 5th ed. Aspen: Gaithersburg, 1998, p. 249-250.

PRIMO, M.S. **Efeito do processamento com CO₂ comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST. HILL).** Dissertação de Mestrado – Unidade acadêmica, Engenharia de Alimentos, ERECHIM, RS, 2006.

PRIGENT, S. **Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties**. Ph.D. thesis, Wageningen University, Netherlands, 2005.

QUDSIEH, H. Y. M.; YUSOF, S.; OSMAN, A; RAHMAN, R. A. **Effect of maturity on chlorophyll, tannin, color and polyphenol oxidase activity of sugarcane juice (*Saccharum officinarum* var. Yellow cane)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 50, n. 6, 2002, p. 1615-1618.

RAMÍREZ, E.C.; WHITAKER, J.R.; VIRADOR, V.M. **Polyphenoloxidase**. In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. Handbook of Food Enzymology. New York: Marcel Dekker Inc, 2003, p. 509-524.

RAMPAZO, E. M.; MARQUES, T.A.; SOUZA, F.C. **Polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) em caldo de cana-de-açúcar**. Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, SP, 2010. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2332&numeroEdicao=18>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

REED, G. **General characteristics of enzymes**. In: REED, G. Enzymes in Food Processing. 2. ed. New York: Academic Press, Cap. 3, 1975, p. 15-19.

RENSBURG, E. van; ENGELBRECHT, A. H. P. **Effect of calcium salts on susceptibility to browning of avocado fruit**. J. Food Sci., v. 51, n. 4, 1986, p. 1067-1068.

RICHARDSON, T.; HYSLOP, D. B. **Enzimas**. In: FENNEMA, O. R. Química de los alimentos. Zaragoza: Acríbia, 2000a, p. 501-503.

RICHARDSON, T; HYSLOP, D.B. **Enzimas**. In: FENNEMA, O.R. Química de los Alimentos. Zaragoza: Acríbia, Cap. 6, 1993b, p. 415-536.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. **Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits**. Food Chemistry, Oxford, v.66, 4, 1999, p.401-436.

SANTOS, T.B. **Estudo Cinético da Oxidação Enzimática do Ácido 5-o-cafeoilquínico por Polifenoloxidases**. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Setor de Engenharia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SAPERS, G. M.; MILLER, R. L. **Browning inhibition in fresh-cut pears**. J. Food Sci., v. 63, n. 2, 1998, p. 342-346.

SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; MONTGOMERY, M. W. **Response contour diagrams to describe effects of moisture, storage, temperature, and sulfur dioxide on color of dried apples**. J. Food Sci., v. 53, n. 2, 1988, p. 643- 644.

SCANDALIOS, J.G. **Oxygen stress and superoxide dismutase**. Plant Physiology, Rockville, v.101, 1993, p.7-12.█

SCOTT, D. **Oxidoreductases**. In: REED, G. *Enzymes in Food Processing*. 2. ed. New York: Academic Press, Cap. 9, 1975, p. 222- 254.

SEGATO, S.V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Cap 2, 2006, 415 p.

SMITH, P.; PATON, N. H. **Sugarcane flavonoids**. *Sugar Technology Reviews*, Amsterdam, v.12, 1985, p. 117-142.

SILVA, E.M. **Mecanismos bioquímicos de fisiopatias importantes de frutas**. In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE TECNOLOGIA POSTCOSECHA Y AGROEXPORTACIONES, Bogotá. Memorias...Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2000, p.5-19.

SILVA, J.B.; DINIZ, L.S. **O binômio engenho-pobreza no brejo paraibano: uma análise sócio-espacial da relação campo-cidade na produção das periferias rururbanas do município de areia/pb**. XIX Encontro Nacional de Geografia Agrária, São Paulo, 2009, p.1-15.

SILVA, M. V.; ROSA, C.I.L.F.; BOAS, E.V.B.V. **Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças**. B.CEPPA, Curitiba v. 27, n. 1, jan./jun. 2009, p. 83-96.

STUPIELLO, J.P. **A cana-de-açúcar como matéria-prima**. In: PARANHOS, S.B. (coord.). *Cana-de-açúcar – cultivo e utilização*. Campinas: Fundação Cargill, v.2, 1987, p.761-791.

STUPIELLO, J.P.; FERNADES, A.C. **Qualidade da Matéria Prima proveniente das colhedoras de cana picada e seus efeitos na fabricação de álcool e açúcar**. *Stab*, v. 2, n.2, 1984, p. 45-49.

SUBRAMANIAN, N.; VENKATESH, P.; GANGULI, S.; SINKAR, V. P. **Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of blach tea theaflavins**. *J. Agric. Food Chem.*, n. 47, 1999, p. 2571-2578.

SUZART, C. A. G.; BERGARA, S.; MOLINA, G.; MORETTI, R. H.; **Caracterização de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) para a produção de caldo de cana: Rendimento de caldo e valor de brix**. In: Congresso Brasileiro de ciências e tecnologia de alimentos, Belo Horizonte. XXI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2007.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 848p. |

TAMBOSCO, N.; TEIXEIRA, J.P.B.; GHERALDI FILHO, L.; USTULIN, E.J.; HENRIQUE, J.L. de P.; ALONSO, O.; CORREA, W.J.; FRANCESCHI, L.R.; GERALDI, R.N.; SALATA, J.C.; SERRA, G.E. **Trash in mechanical and manual harvesting of sugar cane**. In: INTERNATIONAL SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 16., São Paulo, 1977. *Proceedings*. São Paulo: ISSCT. v.2, 1979, p.1975-1979.

TAUBER, H. **The Chemistry and Technology of Enzymas**. New York: J. Wiley & Sons., Cap. 9., 1950, p. 203-210.

TORTORA, G.J. ; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. **Metabolismo microbiano**. In: _____. Microbiologia. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 5, 2005, p. 111-121.

VALSECHI, O.A. **Características tecnológicas e avaliação da qualidade industrial da cana-de-açúcar**. 1ª Semana do Etanol: compartilhando a experiência brasileira. Araras, SP. Set. 2008. Disponível em: <<http://www.etanol.ufscar.br/palestras-do-dia-02-de-setembro/caracteristicas-tecnologicas-e-avaliacao-da-qualidade>>. Acesso em: 29 mar. 2012.

VAROUQUAUX, P.; WILEY, R. C. **Cambios biológicos y bioquímicos en frutas y hortalizas refrigeradas minimamente processadas**. In: WILEY, R. C. (Org.). Frutas y hortalizas minimamente procesadas y refrigeradas. Zaragoza: Acríbia, 1997, p. 242.

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. **Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function**. *Physiol. Plant.*, v. 72, 1988, p. 659-665.

WALKER, J. R. L.; FERRAR, P. H. **Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance**. *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, v. 15, 1998, p. 468.

WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker Inc, 2003, p. 1108.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos: mecanismos e teoria**. Zaragoza: Acríbia, 1995, p. 233-372.

YOSHIYAMA, M.; ITO, Y. **Decrease of adstringency of cacao beans by an enzymatic treatment**. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. v.43, n.2, 1996, p. 124-129.

YUAN, 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 Inc, 2003, p. 403-411.

YUSOF, S.; SHIAN, L. S.; OSMAN, A. **Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage**. *Food Chemistry*, v.68, 2000, p. 395- 401.

ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. **Polyphenol oxidase**. In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. (Ed.) *Oxidative enzymes in foods*. London: Elsevier Science, 1991, p. 218-220.

ZEMEL G. P.; SIMS, C. A.; MARSHALL, M. R.; BALABAN, M. **Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice**. *J. Food Sci.*, v. 55, 1990, p. 562-563.