

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS - CPGEAL

**OXIDASES DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* ST. HILL):
EXTRAÇÃO, ESTABILIDADE TÉRMICA E INFLUÊNCIA DA
EXPOSIÇÃO AO MICROONDAS**

GIOVANA CRISTINA CENI

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

FEVEREIRO DE 2005

**OXIDASES DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* ST. HILL):
EXTRAÇÃO, ESTABILIDADE TÉRMICA E INFLUÊNCIA DA
EXPOSIÇÃO AO MICROONDAS**

Giovana Cristina Ceni

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Débora de Oliveira, D.Sc.
(Orientadora)

Cláudio Dariva, D.Sc.
(Orientador)

Octávio Augusto Ceva Antunes, Ph. D.
(Orientador)

Alice Teresa Valduga, D.Sc.

Jorge Alberto Vieira Costa, D. Sc.

Erechim, 23 de Fevereiro de 2005.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedicatória:

Aos meus pais, Ires e Wilmar, que além da vida e dos esforços para o meu bem estar, deram os ensinamentos que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus irmãos, pelo amor e amizade.

À Paola e Alícia, minhas princesinhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus orientadores Débora de Oliveira, Cláudio Dariva e Octávio Augusto Ceva Antunes, que acreditaram em mim e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela paciência, dedicação, carinho e amizade.

Às amigas Alini Frickis e Dayse Barbosa, da UFRJ, que me receberam com carinho e amizade e compartilharam conhecimentos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À amiga e bolsista Eliana Maria Baldissera pela dedicação, parceria e carinho. Sem sua participação este trabalho não seria possível.

À amiga Geciane Toniazzo, que me incentivou a realizar este trabalho e sempre esteve a meu lado. Poucas são as pessoas como você.

À amiga Maristela Primo, que participou da realização deste trabalho. Obrigada.

À estagiária Andréia Lohmann, pela contribuição neste trabalho.

Ao colega de mestrado Cassiano Busatta e à Vanessa Janesko, Renata Kiffer e Tatiana Rampazzo, funcionários do Centro de Ciências da Saúde da URI – Campus de Erechim, pela paciência, dedicação, apoio e amizade.

Aos professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, especialmente ao Marco Di Luccio, à Helen Treichel e à Eunice Valduga, pelo apoio e preocupação despendidos neste trabalho e na minha formação.

À amiga Cláudia Kuiawinski, simplesmente por tudo.

Às amigas Ieda e Andresa, que compartilharam alegrias e tristezas. Vou sentir saudades.

Aos amigos Léo, Adri, Cacá, Papa, Jonathan, Clari, Elton e Lisandra pelos bate papos entre um cafezinho e um chimarrão. São coisas assim que fazem a vida valer a pena.

Aos demais colegas e amigos dos Laboratórios de Biotecnologia e de Termodinâmica, especialmente à Elisa, à Irede e ao Rodrigo que, além da amizade, empenharam-se para que este trabalho fosse realizado.

A todos colegas de mestrado pelas horas de estudo e dificuldades que enfrentamos juntos.

Aos funcionários do Centro Tecnológico, por toda a atenção.

Aos meus pais, pelo amor, estímulo e dedicação, dispensados por toda minha vida.

À minha irmã e amiga Andréa, fundamental em muitas etapas da minha vida. Valeu por mais essa.

Aos amigos que me acompanham ao longo da vida e, mesmo sem entender muita coisa sobre experimentos e enzimas oxidativas, sempre me ouviram e apoiaram. Sou feliz em ter pessoas como vocês por perto.

Ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim.

À URI – Campus de Erechim, pela estrutura física e profissional disponibilizada aos alunos do Programa de Mestrado.

Ao programa PROCAD/Capes e à Capes pelo suporte financeiro e concessão de bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

... “ o chimarrão, que é ao mesmo tempo um rito social e um vício privado, tal como se pratica na fazenda... Os primeiros goles provocam uma sensação deliciosa feita do contato meio viscoso da prata escaldada, da água efervescente, rica de uma espuma substancial; amarga e cheirosa ao mesmo tempo, como uma floresta inteira concentrada em algumas gotas.”

Levi-Strauss – Tristes Trópicos (1957)

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**OXIDASES DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* ST. HILL):
EXTRAÇÃO, ESTABILIDADE TÉRMICA E INFLUÊNCIA DA
EXPOSIÇÃO AO MICROONDAS**

Giovana Cristina Ceni

Fevereiro/2005

Orientadores: Débora de Oliveira
Cláudio Dariva
Octávio Augusto Ceva Antunes

O objetivo deste trabalho foi determinar a melhor condição de extração e medida de atividade de polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) de erva-mate, avaliar a estabilidade térmica e a influência da exposição ao microondas na atividade das enzimas. A metodologia de extração e medida de atividade das oxidases foi determinada por uma série de planejamentos experimentais. A melhor condição de extração foi definida como: 40 g de erva-mate; 90 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 M); pH de extração 7,5; adição de 3% PVP K90 (p/p) e 30 minutos de centrifugação (11000 xg, 4°C) e medida de atividade em pH 9,0 para PFO e 4,0 para POD. O armazenamento dos extratos brutos enzimáticos a -4 e -80°C não difere significativamente. A POD tem a atividade regenerada quando armazenada em baixas temperaturas. O tratamento térmico em temperaturas de 20 à 80°C afeta significativamente as oxidases. A PFO é inativada com 30 segundos de exposição ao microondas. A POD tem parte da atividade regenerada com o tempo de armazenamento. Os parâmetros de cor L*, a* e b* apresentaram variação com o tempo de exposição ao microondas e a* com o tempo de armazenamento.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

**OXIDASES OF MATE TEA LEAVES (*Ilex paraguariensis* ST. HILL):
EXTRACTION, THERMAL STABILITY AND INFLUENCE OF THE
EXPOSITION TO MICROWAVES**

Giovana Cristina Ceni

February/2005

Advisors: Débora de Oliveira
Cláudio Dariva
Octávio Augusto Ceva Antunes

This work was focused on the investigation of a methodology for extraction and determination of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) presented in mate tea leaves, on the evaluation of the thermal stability and the influence of the exposition to microwaves in enzymes activities. The methodology for extraction and determination of oxidases was investigated by a series of statistical experimental designs. The best extraction condition was defined as: 40 g de mate tea leaves, in 90 mL of sodium phosphate buffer (0.05 M); extraction pH of 7.5; with addition of 3% of PVP (w/w); centrifugation 30 minutes (11000 xg, 4°C) and activity pH measurement of 9.0 for PPO and 4.0 for POD. The storage of the enzymatic crude extract at -4 and -80°C do not differ significantly. POD has regenerated its activity when stored in low temperatures. The thermal treatment in temperatures between 20 to 80°C affected significantly the enzymes activities. Complete inactivation of PPO was achieved with 30 seconds of exposition to microwaves. POD has part of the activity regenerated with the time of storage. The color parameters L*, a* and b* presented variation with the time of exposition to microwaves and a* with the time of storage.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Referências Bibliográficas	4
2 DETERMINAÇÃO DE OXIDASES DE ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill).....	6
2.1 Referencial Teórico.....	6
2.1.1 Erva-mate	6
2.1.2 Enzimas	10
2.1.3 Considerações Gerais	18
2.2 Material e Métodos	19
2.2.1 Material	19
2.2.2 Métodos	20
2.3 Resultados e Discussão	25
2.3.1 Planejamento experimental fracionário 2^{7-3} para extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate	25
2.3.2 Planejamento experimental fatorial completo 2^3 para extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate	29
2.3.3 Planejamento experimental fatorial completo 2^2 para extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate	32
2.3.4 Determinação da melhor condição de extração e medida de atividade de polifenoloxidase de erva-mate	34
2.3.5 Determinação da melhor condição de extração e medida de atividade de peroxidase de erva-mate	35
2.7 Conclusões Parciais	36
2.8 Referências Bibliográficas	38

3 ESTABILIDADE TÉRMICA DE OXIDASES DE ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill).....	46
3.1 Referencial teórico.....	46
3.1.1 Estabilidade enzimática.....	46
3.1.2 Considerações Gerais.....	49
3.2 Material e Métodos.....	50
3.2.1 Material.....	50
3.2.2 Métodos.....	51
3.3 Resultados e Discussão.....	53
3.3.1 Estabilidade enzimática a baixas temperaturas.....	54
3.3.2 Estabilidade enzimática a moderadas e altas temperaturas.....	57
3.4 Conclusões Parciais.....	60
3.5 Referências Bibliográficas.....	61
4 INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO MICROONDAS NA ATIVIDADE DE OXIDASES DE ERVA-MATE.....	65
4.1 Referencial Teórico.....	65
4.1.1 Erva-mate.....	65
4.1.2 Beneficiamento da erva-mate.....	66
4.1.3 Utilização das microondas.....	69
4.1.4 Considerações Gerais.....	73
4.2 Material e Métodos.....	74
4.2.1 Material.....	74
4.2.2 Métodos.....	76
4.3 Resultados e Discussão.....	82
4.3.1 Influência da exposição ao microondas sobre a atividade da polifenoloxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	82

4.3.2 Influência da exposição ao microondas sobre a atividade da peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada	85
4.3.3 Influência da exposição ao microondas sobre a umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	92
4.3.4 Influência da secagem em microondas sobre a coloração de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	97
4.4 Conclusões Parciais	104
4.4 Referências Bibliográficas	105
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	110
5.1 Conclusões Finais	110
5.1 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	112
APÊNDICES - Detalhamento dos resultados experimentais.....	114
APÊNDICE A - Determinação de oxidases de erva-mate.....	116
APÊNDICE B - Estabilidade de oxidases de erva-mate.....	132
APÊNDICE C - Influência do microondas sobre as oxidases de erva-mate.....	157

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Produção de erva-mate plantada no Brasil em toneladas.....	8
Figura 2.2 – Curvas de progresso de reação para três diferentes concentrações enzimáticas iniciais.....	12
Figura 2.3 – Reação de oxidação de compostos fenólicos por polifenoloxidase.....	14
Figura 2.4 - Grupo prostético da enzima peroxidase denominado grupo <i>heme</i> ou grupo ferro-porfirina.....	15
Figura 3.1 – Efeito do armazenamento em temperaturas de 4, -4 e -80°C nos extratos brutos de polifenoloxidase de erva-mate.....	54
Figura 3.2 – Efeito do armazenamento em temperaturas de 4, -4 e -80°C nos extratos brutos de peroxidase de erva-mate.....	55
Figura 3.3 – Efeito do tratamento térmico na atividade de polifenoloxidase de erva-mate a 20, 40, 60 e 80°C.....	57
Figura 3.4 – Efeito do tratamento térmico na atividade de peroxidase de erva-mate a 20, 40, 60 e 80°C.....	58
Figura 4.1 – Esboço do experimento de campo.....	75
Figura 4.2 – Diagrama de cores para análise de colorimetria.....	78
Figura 4.3 – Influência da exposição ao microondas na atividade enzimática de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.....	80
Figura 4.4 – Parte de a* e b* do diagrama de cores que corresponde à coloração apresentada pelas folhas de erva-mate.....	80
Figura 4.5 – Aspecto das folhas de erva-mate em função de diferentes tempos de exposição ao microondas.....	81
Figura 4.6 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate <i>in natura</i> a pleno sol e sombreada.....	83
Figura 4.7 – Efeito da exposição ao microondas por 15 segundos na atividade de polifenoloxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	83

Figura 4.9 – Efeito da exposição ao microondas sobre a atividade da polifenoloxidase de erva-mate sombreada.....	85
Figura 4.10 – Atividade de peroxidase de erva-mate <i>in natura</i> a pleno sol e sombreada.....	86
Figura 4.11 – Efeito da exposição ao microondas por 15 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	87
Figura 4.12 – Efeito da exposição ao microondas por 30 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	88
Figura 4.13 – Efeito da exposição ao microondas por 60 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	88
Figura 4.14 – Efeito exposição ao microondas por 120 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	89
Figura 4.15 – Efeito da exposição ao microondas por 220 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	90
Figura 4.16 – Efeito da exposição ao microondas em relação ao tempo de armazenamento na atividade de peroxidase em erva-mate a pleno sol.....	91
Figura 4.17 – Efeito da exposição ao microondas em relação ao tempo de armazenamento na atividade de peroxidase em erva-mate sombreada.....	91
Figura 4.18 – Umidade da erva-mate <i>in natura</i> a pleno sol e sombreada.....	93
Figura 4.19 – Efeito da exposição ao microondas por 15 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	94
Figura 4.20 – Efeito da exposição ao microondas por 30 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	94
Figura 4.21 – Efeito da exposição ao microondas por 60 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	95
Figura 4.22 – Efeito da exposição ao microondas por 120 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	96
Figura 4.23 – Efeito da exposição ao microondas por 220 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.....	96
Figura 4.24 – Variação da luminosidade (L^*) na cor da erva-mate a pleno sol (a) e sombreada (b) exposta ao microondas.....	98

Figura 4.25 – Variação do parâmetro a^* na cor da erva-mate a pleno sol (a) e sombreada (b) exposta ao microondas.....	99
Figura 4.26 – Variação do parâmetro b^* na cor da erva-mate a pleno sol (a) e sombreada (b) exposta ao microondas.....	100
Figura 4.27 – Amostras de erva-mate a pleno sol (a) e sombreadas (b) expostas ao microondas no 29º de armazenamento.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Reagentes químicos empregados na extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate.....	19
Tabela 2.2 – Intervalo de estudo das variáveis do planejamento 2^{7-3}	23
Tabela 2.3 – Planejamento experimental fatorial 2^{7-3} para extração e atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.....	26
Tabela 2.4 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento 2^{7-3} para a atividade de polifenoloxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico.....	27
Tabela 2.5 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento 2^{7-3} para a atividade de peroxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico.....	28
Tabela 2.6 – Planejamento experimental 2^3 para extração e atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.....	30
Tabela 2.7 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2^3 para a atividade de polifenoloxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico.....	31
Tabela 2.8 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2^3 para a atividade de peroxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico.....	32
Tabela 2.9 – Planejamento experimental 2^2 para extração e atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.....	33
Tabela 2.10 - Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para a atividade de polifenoloxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico.....	33
Tabela 2.11 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para a atividade de peroxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico.....	34
Tabela 2.12 – Atividade de polifenoloxidase em pH de atividade 8,0.....	34

Tabela 3.1 – Análise estatística (análise de variância e teste de Tukey) na atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate armazenadas a baixas temperaturas.....	56
Tabela 3.2 – Análise estatística (análise de variância e teste de Tukey) da atividade residual de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate expostas a moderadas e elevadas temperaturas.....	60
Tabela 4.1 – Influência da secagem de erva-mate em microondas nos parâmetros e variação da coloração.....	81
Tabela 4.2 – Influência da exposição ao microondas de erva-mate a pleno sol nos parâmetros e na variação de cor.....	101
Tabela 4.3 – Influência da exposição ao microondas de erva-mate sombreada nos parâmetros e na variação de cor.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a* = parâmetro de cor eixo verde-vermelho;

b* = parâmetro de cor eixo azul-amarelo;

CAP = Citosol ascarbato peroxidase;

CCP = Citocromo C peroxidase;

CPO = cloroperoxidase;

EC = *Enzyme Comission*;

est = estimado;

ex = experimento;

exp = experimental;

ha = hectare;

HRP = *Horseradish peroxidase*;

IAL = Instituto Adolfo Lutz;

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

L* = parâmetro de cor luminosidade;

LiP = Lignina peroxidase;

m = massa de erva-mate;

mM = milimolar;

MnP = Manganês peroxidase;

p/p = peso por peso;

p/v = peso por volume;

PA = Pró análise;

PFO = polifenoloxidase;

pH_a = pH de medida de atividade;

pH_e = pH de extração enzimática;

POD = peroxidase;

ptn = proteína;

PVP = polivinilpirrolidona;

rpm = rotação por minuto;

ta = concentração molar do tampão fosfato de sódio;

tc = tempo de centrifugação;

TX-100 = Triton X-100;

U = unidade;

UV = ultra violeta;

V.I. = velocidade inicial;

V.F. = volume final;

xg = vezes a gravidade;

ϵ = coeficiente de absorção molar;

ΔE = variação de cor;

μ = micro;

σ_P = desvio padrão.

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) é um importante produto natural no contexto sócio-econômico-cultural da região Sul do país e é reconhecida por ter propriedades anti-inflamatórias, terapêuticas, estimulantes e diuréticas, entre outras. Tendo sua origem na América do Sul, a erva-mate ocorre naturalmente na Argentina, Brasil e Paraguai (Maccari e Santos, 2000).

No Brasil o setor ervateiro compreende cerca de 450 municípios dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, englobando cerca de 750 indústrias, gerando um total de aproximadamente 700.000 empregos diretos e indiretos, para uma produção anual aproximada de 650.000 toneladas. No Alto-Uruguaí gaúcho estão instaladas cerca de 40 empresas processadoras e 9.400 pequenas propriedades têm sua fonte de renda relacionada com o cultivo da erva-mate (Maccari e Santos, 2000; Mosele, 2002; Valduga, 2002).

No entanto, ainda hoje, o maior consumo de erva-mate ocorre na forma de produtos tradicionais, como o chimarrão, que apresenta mercado limitado às regiões onde é produzida. Como se trata de uma planta de composição química elaborada, a erva-mate tem motivado pesquisadores a investirem na melhoria da qualidade do produto. Paralelamente, alguns estudos têm sido conduzidos com o intuito de identificar rotas alternativas para a aplicação da erva-mate, visando agregar valor a esta importante matéria-prima regional (Valduga, 1994; Maccari e Santos, 2000).

Nos últimos anos, as indústrias ervateiras têm buscado ampliar o mercado da erva-mate através do lançamento de novos produtos, como o composto de erva-mate e o chá mate aromatizado. Recentemente iniciou-se a demanda da matéria-prima para indústrias químicas e farmacêuticas, com interesse na produção de produtos de higiene e beleza que utilizam a essência da erva-mate para a produção de sabonete líquido, xampus e cremes para pele (Mosele, 2002). Valduga (2002) utilizou erva-mate no desenvolvimento de novos produtos como o “*Mateccino*”, que consiste em um achocolatado de mate, e de balas duras.

Na erva-mate podem ser encontradas enzimas oxidativas, que foram identificadas por Senglet, em 1928, como sendo a polifenoloxidase e a peroxidase. Estas enzimas estão associadas ao escurecimento das folhas e devem ser inativadas no beneficiamento da erva-mate (Panek, 1955). Por outro lado, as oxidases promovem a oxidação de compostos fenólicos, podendo ser empregadas em processos biotecnológicos. O Brasil possui uma grande variedade de vegetais que podem se constituir em fonte inesgotável de enzimas. Ademais, há uma tendência mundial em utilizar extratos brutos e/ou tecidos vegetais no lugar de enzimas purificadas (Vieira, Lupetti e Fatibello-Filho, 2003).

Entretanto, a utilização das enzimas em processos tecnológicos requer o conhecimento da estabilidade térmica (Uhlig, 1998). A maioria das enzimas possuem atividade bastante específica e, mesmo as mais versáteis, operam dentro de um limite estreito de temperatura e pH (Cox, 1987).

Apesar da evidência da presença de peroxidases e polifenoloxidases em folhas de erva-mate e da importância deste fator para a qualidade do produto erva-mate para chimarrão, a literatura é ainda bastante escassa no que tange ao estabelecimento de uma metodologia para a extração e determinação da atividade destas enzimas na erva-mate e de sua termoestabilidade.

No beneficiamento da erva-mate a inativação das enzimas ocorre no processo de sapeco, que consiste em um contato rápido dos ramos e folhas da erva-mate em chama direta (Valduga, Finzer e Mosele, 2003). Apesar da evolução dos processos de beneficiamento e industrialização da erva-mate através dos tempos, saindo das instalações e sistemas operacionais artesanais para sistemas mecanizados, a indústria ervateira ainda não substituiu o uso do fogo para os processos de sapeco e secagem (Berkai e Braga, 2000).

Muitos estudos têm sido realizados sobre a utilização das microondas visando um amplo campo de aplicações na indústria alimentícia. As microondas geram o calor no interior do produto, apresentando como vantagem a melhor transmissão de calor e vapor (Follows, 1994; Escrivá, Garcia e Marsaioli, 1998). Pastorini, Bacarin e Abreu (2002) compararam a secagem em microondas e em estufa de folhas e raízes de feijão e milho e verificaram que em forno microondas o material vegetal foi seco

entre 3 e 4 min, enquanto que em estufa, após 48 h, os autores não observaram alteração significativa da massa seca do material vegetal. Segundo estudos realizados por Gulati *et al.* (2003) a enzima polifenoloxidase de amostras de chá verde foi inativada após 4 minutos de exposição ao microondas dentro de um recipiente fechado e após 3 minutos quando exposta diretamente às microondas. Os autores constataram que não ocorre variação nos valores de fenóis e catequinas das amostras tratadas em microondas quando comparadas ao tratamento térmico convencional (forno e vapor). Desta forma, a utilização de microondas no beneficiamento da erva-mate pode contribuir para o avanço da indústria ervateira, substituindo o processo de sapeco.

1.1 Objetivos

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo geral o estudo das oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e como objetivos específicos a determinação da melhor condição de extração e medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate, avaliação a estabilidade térmica dos extratos enzimáticos e investigação a influência da exposição ao microondas na atividade das enzimas.

O presente trabalho foi dividido em capítulos, de acordo com os assuntos abordados. Cada um dos capítulos contempla um objetivo específico, encerrando o referencial teórico, metodologia, resultados e discussão e conclusões parciais pertinentes.

O Capítulo 2 apresenta o estudo, através de planejamentos experimentais, da obtenção da melhor condição para extração e medida de atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate. O Capítulo 3 tem como meta a investigação da estabilidade térmica das oxidases de erva-mate. No Capítulo 4 é apresentado um estudo a respeito do efeito da exposição ao microondas sobre a atividade enzimática e cor da erva-mate. As conclusões finais e as sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo 5.

1.2 Referências Bibliográficas

BERKAI, D.; BRAGA, C. A., **500 anos de história da erva-mate**. 2^a ed. Editora Cone Sul, 2000. 97p.

COX, P. M., **Ultracongelacion de alimentos: Guía de la teoría y práctica**. Zaragoza: Acribia, 1987. 459 p.

ESCRIVÁ, M. V. G.; GARCIA, H. P.; MARSAIOLI, A., **Comparação das propriedades reológicas de cacau torrado convencionalmente e por microondas**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.18, n. 2, Campinas, 1998.

FOLLOWS, P., **Tecnología del procesado de los alimentos: Principios e prácticas**. Zaragoza : Editorial Acribia, 1994.

GULATI, A.; RAWAT, R.; SINGH, B.; RAVINDRANATH, S. D., **Application of microwave in the manufacture of enhanced-quality green tea**. Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 51, p. 4764 – 4768, 2003.

MACCARI, A. J.; SANTOS, A. P. R., **Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate**. MCT/CNPq/PADCT, Curitiba, PR, 2000.

MOSELE, S. H., **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense**. Porto Alegre, 2002. 211p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Agronegócios) – Centro de Estudos e Pesquisa em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2002.

PANEK, A. D., **Dosagem da peroxidase nas folhas de mate**. Boletim do Instituto de Química Agrícola, n.39, p.7-12, 1955.

PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; ABREU, C. M., **Secagem de material vegetal em forno de microondas para determinação de matéria seca e análises químicas**. Ciências Agotécnica, v. 26, n. 6, p .1252 – 1258, 2002.

UHLIG, H., **Industrial enzymes and their applications**. John Wiley & Sons:New York, 454 p., 1998.

VALDUGA, E., **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate**. Curitiba, 1994. 119p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 1994.

VALDUGA, A. T., **Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hil (Erva-mate)**. São Carlos, 2002. 216p. Tese de Doutorado (Doutora em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2002.

VALDUGA, A. T.; FINZER, J. R. D.; MOSELE, S. H., **Processamento de erva-mate**. Erechim : Edifapes, 2003. 182p.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O., **Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*)**. Química Nova, v. 26, n. 1, p. 39 – 43, 2003.

2 DETERMINAÇÃO DE OXIDASES DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill)

O presente capítulo tem como objetivo apresentar o estudo realizado para o estabelecimento de uma metodologia de extração e medida da atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate. A utilização da técnica de planejamento de experimentos possibilitou a obtenção da melhor condição para cada enzima. Como forma de embasar cientificamente os resultados obtidos será apresentado um referencial teórico concernente ao assunto, seguido pela descrição detalhada do procedimento experimental adotado. A apresentação e discussão dos resultados obtidos encerram este capítulo.

2.1 Referencial Teórico

2.1.1 Erva-mate

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) era consumida como bebida tônica e estimulante muito antes da chegada dos europeus ao continente sul americano. Em túmulos pré-colombianos de Ancon, perto de Lima (Peru), foram encontradas folhas de erva-mate ao lado de alimentos e bebidas, demonstrando seu uso pelos incas (Mazuchowski, 1991).

A erva-mate, conhecida pelos índios desde os primórdios de sua civilização, foi inicialmente utilizada por pajés e caciques, por atribuírem a ela poderes sobrenaturais. Com o passar dos anos, para estimular seus guerreiros, algumas tribos passaram a fazer uso da erva-mate (Berkai e Braga, 2000).

Desde a ocupação castelhana no Paraguai, por volta de 1592, observou-se a utilização da erva-mate pelos indígenas. Posteriormente, constatou-se que os indígenas brasileiros que habitavam as margens do rio Paraná utilizavam-se igualmente desta Aquifoliácea (Mazuchowski, 1991). Os índios colhiam a erva no

mato (“caa”, em guarani, que significa tanto mato como erva), sapecavam ligeiramente as folhas com o resto dos galhos e amarravam um feixe com essas ramas por cima do fogo para que fossem secas. Quando as folhas estavam estalando e se rachando, eram socadas em um pilão. Em menos de uma semana a erva-mate estava pronta para o preparo do chá (Berkai e Braga, 2000).

Outras tribos não localizadas em regiões de ocorrência natural da essência possuíam o hábito de consumi-la, obtendo-a através de permuta. Estas tribos, localizadas no Peru, Chile e Bolívia, transportavam o produto por milhares de quilômetros. Orientados pelos jesuítas, instalados na Companhia de Jesus do Paraguai (denominação dada, no século XVII, aos territórios das províncias do Paraguai, Buenos Aires e Tucuman), os indígenas iniciaram a plantação de erva-mate. Concomitante à implantação de ervais, os jesuítas aprofundaram-se no estudo do sistema vegetativo da planta, visto que as sementes não germinavam naturalmente. Os jesuítas definiram preceitos sobre época de colheita de sementes, preparo e cultivo da erva-mate (Mazuchowski, 1991).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) pertence à família *Aquifoliaceae*, sendo classificada pelo naturalista francês August de Saint Hillaire e publicada em 1822 nas memórias do Museu de História Natural de Paris (Mazuchowski, 1991).

A ocorrência natural da erva-mate tem sua área restrita a três países: Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil, sua área está dispersa nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e em pequenas partes do Mato Grosso do Sul, totalizando cerca de 95.800 ha (Figura 2.1). A espécie pode ocorrer em pontos isolados, fora destes limites, como em regiões subtropicais e temperadas da América do Sul (Andrade, 1999; Mosele, 2002, IBGE, 2002).

O Rio Grande do Sul possui uma área de 44.910 ha de erva-mate plantada, sendo que, em 2002, somente a mesoregião noroeste, onde está inserido o município de Erechim, possuía 20% do total nacional (IBGE, 2002). Por outro lado, o Rio Grande do Sul é importador de matéria-prima, especialmente erva-mate nativa dos estados de Santa Catarina e Paraná (Mosele, 2002).

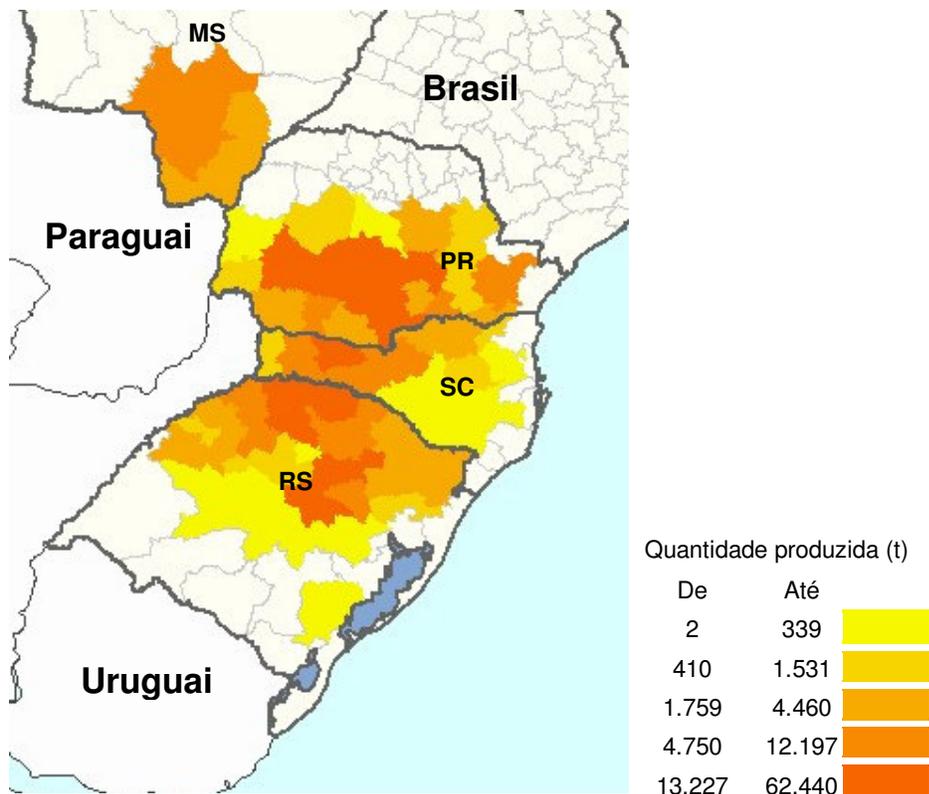


Figura 2.1 – Distribuição de erva-mate plantada no Brasil (IBGE – Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA 2002).

A forma mais difundida de consumo da erva-mate é o chimarrão (infusão de erva-mate) em cuias de madeira ou porongo (Nietsche *et al.*, 2000). O mate é uma bebida estimulante: elimina a fadiga, estimula a atividade física e mental, atuando benéficamente sobre os nervos e músculos e favorecendo o trabalho intelectual. Por possuir vitaminas do complexo B, o mate participa do aproveitamento do açúcar nos músculos, nervos e atividade cerebral. Com a presença das vitaminas C e E, age como defesa orgânica e apresenta benefícios sobre os tecidos do organismo. A presença de sais minerais, juntamente com a cafeína, estimula o trabalho cardíaco, ajudando na circulação do sangue e diminuindo a tensão arterial, pois a cafeína atua como vaso dilatador. Em tais situações também pode ser suprida a sensação de fome (Bassini e Campos, 1997).

O mate favorece a diurese e atua também sobre o tubo digestivo: ativa os movimentos peristálticos, facilita a digestão, suaviza os embaraços gástricos, favorecendo a evacuação e a micção. A ação estimulante do mate é mais prolongada que a do café, não deixando, porém, os efeitos colaterais ou residuais como irritabilidade e insônia. Pesquisas do Instituto Pasteur de Paris atribuem também ao mate um papel importantíssimo no processo de regeneração celular (Andrade, 1999; Valduga, 1994).

As investigações químicas relativas à erva-mate iniciaram-se com Trommsdorff em 1836, que constatou a presença de diversas substâncias resinosas, matéria corante amarela, ácido tânico, etc. A identificação do principal alcalóide, a cafeína, ocorreu em 1843 por Stenhouse. Em 1848 Rochleder, estudando o mate do Paraguai, identificou o ácido do mate – o ácido café-tânico, já conhecido das sementes do café (Andrade, 1999).

Em 1944 Veronese identificou como constituintes da erva mate os seguintes compostos: água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, substâncias graxas, resina aromática (formada por uma mistura de oleína, palmitina, lauro-estearina e um óleo cujas características muito se aproximam da cumarina), legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido caféico, ácido virídico, clorofila, colesterina e óleo essencial. Nas cinzas encontram-se grandes quantidades de potássio, lítio, ácidos fosfórico, sulfúrico, carbônico, clorídrico e cítrico, além de magnésio, manganês, ferro, alumínio e traços de arsênico. A cafeína, teofilina e teobromina são três alcalóides, estreitamente relacionados, encontrados na erva mate, sendo compostos interessantes sob o ponto de vista terapêutico. O teor de cafeína na erva *in natura* atinge em média 1,6%, enquanto que nas infusões o valor médio é de 1,1% (Andrade, 1999; Valduga, 1994).

O processo básico para o beneficiamento da erva-mate para chimarrão constitui-se das etapas de colheita, recepção, sapeco, secagem, trituração, classificação, armazenagem, moagem, mistura, embalagem e expedição (Valduga, Finzer e Mosele, 2003). A indústria da erva-mate evoluiu consideravelmente nos últimos anos, sendo que nos dias atuais utiliza modernos soques ervateiros e

máquinas movidas a energia elétrica. No entanto, ainda não substituiu o uso do fogo para os processos de sapeco e secagem (Berkai e Braga, 2000).

O sapeco é utilizado para evitar que as folhas da erva-mate escureçam. O escurecimento ocorre pela presença das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) que, em 1928, foram identificadas por Senglet como as responsáveis pela oxidação dos compostos fenólicos quando as folhas frescas são tiradas do pé e deixadas ao ar (Panek, 1955). O sapeco, que tem por finalidade a inativação destas enzimas, é realizado junto ao fogo direto e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador (Esmelindro *et al.*, 2002).

Prat Kricum *et al.* (2000) investigaram a atividade de peroxidase em *Ilex dumosa*, variedade utilizada na adulteração da erva-mate, utilizando planejamento experimental com as variáveis pH (3,8 a 7,2), concentração de peróxido (0,028 a 1,12% p/v) e de guaiacol (0,13 a 6,86% v/v). Observaram que as variáveis pH do meio e concentração de guaiacol apresentaram efeito significativo positivo, enquanto que a variável concentração de peróxido apresenta efeito significativo negativo sobre a atividade enzimática. Segundo os autores os resultados apresentados para a atividade da peroxidase de *Ilex dumosa* diferem dos encontrados por Argüello, em 1999, para a peroxidase de erva-mate, que determinou valores de pH de 5,15, concentração de peróxido de 0,2% (p/v), concentração de guaiacol de 1,25% (v/v) e temperatura de reação de 30°C.

2.1.2 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos, na sua maioria de natureza protéica. Possuem um centro ativo responsável pela atividade biológica, que é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína (apoenzima) e um grupo não-proteico (cofator). Os cofatores podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas de coenzimas (Lehninger, Nelson e Cox, 1995).

A conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. A atividade catalítica, a estabilidade e a especificidade da enzima dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (Lima *et al.*, 2001).

As enzimas são catalisadores biológicos sujeitos às mesmas leis termodinâmicas e cinéticas dos catalisadores químicos, isto é, alteram a velocidade da reação, porém não a posição final de equilíbrio entre o substrato e o produto. Na primeira etapa da reação a concentração enzimática diminui drasticamente, pois a maior parte das enzimas se liga ao substrato em um equilíbrio dinâmico. A velocidade da reação depende da energia com que a enzima se une ao substrato. Na segunda etapa é alcançada a atividade máxima. A elevada concentração de substrato permite que a enzima volte a formar os complexos enzima – substrato. Na terceira etapa, a concentração de substrato diminui, fazendo a velocidade da reação catalisada pela enzima decrescer (Wiseman, 1991).

A nomenclatura científica das enzimas foi estabelecida em 1956, pela União Internacional de Bioquímica (IUB), que, através de uma comissão de especialistas – *Enzyme Commission* (EC), procurou sistematizar classes e nomes desses biocatalisadores (Lima *et al.*, 2001). Cada enzima recebe um número de quatro dígitos e um nome sistemático que identifica a reação catalisada. O primeiro dígito indica o nome da classe da enzima (de 1 a 6), o segundo dígito indica a subclasse (tipo de ação ou grupo sobre o qual atua), o terceiro dígito indica a sub-subclasse e o quarto dígito se refere ao número de ordem da enzima dentro da subclasse considerada (Lehninger, Nelson e Cox, 1995).

A expressão da atividade de uma enzima é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A Figura 2.2 ilustra o progresso de reações conduzidas com distintos teores iniciais de enzima. A concentração de produto formado aumenta linearmente com o tempo num dado intervalo (velocidade de reação constante). No entanto, a partir de certo tempo, a velocidade (valor da tangente à curva num dado instante) decresce. Vários fatores

podem contribuir para esse decréscimo: diminuição da concentração de substrato, inativação parcial da enzima no decorrer da reação, inibição por produto e deslocamento do equilíbrio se a reação for reversível. Para evitar a influência dos fatores mencionados, costuma-se associar a atividade à medida da velocidade de reação em condição inicial, ou seja, aquela que assegura velocidade constante (fase linear das curvas) (Lima *et al.*, 2001).

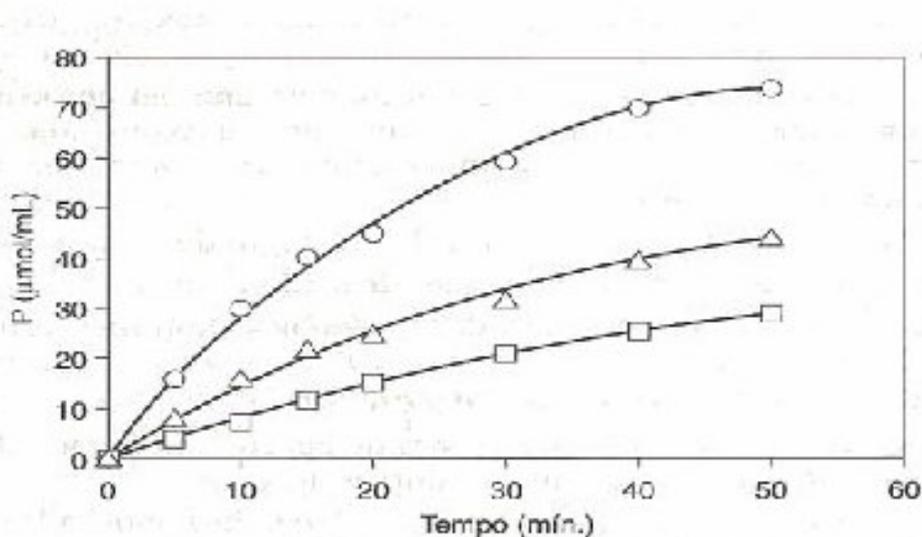


Figura 2.2 – Curvas de progresso de reação para três diferentes concentrações enzimáticas iniciais: 1,7 $\mu\text{mol/mL}$ (O); 0,85 $\mu\text{mol/mL}$ (Δ); 0,43 $\mu\text{mol/mL}$ (\square) (Lima *et al.*, 2001).

A atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB (Unidade Internacional – IU) considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto em condições de ensaio definidas. Em muitas situações, emprega-se a atividade específica, que é expressa em unidades (U) por massa de proteína (Lima *et al.*, 2001).

O teor de proteína total da solução enzimática pode ser determinado pelo método do Biureto ou de Lowry, empregando-se albumina do soro bovino como padrão (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). No entanto, o método de Lowry está sujeito a

interferências por compostos como os íons potássio e magnésio, EDTA, Tris, reagentes tiol e carboidratos. A reação de Biureto está sujeita à interferência por Tris, amônia e glicerol. O método de Bradford elimina a maioria dos problemas descritos acima, sendo facilmente empregado a um grande número de amostras. O método é baseado na observação de que o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* existe em duas formas diferentes de cores, vermelho e azul. A cor vermelha é convertida para a azul após ligação do corante com a proteína. O complexo proteína-corante possui alto coeficiente de extinção, conduzindo para uma grande sensibilidade da medida de proteína (Bradford, 1976).

Polifenoloxidase (PFO)

Em 1895, Bourquelot e Bertrand observaram o aparecimento de um composto escuro no cogumelo na presença de tirosina. Em 1896 foi atribuído o nome de tirosinase à enzima presente no cogumelo. Atualmente, a enzima é denominada polifenoloxidase (EC 1.14.18.1), designação mais precisa do substrato sensível à sua ação, sendo também conhecida como tirosinase, cresolase, catecolase, difenolase e fenolase (Chlamtac, 1955; Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

A polifenoloxidase é uma enzima que contém Cu^{2+} , sintetizada somente em tecidos em desenvolvimento e estocada no cloroplasto (van Gelder *et al.*, 1997). A massa molar das polifenoloxidases varia de 57 a 62 kDa, com exceção da PFO do cogumelo que apresenta 128 kDa, possuindo duas cadeias maiores com 43-45 kDa cada, onde estão os sítios ativos, e duas menores com 13 kDa cada (Araújo, 1995).

A enzima catalisa duas diferentes reações: atividade cresolase (a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois) e atividade catecolase (a oxidação de *o*-difenois para *o*-quinonas), ambas envolvendo oxigênio molecular, conforme demonstrado na Figura 2.3 (Pérez-Gilabert e Carmona, 2000). O escurecimento enzimático de vegetais e frutas, quando cortados e expostos ao ar, ocorre devido à polimerização das *o*-quinonas, originando as melanoidinas (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

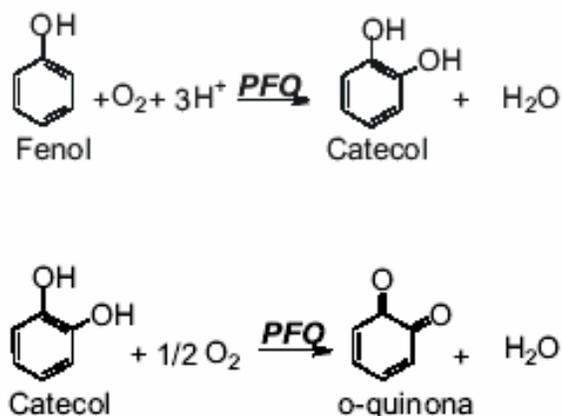


Figura 2.3 – Reação de oxidação de compostos fenólicos por polifenoloxidase (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com a utilização de polifenoloxidases em biossensores para quantificação de compostos fenólicos (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Lupetti, Ramos e Fatibello-Filho (2003) desenvolveram um sistema para determinação de dopamina em amostras farmacêuticas, utilizando extrato bruto de polifenoloxidase de abacate. Os resultados obtidos apresentaram boa repetibilidade e foram semelhantes, com 95% de confiança, aos resultados obtidos com o método padrão determinado pela Farmacopéia Brasileira.

Peroxidase (POD)

Peroxidasas (EC 1.11.1.7) são enzimas que utilizam peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de um variado grupo de compostos orgânicos e inorgânicos, como monofenóis, difenóis e polifenóis e aminofenóis, entre outros (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Estas enzimas têm sido isoladas de diversos organismos e a grande maioria apresenta a Protoporfina IX (grupos heme) (Figura 2.4) como grupo prostético (Conesa, Punt e van den Hondel, 2002). Este tipo de enzima não necessita de cofatores, tais como o NADH ou NADPH, para catalisar as reações (Santos, 2003). São conhecidas como enzimas termoestáveis, uma vez que

podem ter sua atividade regenerada após tratamento térmico (Banci, 1997; Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

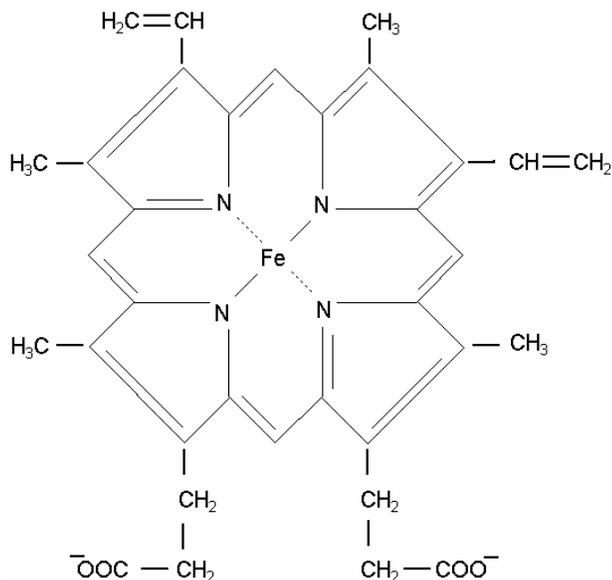


Figura 2.4 - Grupo prostético da enzima peroxidase denominado grupo *heme* ou grupo ferro-porfirina (Wilberg, 2003).

As peroxidases podem ser classificadas de acordo com a superfamília a que pertencem: a superfamília das peroxidases de mamíferos, que incluem enzimas como as lactoperoxidases e as mieloperoxidases; e a superfamília das peroxidases de vegetais. Segundo Welinder e Gajhede (1993), citados por Conesa, Punt e van den Hondel (2002), as peroxidases de origem vegetal apresentam uma relação evolutiva, e foram divididas em três classes:

Classe I: peroxidases intracelulares que incluem a citocromo C peroxidase de levedura (CCP), cloroperoxidase (CPO) e citosol ascorbato peroxidase (CAP);

Classe II: peroxidases fúngicas extracelulares, tais como lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium* e outras peroxidases que degradam ligninas obtidas a partir de basidiomicetos;

Classe III: peroxidases vegetais extracelulares, tais como a peroxidase de raiz forte (HRP – horseradish peroxidase).

As peroxidases das classes II e III contêm sinal peptídico, pontes dissulfeto e cálcio estrutural.

A peroxidase possui habilidade de causar mudanças indesejáveis, como desenvolvimento de sabor desagradável, alteração da cor e textura e/ou redução do valor nutricional. Em contrapartida, o desejável escurecimento obtido pela formação de compostos escuros em produtos como chá preto, apresenta também aplicações de interesse na indústria alimentícia (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000).

Comercialmente, as peroxidases vêm sendo amplamente utilizadas como um importante componente em processos biotecnológicos (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Vieira, Lupitti e Fatibello-Filho (2003) desenvolveram um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinhas para determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos. O biossensor apresentou bom desempenho analítico e tempo de vida superior aos biossensores de pasta de carbono que empregam peroxidase purificada. Wilberg (2003) investigou a oxidação de compostos fenólicos em efluente de refinaria de petróleo com extrato de casca de grão de soja e constatou a eficiência de oxidação de pelo menos 95% dos compostos. As peroxidases são utilizadas, também, como enzimas indicadoras em imunoenaios enzimáticos no processamento de alimentos (Liu *et al.*, 1999).

Obtenção de extratos e atividade enzimática

A literatura é abundante no que tange à obtenção de extratos enzimáticos brutos. Fatibello-Filho e Vieira (2002) sugerem um método simples, rápido, eficiente e que, segundo os autores, mantém a atividade enzimática no extrato por longos períodos para a enzima peroxidase. No método, 25 g de tecido vegetal são picados e homogeneizados em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), contendo 2,5 g de agente protetor (polivinilpirrolidonas). O homogenato é filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado à 25.000 xg durante 15 minutos, à 4°C. A solução sobrenadante é armazenada à 4°C e utilizada como fonte enzimática. Apesar de variações, que envolvem quantidade de amostras, tampão,

pH, adição de agentes surfactantes e centrifugação, o princípio do método é utilizado por vários autores para a extração de peroxidase e polifenoloxidase de fontes vegetais (Ohya *et al.*, 1997; Broothaerts *et al.*, 2000; Duarte-Vázquez *et al.*, 2000; Pérez-Gilabert e Carmona, 2000; Sojo *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2001; Martínez-Parra e Muñoz, 2001; Kennedy, Alemany e Warith, 2002).

Por exercer grande influência sobre as reações enzimáticas, a investigação do pH ótimo, onde a atividade e a velocidade das reações são máximas, é uma constante na literatura (Gomes, Lupetti e Fatibello-Filho, 2003). Gomes *et al.* (2001) constataram que o pH ótimo para a atividade de polifenoloxidase de nove cultivares de feijão foi em pH 7,2, utilizando catecol como substrato. Núñez-Delicado *et al.* (2003), estudando a purificação parcial de polifenoloxidase de caqui, determinaram o pH ótimo como 5,3 para medida de atividade. A extração de peroxidase e polifenoloxidase de amoras foi conduzida em pH 7,5 por apresentar a melhor solubilidade dos extratos (Gonzáles, Ancos e Cano, 2000).

A adição de agentes surfactantes nos extratos tem por finalidade evitar o escurecimento provocado pelas enzimas em compostos fenólicos naturais. Dentre os agentes utilizados destacam-se as polivinilpirrolidonas (PVPs), que são polímeros de alta massa molar, comercializados na forma de pó branco com baixa granulometria. Este polímero tem a habilidade de remover compostos fenólicos de soluções, devido à sua baixa solubilidade (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Esta habilidade é atribuída à formação de pontes de hidrogênio entre os substratos naturais e o polímero (Andersen e Sowers, 1968).

Detergentes, como Triton X-100, são adicionados para romper as membranas celulares, liberando as enzimas. A peroxidase pode ocorrer na forma solúvel ou ligada à parede celular e, possivelmente, às organelas (Banci, 1997; Gonzáles, Ancos e Cano, 2000). A enzima polifenoloxidase permanece estocada no cloroplasto (van Gelder *et al.*, 1997). A adição de 0,5% (p/v) de Triton X-100 aumentou a extração de peroxidase e polifenoloxidase de amoras (Gonzáles, Ancos e Cano, 2000). Broothaerts *et al.* (2000) observaram um aumento de 44 e 74% na atividade de polifenoloxidase em folhas de maçã e tabaco, respectivamente, com a adição de 1% de TX-100 para folhas de maçã e 2% para tabaco.

Gonzáles, Ancos e Cano (2000), buscando uma purificação parcial de peroxidase e polifenoloxidase de amoras, concluíram que a variação da concentração molar (0,05; 0,1 e 0,2 M) do tampão fosfato de sódio não afeta a taxa de extração, porém, a adição de 4% (p/v) de PVP e 0,5% (p/v) de Triton X-100 aumenta a extração de ambas enzimas.

2.1.3 Considerações Gerais

A utilização de enzimas oxidativas em processos biotecnológicos vem crescendo nos últimos anos. O Brasil possui uma fonte incalculável de recursos vegetais que vêm sendo investigados para aplicação em diversas áreas. Entre as diversas aplicações da PFO e POD, podem ser citadas seu emprego no tratamento de efluentes para a oxidação de compostos fenólicos, no desenvolvimento de biossensores analíticos e na biotransformação de monoterpenos para a produção de compostos de maior valor agregado, como carvona e α -terpineol.

Nas folhas de erva-mate são encontradas as enzimas polifenoloxidase e peroxidase que, no beneficiamento, devem ser inativadas para evitar o escurecimento enzimático. Considerando que praticamente toda erva-mate está voltada para a produção de erva para chimarrão, tem-se um excesso de oferta de matéria-prima em contraste com a possibilidade de extração de enzimas oxidativas que apresentam potencial de aplicação tecnológica. Apesar da procura por fontes alternativas de enzimas ser bem explorada por pesquisas científicas e da importância da erva-mate no contexto sócio-econômico da região, pouco se conhece sobre as enzimas oxidativas presentes na erva-mate.

Dentro deste contexto, esta etapa do trabalho teve por objetivo determinar a melhor condição de extração e de medida de atividade da polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate, investigando as variáveis: massa de erva-mate, concentração molar do tampão fosfato de sódio, pH do tampão fosfato de sódio para a extração e para a medida de atividade enzimática, adição do surfactante polivinilpirrolidona K-90 e do detergente Triton X-100 e tempo de centrifugação.

2.2 Material e Métodos

Neste item são apresentadas as descrições dos materiais e equipamentos utilizados e do procedimento adotado para a determinação das condições de extração e de medida de atividade da polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.

2.2.1 Material

As folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) foram coletadas de árvores existentes nos jardins da URI – Campus de Erechim. As amostras foram coletadas de janeiro a abril de 2003, fora do período de dormência das erveiras. As amostras provêm de plantas expostas ao sol, sem nenhum tipo de adubação. A coleta das folhas foi conduzida a partir de diferentes locais da planta – terço superior, médio e inferior – sendo realizadas sempre entre 7 e 8 horas da manhã, em dias sem chuva.

Na Tabela 2.1 são apresentados os reagentes químicos utilizados para a extração e medida da atividade das enzimas, sendo indicadas algumas características dos produtos e suas procedências. Todos os reagentes foram empregados sem nenhum tratamento adicional.

Tabela 2.1 – Reagentes químicos empregados na extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate.

Reagente químico	Característica	Procedência
Fosfato de sódio dibásico heptaidratado	-	Synth
Polivinilpirrolidona – K90 (PVP-K90)	Massa molecular 360.000	Fluka
Triton – X 100	-	JT Baker
Tween 80	nº de hidroxilas 65 – 80	Vetec
Guaiacol	Pureza aproximada 98%	Reagen
Peróxido de hidrogênio	Solução a 30% p/p	Reagen
Pirocatecol	Pureza aproximada 99%	Fluka
Coomassie Brilliant Blue G 250	Pureza aproximada 90%	Sigma
Albumina de soro bovino	-	Sigma
Etanol	Concentração 95%	Merck
Ácido fosfórico	Concentração 85% (PA)	Nuclear

Os principais equipamentos utilizados para a determinação da melhor condição de extração e de medida de atividade de oxidases presentes na erva-mate estão relacionados a seguir:

- Liquidificador doméstico (Walita);
- Centrífuga (Nova Técnica NT815);
- Espectrofotômetro UV/Visível (Agilent Technologies 8453);
- Congelador doméstico com temperatura em torno de -4°C (Freezer Frost Free 270 - Brastemp).

2.2.2 Métodos

Obtenção do extrato enzimático bruto

A obtenção do extrato enzimático foi realizada com base no método proposto por Fatibello-Filho e Vieira (2002). Folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) foram homogeneizadas em liquidificador doméstico com 90 mL de tampão fosfato de sódio. O homogenato foi filtrado em cinco camadas de gaze e centrifugado à 11.000 xg (8.400 rpm), à 4°C . A solução sobrenadante foi denominada extrato enzimático bruto e utilizada na determinação de atividade enzimática. As amostras foram mantidas em banho de gelo durante o processo de extração e medida de atividade.

Determinação da atividade enzimática dos extratos enzimáticos brutos

Polifenoloxidase (PFO): Para a determinação da atividade dos extratos brutos da polifenoloxidase foi determinada a variação de absorbância a 420 nm na reação de oxidação do pirocatecol, com base no trabalho proposto por Lima, Pastore e Lima (2001). A atividade foi determinada em uma mistura reacional contendo: 50, 75 ou 100 μL de extrato enzimático bruto, 100 μL de solução de pirocatecol 0,1 M

preparada em solução de Tween 80 0,1% e tampão fosfato de sódio para completar o volume de 3 mL. Uma unidade (U) de polifenoloxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de *o*-quinona a partir de pirocatecol, na condição padrão. A atividade específica (U/mg de proteína) foi determinada de acordo com a quantidade de proteína presente nos extratos brutos.

Peroxidase (POD): A atividade enzimática dos extratos enzimáticos brutos de peroxidase foi determinada espectrofotometricamente medindo-se a variação de absorbância em 470 nm do tetraguaiacol formado na reação enzimática, tomando como base o trabalho de Martínez-Parra e Muñoz (2001). Para cada reação foram utilizados 50, 75 ou 100 μL do extrato enzimático bruto, 100 μL de solução de guaiacol 0,1 M preparada em solução de Tween 80 0,1%, 100 μL de solução de peróxido de hidrogênio 0,02 M e tampão fosfato de sódio para completar o volume de 3 mL. Uma unidade (U) de POD foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de tetraguaiacol a partir de guaiacol, na condição padrão. A atividade específica (U/mg de proteína) foi determinada de acordo com a quantidade de proteína presente nos extratos brutos.

Determinação do coeficiente de absorção molar (ϵ): A determinação do coeficiente de absorção molar foi realizada segundo Mendham *et al.* (2002). O efeito da concentração de um constituinte colorido de uma solução sobre a transmissão e a absorção da luz pode ser estabelecido pela Lei de Beer, que indica a intensidade de um feixe de luz monocromático diminui exponencialmente quando a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente. A lei de Beer (eq. 2.1) constitui-se na lei fundamental da espectrofotometria:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = acl \quad (2.1)$$

Na equação de Beer o valor de a depende da forma como se expressa a concentração. Se c é expresso em mol L⁻¹ e l em cm, então a é substituído por ϵ , o coeficiente de absorção molar. O coeficiente de absorção molar (ϵ) é o coeficiente de absorção específico na concentração de 1 mol L⁻¹ e passo óptico de 1 cm (Mendham *et al.*, 2000). Quando se conhece o valor da absorvidade molar do analito ou de um dos produtos da reação enzimática, é possível determinar a atividade internacional (U) (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). O coeficiente de absorção molar do guaiacol, informado na literatura, é de 26.600 M⁻¹cm⁻¹ para comprimento de onda de 470 nm. Para o pirocatecol, em comprimento de onda 260 nm, ϵ é igual e 16.000 M⁻¹cm⁻¹ (Silverstein, 1991).

Neste estudo optou-se pelo cálculo experimental do coeficiente de absorção molar, para ambos os substratos, uma vez que não foi possível obter medida de cinética enzimática para a atividade de polifenoloxidase com pirocatecol em comprimento de onda 260 nm. Para a determinação experimental do ϵ foram preparadas soluções de 1 mol L⁻¹ de guaiacol e pirocatecol, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5. A leitura da absorbância foi realizada espectrofotometricamente em comprimento de onda 470 nm para guaiacol e 420 nm para pirocatecol. Para o cálculo, a absorbância foi substituída na equação de Beer:

$$\epsilon = \frac{A}{c * l} \quad (2.2)$$

onde A representa a absorbância; c a concentração do analito em mol L⁻¹ e l o comprimento do passo óptico em cm.

O valor experimental do ϵ para guaiacol, medido em comprimento de onda de 470 nm, foi de 32.800±1.500 M⁻¹cm⁻¹ e para pirocatecol, em 420 nm, foi de 2.800±200 M⁻¹cm⁻¹. Esses valores foram utilizados para o cálculo da atividade das enzimas.

Determinação da proteína: O conteúdo de proteína da preparação enzimática foi determinado pelo método de Bradford (1976). Albumina de soro bovina foi utilizada como proteína padrão.

Planejamento experimental para determinação das condições de extração e de medida de atividade de oxidases de erva-mate

A determinação da condição de extração e medida de atividade de PFO e POD de erva-mate foi conduzida com auxílio de técnicas de planejamento experimental. Inicialmente, utilizou-se um planejamento de experimentos fracionário 2^{7-3} , avaliando o efeito das variáveis: massa de erva-mate (g), concentração molar do tampão fosfato de sódio (M), adição de detergente (Triton X-100) (% de peso de detergente/volume de tampão), pH do tampão de extração, pH do tampão de medida de atividade enzimática, adição de polivinilpirrolidona (PVP K-90) (% de peso de PVP K90/peso de erva-mate) e tempo de centrifugação (minutos). Os intervalos de estudo das variáveis, apresentados na Tabela 2.2, foram definidos com base em trabalhos de investigação de atividade de oxidases em outras fontes vegetais (Ohya *et al.*, 1997; Gonzáles, Ancos e Cano, 2000; Duarte-Vázquez *et al.*, 2000; Kennedy, Alemany e Warith, 2002; Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

Tabela 2.2 – Intervalo de estudo das variáveis do planejamento 2^{7-3} .

Variável / Nível	-1	+1
Massa de erva-mate (g)	15	35
Concentração molar do tampão (M)	0,05	0,2
Triton TX-100 (%p/v)*	0	2
pH de extração	6,0	7,5
pH de medida de atividade	6,0	7,5
PVP K-90 (%p/p)**	0	10
Tempo centrifugação (min)	30	50

* em relação ao volume de tampão utilizado na extração. ** em relação à massa de erva-mate.

O erro experimental para cada condição foi obtido através da média. Visando obter uma comparação direta do efeito da cada variável, as variáveis independentes foram normalizadas no intervalo de -1 a +1, de acordo com a equação abaixo:

$$x_i = \frac{2(X_i - X_{min})}{(X_{max} - X_{min})} - 1 \quad (2.3)$$

onde x_i é o valor normalizado da variável X na condição i ; X_i é o valor real, enquanto que X_{min} e $X_{máx}$ representam o limite inferior e superior da variável X , respectivamente. O nível -1 representa o limite inferior enquanto o nível $+1$ representa o limite superior de cada variável. Uma modelagem estatística foi adotada para construir modelos empíricos capazes de reproduzirem os dados experimentais. Os modelos empíricos foram construídos supondo que todas interações binárias entre as variáveis eram significativas, estimando os parâmetros relacionados a cada interação das variáveis e o efeito principal da variável e descartando os parâmetros não significativos, considerando um nível de confiança de 95%. Os parâmetros foram estimados pela minimização de função objetivo de mínimos quadrados utilizando um software comercial (Statsoft 5.5). Para validar o modelo estatístico, foi comparada a variância do procedimento de estimação, S^2_{est} (eq. 2.4) com a variância experimental média, S^2_{exp} , (eq. 2.5), empregando o teste F de Fisher com 95% de confiança.

$$S^2_{est} = \frac{\sum_{i=1}^{Nexp} (Y_i^{exp} - Y_i^{mod})^2}{Nexp - Npar} \quad (2.4)$$

onde $Nexp$ é o número de condições experimentais e $Npar$ é o número de parâmetros no modelo estatístico. Y_i^{exp} representa o valor médio da atividade da peroxidase ou da polifenoloxidase na condição experimental i . Os subscritos “ exp ” e “ mod ” referem-se aos valores experimentais e do modelo, respectivamente.

$$S^2_{exp} = \frac{\sum_i v_i S_i^2}{\sum_i v_i} \quad (2.5)$$

onde v_i é o número de graus de liberdade da condição experimental i (número de réplicas na condição experimental menos 1). S_i^2 é a variância experimental da condição i , que foi calculada a partir das réplicas.

A partir dos resultados obtidos no planejamento fracionário 2^{7-3} foram elaborados novos planos experimentais, visando a obtenção da melhor condição de extração e medida de atividade das enzimas. Tais planos, por dependerem dos resultados obtidos no planejamento inicial, serão discutidos na seção de resultados e discussão do presente capítulo.

2.3 Resultados e Discussão

Para a determinação da melhor condição de extração e de medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate, foram realizados três planejamentos de experimentos, a partir dos quais foi possível identificar a melhor condição experimental. Os resultados apresentados no corpo do texto representam os valores médios dos experimentos. Informações detalhadas dos dados de extração e medida de atividade são apresentados no Apêndice A.

2.3.1 Planejamento experimental fracionário 2^{7-3} para extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate

Para a avaliação do efeito das variáveis sobre a atividade das oxidases de erva-mate, uma variação na massa de erva-mate de até 100 mg foi tolerada, evitando desta forma a necessidade de quebra das folhas para a obtenção do peso exato, o que poderia desencadear a reação enzimática de oxidação por disponibilidade de oxigênio atmosférico.

A Tabela 2.3 apresenta os valores reais do planejamento 2^{7-3} e os resultados de atividade das oxidases da erva-mate, em U/mL, juntamente com a incerteza dos valores obtidos das atividades enzimáticas. As variáveis investigadas foram: massa

de erva-mate, m, (g); concentração molar do tampão, ta, (M); adição de detergente Triton X-100, TX-100, (% p/v); pH do tampão fosfato de sódio para extração, pHe; pH do tampão fosfato de sódio para medida de atividade enzimática, pHa; adição de polivinilpirrolidona K90, PVP, (% p/p) e tempo de centrifugação, tc, (min).

Tabela 2.3 – Planejamento experimental fatorial 2^{7-3} para extração e atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.

Ex	m (g)	ta (M)	TX-100 (%p/v ^{*1})	pHe	pHa	PVP (%p/p ^{*2})	tc (min)	n ₁ ^{*3}	n _{1a} ^{*4}	PFO (U/mL)	n ₂ ^{*5}	n _{2a} ^{*6}	POD (U/mL)
1	15	0,05	0	6,0	6,0	0	30	2	6	108,72 (±1,98)	2	6	0,18 (±0,03)
2	15	0,05	0	6,0	7,5	10	50	3	9	138,97 (±7,30)	2	4	0,04 (±0,01)
3	15	0,05	2	7,5	6,0	0	50	3	9	132,30 (±10,47)	2	4	0,17 (±0,02)
4	15	0,05	2	7,5	7,5	10	30	2	6	117,14 (±5,32)	3	9	<0,01
5	15	0,2	0	7,5	6,0	10	30	3	9	100,40 (±7,28)	3	8	0,56 (±0,05)
6	15	0,2	0	7,5	7,5	0	50	2	6	267,36 (±11,27)	2	6	0,13 (±0,02)
7	15	0,2	2	6,0	6,0	10	50	2	6	116,31 (±8,52)	2	6	0,38 (±0,02)
8	15	0,2	2	6,0	7,5	0	30	4	12	220,51 (±17,52)	3	9	0,08 (±0,01)
9	35	0,05	0	7,5	6,0	10	50	2	6	142,97 (±8,15)	2	6	1,05 (±0,08)
10	35	0,05	0	7,5	7,5	0	30	3	9	473,65 (±20,25)	3	9	<0,01
11	35	0,05	2	6,0	6,0	10	30	3	9	243,51 (±14,78)	2	6	1,31 (±0,16)
12	35	0,05	2	6,0	7,5	0	50	2	6	353,57 (±27,08)	3	9	<0,01
13	35	0,2	0	6,0	6,0	0	50	3	9	262,73 (±11,09)	2	6	0,67 (±0,05)
14	35	0,2	0	6,0	7,5	10	30	2	6	244,08 (±8,94)	2	6	0,55 (±0,06)
15	35	0,2	2	7,5	6,0	0	30	2	6	288,37 (±15,57)	2	4	0,37 (±0,01)
16	35	0,2	2	7,5	7,5	10	50	3	8	213,16 (±12,23)	3	8	0,56 (±0,11)
17	25	0,125	1	6,75	6,75	5	40	3	9	211,19 (±10,90)	2	6	0,49 (±0,12)

O valor da incerteza das atividades enzimáticas (entre parênteses) refere-se ao desvio padrão da condição experimental. %p/v^{*1} em relação ao volume de tampão utilizado na extração. %p/p^{*2} em relação à massa de erva-mate. n₁^{*3} e n₂^{*5} = número de réplicas autênticas para a extração enzimática de polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente. n_{1a}^{*4} e n_{2a}^{*6} = número de réplicas para medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente.

Pode ser observado na Tabela 2.3 que a atividade máxima alcançada para a polifenoloxidase foi de $473,65 \pm 20,25$ U/mL, utilizando 35 g de erva-mate, tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 para extração e medida de atividade, sem adição de TX-100 e PVP K90 e 30 minutos de centrifugação. A peroxidase alcançou atividade de $1,31 \pm 0,16$ U/mL utilizando 35 g de erva-mate, tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0 para extração e medida de atividade, adição de 2% (p/v) de TX-100 e de 10% (p/p) de PVP K90 e 30 minutos de centrifugação. A partir desta tabela pode ser constatado que na erva-mate a atividade da polifenoloxidase é bastante superior à atividade da peroxidase.

Os resultados significativos da regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento 2^{7-3} para a atividade de polifenoloxidase são demonstrados na Tabela 2.4. Adotando um nível de confiança de 95%, pode ser observado que a massa e o pH de medida de atividade e a interação concentração molar do tampão-tempo de centrifugação apresentaram efeito significativo positivo. As variáveis PVP e tempo de centrifugação, bem como as interações massa-PVP, massa-concentração molar do tampão e massa-tempo de centrifugação afetam negativamente a atividade da enzima. Dentre os efeitos principais, a massa de erva-mate apresentou-se como mais importante dentro das faixas experimentais investigadas.

Tabela 2.4 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento 2^{7-3} para a atividade de polifenoloxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico. Coeficiente de correlação: 0,994. S^2_{est} : 240,66; S^2_{exp} : 174,41; Razão F: 1,38.

Atividade de PFO = $a_0 + a_1*m + a_2*pHa + a_3*PVP + a_4*tc + a_5*m*PVP + a_6*m*ta + a_7*m*tc + a_8* ta*tc$									
Variável	Independente	m	pHa	PVP	tc	m x PVP	m x ta	m x tc	ta x tc
Parâmetro	213,82	63,77	39,57	-49,42	-10,56	-17,41	-25,80	-24,08	11,34
Incerteza	3,76	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88
p-level	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,03	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02

A enzima polifenoloxidase encontra-se, em sua maior parte, localizada nas membranas do cloroplasto (van Gelder *at al.*, 1997). Desta forma, a adição de detergentes (como o Triton X-100) é utilizada para a remoção da enzima. Estudos

A análise do planejamento 2^{7-3} para a extração e medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate indicou que as variáveis pH de extração e adição de Triton X-100 não apresentam efeito significativo. Para a enzima polifenoloxidase, a variável concentração molar do tampão apresenta efeito significativo negativo quando interage com a variável massa. Para a peroxidase, também não apresentaram efeito significativo as variáveis tempo de centrifugação e concentração molar do tampão. Para peroxidase e polifenoloxidase de amora, segundo Gonzáles, Ancos e Cano (2000), a atividade aumenta quando medida com tampão fosfato de sódio 0,2 M.

2.3.2 Planejamento experimental fatorial completo 2^3 para extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate

Com base nos resultados obtidos no planejamento 2^{7-3} um novo plano experimental foi elaborado. No planejamento experimental completo 2^3 os níveis das variáveis massa e PVP K-90 foram aumentados e os de pH de medida de atividade diminuídos. Neste segundo planejamento, buscou-se uma condição que permitisse a extração e medida de atividade de ambas enzimas. Optou-se por fixar no menor nível a adição de Triton X-100, 0% (p/v), e realizar a extração enzimática em pH 7,5, por estas variáveis não apresentarem influência significativa na atividade das enzimas. O tempo de centrifugação foi fixado em 30 minutos à 11.000 xg, considerando o efeito negativo sobre a atividade da polifenoloxidase e por não exercer influência para a peroxidase. A concentração molar do tampão fosfato de sódio, que apresentou efeito significativo negativo para a polifenoloxidase em interações com as variáveis massa e tempo de centrifugação e não apresentou efeito significativo para a peroxidase, foi fixada em 0,05 M, o menor nível.

A Tabela 2.6 apresenta os resultados obtidos no segundo planejamento experimental, onde pode ser observado que a melhor condição de atividade foi alcançada com 40 g de erva-mate, pH de medida de atividade 5,0 e adição de 7% de PVP K90, para ambas as enzimas. A atividade foi de $429,12 \pm 53,82$ U/mL para

polifenoloxidase e de $3,53 \pm 0,33$ U/mL para peroxidase. A atividade enzimática da peroxidase aumentou cerca de 3 vezes quando comparada com a maior atividade alcançada no planejamento anterior, já para a enzima polifenoloxidase não ocorreu aumento de atividade. É importante notar que para a elaboração do 2º plano experimental foi levado em consideração o resultado obtido para a regressão dos dados experimentais da atividade de peroxidase de erva-mate, onde alguns efeitos, como o pH de atividade e adição de PVP, demonstraram ser distintos para as duas enzimas.

Tabela 2.6 – Planejamento experimental 2³ para extração e atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.

Ex	m (g)	pHa	PVP (%p/p* ¹)	n ₁ * ²	n _{1a} * ³	PFO (U/mL)	n ₂ * ⁴	n _{2a} * ⁵	POD (U/mL)
1	20	5,0	5	3	9	232,83 (±47,92)	3	9	1,21 (±0,16)
2	40	5,0	5	3	7	429,12 (±53,82)	3	9	3,53 (±0,33)
3	20	7,0	5	3	9	231,44 (±19,18)	2	3	0,87 (±0,11)
4	40	7,0	5	2	6	374,76 (±24,77)	2	6	0,93 (±0,09)
5	20	5,0	15	3	9	135,22 (±17,81)	3	9	1,24 (±0,11)
6	40	5,0	15	3	9	254,76 (±17,74)	3	9	2,85 (±0,24)
7	20	7,0	15	3	9	132,78 (±17,08)	3	7	0,65 (±0,28)
8	40	7,0	15	3	9	192,09 (±11,44)	3	6	0,82 (±0,19)
9	30	6,0	10	5	12	154,68 (±15,12)	5	15	1,53 (±0,17)

O valor da incerteza das atividades enzimáticas (entre parênteses) refere-se ao desvio padrão da condição experimental. %p/p*¹ em relação à massa de erva-mate. n₁*² e n₂*⁴ = número de réplicas autênticas para a extração enzimática de polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente. n_{1a}*³ e n_{2a}*⁵ = número de réplicas para medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente.

Na Tabela 2.7 estão demonstrados os resultados da regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2³ para a atividade de polifenoloxidase. A variável massa apresenta efeito significativo positivo e a adição

de PVP influência negativamente na atividade da polifenoloxidase. Nesta tabela pode ser observada a presença de um termo quadrático positivo para a atividade enzimática, isto é, um efeito não linear com concavidade positiva de alguma variável está presente do nível mínimo para o máximo. Neste sentido, o aumento da atividade da polifenoloxidase pode ser alcançado em níveis fora da faixa investigada.

Segundo Fatibello-Filho e Vieira (2002) diversos autores utilizam as polivinilpirrolidonas (PVPs) para promover a separação dos compostos fenólicos naturais dos extratos enzimáticos, evitando que os mesmos sejam oxidados. A erva-mate possui de 20 a 30% de polifenóis (flavonóides). A alta concentração de materiais polifenólicos confere excelentes características químicas à erva-mate. Os principais flavonóides encontrados na erva-mate são a rutina, a quercetina-3-glicosídeo e canferol-3-rutinosídeo (Valduga, 1994). Como a presença de compostos fenólicos não é interessante em extratos enzimáticos, pelos motivos citados acima, a adição da PVP K90 pode contribuir para a estabilidade das enzimas de erva-mate em extratos brutos.

Tabela 2.7 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2^3 para a atividade de polifenoloxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico. Coeficiente de correlação: 0,991. S^2_{est} : 539,80; S^2_{exp} : 753,02; Razão F: 0,72.

Atividade PPO = $a_0 + a_1*m + a_2*pHa + a_3*PVP + a_4*m*PVP + a_6*$ quadrático						
Variável	Independente	m	pHa	PVP	m x PVP	quadrático*
Parâmetro	154,68	64,81	-15,11	-69,16	-20,09	93,19
Incerteza	23,23	8,21	8,21	8,21	8,21	24,64
p-level	0,01	<0,01	0,16	<0,01	0,09	0,03

* indica a presença do efeito quadrático em alguma variável na atividade de PFO.

A análise dos resultados experimentais obtidos do planejamento experimental 2^3 para a atividade de peroxidase, Tabela 2.8, demonstrou que a massa de erva-mate apresenta efeito significativo positivo, e as variáveis pH de medida de atividade e a interação massa-pH de medida de atividade afetam negativamente a atividade da enzima peroxidase.

Tabela 2.8 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2^3 para a atividade de peroxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico. Coeficiente de correlação: 0,991. S^2_{est} : 0,034; S^2_{exp} : 0,043; Razão F: 0,791.

Atividade de POD = $a_0 + a_1*m + a_2*pHa + a_3*PVP + a_4*m*pHa$					
Variável	Independente	m	pHa	PVP	m x pHa
Parâmetro	1,52	0,52	-0,69	-0,12	-0,46
Incerteza	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07
p-level	<0,01	<0,01	<0,01	0,14	<0,01

Para ambas as enzimas, a atividade aumenta com a elevação da variável massa. Experimentos realizados com quantidades superiores a 40 g de erva-mate em 90 mL de tampão prejudicaram a extração das enzimas, por dificuldade de homogeneização. Desta forma, optou-se por fixar a variável massa em 40 g de erva-mate.

2.3.3 Planejamento experimental fatorial completo 2^2 para extração e medida de atividade de oxidases de erva-mate

A partir dos resultados do 2º planejamento de experimentos, objetivando a obtenção de uma condição única para ambas enzimas, optou-se por diminuir o nível da variável pH de atividade, uma vez que apresentou efeito negativo para a peroxidase e não foi significativa para a polifenoloxidase, e diminuir o nível da variável PVP K90, que não foi significativa para peroxidase, porém apresentou efeito negativo para PFO. Para o planejamento experimental fatorial completo 2^2 (Tabela 2.9) os níveis foram fixados em 40 g de massa de erva-mate, tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH do tampão de extração 7,5 e 30 minutos de centrifugação.

Pode ser observado na Tabela 2.9 que as maiores atividades, tanto de polifenoloxidase, $551,43 \pm 38,09$ U/mL e $1.364,44 \pm 64,45$ U/mg de proteína, como para a peroxidase, $5,65 \pm 0,20$ U/mL e $11,66 \pm 0,52$ U/mg de proteína, foram alcançadas com adição de 7% (p/p) de PVP K90 e de pH de medida de atividade 4,0. Ambas as enzimas apresentaram aumento de atividade, quando comparada com a maior atividade alcançada no planejamento anterior.

Tabela 2.9 – Planejamento experimental 2² para extração e atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.

Ex	PVP (%p/p ^{*1})	pHa	n ₁ ^{*2}	n _{1a} ^{*3}	PFO (U/mL)	PFO (U/mg ptn)	n ₂ ^{*4}	n _{2a} ^{*5}	POD (U/mL)	POD (U/mg ptn)
1	3	4,0	5	8	509,64 (±44,68)	1.138,26 (±96,21)	4	10	4,71 (±0,29)	10,86 (±0,74)
2	7	6,0	6	13	299,95 (±31,92)	641,14 (±58,20)	6	14	2,20 (±0,23)	4,71 (±0,45)
3	7	4,0	5	9	551,43 (±38,09)	1.364,46 (±64,45)	5	13	5,65 (±0,20)	11,66 (±0,52)
4	3	6,0	6	14	525,31 (±19,17)	1.102,49 (±48,85)	6	11	2,89 (±0,20)	5,92 (±0,35)
5	5	5,0	3	7	553,88 (±30,53)	1.344,23 (±70,21)	4	10	4,39 (±0,28)	10,62 (±0,63)

O valor da incerteza das atividades enzimáticas (entre parênteses) refere-se ao desvio padrão da condição experimental. %p/p^{*1} em relação à massa de erva-mate. n₁^{*2} e n₂^{*4} = número de réplicas autênticas para a extração enzimática de polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente. n_{1a}^{*3} e n_{2a}^{*5} = número de réplicas para medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente.

A regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2² para a extração e atividade de polifenoloxidase de erva-mate está demonstrada na Tabela 2.10, para a atividade em U/mL. Para a atividade de polifenoloxidase, neste plano experimental, nenhuma variável apresentou-se significativa com 95% de confiança.

Tabela 2.10 - Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2² para a atividade de polifenoloxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico. Coeficiente de correlação: 0,939. S²_{est}: 2700,15; S²_{exp}: 1047,33; Razão F: 2,58.

Atividade da PFO = a ₀ + a ₁ *pHa + a ₂ *PVP + a ₃ *pHa*PVP				
Variável	Independente	pHa	PVP	pHa x PVP
Parâmetro	488,04	-58,95	-45,89	-66,79
Incerteza	32,92	36,80	36,80	36,80
p-level	0,04	0,36	0,43	0,32

Na Tabela 2.11 são apresentados os resultados das análises para atividade de peroxidase em U/mL. O pH de medida de atividade apresenta efeito significativo negativo na atividade da enzima.

Tabela 2.11 – Regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para a atividade de peroxidase presente em erva-mate utilizando um modelo estatístico. Coeficiente de correlação: 0,999. $S^2_{est.}$: 0,015; $S^2_{exp.}$: 1,256; Razão F: 0,012.

Atividade de POD = $a_0 + a_1 \cdot \text{pHa} + a_2 \cdot \text{PVP} \cdot \text{pHa} + a_3 \cdot \text{quadrático}$				
Variável	Independente	pHa	pHa x PVP	quadrático*
Parâmetro	4,40	-1,32	-0,41	-0,53
Incerteza	0,12	0,06	0,06	0,14
p-level	0,02	0,03	0,09	0,16

* indica a presença do efeito quadrático em alguma variável na atividade de POD.

2.3.4 Determinação da melhor condição de extração e medida de atividade de polifenoloxidase de erva-mate

A análise do plano de experimentos 2^3 (3^0 planejamento) não indicou nenhum efeito significativo para a atividade da polifenoloxidase para os níveis investigados, entretanto a regressão dos dados experimentais obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 apresentou termo quadrático positivo, o que indica que a atividade pode ser aumentada quando utilizados variáveis com níveis fora dos investigados até então. Desta forma, buscando uma condição que permita a maior extração e medida de atividade de PFO, foram realizados experimentos com variação de PVP K90 (3 e 7% p/p) em pH 8,0 para medida de atividade (Tabela 2.12). As amostras extraídas com 3% de PVP apresentaram atividade enzimática superior às extraídas com 7%.

Tabela 2.12 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate em pH de medida de atividade 8,0.

Ex	PVP (%p/p ^{*1})	N_1 ^{*2}	n_{1a} ^{*3}	U/mL	U/mg ptn
1	3%	6	12	712,02 (±67,13)	1.693,94 (±190,21)
2	7%	5	9	476,11 (±66,57)	1.148,99 (±125,92)

O valor da incerteza das atividades enzimáticas (entre parênteses) refere-se ao desvio padrão da condição experimental. %p/p^{*1} em relação à massa de erva-mate. n_1 ^{*2} e n_2 ^{*4} = número de réplicas autênticas para a extração enzimática de polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente. n_{1a} ^{*3} e n_{2a} ^{*5} = número de réplicas para medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2.12, foram realizadas extrações utilizando 40 g de erva-mate, em 90 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, adição de 3% (p/p) de PVP K90 e tempo de centrifugação de 30 minutos, a medida de atividade enzimática foi realizada utilizando tampão fosfato de sódio 0,05 M, em **pH 9,0**. Os resultados indicaram que apresentaram atividade de $1.055,95 \pm 70,85$ U/mL e $2.544,96 \pm 196,58$ U/mg de proteína. Nesta condição a atividade de polifenoloxidase foi superior às demais investigadas neste trabalho. Valores de pH de medida de atividade superiores a 9,0 excedem o pl catiônico da enzima.

Em estudos com couve de Bruxelas, Nagai e Suzuki (2003) constataram o pH 9,0 como ótimo para atividade e estabilidade da polifenoloxidase. Owusu-Ansah (1989) observou que para a polifenoloxidase presente em extrato bruto de arroz selvagem a atividade enzimática é baixa em pH de 2 à 6 e apresenta atividade máxima em pH 7,8, seu pH ótimo. Em pH 9,0 ocorre decréscimo de atividade, apresentando atividade residual de 40%. Pérez-Gilabert e García-Carmona (2000) investigaram o efeito da variação de pH na atividade cresolase e catecolase de polifenoloxidase purificada de beringela e constataram que a atividade catecolase foi maior em pH de 5,0 à 7,5, e quando a medida de atividade foi realizada em tampão borato pH 9,0 a atividade foi inferior às demais. Segundo Fujita *et al.* (1995) a atividade cresolase de repolho foi maior em pH 7,5, e para a medida de atividade de polifenoloxidase purificada, o pH ótimo ficou em 7,6.

2.3.5 Determinação da melhor condição de extração e medida de atividade de peroxidase de erva-mate

A partir dos resultados indicados no planejamento de experimentos 2³ a atividade da peroxidase foi investigada em valores de pH inferiores a 4,0. Nos experimentos realizados com medida de atividade com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 2,0 e 3,0, ocorreu desnaturação da enzima. A peroxidase possui pl aniônico entre 3,4 e 5,6 (Sakharov *et al.*, 1999), e quando submetida à condições inferiores

ao seu pl ocorre desnaturação protéica. Experimentos realizados com erva-mate, com adição de 3 e 7% de PVP K90, com tampão de medida de atividade 8,0, não apresentaram atividade para a peroxidase.

Desta forma, a melhor condição para a extração e medida de atividade da peroxidase foi obtida com 40 g de erva-mate, tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH de extração 7,5 e de medida de atividade 4,0, adição de 3% (p/p) de PVP K90 e 30 minutos de centrifugação. Nesta condição foi possível alcançar uma atividade de $5,61 \pm 0,26$ U/mL e $13,19 \pm 0,51$ U/mg de proteína.

Barbosa *et al.* (2004), extraindo peroxidase de nabo e rabanete, obtiveram atividade de 35,3 e de 16,8 U/mg de proteína em extratos brutos, respectivamente. A atividade encontrada para o rabanete, neste trabalho, foi semelhante à atividade de peroxidase encontrada para extratos brutos de erva-mate. Gazaryan e Lagrimini (1996) isolaram uma peroxidase aniônica de tabaco que apresentou atividade máxima em pH 4,55. Segundo Fujita *et al.* (1995) o pH ótimo para peroxidase de repolho é 6,4.

2.7 Conclusões parciais

Os resultados obtidos para a determinação da melhor condição de extração e de medida de atividade das enzimas oxidativas presentes na erva-mate permitem estabelecer as seguintes conclusões:

- Dentro da faixa experimental investigada a concentração molar (0,05 à 0,2 M), o pH de extração do tampão fosfato de sódio (6,0 à 7,5), bem como a adição de TX-100 (0 à 2%) não interferem na extração e atividade de ambas as enzimas;
- O tempo de centrifugação, avaliado entre 30 e 50 minutos, exerce efeito significativo negativo sobre a atividade da polifenoloxidase, e não apresenta influência na atividade da peroxidase;

- A massa de erva-mate apresentou efeito significativo positivo no 1º e 2º planejamentos experimentais, sendo fixada em 40 g para não dificultar a homogeneização dos extratos;
- A adição de PVP K90, como agente removedor de compostos fenólicos, contribui para a obtenção dos extratos brutos enzimáticos de polifenoloxidase;
- A atividade de ambas as enzimas está diretamente relacionada com o pH de medida de atividade. Na literatura é demonstrado que enzimas de fontes vegetais diferentes apresentam diferenciação de pH para a medida de atividade.
- A melhor condição de extração e medida de atividade de polifenoloxidase foi definida como: 40 g de erva-mate, em 90 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, adição de 3% (p/p) de PVP K90 e tempo de centrifugação de 30 minutos, e medida de atividade enzimática em pH 9,0. Nesta condição foram alcançadas atividades de **1.055,95±70,85 U/mL e 2.544,96±196,58 U/mg de proteína;**
- Para a extração e medida de atividade de peroxidase a melhor condição foi de: 40 g de erva-mate, 90 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH de extração 7,5 e de medida de atividade 4,0, adição de 3% (p/p) de PVP K90 e 30 minutos de centrifugação. Nesta condição foi possível obter uma atividade de **5,61±0,26 U/mL e 13,19±0,51U/ mg de proteína.**
- A utilização da técnica de planejamento experimental permitiu determinar as condições de extração das oxidases e de medida de atividade enzimática para peroxidase e polifenoloxidase de erva-mate, que resultou em um aumento de cerca de 2 vezes para a atividade da polifenoloxidase e de 4 vezes para a peroxidase.

2.8 Referências bibliográficas

ANDERSEN, R. A.; SOWERS, J. A., **Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone.** *Phytochemistry* v. 7, p. 293 – 301, 1968.

ANDRADE, F. M., **Diagnóstico da Cadeia Produtiva da *Ilex Paraguariensis* St. Hill Erva-Mate. São Mateus do Sul-PR.** 1999 Disponível em <http://www.unicamp.br/nipe/rbma/ervmenub.htm> Acesso em 05 de nov 2004.

ARAÚJO, M. A., **Química de alimentos. Teoria e prática.** Imprensa Universitária de Universidade Federal de Viçosa, 1995, p. 247.

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

BARBOSA, D. P., FRICKS, A. T., ALVAREZ, H. M., SALOMÃO, G. C.; OLSEN, M. H. N.; JARDELINO, M. L.; ABARZÚA, E. G. O.; ANTUNES, O. A. C., **Eficiente epoxidación de 1,2-metilenodioxi-4[1'propenil]benzeno (isosafrol) utilizando peroxidases provenientes de fuentes vegetales (*Raphanus sativus* L. y *Brassica napus*).** In: XIX Simpósio Iberoamericano de Catálisis, México, p. 1764 – 1771, 2004.

BASSINI, V. L.; CAMPOS, A. M., **Desenvolvimento de extratos secos e nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill; aquifoliácea (erva-mate) visando à exploração do potencial vegetal como fonte de produtos.** Anais de 1º Congresso Sul-americano de erva-mate. EMBRAPA, Curitiba, PR. p. 69 – 83, 1997.

BERKAI, D.; BRAGA, C. A., **500 anos de história da erva-mate**. 2^a ed. Editora Cone Sul, 2000. 97p.

BRADFORD, M. M., **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding**. *Anal. Biochemistry*, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BROOHAERTS, W.; MCPHERSON, J.; LI, B.; RANDALL, E.; LANE, W. D.; WIERSMA, P. A., **Fast apple (*Malus x domestica*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf polyphenol oxidase activity assay for screening transgenic plants**. *Journal of Agricultural and Food Chemical*, v. 48, 5924 - 5928, 2000.

CESTARI, A. R.; VIEIRA, E. F. S.; SANTOS FILHA, M. M.; NASCIMENTO, A. J. P.; CLAUDIO AIROLDI, C., **Oxidação seletiva de catecol catalisada pela enzima polifenol oxidase extraída da jaca (*Artocarpus integrifolia*)**. *In: Anais 23 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Poços de Caldas, MG. 2000.

CHLAMTAC, E. B., **Enzimas no mate: polifenol-oxidase**. *Boletim do Instituto de Química Agrícola*, n. 39, p. 7 – 12, 1955.

CONESA, A.; PUNT, P. J.; van den HONDEL, C. A. M. J. J., **Fungal peroxidases: molecular aspects and applications**. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 143 – 148, 2002.

DUARTE-VÁZQUEZ, M. A; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B; REGALADO, C; WHITAKER, J. R., **Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* D.C.) Peroxidases**. *Journal of Agricultural and Food Chemical*, v. 48, n. 5, p. 1574 – 1579, 2000.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A., DARIVA, C.; OLIVEIRA, D., **Caracterização Físico-Química da erva-mate: influência das etapas do processo industrial.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 22, n. 2, p. 199 – 204, 2002.

FATIBELLO-FILHO, O.; CRUZ VIEIRA, I., **Uso Analítico de Tecidos e Extratos Brutos Vegetais como Fonte Enzimática.** Química Nova, v. 25, n. 3, p. 455 – 464, 2002.

FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T., **Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.).** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 43, p. 1138 – 1142, 1995.

GAZARYAN, I. G.; LAGRIMINI, L. M., **Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase.** Phitochemistry, v. 41, n. 4, p. 1029 – 1034, 1996.

GONZÁLES, E. M.; ANCOS, B.; CANO, M. P., **Partial characterization of polyphenol oxidase activities in raspberry fruits.** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 47, p. 4068 – 4072, 1999.

GONZÁLES, E. M.; ANCOS, B.; CANO, M. P., **Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits.** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 48, p. 5459 – 5464, 2000.

GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A., **Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, n. 1, p. 69 – 72, 2001.

HALDER, J.; TAMULI, P.; BHADURI, A. N., **Isolation and characterization of polyphenol oxidase from India tea leaf (*Camellia sinensis*)**. Journal Nutri. Biochem. v.9, p. 75 – 80, 1998.

IBGE – Banco de Dados – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em <http://www.sidra.gov.br> Acesso em 20 nov 2004.

KENNEDY, K; ALEMANY, K; WARITH, M., **Optimisation of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol**. Water SA, v.28, n.2, 2002.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M., **Princípios de Bioquímica**. 2^a ed., São Paulo : Editora Sarvier, 1995.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W., **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3, 1^a ed, São Paulo : Edgard Blücher Ltda, 2001, 594 p.

LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, C. A. **Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, n. 1, p. 98 – 104, 2001.

LIU, W.; FANG, J.; ZHU, W-M.; GAO, P-J., **Isolation, purification and properties of the peroxidase from the hull of *Glycine max* var HH2**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 79, p. 779 – 785, 1999.

LUPETTI, K. O. RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO, O., **Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por**

injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). Química Nova, v. 26, n. 2, p. 197 – 201, 2003.

MARTÍNEZ-PARRA, J.; MUÑOZ, R., **Characterization of betacyanin oxidation catalyzed by a peroxidase from *Beta vulgaris* L. Roots.** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 49, p. 4064 – 4068, 2001.

MAZUCHOWSKI, J. Z., **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill).** Empresa paranaense de assistência técnica e extensão rural. Curitiba:EMATER, 1991. 104p.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M., **Análise química quantitativa.** 2002. 6^a ed, 462p.

MOSELE, S. H., **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense.** Porto Alegre, 2002. 211p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Agronegócios) – Centro de Estudos e Pesquisa em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2002.

NAGAI, T.; SUZUKI, N., **Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.).** Journal of Food Science, v. 68, n. 1, p.16 – 20, 2003.

NIETSCHE, K.; CANÇADO, R. A.; KOHLER, R. G.; WASZCZYNSKYJ, N., **Análise sensorial de chimarrão pelo método de estimativa de magnitude.** Anais 2^o Congresso Sul-americano da Erva Mate, p. 169 – 170, 2000.

NÚÑEZ-DELICATO, E.; SOJO, M. M.; GARCÍA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A., **Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase.** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 51, p. 2058 – 2063, 2000.

OHYA, T; MORIMURA, H. S; MIHARA, T; IKAWA, T., **Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish.** Plant Science, n.125, p.137-145, 1997.

OWUSU-ANSAH, Y. J., **Polyphenoloxidase in wild rice (*Zizania palustris*).** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 37, p. 901 – 904, 1989.

PANEK, A. D., **Dosagem da Peroxidase nas folhas de mate.** Boletim do Instituto de Química Agrícola, n. 39, p. 7 – 12, 1955.

PÉREZ-GILABERT, M.; GARCÍA-CARMONA, F., **Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase.** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 48, p. 695 – 700, 2000.

PRAT KRICUM, S. D.; LEHMANN, E. A.; SCIPIONI, G. P.; ARGÜELLO, B. DEL V., **Actividad de peroxidasas en *Ilex dumosa*.** Anais 2º Congresso Sul-americano da Erva Mate, p. 348 – 351, 2000.

SAKHAROV, I. Y.; ARDILA, G. B.; SAKHAROVA, I. V.; ROJAS, A.; YU, O., **Peroxidasa de plantas tropicales.** Revista Colombiana de Química, v. 28, p. 1 – 6, 1999.

SANTOS, A. S., **Processo de oxidação microbiológica do isossafrol a piperonal**. Rio de Janeiro, 2003. 209p. Tese de Doutorado (Doutor em Bioquímica) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2003.

SILVERSTEIN, R. M., **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5^a ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1991. 387 p.

STATISTICA FOR WINDOWS, versão 5.5; Statsoft, 2000.

SOJO, M. M.; NUÑEZ-DELICADO, E.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCIA-CARMONA, F., **Oxidation of salsolinol by banana pulp polyphenol oxidase and its kinetic synergism with dopamine**. Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 48, p. 5543 – 5547, 2000.

VALDUGA, E., **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate**. Curitiba, 1994. 119p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 1994.

VALDUGA, A. T.; FINZER, J. R. D.; MOSELE, S. H., **Processamento de erva-mate**. Erechim : Edifapes, 2003. 182p.

van GELDER, C. W. G.; FLURKEY, W. H.; WICHERS, H. J., **Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases**. Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 41, p. 532 – 536, 1997.

VIEIRA, I. C.; LUPITTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O., **Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de**

carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). Química Nova, v. 26, n. 1, p. 39 – 43, 2003.

WILBERG, K. Q., **Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais.** Porto Alegre, 2003. 156p. Tese de Doutorado (Doutora em Engenharia) – Engenharia de minas, metalúrgica e de materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2003.

WISEMAN, A., **Manual de biotecnologia de los enzimas.** Zaragoza : Editorial Acribia, 1991. 444p.

3 ESTABILIDADE TÉRMICA DE OXIDASES DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill)

Neste capítulo estão demonstrados os resultados obtidos no estudo de avaliação da estabilidade térmica das oxidases presentes na erva-mate. Para a verificação da estabilidade, os extratos brutos foram submetidos a temperaturas de até 80°C, bem como armazenados em baixas temperaturas (até -80°C).

3.1 Referencial teórico

3.1.1 Estabilidade enzimática

A maior parte das enzimas possui atividade bastante específica, capaz de catalisar só uma determinada reação e de fazê-la só em um tipo de meio ou substrato. Algumas enzimas são mais versáteis. Entretanto, todas as enzimas operam dentro de um limite estreito de temperatura e pH (Cox, 1987). Grande parte das enzimas apresenta sua atividade ótima em uma faixa de 30 a 40°C, sendo que acima de 45°C pode ocorrer início da desnaturação (Fennema, 1993). Enquanto algumas enzimas perdem sua atividade catalítica a baixas temperaturas, outras suportam, ao menos durante um curto período de tempo, um intenso tratamento térmico (Belitz e Grosch, 1997).

As temperaturas em que as enzimas são estáveis ou lábeis são de grande importância para os processos biotecnológicos. Em alguns processos as enzimas devem ser lábeis para que possam ser completamente inativadas em temperaturas de 70 a 80°C. Por outro lado, enzimas que permanecem ativas em temperaturas acima de 100°C são necessárias para a moderna produção de glicose a partir de amido. Neste caso, a alta estabilidade enzimática é de valor econômico significativo e a procura por enzimas estáveis às altas temperaturas apresenta destaque em pesquisas enzimáticas (Uhlig, 1998).

Os efeitos da elevação da temperatura sobre as enzimas são muito complexos. Por exemplo, as temperaturas elevadas podem afetar os estados de dissociação dos grupos funcionais envolvidos na reação enzimática, a afinidade da enzima por ativadores e outras questões secundárias, como a solubilidade do oxigênio, que pode ser um dos substratos para a reação (Fennema, 1993).

Com o aumento da temperatura pode ocorrer, também, a desnaturação da proteína enzimática, que consiste na perda irreversível da conformação nativa, modificando a estrutura terciária e quaternária da proteína globular. Desta forma, a enzima passa de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. As enzimas possuem uma temperatura de resistência máxima à desnaturação. Entretanto, na desnaturação das enzimas pelo calor a relação tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico é de fundamental importância. Os efeitos que se observam nas enzimas apresentam papel relevante, uma pequena modificação da conformação do centro ativo pode conduzir à perda da atividade catalítica (Scriban, 1985; Belitz e Crosch, 1997).

Em alguns casos de tratamento térmico moderado de um produto alimentício pode ocorrer que a desnaturação da enzima não seja irreversível e, neste sentido, com o decorrer do tempo, a enzima pode ser reativada. Esse fenômeno foi observado para as enzimas particularmente resistentes ao calor: peroxidases, lipoxigenases e fosfatase alcalina do leite (Scriban, 1985).

Por outro lado, baixas temperaturas geralmente não apresentam efeito desnaturante sobre as enzimas. A repetição de transições sólido-líquido, através do congelamento-descongelamento, provoca várias perdas da atividade enzimática (Scriban, 1985). As enzimas continuam ativas durante o processo de congelamento, porém permanecem inativadas durante a conservação em congelador a -18°C , reassumindo sua atividade quando ocorre o descongelamento (Cox, 1987).

O congelamento e o descongelamento lento leva, em geral, a maiores perdas de atividade enzimática que o processo rápido (Fennema, 1993). Quando congeladas em temperaturas bastante baixas, a atividade enzimática cessa, porém só uma quantidade muito pequena de enzimas sofre dano irreversível por congelamento (Belitz e Crosch, 1997). Enzimas presentes em fontes vegetais, como

a peroxidase, mesmo quando inativadas por branqueamento, podem ter a atividade enzimática regenerada durante o armazenamento (Belitz e Crosch, 1997).

Polifenoloxidase

A polifenoloxidase não pertence ao grupo de enzimas estáveis a altas temperaturas. Mesmo curtas exposições em temperaturas entre 70 e 90°C podem ser suficientes para reduzir apreciavelmente a atividade desta enzima (Yemeniciog e Cemerog, 2003). Gomes e Ledward (1996) observaram que para polifenoloxidases de extratos de cogumelos e batatas e de tirosinase de cogumelos (Sigma), a exposição em temperatura de 60°C por 30 minutos é suficiente para total inativação.

Fujita *et al.* (1995), investigando a estabilidade da polifenoloxidase de repolho exposta por 10 minutos em temperaturas de 20 à 100°C, observaram que cerca de 40% da atividade se mantém após tratamento a 100°C. Em 1997, Fujita *et al.* constataram que a atividade de três isoenzimas da polifenoloxidase purificada de repolho, denominadas F-IA, F-IB e F-II, mantiveram 50% da atividade após tratamento térmico de 83, 62 e 65°C por 10 minutos, respectivamente.

Nagai e Suzuki (2003) purificaram polifenoloxidase de couve de bruxela e analisaram o comportamento da enzima estocada à 4°C. A atividade manteve-se no 1º dia de armazenagem e foi ativada no 2º e 4º dias. Porém, no 8º dia de estocagem ocorreu um decréscimo na atividade, sendo que no 14º dia somente cerca de 20% da atividade inicial foi observada.

Peroxidase

A peroxidase é conhecida como uma enzima termoestável, que pode ter sua atividade regenerada após tratamento térmico (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Em contraste ao fato da atividade da maioria das demais enzimas ser insignificante após tratamento à 80°C, as peroxidases toleram temperaturas de até 130°C durante

vários minutos (Cox, 1987). Sendo, dentre as oxidases, a enzima que mais resiste ao aquecimento, a peroxidase é utilizada em alimentos como indicadora da inativação das demais enzimas (Belitz e Crosch, 1997).

Entretanto, Fujita *et al.* (1995) observaram que somente cerca de 50% da atividade de peroxidase purificada de repolho permanece ativa após tratamento térmico de 70°C por 10 minutos. Em 1997 Fujita *et al.*, investigando a atividade das isoenzimas, F-IA, F-IB e F-II, da peroxidase purificada de repolho, observaram que após tratamento a 69, 57 e 53°C, por 10 minutos, respectivamente, a atividade das enzimas manteve-se em 50% da atividade inicial.

Vieira, Lupetti e Fatibello-Filho (2003) avaliaram a estabilidade de extratos brutos de abobrinha, rabanete, batata doce e nabo, com adição de PVP, armazenados em refrigerador à 4°C. Constataram que, com 80 dias de armazenamento, a atividade de peroxidase de todos os extratos não foi inferior à 80% da atividade inicial.

3.1.2 Considerações Gerais

O conhecimento das propriedades térmicas das enzimas permite que as mesmas sejam utilizadas em processos biotecnológicos específicos. Cada enzima possui características próprias, que podem contribuir ou inviabilizar sua aplicação. Este fato implica no estabelecimento prévio das condições de temperatura que a enzima suporta, sem sofrer desnaturação ou inativação.

Quando se pretende utilizar extratos enzimáticos brutos, um ponto de fundamental importância é o estabelecimento das condições de armazenamento dos mesmos. A condição mais indicada é a que permite que a atividade enzimática seja mantida com o passar do tempo.

Considerando que a literatura é escassa quanto às enzimas presentes em erva-mate e que polifenoloxidasas e peroxidases de fontes variadas apresentam comportamento térmico diferenciado, é relevante investigar o comportamento destas enzimas frente a diferentes temperaturas ao longo do tempo.

Neste sentido, esta etapa do trabalho tem por objetivo avaliar a condição de armazenamento, investigando a atividade enzimática de extratos brutos de erva-mate estocadas em temperaturas de 4, -4 e -80°C. É também foco do estudo o comportamento enzimático dos extratos expostos a moderadas e altas temperaturas (20, 40, 60 e 80°C), em intervalo de tempo de 0 à 30 minutos.

3.2 Material e Métodos

A descrição do material e equipamentos utilizados e dos procedimentos adotados para verificação da estabilidade enzimática dos extratos brutos de erva-mate estão demonstrados nesta seção.

3.2.1 Material

As folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) foram coletadas de árvores existentes nos jardins da URI – Campus de Erechim. As amostras para o armazenamento a baixas temperaturas foram coletadas em junho de 2004, no período de dormência das erveiras. Para a verificação da atividade enzimática em moderadas e altas temperaturas, as amostras foram coletadas em outubro de 2004. As amostras provém de plantas expostas ao sol, sem nenhum tipo de adubação. A coleta foi conduzida a partir de diferentes locais da planta – terço superior, médio e inferior, sendo realizadas entre 7 e 8 h da manhã, em dias sem chuva.

Os principais equipamentos utilizados para determinação da estabilidade térmica das oxidases de erva-mate estão relacionados a seguir:

- Liquidificador doméstico (Walita);
- Centrífuga (Nova Técnica NT815);
- Espectrofotômetro UV/Visível (Agilent Technologies 8453);

- Geladeira doméstica com temperatura de 4°C (Eletrolux Air Flow System DC47);
- Congelador com temperatura a -80°C (MDF- U3086S - Sanyo);
- Congelador doméstico com temperaturas de -4°C (Freezer Frost Free 270 - Brastemp);
- Banho ultratermostatizado (Marconi).

3.2.2 Métodos

Obtenção do extrato enzimático bruto

A obtenção do extrato enzimático foi realizada conforme determinado no Capítulo 2 deste trabalho, com a melhor condição de extração das enzimas. Em síntese, cerca de 40 g de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) foram homogeneizadas em liquidificador doméstico com 90 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, com adição 3% de PVP K90 (p/p). O homogenato foi filtrado em cinco camadas de gaze e centrifugado à 11.000 xg (8.400 rpm), à 4°C, por 30 minutos. A solução sobrenadante foi denominada extrato enzimático bruto e utilizado na determinação de atividade enzimática. As amostras foram mantidas em banho de gelo durante o processo de extração e medida de atividade.

Determinação da atividade enzimática dos extratos enzimáticos brutos

Polifenoloxidase (PFO): Para a determinação da atividade dos extratos brutos da PFO foi medida a variação de absorbância a 420 nm na reação de oxidação do pirocatecol, conforme definido no Capítulo 2 deste trabalho. A atividade foi determinada em uma mistura reacional contendo: 50, 75 ou 100 µL de extrato enzimático bruto, 100 µL de solução de pirocatecol 0,1 M preparada em solução de

Tween 80 0,1% e tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 9,0, para completar o volume de 3 mL. Uma unidade (U) de PFO foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de orto-quinona a partir de pirocatecol, na condição padrão. A atividade específica (U/mg de proteína) foi determinada de acordo com a quantidade de mg de proteína dos extratos brutos.

Peroxidase (POD): A atividade enzimática dos extratos enzimáticos brutos de POD foi determinada espectrofotometricamente medindo-se a variação de absorbância em 470 nm do tetraguaiacol formado na reação enzimática, conforme definido no Capítulo 2 deste trabalho. Para cada reação foram utilizados 50, 75 ou 100 μL do extrato enzimático bruto, 100 μL de solução de guaiacol 0,1 M preparada em solução de Tween 80 0,1%, 100 μL de solução de peróxido de hidrogênio 0,02 M e tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 4, para completar o volume de 3 mL. Uma unidade (U) de POD foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de tetraguaiacol a partir de guaiacol, na condição padrão. A atividade específica (U/mg de proteína) foi determinada de acordo com a quantidade de mg de proteína dos extratos brutos.

Determinação da proteína: O conteúdo de proteína da preparação enzimática foi determinado pelo método de Bradford (1976). Para as amostras armazenadas em baixas temperaturas, a medida de proteína foi realizada no dia da extração. Para as amostras submetidas a moderadas e altas temperaturas, a medida de proteína foi realizada para cada intervalo de tempo de exposição ao banho termostatizado, com intuito de verificar possíveis desnaturações da proteína com o tratamento térmico.

Estabilidade enzimática a baixas temperaturas

Para o acompanhamento da atividade das enzimas armazenadas em baixas temperaturas, foram realizadas extrações em triplicata. As amostras armazenadas em -4 e -80°C foram divididas em 15 frações de 500 μL para cada temperatura, e

descongeladas 1 hora antes da medida da atividade. As amostras armazenadas em 4°C foram colocadas em frascos de 30 mL e frações de 500 µL foram retiradas para a medida da atividade. A atividade enzimática foi verificada no dia da extração (dia 0) e com 1, 2, 4, 9, 14, 19, 24, 29, 39, 49, 59, 74, 99 e 149 dias de armazenamento.

Estabilidade enzimática a moderadas e altas temperaturas

As extrações para a verificação da estabilidade enzimática em moderadas e altas temperaturas foram realizadas em duplicata. Os extratos foram fracionados em tubos de ensaio, contendo 5 mL de amostra em cada tubo. Os tubos foram transferidos para um banho termostaticado, regulado em temperaturas de 20, 40, 60 e 80°C, em intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 30 minutos. Imediatamente após o tratamento térmico, na temperatura e tempo determinados, os tubos foram transferidos para um banho de gelo, para determinação da atividade enzimática.

Análise Estatística

Para verificar a influência das variáveis no armazenamento a baixas temperaturas e na exposição a moderadas e altas temperaturas, os dados foram avaliados por análise de variância juntamente com o teste de Tukey, adotando nível de confiança de 95%. As análises foram conduzidas no software Statistica® 5.0.

3.3 Resultados e Discussão

Os resultados da estabilidade dos extratos enzimáticos submetidos a altas temperaturas e estocados a baixas temperaturas são apresentados em atividade residual, que corresponde à porcentagem da média de atividade enzimática após o tratamento térmico em relação à atividade inicial, sem tratamento térmico. Os dados referentes à atividade enzimática das oxidases são apresentados no Apêndice B.

3.3.1 Estabilidade enzimática a baixas temperaturas

O comportamento da atividade da polifenoloxidase e peroxidase dos extratos brutos enzimáticos de erva-mate, armazenados em baixas temperaturas, foi verificado no decorrer de cerca de 150 dias. Foram realizadas extrações em triplicata para cada temperatura de armazenamento. Com o intuito de melhor analisar os resultados da atividade das enzimas armazenadas em baixas temperaturas, os dados foram plotados em gráficos que correlacionam a atividade com o tempo de armazenamento conforme apresentado nas Figuras 3.1 e 3.2, para a polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente.

Conforme demonstrado na Figura 3.1, a atividade da enzima polifenoloxidase armazenada nas três condições apresentou elevação nos primeiros dias de armazenamento. Nagai e Suzuki (2003) observaram este tipo de variação para polifenoloxidase de couve de bruxela armazenada à 4°C. No armazenamento à -4 e -80°C, a enzima apresentou comportamento bastante similar, sendo que os extratos mantiveram a atividade após 99 e 149 dias de armazenamento, respectivamente. Quando armazenada à 4°C, a polifenoloxidase apresentou diminuição contínua da atividade e após 149 dias a atividade residual foi de 51%.

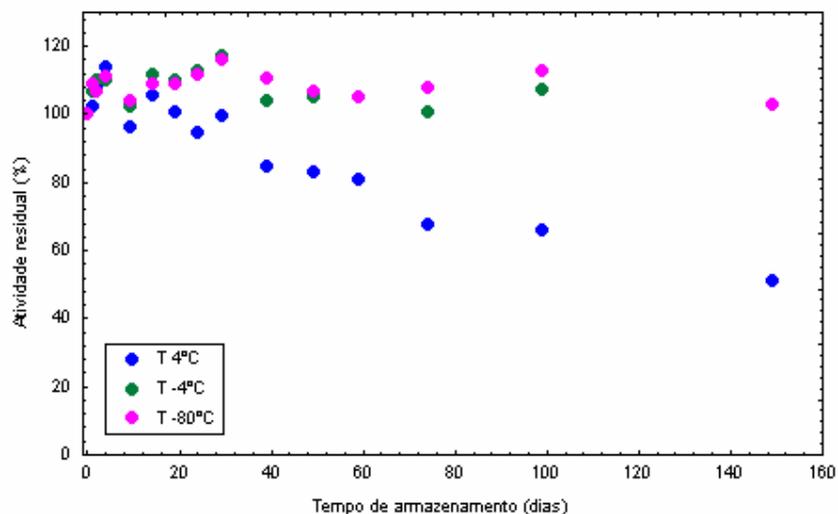


Figura 3.1 – Efeito do armazenamento em temperaturas de 4, -4 e -80°C nos extratos brutos de polifenoloxidase de erva-mate.

A atividade da peroxidase presente nos extratos enzimáticos brutos está demonstrada na Figura 3.2. Vieira, Lupetti e Fatibello-Filho (2003) avaliaram a atividade enzimática de extratos brutos de várias fontes vegetais, contendo 10% de PVP (Polyclar Super R), por 80 dias, armazenados em temperatura de 4°C. Entretanto, neste trabalho, a extração da peroxidase de erva-mate foi realizada com 7% de PVP K90 e em 5 dias de armazenamento à 4°C as amostras apresentaram elevada viscosidade, impedindo a retirada das alíquotas para verificação da atividade enzimática. Pode ser constatado na Figura 3.2 que em 4 dias de armazenamento à 4°C, a atividade residual da peroxidase é de cerca de 35%.

A atividade dos extratos armazenados em -4 e -80°C diminuiu nos primeiros 9 dias de armazenamento. Após o 14º dia a enzima recuperou gradativamente sua atividade, alcançando, após 99 dias de armazenamento, cerca de 78% de atividade residual. Tais resultados estão de acordo com a literatura, que indica que a peroxidase possui a habilidade de ter sua atividade regenerada, mesmo após tratamento térmico, quando refrigerada ou não (Belitz e Crosch, 1997; Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

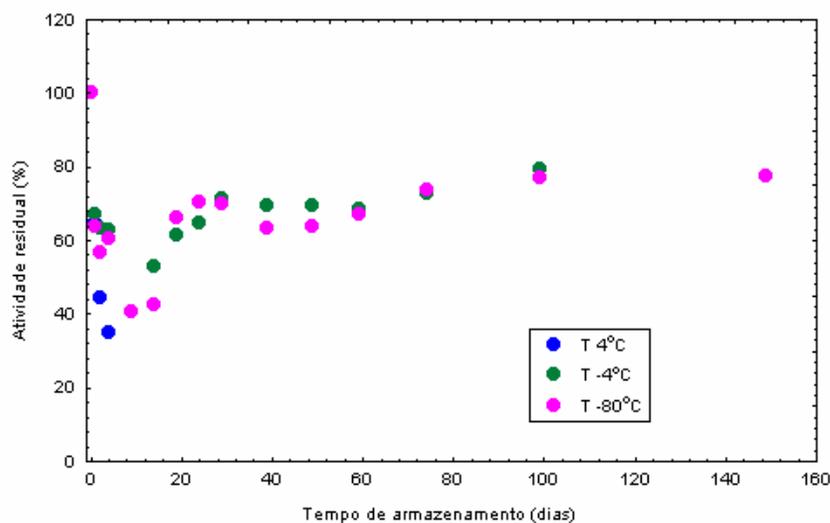


Figura 3.2 – Efeito do armazenamento em temperaturas de 4, -4 e -80°C nos extratos brutos de peroxidase de erva-mate.

A Tabela 3.1 apresenta a análise estatística do efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a atividade residual das enzimas polifenoloxidase e peroxidase obtidas a partir de erva-mate. Os valores apresentados nesta tabela referem-se aos valores médios da atividade em cada condição. Para tal, foi realizada uma análise de variância acoplada ao teste de Tukey a nível de 5%.

Tabela 3.1 – Análise estatística (análise de variância e teste de Tukey) na atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate armazenadas a baixas temperaturas.

	PFO	POD
Tempo (dias)		
0	100 a	100 a
1	106,5 a	66,0 b
2	108,5 a	54,9 c
4	111,7 a	52,7 cd
9	101,4 a	40,8 d
14	108,5 a	47,2 d
19	106,8 a	63,8 bc
24	107,0 a	67,6 b
29	110,3 a	70,8 b
39	99,8 ab	67,3 b
49	97,9 b	66,6 b
59	97,2 b	67,7 b
74	92,0 b	73,2 b
99	95,3 b	78,3 b
149	-	77,3 b
Temperatura (°C)		
4	92,8 b	61,7 b
-4	107,5 a	67,4 a
-80	108,9 a	66,3 a

a,b,c,d: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

Conforme demonstrado na Tabela 3.1, quando analisado o tempo de armazenamento, o extrato bruto de polifenoloxidase não apresenta diferença significativa na atividade enzimática até o 39º dia. Para o extrato enzimático de peroxidase, com o decréscimo da atividade nos primeiros dias, ocorre redução significativa da atividade, entretanto, com a regeneração da atividade, pode ser observado que do 19º até o 149º dia a atividade é semelhante a apresentada com 1 dia de armazenamento. Para ambas as enzimas, o armazenamento à -4 e -80°C são semelhantes e diferem significativamente do armazenamento à 4°C.

3.3.2 Estabilidade enzimática a moderadas e altas temperaturas

A estabilidade das enzimas presentes em erva-mate, frente ao tratamento térmico em temperaturas moderadas e altas, foi realizado em uma faixa de temperatura de 20 a 80°C, em duplicata. Os resultados da atividade da enzima polifenoloxidase são apresentados na Figura 3.3, que correlaciona a atividade enzimática com o tempo de exposição. Conforme demonstrado nesta figura a enzima mantém sua atividade quando ocorre tratamento térmico de 20°C, apresenta pequena variação com tratamento térmico de 40°C e queda contínua da atividade em 60°C. Após 6 minutos de exposição à 80°C ocorre inativação da enzima.

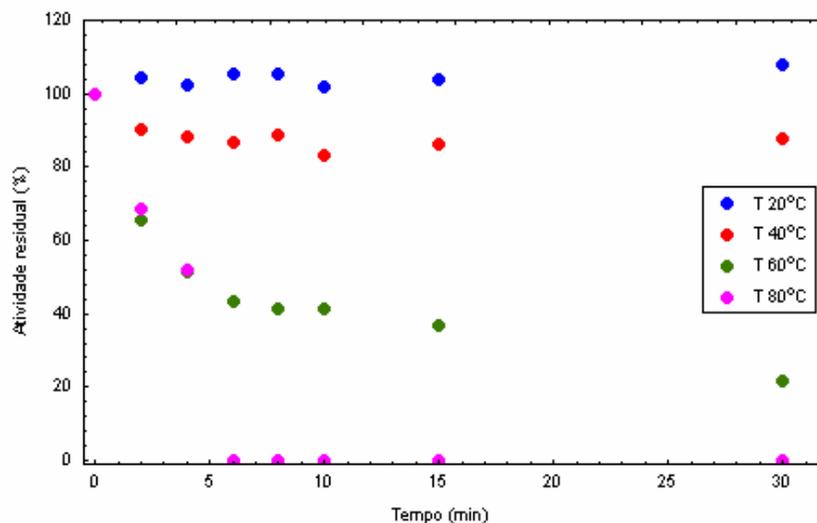


Figura 3.3 – Efeito do tratamento térmico na atividade de polifenoloxidase de erva-mate a 20, 40, 60 e 80°C.

Resultados similares foram obtidos por Valderrama, Marangoni e Clemente (2001), quando verificaram que a polifenoloxidase presente em extratos concentrados de casca de maçã gala e em polpa de maçã fuji, mantém cerca de 50% da atividade após tratamento a 60°C por 10 minutos. Quando tratadas a 75°C por 10 minutos, as amostras apresentaram cerca de 20% da atividade inicial. Entretanto, Yang *et al.* (2000), avaliando a estabilidade térmica de polifenoloxidase de polpa de banana, que apresentou temperatura ótima de 30°C, constataram que a

enzima mantém 80 e 60% de atividade após tratamento à 70°C, por 10 e 30 minutos, respectivamente, sendo inativada nos dois tempos de exposição quando exposta à 80°C. Nkya *et al.* (2003), investigando a estabilidade de polifenoloxidase de crisântemos, contataram que a enzima mantém a atividade em tratamento térmico de 50°C por 10 e 30 minutos e que em 80°C a enzima manteve menos de 10% da atividade em 10 minutos e foi inativada em 30 minutos. Owusu-Ansah (1989), avaliando a termoestabilidade de polifenoloxidase de arroz selvagem presente em extrato bruto, com temperatura ótima de 25°C, constatou que a atividade enzimática apresentou um comportamento razoavelmente estável à 60°C, e que a atividade decresce rapidamente à 90°C.

Na Figura 3.4 estão relacionados os resultados obtidos para a atividade de peroxidase em moderadas e altas temperaturas. Em tratamento térmico de 20°C a enzima manteve a atividade, mesmo com 30 minutos de exposição. Quando exposta à 40°C a atividade enzimática apresentou queda com 6 e 8 minutos de exposição ao tratamento térmico, apresentando, após 10 minutos, atividade similar à inicial. Em tratamento térmico de 60°C, após 30 minutos, a enzima apresentou cerca de 80% de atividade residual. Em 80°C a atividade enzimática decresceu com o aumento do tempo de exposição, apresentando em 30 minutos atividade residual de 16%.

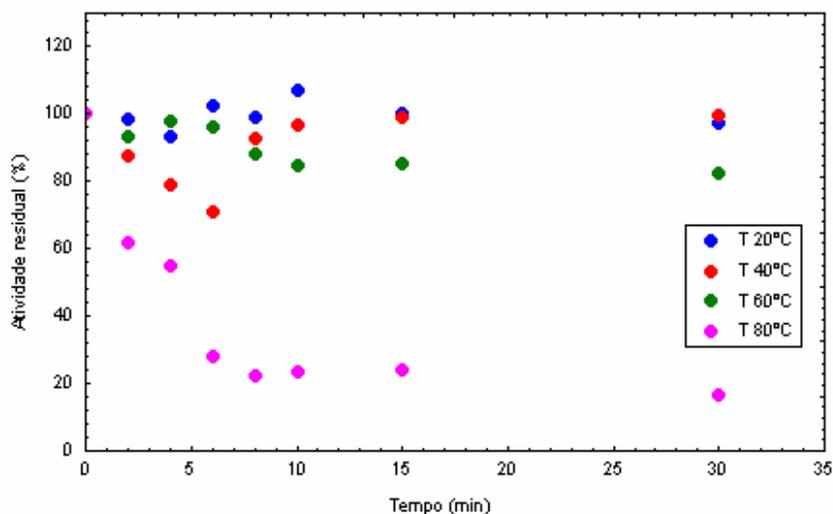


Figura 3.4 – Efeito do tratamento térmico na atividade de peroxidase de erva-mate a 20, 40, 60 e 80°C.

Xander *et al.* (2000) estudaram a cinética de inativação térmica de peroxidases presentes em erva-mate e em uma de suas adulterantes (*Ilex dumosa*). Folhas *in natura* foram submetidas a banho termostatizado por tempos de 60 a 600 segundos para 70°C e de 15 a 75 segundos para 75°C. Após o tempo de tratamento térmico as amostras foram submetidas a um banho de água com temperatura inferior à 10°C por 5 minutos. Folhas de erva-mate tratadas à 65°C apresentaram atividade residual por até 50 minutos de exposição e por 60 minutos para a adulterante. Entretanto, os autores observaram que com a elevação da temperatura (70 e 75°C) as amostras de *I. dumosa* são mais sensíveis à inativação térmica.

Valderrama, Marangoni e Clemente (2001) observaram um decréscimo quase contínuo, porém não-linear, na atividade de peroxidase de extratos concentrados de maçã tratados termicamente à 60, 65, 70 e 75°C. Neste trabalho, a peroxidase de erva-mate apresentou atividade elevada em tratamento térmico de até 60°C e não foi inativada em 80°C, apresentando comportamento que corresponde ao citado pela literatura, que caracteriza a enzima como termoestável (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).

A análise de variância para a atividade residual da estabilidade das oxidases de erva-mate a moderadas e altas temperaturas está demonstrada na Tabela 3.2. Os valores apresentados representam a média da atividade residual das enzimas a cada tempo de exposição e de temperatura. O teste de Tukey foi utilizado para verificar diferenças significativas a nível de 5%. Como pode ser observado na tabela, para a polifenoloxidase, o tempo de exposição afeta a atividade enzimática, entretanto não há diferença quando a exposição varia de 6 a 15 minutos, e de 10 a 30 minutos. Para a peroxidase, a exposição de 2 e 4 minutos afeta a atividade da enzima, sendo que no tratamento térmico de 6 a 30 minutos não ocorre diferença significativa na atividade enzimática.

Quanto ao efeito da temperatura observa-se que para a polifenoloxidase a variação de 20 a 80°C interfere significativamente na atividade da enzima. Para a atividade da peroxidase o tratamento térmico com temperaturas de 40 e 60°C não difere entre si, entretanto apresenta diferença quando comparado aos tratamentos de 20 e 80°C.

Tabela 3.2 – Análise estatística (análise de variância e teste de Tukey) da atividade residual de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate expostas a moderadas e elevadas temperaturas.

	PFO	POD
Tempo (min)		
0	100,0 a	100,0 a
2	82,4 b	86,6 b
4	73,8 c	82,1 b
6	59,5 d	75,1 c
8	59,5 d	76,2 c
10	57,4 de	78,1 c
15	57,4 de	77,8 c
30	55,7 e	74,5 c
Temperatura (°C)		
20	108,6 a	101,7 a
40	86,9 b	90,0 b
60	50,4 c	90,6 b
80	26,9 d	43,6 c

a,b,c,d,e: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

3.4 Conclusões parciais

A partir dos resultados obtidos para a estabilidade das enzimas armazenadas em baixas temperaturas e expostas a moderadas e altas temperaturas, pode-se concluir que:

- A polifenoloxidase mantém a atividade enzimática quando armazenada a temperaturas de -4 e -80°C ;
- O armazenamento da polifenoloxidase em temperatura de 4°C provocou queda da atividade após 29 dias;
- A peroxidase armazenada a baixas temperaturas apresentou uma queda acentuada da atividade nos primeiros dias de armazenamento, tendo sua atividade regenerada após 14 dias;
- A atividade da polifenoloxidase de extrato bruto de erva-mate não apresenta diferença significativa quando armazenada por até 39 dias;

- Após a regeneração da peroxidase de extrato bruto de erva-mate, a atividade enzimática apresentada do 19^o ao 149^o dia não difere significativamente da apresentada no 1^o dia do armazenamento;
- O armazenamento das oxidases em temperaturas de -4 e -80°C não diferem entre si e apresentam diferença significativa quando comparados ao armazenamento à 4°C;
- A atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase se mantém quando expostas a tratamento térmico de 20°C;
- O aumento do tempo de exposição, em temperaturas de 40 e 60°C, provoca a diminuição da atividade da polifenoloxidase;
- A inativação da polifenoloxidase ocorre após exposição de 6 minutos em tratamento térmico de 80°C;
- A enzima peroxidase mantém a atividade em tratamento térmico à 20 e 40°C, após 30 minutos de exposição;
- Em tratamento térmico de 60°C a peroxidase apresentou atividade residual de 80% após 30 minutos de exposição;
- A peroxidase de erva-mate, apesar de ter sua atividade diminuída, não é inativada em 80°C;
- A variação do tempo de exposição das enzimas aos tratamentos térmicos afeta significativamente a atividade das enzimas;
- A temperatura à que são submetidas as enzimas afetam significativamente a atividade enzimática.

3.5 Referências bibliográficas

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

COX, P. M., **Ultracongelacion de alimentos: Guía de la teoría y práctica.** Zaragoza : Acribia, 1987. 459 p.

FATIBELLO-FILHO, O.; CRUZ VIEIRA, I., **Uso Analítico de Tecidos e Extratos Brutos Vegetais como Fonte Enzimática.** Química Nova, v. 25, n. 3, p. 455 – 464, 2002.

FENNEMA, O. R., **Química de los alimentos,** Zaragoza : Acribia, 1993. 1095 p.

FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. **Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.).** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 43, p. 1138 – 1142, 1995.

FUJITA, S.; SAARI, N. B.; MAEGAWA, M.; SAMURA, N.; HAYASHI, N.; TONO, T., **Isolation and characterization of two phloroglucinol oxidases from cabbage (*Brassica oleracea* L.).** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 45, p. 59 – 63, 1997.

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

NAGAI, T.; SUZUKI, N., **Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.).** Journal of Food Science, v. 68, n. 1, p.16 – 20, 2003.

NKYA, E.; KOUNO, C.; LI, Y.; YANG, C.; HAYASHI, N.; FUJITA, S., **Purification and characterization of polyphenol oxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.).** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 51, p. 5467 – 5471, 2003.

SCRIBAN, E., **Biotecnologia**. Editora Malone:São Paulo. 498p., 1985.

UHLIG, H., **Industrial enzymes and their applications**. John Wiley & Sons:New York, 454 p., 1998.

OWUSU-ANSAH, Y. J., **Polyphenoloxidase in wild rice (*Zizania palustris*)**. Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 37, p. 901 – 904, 1989.

YANG, C.; FUJITA, S.; ASHRAFUZZAMAN, M. D.; NAKAMURA, N.; HAYASHI, N., **Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp**. Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 48, p. 2732 – 2735, 2000.

YEMENICIOG, A.; CEMEROG, B., **Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots**. Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 51, p. 2371 – 2379, 2003.

VALDERRAMA, P; MARANGONI, F; CLEMENTE, E., **Efeito do Tratamento Térmico sobre a Atividade de Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em Maçã (*Mallus comunis*)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.21, n.3, p.321-325, 2001.

VIEIRA, I. C.; LUPITTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O., **Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*)**. Química Nova, v. 26, n. 1, p. 39 – 43, 2003.

XANDER, C. G.; ACOSTA, L. M.; SCIPIONI, G. P.; ARGÜELLO, B. DEL V.,
**Inactivación térmica de peroxidases en *Ilex paraguariensis* A. ST. Hil. y
*Dumosa***. Anais 2º Congresso Sul-americano da Erva Mate, p. 366 – 369, 2000.

4 INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO MICROONDAS NA ATIVIDADE DE OXIDASES DE ERVA-MATE

O estudo da influência da exposição da erva-mate ao microondas é demonstrado neste capítulo. O processamento da erva-mate requer a inativação das oxidases, que provocam o escurecimento das folhas. A utilização de microondas para a inativação das enzimas e secagem da erva-mate pode constituir-se em um processo alternativo aos existentes. Desta forma, foram avaliados a atividade enzimática, os parâmetros de cor e a umidade das folhas de erva-mate expostas ao microondas.

4.1 Referencial Teórico

4.1.1 Erva-mate

A erva-mate apresenta grande importância no contexto econômico-cultural do sul do Brasil. O setor ervateiro compreende cerca de 450 municípios dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Cerca de 91% das indústrias brasileiras de erva-mate são classificadas como micro ou pequenas empresas, gerando cerca de 700.000 empregos diretos e indiretos. No Alto-Uruguai gaúcho estão instaladas cerca de 40 indústrias e 9.400 pequenas propriedades têm suas fontes de renda relacionadas com o cultivo da erva-mate (Maccari e Santos, 2000; Mosele, 2002).

O Rio Grande do Sul é o maior produtor de erva-mate, sendo responsável por 52,68% da produção nacional de erva-mate. A região noroeste do estado, onde está inserida a microregião de Erechim, produziu em 1995, 20% do total nacional (IBGE, 2002). Entretanto, para manter a produção, o Rio Grande do Sul é importador de matéria-prima, especialmente erva-mate nativa dos estados de Santa Catarina e Paraná. A importação desta matéria prima, reconhecida como produto suave, se

justifica em função da necessidade de misturá-la com a erva-mate proveniente de ervais cultivados, que possuem sabor mais amargo, a fim de obter um melhor *blend* para o produto (Mosele, 2002).

A erva nativa representa a erva-mate verde colhida em condições de floresta. Nos dias atuais, erval-nativo é designado para as ervaíras que estejam em condições de sombreamento parcial por outras espécies arbóreas, ou submetidas a níveis de radiação solar parcial devido ao tipo de cobertura (Mazuchowski, 2000).

4.1.2 Beneficiamento da erva-mate

O beneficiamento da erva-mate para chimarrão compreende a colheita, recepção, sapeco, secagem, trituração, classificação, armazenagem, moagem, mistura, embalagem e expedição (Valduga, Finzer e Mosele, 2003). A indústria da erva-mate evoluiu consideravelmente, passando de processos artesanais para equipamentos movidos com energia elétrica. Entretanto ainda não abriu mão da utilização do fogo para os processos de sapeco e secagem da erva-mate, porém com temperatura controlada (Berkai e Braga, 2000).

A colheita de erva-mate é efetuada com o uso de facão, tesoura, podão ou similar, observando-se as condições de manejo adequado (Valduga, Finzer e Mosele, 2003). A época ideal de podar as ervaíras é no inverno, antes de ocorrer a nova brotação. As folhas estão maduras e a ervaíra está em repouso fisiológico. Normalmente, colhe-se de maio a setembro, mas concentrando-se nos meses de junho e julho (Mazuchowski, 1991).

Logo após a colheita é realizado o sapeco, que consiste em uma etapa preliminar à secagem. Os processos de sapeco e secagem consistem em tratamentos térmicos seqüenciais, onde ocorre perda de umidade da erva-mate. No sapeco ocorre a retirada da umidade superficial e inativação do complexo enzimático das folhas (peroxidase e polifenoloxidase) (Valduga, 2002; Valduga, Finzer e Mosele, 2003).

O sapeco é realizado promovendo o contato das folhas de erva-mate com a chama direta proveniente da queima de lenha da fornalha. Os ramos deslocam-se em queda livre de uma altura de cerca de 1 metro, em escoamento cruzado com as labaredas da fornalha, o que acontece em cerca de 2 segundos. Segue-se o escoamento dos gases de combustão através das folhas no interior de um cilindro rotativo. O cilindro rotativo faz parte da etapa de sapeco: as folhas são elevadas por aletas dispostas na parede do cilindro até determinada altura e depois escoam em cascata, pela ação da força de arraste dos gases de combustão e direcionamento pela inclinação das aletas, propiciando o avanço das folhas (Valduga, Finzer e Mosele, 2003).

No processo industrial, durante o sapeco, ao sofrer ação das labaredas, as folhas estalam e perdem água de sua constituição. Consiste em uma operação violenta, que se opera nos tecidos da folha evitando que a erva se torne escura e de sabor desagradável depois de preparada (Valduga, Finzer e Mosele, 2003).

O sapeco deve ser efetuado com rapidez. A ação prolongada das chamas ou a falta de calor das labaredas pode causar o indesejável enegrecimento das folhas. Um sapeco imperfeito compromete o aroma, o sabor e o aspecto da erva-mate, alterando a qualidade do produto. Folhas negras indicam que não sofreram ação das chamas. As folhas queimadas demonstram que eles estiveram tempo demasiado sob a ação das chamas. Quando o sapeco é bem executado, as folhas tornam-se de coloração uniforme, verde-amareladas; se for mal executado, apresentam cor verde-escura, algumas folhas amareladas, outras pretas e, muitas, queimadas (Valduga, Finzer e Mosele, 2003). Considerando que, dos três principais atributos de controle de qualidade de erva-mate – cor, sabor e textura, a cor é o primeiro critério aplicado pelos consumidores na aceitabilidade do produto, o sapeco é determinante para a obtenção de um produto de qualidade (Rucker, 2000).

Schmalko e Alzamora (2001) avaliaram a cor da erva-mate durante o processamento. A análise de cor foi realizada com a utilização de colorímetro e foram avaliados os parâmetros L^* (luminosidade), a^* (eixo verde-vermelho) e b^* (eixo azul-amarelo). Foram avaliadas amostras de erva-mate *in natura*, após o sapeco,

após a primeira secagem e após a segunda secagem. Os resultados indicaram que as maiores mudanças na cor da erva-mate ocorrem com o processo de sapeco.

Woniaczuk *et al.* (2003) investigaram a cor, entre outros, como quesito de qualidade da erva-mate elaborada em duas ervateiras da província de Misiones (Argentina). As amostras foram coletadas na linha de produção logo após serem embaladas, no decorrer de 50 dias. As análises indicaram que o parâmetro de cor L* variou de 46,17 à 48,82 e o parâmetro b* apresentou pouca variação (médias de 16,26 e 15,90). Entretanto, foram observadas importantes variações para o parâmetro a* (entre -3,17 e -4,31), com coeficientes de variação de 6,97% e 6,88% para as ervateiras A e B, respectivamente.

Após o sapeco, o produto é triturado e conduzido ao secador. O secador rotativo faz a secagem contínua do produto e é composto de três tubos horizontais, um dentro do outro, sendo que a erva-mate triturada entra em uma das extremidades e sai na outra. O ar é aquecido em uma fornalha anexa e sugado por uma turbina, secando a erva-mate que transita no seu interior (Mosele, 2002).

A umidade das folhas após a operação de secagem deve ser inferior a 5% (b.u.). Valores de umidade acima do adequado podem promover o desenvolvimento de microorganismos durante o armazenamento (Valduga, 2002). Schmalko e Alzamora (2001) constataram que em folhas *in natura* de erva-mate a umidade é de cerca de 60% (b.s.), com o processo de sapeco a umidade das folhas gira em torno de 20%, diminuindo para cerca de 5% após finalizado o processo de secagem.

A erva-mate seca e triturada passa a denominar-se cancheada, que constitui-se no sub-produto para as indústrias de beneficiamento. A erva-mate cancheada é estocada em sacos, em tulhas ou a granel. Se o produto for destinado ao mercado interno, o tempo de armazenagem é de três a quinze dias, sendo então peneirado, misturado nas proporções adequadas de folhas, de goma e de palito de acordo com o tipo de produto desejado, respeitando a legislação vigente. Após a mistura, a erva-mate é moída e empacotada. Quando o produto é destinado ao mercado externo (principalmente Uruguai ou Chile), a erva-mate cancheada é depositada em sacos e armazenada de três meses a um ano. Esta armazenagem é necessária para que o

produto adquira a cor amarela e o sabor mais amargo característico da erva-mate para a exportação (Valduga, Finzer e Mosele, 2003).

Valduga (2002), utilizando equipamentos experimentais, realizou o sapeco de erva-mate em sapecador cilíndrico manual a gás e constatou que em 4 minutos a umidade das folhas foi de 8,4%. Este processo, seguido de secagem por 15 minutos em secador de bandeja vibrada, operando à temperatura e velocidade do ar de secagem de 70°C e 64 cm/s, proporcionou umidade final de 4,5%.

4.1.3 Utilização das microondas

As microondas constituem-se em ondas eletromagnéticas compreendidas entre o infravermelho e as ondas de rádio do espectro eletromagnético, cujas frequências específicas podem ser encontradas a 915 ou 2.450 MHz, de modo que não interfiram com radares ou outros aparelhos de telecomunicação. As microondas são geradas através de magnetrons, que convertem energia elétrica a baixas frequências (60 Hz) em campo eletromagnético com centros de cargas positivas e negativas, que mudam de direção bilhões de vezes por segundo. Em comprimento de onda de 2.450 MHz ocorrem oscilações de $4,9 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ e, como consequência, as moléculas sujeitas à radiação eletromagnética neste comprimento de onda são extremamente agitadas (Lew *et al.*, 2002).

A estrutura da molécula de água está constituída por um átomo de oxigênio, carregado negativamente, e dois átomos de hidrogênio, carregados positivamente. A molécula adquire, portanto, a forma de um dipolo elétrico. As microondas, ao penetrar no produto, interagem com os dipolos elétricos da molécula de água e, por forças de atração e repulsão entre regiões opostamente carregadas, promovem a sua rotação, resultando no rompimento das pontes de hidrogênio com as moléculas vizinhas de água, gerando o aquecimento por fricção molecular. Íons positivos e negativos dos sais dissolvidos nos alimentos geram aquecimento adicional pela interação com o campo elétrico, por migração através das regiões opostamente

carregadas do campo, promovendo também rompimento das pontes de hidrogênio das moléculas de água (Fellows, 1994).

O aquecimento por microondas é do tipo dielétrico, mas refere-se ao aquecimento que se produz em um material não condutor, devido principalmente ao efeito da polarização em frequências entre 300 MHz e 300 GHz (comprimentos de onda entre 1 m e 1 mm, respectivamente). Assim, as diferenças básicas entre os aquecimentos capacitativo e por microondas estão relacionadas às frequências empregadas e ao modo pelo qual o aquecimento é conduzido. No aquecimento capacitativo o material é usualmente colocado entre eletrodos, enquanto que no aquecimento por microondas um forno fechado é comumente empregado (Marsaioli Jr., 1991).

A frequência constitui fator capaz de influenciar a penetração das microondas. Nos microondas com frequência de 915 MHz (uso industrial) a profundidade alcançada é duas a três vezes superior aos de 2.450 MHz (uso doméstico) (Nunes, Germano e Germano, 1996). Atualmente, as microondas têm sido objeto de muitos estudos visando um amplo campo de aplicações. De acordo com Di Cesare *et al.* (2003) a transferência de energia das microondas causa uma rápida evaporação da água presente no tecido vegetal. O tempo de tratamento com microondas é curto e a oxidação fica limitada, o que provoca a preservação da cor, *flavor* e qualidade sensorial dos produtos.

O microondas apresenta como vantagens, além da penetração da energia de forma rápida, o controle instantâneo da temperatura, ser facilmente adaptável aos sistemas automatizados, dosagem do tratamento mais exata, dimensões reduzidas da câmara para uma capacidade produtiva equivalente, alta eficiência na conversão de energia elétrica em calor, limpeza facilitada, gradiente de temperatura desnecessário para efetivar o transporte da energia das microondas, ausência de efeitos térmicos residuais no ambiente e facilmente adaptável à quantidade e tipo de produto a tratar. Um estágio com energia de microondas pode ser introduzido dentro de um processo tecnológico sem grandes dificuldades, podendo-se combinar o sistema de microondas com os métodos convencionais (Escrivá, Garcia e Marsaioli, 1998).

Marsaioli Jr. (1991) desenvolveu um protótipo de secador cilíndrico-rotativo combinado com ar quente e microondas (operando a 2.450 MHz) para secagem de produtos granulados. Testes preliminares com arroz em casca natural, com pré-tratamento de hidratação, semelhante ao conduzido como uma das etapas de preparação do arroz parboilizado pelo processo convencional, indicaram que foram alcançados, no sistema aplicador das microondas, os efeitos de gelatinização do amido dos grãos e secagem em condição favorável para o beneficiamento. A parboilização foi obtida em um tempo significativamente mais curto que com o processo convencional.

O autor também investigou a substituição do equipamento convencional pelo protótipo com microondas na inativação enzimática de grãos de soja integral, utilizada como componente de formulação de rações animais. Amostras de soja limpa, obtidas comercialmente e de variedade não identificada, com teor de umidade inicial entre 11 e 12%, foram submetidas ao protótipo de forno com tempos de residência entre 2,5 e 5 minutos. Com o aumento da temperatura até 123°C o produto processado teve sua umidade reduzida em até 6,5% (b.s.). As análises indicaram que os resultados encontrados estão de acordo com os obtidos com os procedimentos normais adotados pela indústria para controle de qualidade. As amostras satisfizeram os requisitos de controle de qualidade estabelecidos, principalmente quanto à atividade ureática, que foi reduzida a valores abaixo de 30%.

Pastorini, Bacarin e Abreu (2002) compararam a secagem em microondas e estufa de folhas e raízes de feijão e milho e verificaram que em forno microondas o material vegetal foi seco entre 3 e 4 minutos e, quando utilizada a estufa, após 48 horas, não foi observada alteração significativa da massa seca do material vegetal. A utilização do microondas não alterou os teores de carboidratos solúveis totais, açúcares redutores e aminoácidos de extratos aquosos obtidos a partir das folhas e raízes secas.

Oomah *et al.* (1998) avaliaram o efeito do tratamento térmico sobre sementes de uva, realizado com a utilização de ar quente e microondas, na qualidade de seus óleos. O tratamento térmico foi efetuado com a exposição ao ar seco à 50°C por 2

horas e ao microondas por 9 minutos contínuos e por 24 minutos, com interrupções a cada 3 minutos para homogeneização das amostras. Os resultados indicaram que a exposição das sementes de uva ao microondas provoca mudanças na qualidade de seu óleo. Alguns efeitos positivos, como a diminuição dos níveis de clorofila e aumento de α -tocoferol e α - e γ -tocotrienóis, foram obtidos com a exposição ao microondas. Segundo os autores, o tratamento das sementes de uva em microondas é rápido e, com controle apropriado, pode ser utilizado para a elaboração de óleos de melhor qualidade.

A desidratação de macarrão tipo pene em microondas de escala piloto e comparado ao processo convencional demonstrou que para uma umidade final de cerca de 12,5% são necessários de 18 a 19 minutos em microondas, apresentando uma considerável redução de tempo do processo convencional (6,5 horas) (Bertili e Marsaioli, 2005).

Escrivá, Garcia e Marsaioli (1998) compararam, através da viscosidade, os efeitos da torrefação de cacau em forno elétrico rotativo e por um protótipo de forno rotativo contínuo de 2.450 MHz. As amostras torradas em microondas apresentaram um valor de viscosidade menor que aquelas torradas em forno elétrico, o que reduz a quantidade de manteiga de cacau necessária para o processamento do chocolate em geral. A análise sensorial indicou que o sabor das amostras de cacau torradas em microondas foi similar ao das amostras processadas com torrefação convencional.

Efeito de microondas na atividade enzimática

A irradiação de microondas pode alterar a taxa de reação catalisada por enzimas, embora o papel de alguns fatores não térmico em cada processo seja controverso (Roy e Gupta, 2003). Selmo, Treptow e Antunes (1996) realizaram o branqueamento de dois cultivares de maçã, comparando os processos realizados em aquecimento em isocalda ($^{\circ}$ Brix e acidez semelhantes aos da maçã), aquecimento em água e em 5 minutos de exposição ao microondas, tempo

suficiente para inativação das enzimas oxidativas. Constataram que o tratamento em microondas anterior à desidratação das maçãs é eficiente e o produto resultante é de boa qualidade, sendo que o rendimento foi 58% superior ao branqueamento em água.

A inativação de polifenoloxidase presente no pileo de cogumelos foi completa após 2 minutos de irradiação em microondas, sendo que no processo convencional de branqueamento são necessários cerca de 6 minutos para a inativação. Tanto a exposição ao microondas como o tratamento convencional, ambos por 5 minutos, não foram suficientes para a inativação da enzima presente no estipe do cogumelo (Devece *et al.*, 1999).

Gulati *et al.* (2003) avaliaram o efeito da aplicação de microondas na inativação de polifenoloxidase de chá verde. Amostras de chá foram submetidos a tratamentos em microondas doméstico e a polifenoloxidase foi inativada após 4 minutos quando exposta ao microondas dentro de um recipiente fechado e após 3 minutos quando exposta diretamente às microondas. Na exposição direta ao microondas, após 6 minutos, as folhas apresentaram escurecimento nas extremidades. A exposição das amostras a um forno e ao vapor também proporcionaram a inativação enzimática após 4 minutos de tratamento. Os autores constataram que não ocorre variação nos valores de fenóis e catequinas com a variação do tratamento térmico.

4.1.4 Considerações Gerais

O processo de industrialização de erva-mate, apesar da evolução que obteve nos últimos anos, continua a fazer uso do fogo para as etapas de sapeco e secagem da matéria-prima. A utilização de microondas para a secagem de produtos alimentícios e/ou inativação de enzimas vem sendo bastante investigada nos últimos anos. O microondas possui características que permitem um controle mais preciso dos processos, tornando-os, inclusive, mais rápidos.

O processo de sapeco tem como objetivo principal a inativação do complexo enzimático (oxidases), que provoca o escurecimento da erva-mate. Tal processo, ainda bastante rudimentar, apresenta sérios problemas de controle e, neste sentido, a utilização de microondas na indústria ervateira pode vir a contribuir para a padronização e controle de qualidade do produto.

Para a implantação de novas tecnologias na indústria, tais como a utilização de microondas, são necessários estudos prévios. Desta forma, esta etapa do trabalho teve por objetivo verificar a influência da exposição de erva-mate a pleno sol e sombreada ao microondas, verificando a atividade enzimática das oxidases, a umidade das amostras e a variação de cor da erva-mate no dia da exposição e com o armazenamento.

4.2 Material e Métodos

O procedimento adotado para a verificação da influência da exposição da erva-mate ao microondas sobre a atividade enzimática, coloração e umidade estão descritas neste item.

4.2.1 Material

As amostras de erva-mate foram obtidas em um experimento de campo montado nas dependências da Indústria e Comércio de Erva-Mate Barão Ltda, em Barão de Cotegipe, RS, onde o manejo das plantas é conduzido sob controle de adubação, intensidade de luz e idade da folha. Foram coletadas amostras de 7 plantas não adubadas, com intensidade de luz a pleno sol e controlada através de sombrites, onde 75% da luminosidade incidente é retida (plantas sombreadas). As folhas e os ramos das plantas foram homogeneizados para compor a amostra. Na Figura 4.1 pode se observado um esboço do experimento de campo que evidencia o controle de intensidade de luz.

A coleta das amostras foi conduzida a partir de diferentes locais das plantas – terço superior, médio e inferior, sendo realizada às 7 horas da manhã, em dias sem chuva. As amostras foram coletadas em dois dias do mês de junho de 2004, época de dormência das erveiras. No primeiro dia foram coletadas as amostras a pleno sol e no segundo dia as amostras sombreadas.



Figura 4.1 – Esboço do experimento de campo. (a) área a pleno sol e (b) área sombreada, onde 75% da luminosidade incidente é retida.

Os principais equipamentos utilizados para a verificação da influência da aplicação de microondas sobre a atividade do complexo enzimático (oxidase), sobre a umidade e a cor da erva-mate foram:

- Liquidificador doméstico (Walita);
- Centrífuga (Nova Técnica NT815);
- Espectrofotômetro UV/Visível (Agilent Technologies 8453);
- Congelador doméstico com temperaturas de -4°C (Freezer Frost Free 270 - Brastemp);
- Formo microondas doméstico à 2.450 MHz, modelo PMW – 101 (Philco);
- Colorímetro Minolta CR400;
- Estufa à 105°C , modelo 320 – SE (Fanem).

4.2.2 Métodos

Obtenção do extrato enzimático bruto

A obtenção do extrato enzimático foi realizada conforme determinado no Capítulo 2 deste trabalho, com a melhor condição de extração das enzimas. Resumidamente, cerca de 40 g de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) foram homogeneizadas em liquidificador doméstico com 90 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, com adição 3% de PVP K90 (p/v). O homogenato foi filtrado em cinco camadas de gaze e centrifugado à 11.000 xg (8.400 rpm), à 4°C, por 30 minutos. A solução sobrenadante foi denominada extrato enzimático bruto e utilizado na determinação de atividade enzimática. As amostras foram mantidas em banho de gelo durante o processamento de extração e medida de atividade. As extrações foram realizadas no dia da coleta da erva-mate (dia 0), e no 2º, 7º, 16º e 29º dia de armazenamento.

Determinação da atividade enzimática dos extratos enzimáticos brutos

Polifenoloxidase (PFO): Para a determinação da atividade dos extratos brutos da PFO foi medida a variação de absorbância a 420 nm na reação de oxidação do pirocatecol, conforme definido no Capítulo 2 deste trabalho. A atividade foi determinada em uma mistura reacional contendo: 50, 75 ou 100 µL de extrato enzimático bruto, 100 µL de solução de pirocatecol 0,1 M preparada em solução de Tween 80 0,1% e tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 9,0, para completar o volume de 3 mL. Uma unidade (U) de PFO foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de orto-quinona a partir de pirocatecol, na condição padrão. A atividade específica (U/mg de proteína) foi determinada de acordo com a quantidade de mg de proteína dos extratos brutos.

Peroxidase (POD): A atividade enzimática dos extratos enzimáticos brutos de POD foi determinada espectrofotometricamente medindo-se a variação de absorbância em 470 nm do tetraguaiacol formado na reação enzimática, conforme definido no Capítulo 2 deste trabalho. Para cada reação foram utilizados 50, 75 ou 100 µL do extrato enzimático bruto, 100 µL de solução de guaiacol 0,1 M preparada em solução de Tween 80 0,1%, 100 µL de solução de peróxido de hidrogênio 0,02 M e tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 4, para completar o volume de 3 mL. Uma unidade (U) de POD foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de tetraguaiacol a partir de guaiacol, na condição padrão. A atividade específica (U/mg de proteína) foi determinada de acordo com a quantidade de mg de proteína dos extratos brutos.

Determinação da proteína: O conteúdo de proteína da preparação enzimática foi determinado pelo método de Bradford (1976). Albumina de soro bovina foi utilizada como proteína padrão.

A medida de proteína foi realizada para cada tempo de exposição das folhas de erva-mate ao microondas.

Exposição ao microondas

As folhas de erva-mate foram pesadas (40 g) e divididas em duas frações. Cada fração foi colocada no microondas doméstico (Philco), potência de 800 W e frequência de operação de 2.450 MHz. A exposição ao microondas ocorreu em duas etapas, sendo que em cada uma o aparelho foi programado para metade do tempo total de exposição. Imediatamente após a primeira etapa, as folhas foram viradas e o aparelho ligado para completar o tempo de exposição. Os tempos de exposição ao microondas foram determinados em testes preliminares.

Todas as amostras foram submetidas ao microondas no dia da coleta. As amostras ficaram armazenadas, em caixas de papel individuais, em sala isolada, sem incidência de sol, à temperatura ambiente.

Colorimetria

A verificação da influência da exposição ao microondas na cor da matéria-prima foi conduzida com medidas em um colorímetro Minolta CR400. As leituras foram realizadas imediatamente após a trituração das folhas de erva-mate em liquidificador doméstico Walita. As leituras foram realizadas nos dias de extração das enzimas. Os parâmetros avaliados foram L^* (luminosidade), de 0 à 100; a^* e b^* (parâmetros de cor), de 0 à 60. Segundo o fabricante, o parâmetro de cor a^* positivo indica cor vermelha e negativo cor verde, b^* positivo indica cor amarela enquanto o negativo cor azul. Para o parâmetro L^* , 0 corresponde a cor escura e 100 a cor clara, conforme demonstrado na Figura 4.2.

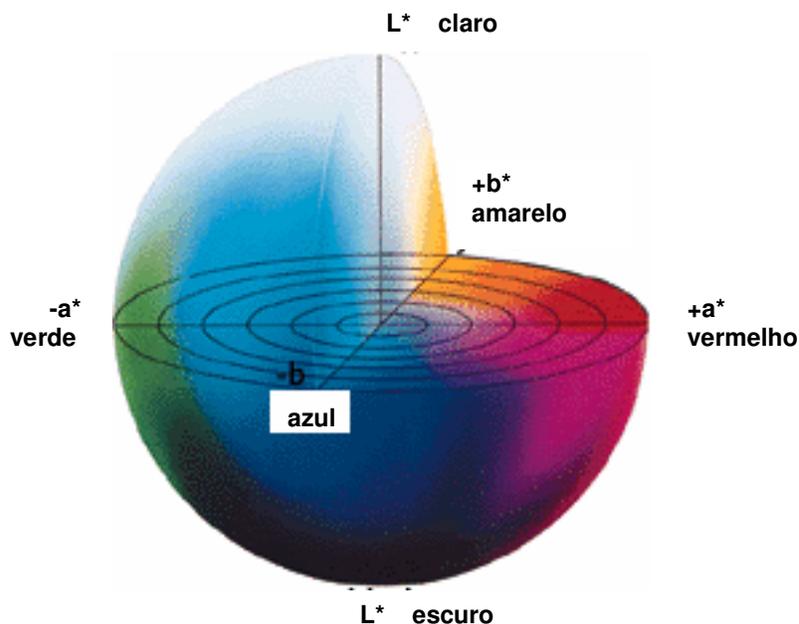


Figura 4.2 – Diagrama de cores para análise de colorimetria.

Para verificação da variação de cor do dia 0 para os demais dias, foram calculados os valores de ΔE (eq. 4.1) conforme definido pelo fabricante:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4.1)$$

onde: ΔL^* é a variação da luminosidade, Δa^* a variação da cor verde e Δb^* a variação da cor amarela.

Umidade

As determinações de umidade foram realizadas conforme metodologia descrita pelo IAL (1985). As amostras foram expostas em estufa à 105°C por 8 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Testes preliminares

Para a determinação dos tempos de exposição ao microondas foram realizados testes preliminares. As extrações foram realizadas com erva-mate, a pleno sol, nos dias de colheita. Foram realizadas análises de atividade enzimática de polifenoloxidase e peroxidase, umidade e colorimetria.

A Figura 4.3 apresenta os resultados preliminares de atividade residual e umidade (%). Pode ser constatado que a polifenoloxidase é inativada após 20 segundos de exposição ao microondas, apresentando uma umidade de cerca de 60%. A enzima peroxidase, após 300 segundos de exposição, com umidade de 8%, mantém a atividade enzimática residual de cerca de 5%. O tempo de exposição ao microondas provoca a diminuição da umidade nas folhas de erva-mate. Conforme pode ser observado na Figura 4.3, a erva-mate *in natura* apresenta umidade de cerca de 65% e após exposição de 300 segundos ao microondas a umidade diminui cerca de 85%. A exposição ao microondas por tempos superiores a 90 segundos provoca uma aceleração da perda de umidade das amostras de erva-mate. Não foi realizado teste de umidade para folhas de erva-mate exposta ao microondas por 250 segundos.

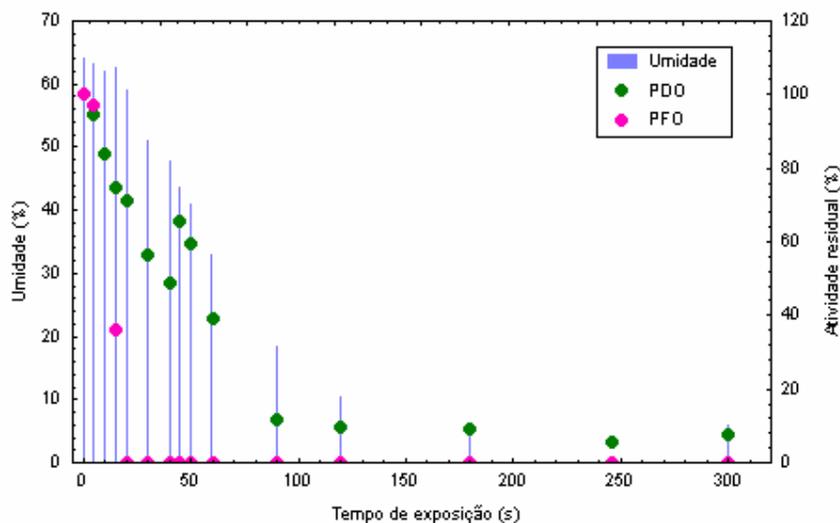


Figura 4.3 – Influência da exposição ao microondas na atividade enzimática de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.

Os parâmetros de cor a^* negativo e b^* positivo, observados para as folhas de erva-mate, indicam cor verde e amarela, respectivamente, como pode ser observado na Figura 4.4. Valores dos parâmetros de 0 à 20 são localizados na região denominada acromática (região central do diagrama).

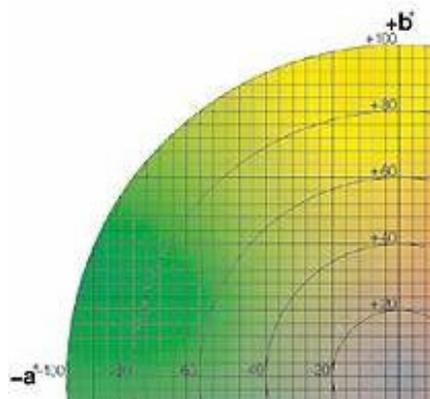


Figura 4.4 – Parte de a^* e b^* do diagrama de cores que corresponde à coloração apresentada pelas folhas de erva-mate.

Na Tabela 4.1 são apresentados os resultados obtidos para a análise de cor das amostras de erva-mate submetidas ao microondas. Conforme demonstrado na

tabela, ocorre variação de cor proporcional ao aumento do tempo de exposição ao microondas.

Tabela 4.1 – Influência da secagem de erva-mate em microondas nos parâmetros e variação da coloração.

Parâmetros	Tempo de exposição ao microondas (s)					
	0	15	30	60	120	300
L*	20,76	34,81	39,38	39,71	44,75	42,31
a*	-2,76	-11,95	-12,41	-12,58	-12,06	-12,57
b*	15,45	25,47	25,42	27,21	26,66	29,88
ΔE		19,55	23,22	24,36	28,07	27,73

Na Figura 4.5 pode ser observado o aspecto das folhas de erva-mate em alguns tempos de exposição ao microondas. As folhas expostas ao microondas por tempos de 10 a 20 segundos apresentaram manchas escuras e, ao entrarem em contato com o ar do ambiente, o escurecimento das mesmas foi acentuado. As amostras expostas ao microondas por 300 segundos sofreram torração de parte das folhas. As folhas expostas em intervalos de 30 a 250 segundos apresentaram coloração e odor característicos de erva-mate.

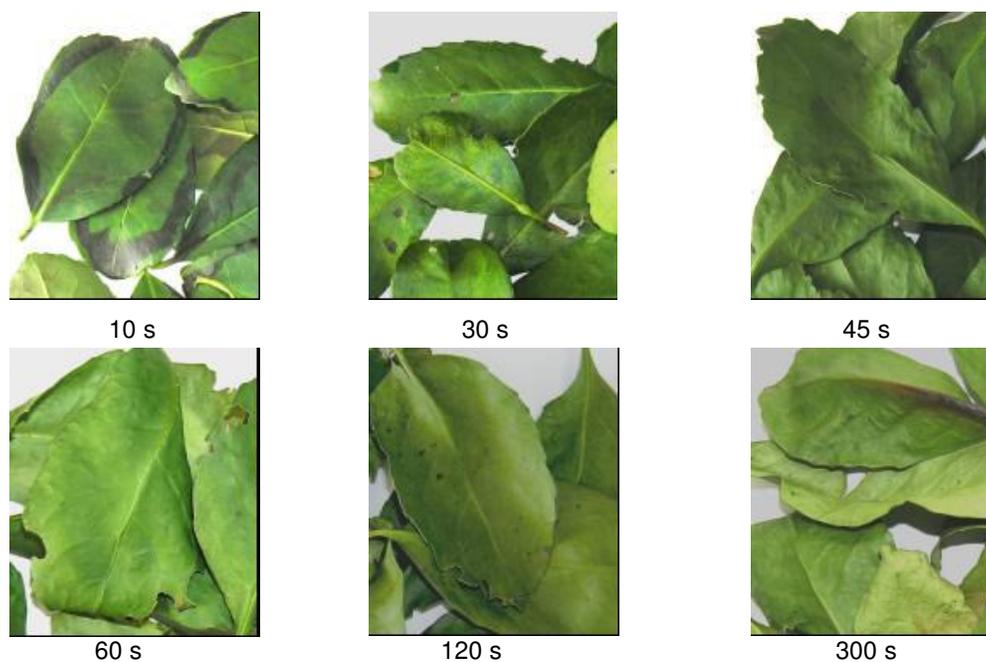


Figura 4.5 – Aspecto das folhas de erva-mate em função de diferentes tempos de exposição ao microondas.

A partir dos resultados preliminares, optou-se por expor as amostras de erva-mate ao microondas por tempos de 0, 15, 30 e 60 segundos para polifenoloxidase, e de 0, 15, 30, 60, 90 e 220 segundos para a peroxidase. Após a exposição ao microondas foi verificado o efeito do armazenamento sobre a atividade das oxidases, a umidade e a coloração das amostras.

4.3 Resultados e Discussão

Os resultados da verificação da influência da secagem em microondas sobre a atividade enzimática e cor da erva-mate a pleno sol e sombreada são demonstrados nesta seção. Os resultados são apresentados como atividade residual, ou seja, a atividade foi calculada com base na atividade enzimática apresentada pela amostra de erva-mate sem exposição ao microondas no dia da coleta (dia 0), denominada atividade inicial. No Apêndice C estão demonstradas as medidas de atividade das enzimas.

4.3.1 Influência da exposição ao microondas sobre a atividade da polifenoloxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada

Os resultados obtidos para a atividade de PFO de erva-mate a pleno sol e sombreada sem exposição ao microondas são demonstrados na Figura 4.6. A atividade enzimática inicial foi de $2.455,13 \pm 119,61$ e de $2.478,12 \pm 155,43$ U/mg de proteína para as amostras a pleno sol e sombreadas, respectivamente. Desta forma, a diferença no cultivo das erva-mates (a pleno sol e sombreada) não apresentou influência na atividade da polifenoloxidase.

Pode ser observado na Figura 4.6 que ocorre inativação enzimática com 16 dias de armazenamento da erva-mate *in natura*. Na erva-mate a pleno sol, não submetida ao microondas, ocorreu diminuição de 5% da atividade. A atividade da PFO de erva-mate sombreada teve sua atividade residual de 87% no 2º dia. No 7º

dia a atividade residual foi de cerca de 5%. As amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada não apresentaram atividade enzimática a partir do 16º dia.

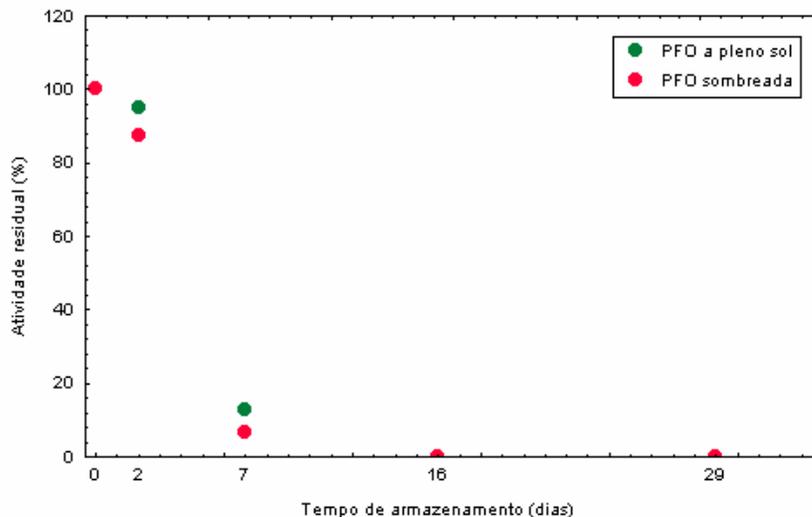


Figura 4.6 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate *in natura* a pleno sol e sombreada.

A influência da exposição das amostras de erva-mate a pleno sol e sombreadas por 15 segundos ao microondas pode ser observada na Figura 4.7.

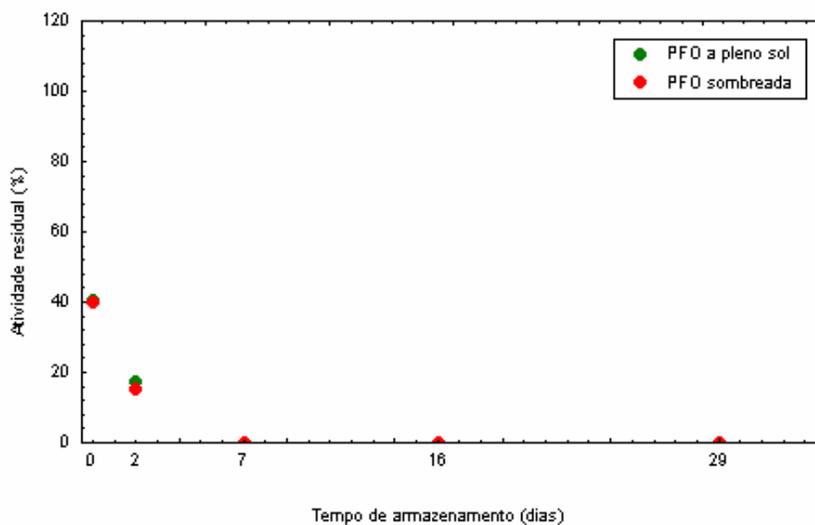


Figura 4.7 – Efeito da exposição ao microondas por 15 segundos na atividade de polifenoloxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.

Conforme pode ser observado na Figura 4.7, a exposição das folhas de erva-mate a pleno sol provocou um decréscimo na atividade da polifenoloxidase e no 7º dia as amostras não apresentaram atividade enzimática. Após exposição de 15 segundos nas amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada a atividade residual foi de cerca de 40%. No 2º dia a atividade residual da erva-mate a pleno sol foi cerca de 13%.

Exposições ao microondas por tempos de 30 e 60 segundos foram suficientes para inativar a polifenoloxidase nas amostras de erva-mate a pleno e sombreada. Entretanto, as amostras foram armazenadas e a extração enzimática foi conduzida como para as demais. Não foi constatada atividade de polifenoloxidase em nenhuma das extrações com erva-mate exposta 30 e 60 segundos ao microondas.

Nas Figuras 4.8 e 4.9 estão demonstradas as atividades de polifenoloxidase de amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada, respectivamente, expostas ao microondas e armazenadas no decorrer de 29 dias. A atividade da polifenoloxidase apresentou uma queda contínua com o aumento do tempo de exposição e tempo de armazenamento. Exposições ao microondas de 30 segundos foram suficientes para inativar a enzima.

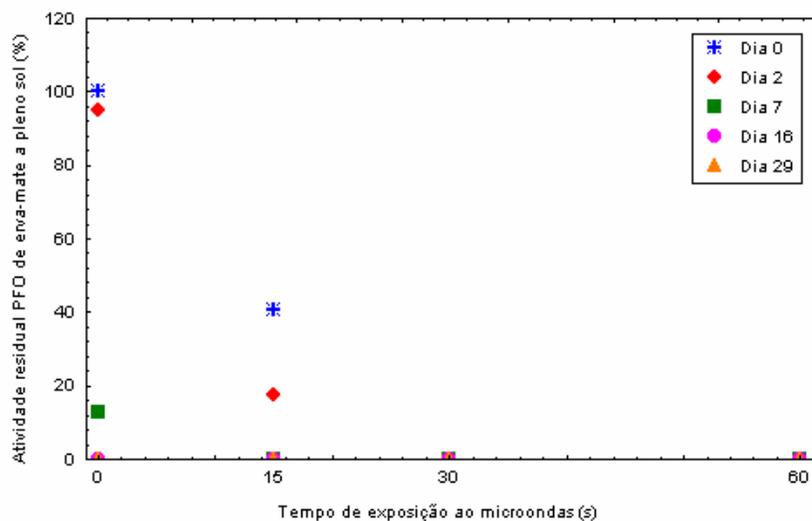


Figura 4.8 – Efeito da exposição ao microondas sobre a atividade da polifenoloxidase de erva-mate a pleno sol.

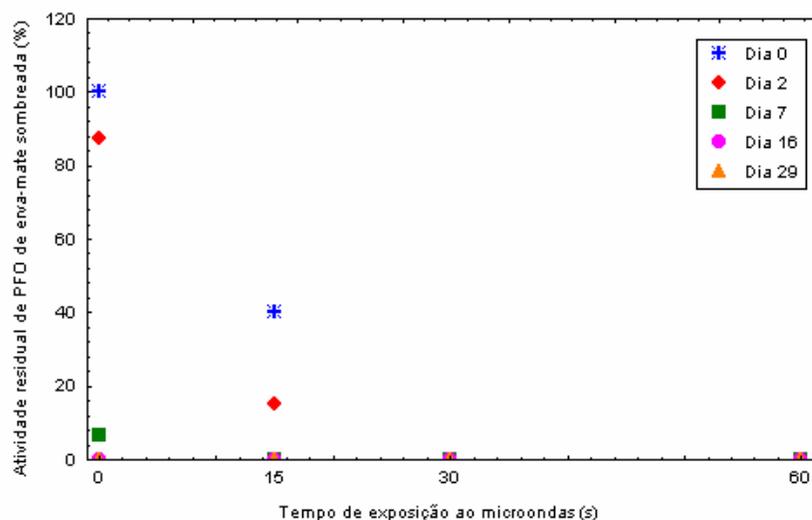


Figura 4.9 – Efeito da exposição ao microondas sobre a atividade da polifenoloxidase de erva-mate sombreada.

Os resultados relacionados à inativação da polifenoloxidase de erva-mate, obtidos neste trabalho, condizem com os apresentados na literatura por Selmo, Treptow e Antunes (1996) e Devece *et al.* (1999), que inativaram a polifenoloxidase após exposição ao microondas.

4.3.2 Influência da exposição ao microondas sobre a atividade da peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada

A atividade inicial de peroxidase de amostras de erva-mate a pleno sol foi de $19,39 \pm 0,26$ U/mg de proteína diferenciando da atividade das amostras sombreadas: $16,02 \pm 0,51$ U/mg de proteína. Como apresentado na seção anterior, tal fato não foi observado para a enzima polifenoloxidase, que não apresentou diferença entre a atividade das amostras a pleno sol e sombreada.

Nesta etapa do trabalho as amostras obtidas de erva-mate a pleno sol e sombreada apresentaram atividade de peroxidase superior à encontrada no processo de determinação da melhor condição de extração e medida de atividade, realizado no período de crescimento das erva-mates. Rodrigues *et al.* (2002), ao

avaliarem as influências nos processos fisiológicos e bioquímicos da enxertia em porta-enxertos de *Prunus sp.*, em diferentes períodos de crescimento e tecidos, observaram maior atividade da peroxidase na casca dos porta-enxertos no período de dormência. No lenho, tanto no período de crescimento vegetativo como no de dormência, não houve variação na atividade da enzima.

A atividade e umidade da peroxidase de erva-mate *in natura*, a pleno sol e sombreada, estão demonstradas na Figura 4.10. A atividade enzimática foi reduzida do dia 0 para o 29º dia, entretanto não ocorreu inativação, como ocorreu para a atividade da polifenoloxidase. A atividade da peroxidase apresentou acréscimo no 2º dia para ambas as amostras. Após 29 dias as amostras a pleno sol apresentaram atividade residual de 29% e as sombreadas 25%.

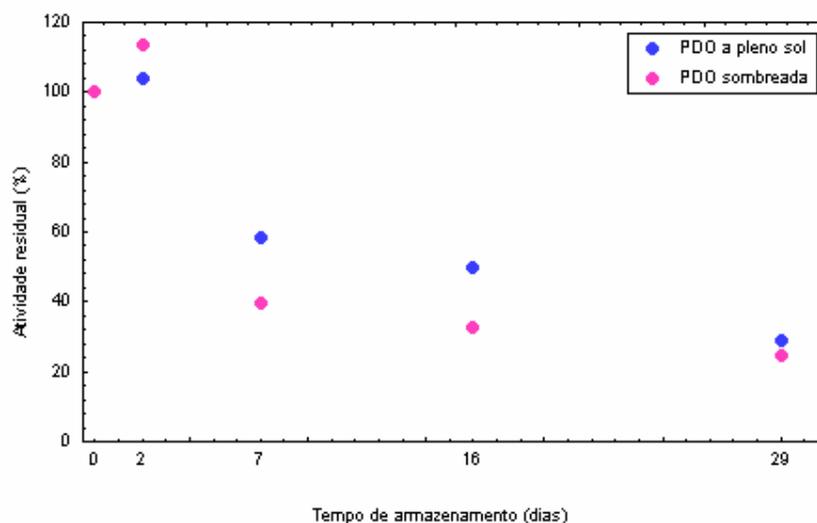


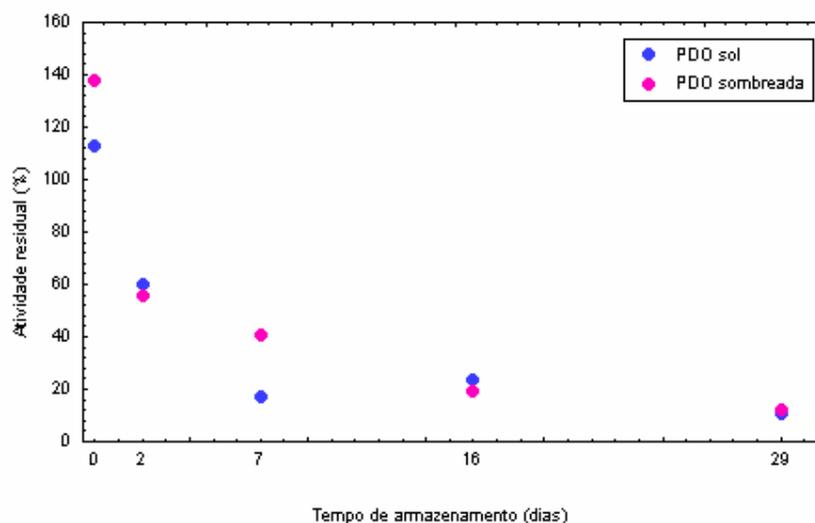
Figura 4.10 – Atividade de peroxidase de erva-mate *in natura* a pleno sol e sombreada.

O efeito de 15 segundos de exposição de microondas sobre as amostras de erva-mate é apresentado na Figura 4.11. A atividade da peroxidase de ambas as amostras de erva-mate aumentou com a exposição de 15 segundos ao microondas. Segundo Roy e Gupta (2003) a irradiação de microondas pode ser utilizada para acelerar reações enzimáticas através do efeito do aquecimento. De acordo com Lew *et al.* (2002) a hidrólise de um peptídeo, que pelo método tradicional consiste em

tratar o peptídeo com HCl 6 M à 110 – 120°C, por 24 horas, foi realizado por Yu *et al.*, em 1999, em 7 minutos com a ajuda de um forno de microondas doméstico.

Conforme demonstrado na Figura 4.11, a atividade aumenta com a exposição ao microondas, ocorrendo decréscimo acentuado com 2 dias de armazenamento. No 2º dia, a atividade foi de 60% e de 56% da atividade inicial, para a amostra a pleno sol e sombreada, respectivamente. No 29º dia, a amostra a pleno sol apresentou atividade de cerca de 10% e a erva-mate sombreada 12% de atividade residual.

Figura 4.11 – Efeito da exposição ao microondas por 15 segundos na atividade de



peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.

A exposição das folhas de erva-mate por 30 segundos de microondas é apresentada na Figura 4.12. A exposição por 30 segundos ao microondas provocou perda de atividade da enzima, provavelmente em decorrência do calor produzido pela exposição, ocorrendo posterior regeneração de parte da atividade. Com a exposição de 30 segundos as amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada apresentaram atividade residual de 65 e 80%, respectivamente no dia 0. No 16º dia a atividade da peroxidase da amostra a pleno sol apresentou aumento de atividade, atingindo resultado próximo à atividade do dia 0. A erva-mate sombreada também apresentou aumento de atividade no 16º dia, porém menos acentuado.

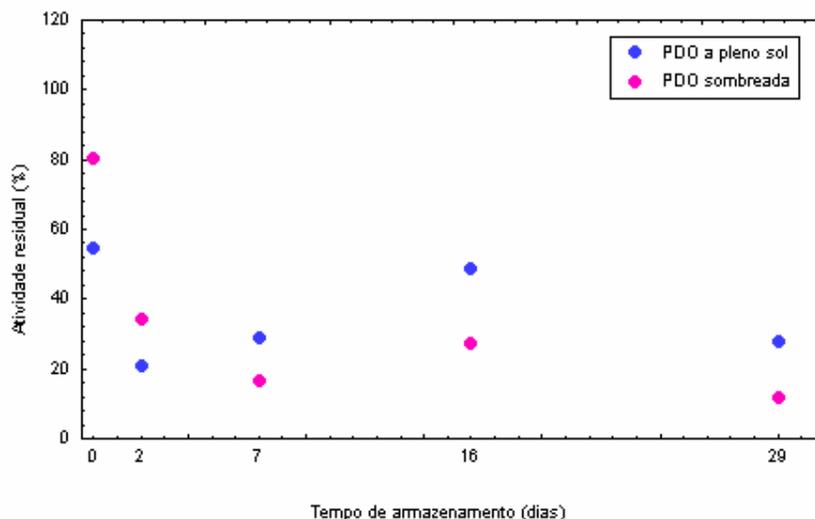


Figura 4.12 – Efeito da exposição ao microondas por 30 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.

Na Figura 4.13 pode ser observado que a exposição ao microondas por 60 segundos provocou a queda da atividade da POD, com uma pequena regeneração no 16º dia. As amostras a pleno sol e sombreada apresentaram a mesma tendência enzimática. A erva-mate a pleno sol apresentou atividade residual de cerca de 35%. A atividade decaiu no 2º dia e apresentou uma elevação no 7º e 16º dia. Para as amostras sombreadas a atividade residual foi de 48% e decresceu até o 7º dia. No 16º dia a atividade foi de 35%. A atividade de ambas voltou a decrescer no 29º dia.

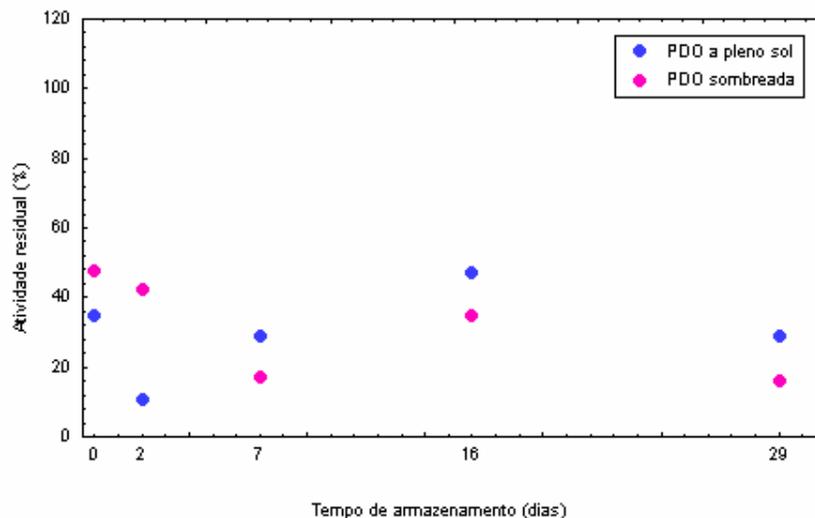


Figura 4.13 – Efeito da exposição ao microondas por 60 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.

A enzima peroxidase, após exposição por 120 segundos ao microondas, apresentou diminuição de atividade, entretanto, para a amostra de erva-mate a pleno sol no 29^o dia a atividade apresentada foi superior a do dia 0, conforme demonstrado na Figura 4.14. Com a exposição por 120 segundos, a atividade residual da peroxidase foi de 12% para erva-mate a pleno sol e de 35% para a sombreada. A atividade enzimática no 7^o dia foi semelhante para ambas as amostras, sendo que as mesmas apresentaram elevação da atividade no 16^o dia.

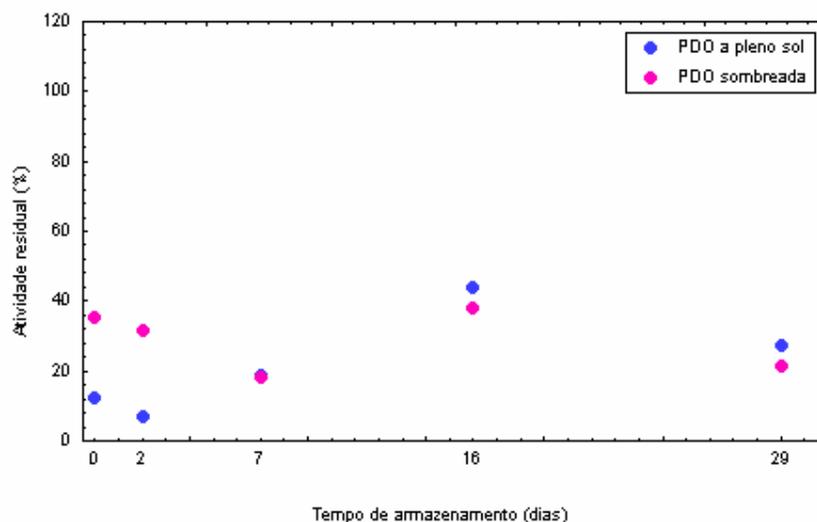


Figura 4.14 – Efeito exposição ao microondas por 120 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.

Na Figura 4.15 estão demonstrados os efeitos da exposição ao microondas por 220 segundos. Este tempo de exposição foi suficiente para inativar a enzima presente na erva-mate a pleno sol, entretanto a atividade apresentou regeneração a partir do 7^o dia de armazenamento, sendo que no 29^o dia de armazenamento a atividade enzimática foi superior à apresentada no dia 0 pela amostra de erva-mate sombreada. Conforme demonstrado na figura, a amostra de erva-mate sombreada apresentou atividade residual de 32% no dia 0. A amostra sombreada teve a atividade enzimática da peroxidase diminuída até o 7^o dia. No 29^o dia a atividade residual foi de 17%.

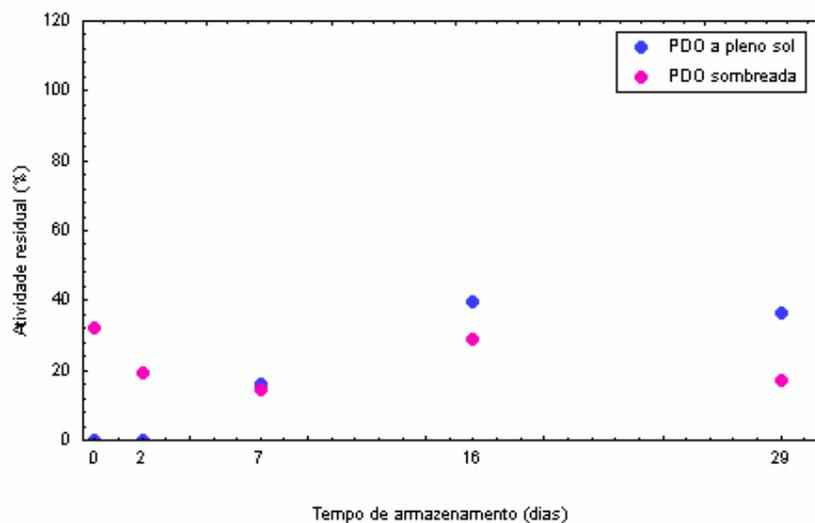


Figura 4.15 – Efeito da exposição ao microondas por 220 segundos na atividade de peroxidase de erva-mate a pleno sol e sombreada.

Pode ser observado da Figura 4.11 até a Figura 4.15 que a peroxidase de erva-mate apresenta uma mesma tendência. Nestes tempos de exposição, 30, 60, 120 e 220 segundos, a enzima apresenta perda de atividade e, com o decorrer do tempo de armazenamento ocorre regeneração de parte da atividade. Nestas amostras a atividade volta a decrescer no 29º dia de armazenamento. Os resultados apresentados estão de acordo com a literatura. A peroxidase é uma enzima termoresistente, com habilidade de regenerar sua atividade após tratamento térmico (Fatibello-Filho e Vieira, 2003). Para todos os tempos de exposição a peroxidase presente em erva-mate a pleno sol sofreu maior perda de atividade, entretanto, quando regenerada, a atividade apresentada foi superior à das amostras de erva-mate sombreada.

A atividade de peroxidase apresentada pelas amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada, expostas ao microondas e armazenadas por 29 dias, está demonstrada nas Figuras 4.16 e 4.17. Nas figuras pode ser observado uma tendência semelhante para ambas as amostras. A inativação da peroxidase ocorreu com exposição ao microondas de 220 segundos das amostras sombreadas, ocorrendo regeneração da atividade a partir do 7º dia de armazenamento.

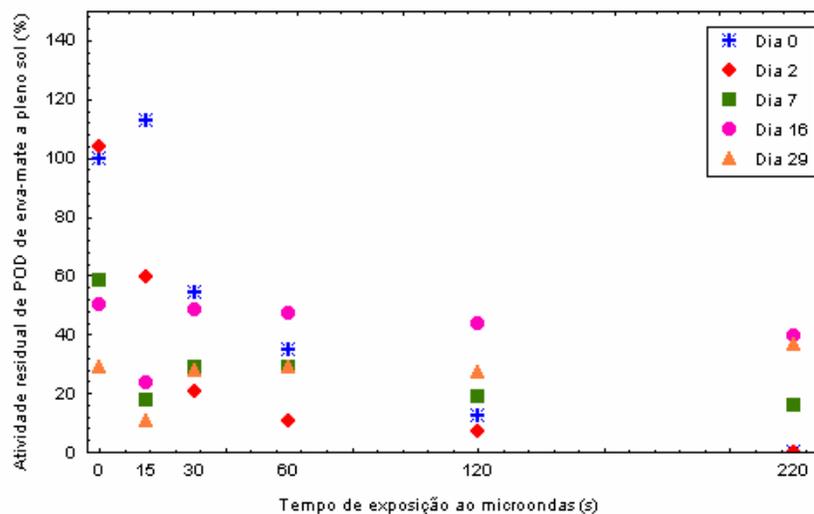


Figura 4.16 – Efeito da exposição ao microondas em relação ao tempo de armazenamento na atividade de peroxidase em erva-mate a pleno sol.

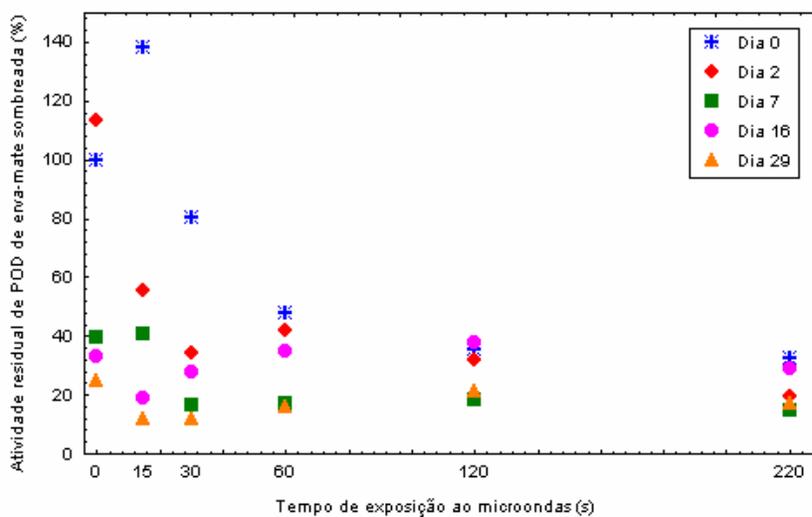


Figura 4.17 – Efeito da exposição ao microondas em relação ao tempo de armazenamento na atividade de peroxidase em erva-mate sombreada.

O estudo da atividade da polifenoloxidase presente em erva-mate indicou atividade inicial e comportamento com o armazenamento similar entre as amostras a pleno sol e sombreadas. Entretanto, a peroxidase apresentou maior atividade enzimática inicial nas amostras a pleno sol, com a mesma tendência de atividade enzimática no decorrer do armazenamento para ambas as amostras.

Na literatura não são encontrados dados referentes à atividade enzimática de erva-mate a pleno sol e sombreada, entretanto estudos realizados envolvendo amostras em diferentes condições de cultivo indicam diferenciação na composição química das mesmas. Coelho *et al.* (2000) avaliaram a composição de metilxantinas (cafeína e teobomina) de amostras de erva-mate cultivadas em diferentes condições de sombreamento e contataram que o teor de metilxantinas é mais alto em condições de maior sombreamento.

Esmelindro *et al.* (2004), investigando a influência das variáveis agrônomicas na composição química de extratos de erva-mate obtidos com CO₂, constataram que cafeína, teobromina, fitol e stigmasterol tiveram suas concentrações aumentadas nas plantas submetidas a sombreamento, com exceção do esqualeno que teve sua concentração diminuída e da vitamina E que não apresentou variação significativa com as variações de intensidade da luz. Quando compararam o processo de secagem, observaram que as concentrações dos compostos foram maiores para as amostras secas em microondas, com exceção do esqualeno.

4.3.3 Influência da exposição ao microondas sobre a umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada

O efeito da exposição ao microondas foi verificado sobre a umidade das amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada. Ramallo e Albani (2003), avaliando a umidade de erva-mate em três diferentes tipos de embalagem, observaram que a umidade inicial de 8,22% (b.s.) aumentou para 17,01, 10,55 e 9,9% para as embalagens A, B (papel multilaminado) e C (papel), respectivamente, após 22 dias de armazenamento.

Na Figura 4.18 estão demonstrados os resultados referentes à umidade apresentada pelas amostras de erva-mate *in natura*. Pode ser observado que a umidade decresce nos primeiros dias, ocorrendo estabilização em cerca de 10% após o 16º dia. Na erva-mate a pleno sol, não submetida ao microondas, ocorreu diminuição de 63% para 46%, do dia 0 para o 2º dia e continuou decrescendo no 7º dia de armazenamento. As amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada apresentaram umidade semelhante a partir do 16º dia. Assim sendo, o comportamento de ambas as amostras (sol e sombreada) é qualitativamente similar no que tange à perda de umidade e atividade das oxidases.

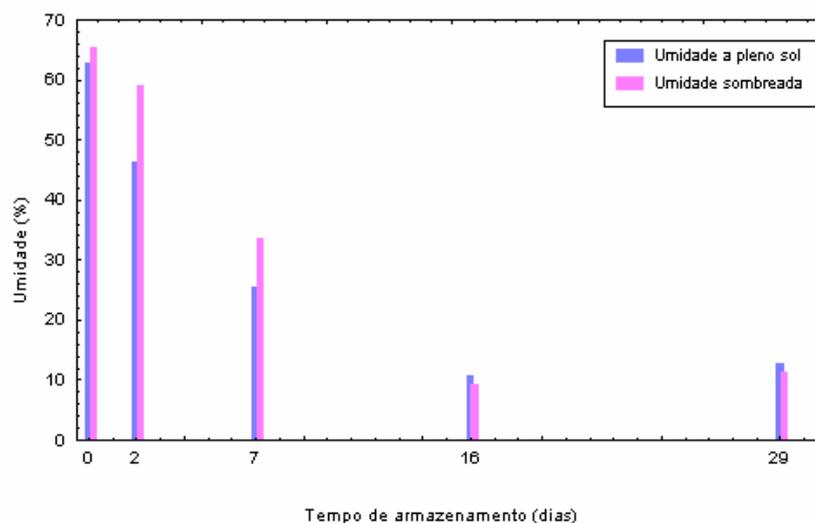


Figura 4.18 – Umidade da erva-mate *in natura* a pleno sol e sombreada.

A influência da exposição das amostras de erva-mate por 15 segundos ao microondas na umidade das amostras pode ser observada na Figura 4.19. Com a exposição das folhas de erva-mate a pleno sol e sombreada a umidade apresentada no dia 0 foi semelhante a das amostras não expostas ao microondas, estabilizando após o 16º dia. Após exposição de 15 segundos nas amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada a umidade foi de 61 e 64%, respectivamente. A umidade apresentada pelas amostras, no 29º dia, foi inferior a 15%.

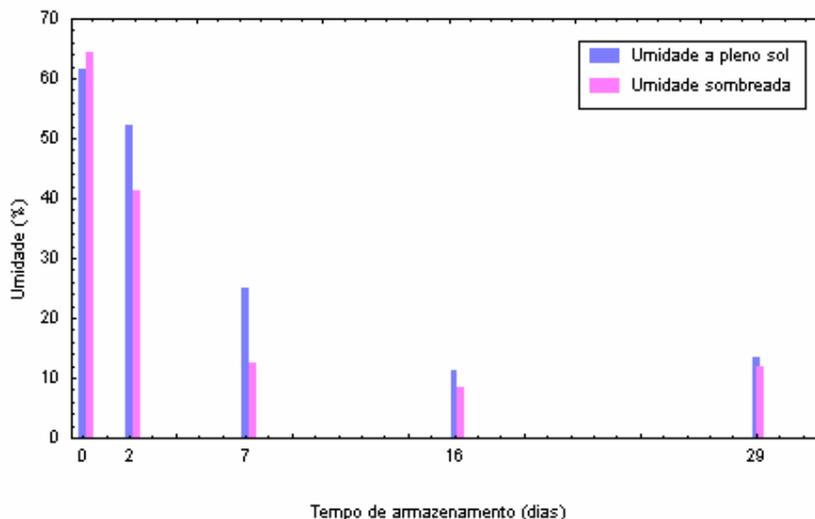


Figura 4.19 – Efeito da exposição ao microondas por 15 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.

A exposição das folhas de erva-mate por 30 segundos em microondas, com seus efeitos sobre a umidade é apresentada na Figura 4.20. Para a erva-mate a pleno sol e sombreada, expostas a 30 segundos de microondas, a umidade das folhas de erva-mate no dia 0 foi próxima a 57%. A umidade é estabilizada a partir do 7º dia de armazenamento, apresentado cerca de 11% no 29º dia.

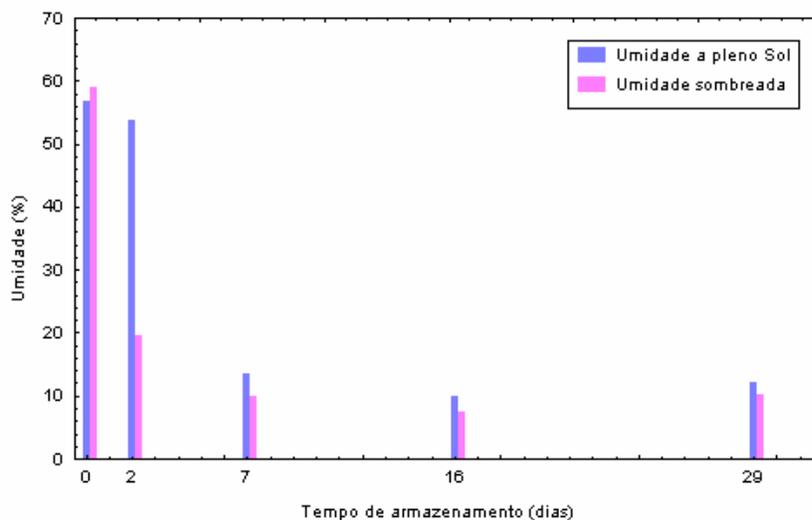


Figura 4.20 – Efeito da exposição ao microondas por 30 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.

Conforme já exposto em item anterior, a exposição das amostras de erva-mate por 30 segundos ao microondas foram suficientes para inativação da enzima polifenoloxidase.

O efeito da exposição por 60 segundos ao microondas na umidade das amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada está demonstrado na Figura 4.21. Quando a exposição foi de 60 segundos no dia 0 a umidade foi de 31% para amostras a pleno sol e 27% para sombreadas. No 16^o dia a umidade das amostras foi de cerca de 7%. No 29^o dia a umidade foi de 12 e 10% para a erva-mate a pleno sol e sombreada, respectivamente.

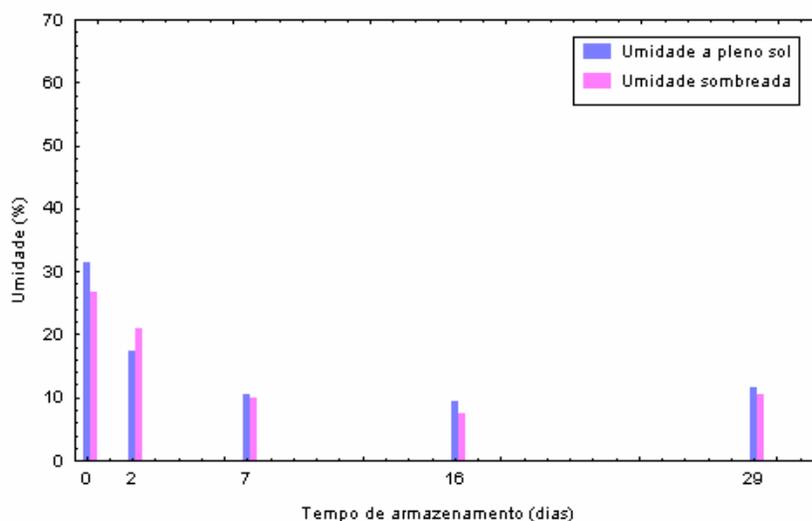


Figura 4.21 – Efeito da exposição ao microondas por 60 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.

Na Figura 4.22 está demonstrada a influência da exposição por 120 segundos na umidade das amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada. A umidade inicial para as amostras de erva-mate a pleno sol foi de cerca de 26% e de 24% para as amostras de erva-mate sombreada. No 7^o dia de armazenamento a umidade apresentada por ambas as amostras foi de cerca de 9%, estabilizando no decorrer do tempo de armazenamento e apresentado, no 29^o dia, cerca de 11% de umidade.

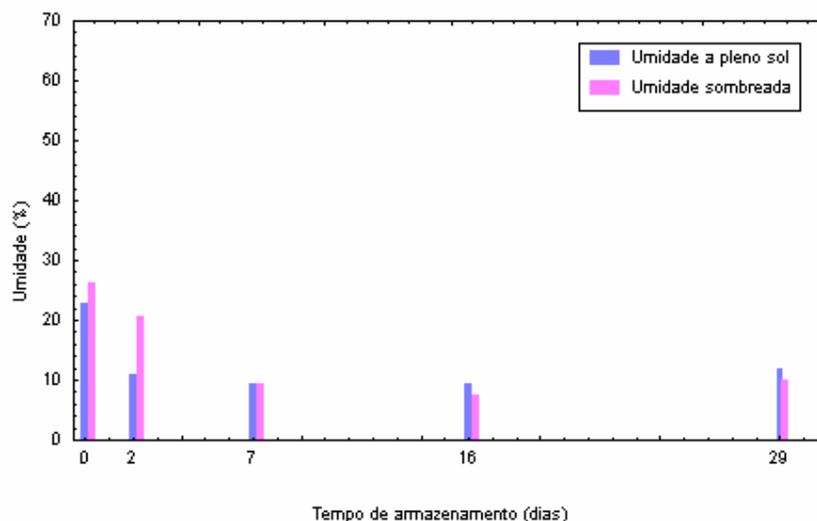


Figura 4.22 – Efeito da exposição ao microondas por 120 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.

Na Figura 4.23 estão demonstrados os efeitos da exposição ao microondas por 220 segundos. A umidade, que para ambas as amostras foi de cerca de 4% no dia 0, aumentou no 2º dia de armazenamento e tendeu para o equilíbrio, como as demais amostras.

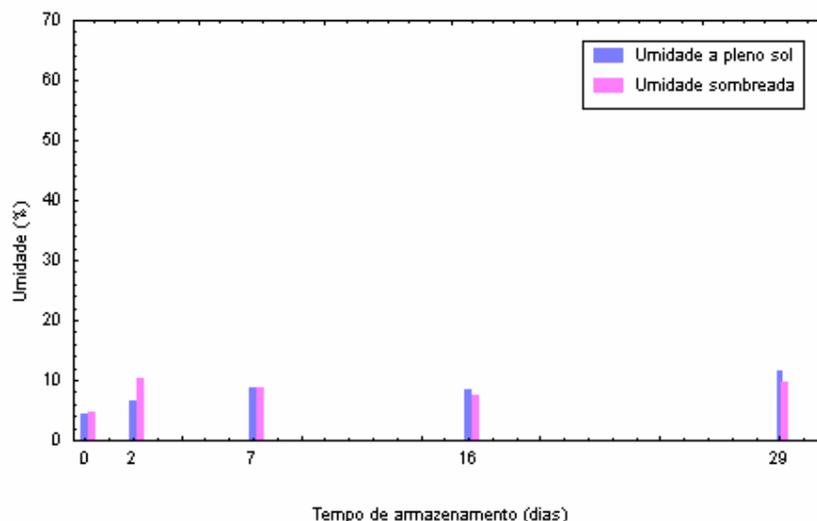


Figura 4.23 – Efeito da exposição ao microondas por 220 segundos na umidade de erva-mate a pleno sol e sombreada.

A exposição das amostras ao microondas por 220 segundos assegura o percentual de umidade de acordo com o requerido para a industrialização da erva-mate após o processo de secagem, de cerca de 5%, segundo Valduga, Finzer e Mosele (2003).

A umidade de todas as amostras, independente do tempo de exposição ao microondas, apresentou comportamento similar, tendendo ao equilíbrio (cerca de 10%) após o 7º dia de armazenamento.

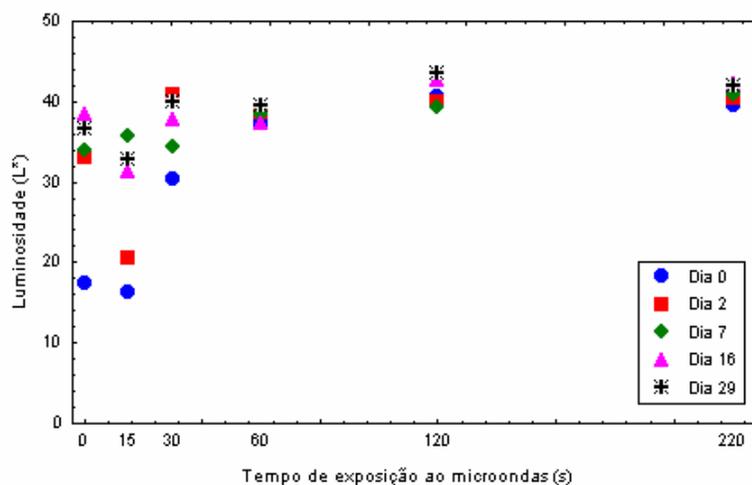
4.3.4 Influência da secagem em microondas sobre a coloração de erva-mate a pleno sol e sombreada

O atributo cor é considerado o primeiro critério aplicado pelo consumidor na compra de erva-mate (Rucker, 2000). Qualquer processo de secagem das folhas de erva-mate não deve prejudicar a cor do produto. De acordo com Rucker (2000), em 1836 Tromsdorf identificou substâncias resinosas com pigmento amarelo e determinou que a matéria corante em erva-mate é amarelo-dourado. Desta forma, a coloração da erva-mate é determinada pela presença de cor verde-clorofila e do pigmento corante amarelo-dourado.

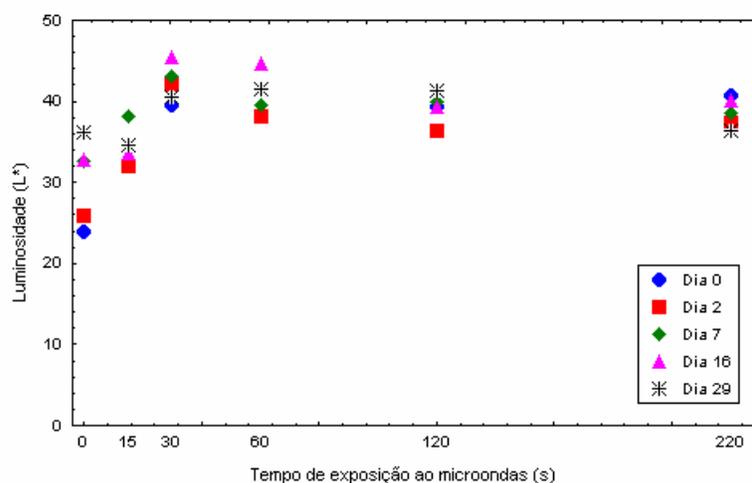
Schmalko *et al.* (2003) observaram que a degradação das clorofilas a e b em erva-mate está correlacionada com o tratamento térmico (50, 60, 70 e 80°C) e a atividade de água (entre 0,1 e 0,8). A análise da coloração das amostras indicou uma importante redução no parâmetro a* (verde), sem causar grandes variações nos parâmetros L* (luminosidade) e b* (amarelo). A redução dos níveis de clorofilas e do parâmetro de cor a* aumentou com o aumento da temperatura e do tempo de exposição.

A erva-mate preferida pelo consumidor brasileiro tem cor verde e o tempo de estocagem gira entre três a quinze dias. Quando o produto é destinado ao mercado externo (Uruguai ou Chile), a erva-mate cancheada é depositada em sacos e armazenada de três meses a um ano, para que adquira a cor amarelada característica do produto tipo exportação (Valduga, Finzer e Mosele, 2003).

Na Figura 4.24 estão demonstradas as variações no parâmetro luminosidade (L^*) na cor das amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada submetidas ao microondas. Pode ser observado que o tempo de exposição ao microondas provocou variação de L^* . As amostras *in natura* e a amostra a pleno sol exposta por 15 segundos ao microondas apresentaram maior variação de L^* em relação ao período de armazenamento, sendo maior nas amostras a pleno sol. As demais amostras sofreram menor variação com o armazenamento e apresentaram maior luminosidade que a erva-mate *in natura* no dia da coleta.



(a)



(b)

Figura 4.24 – Variação da luminosidade (L^*) na cor da erva-mate a pleno sol (a) e sombreada (b) exposta ao microondas.

A variação no parâmetro de cor a^* na cor da erva-mate é demonstrada na Figura 4.25. O parâmetro a^* apresentou valores negativos, que correspondem ao eixo verde no diagrama de cores. A exposição ao microondas no dia 0 provocou aumento da intensidade da cor verde nas amostras a pleno sol e sombreada. As amostras *in natura* não apresentaram importante variação com o armazenamento. As amostras expostas por tempos de 15 segundos ou mais apresentaram importante variação em relação ao tempo de armazenamento, ocorrendo diminuição da intensidade da cor. Entretanto, a intensidade do verde apresentado pelas amostras no 29º dia de armazenamento foi semelhante à apresentada pelas amostras *in natura* no dia 0.

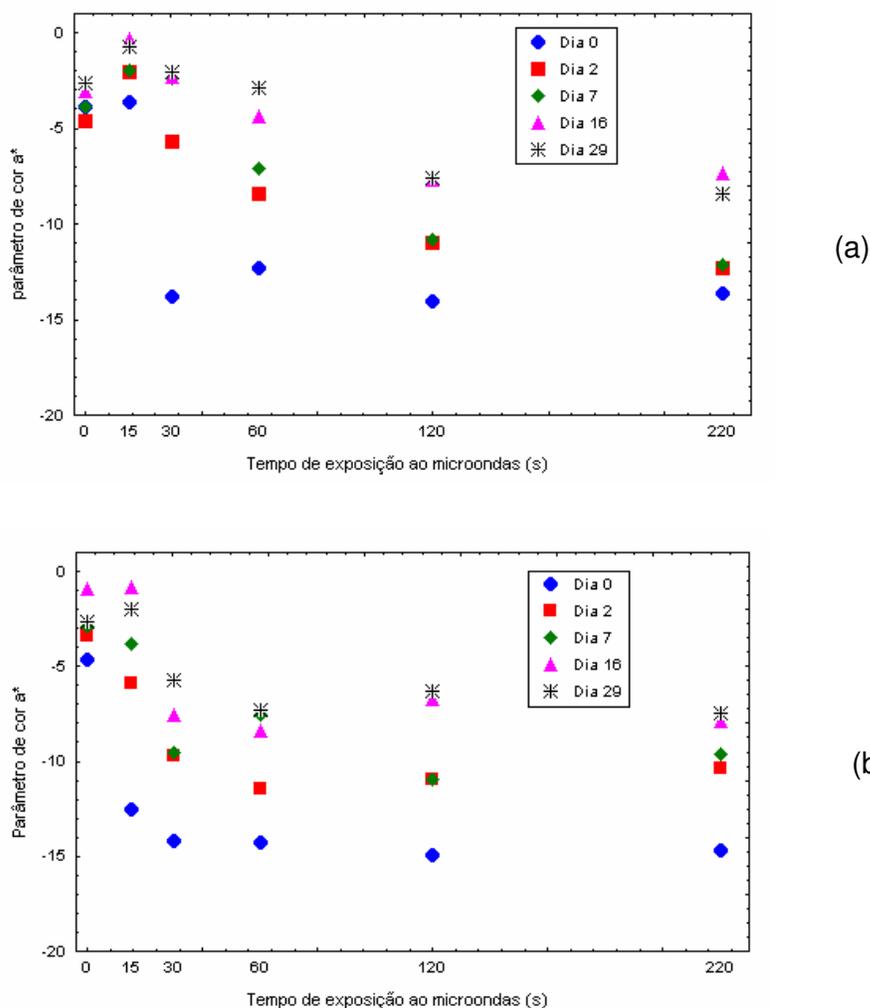


Figura 4.25 – Variação do parâmetro a^* na cor da erva-mate a pleno sol (a) e sombreada (b) exposta ao microondas.

A Figura 4.26 apresenta a variação de cor do parâmetro b^* nas amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada expostas ao microondas no decorrer dos 29 dias de armazenamento. A variação do parâmetro b^* positivo, que corresponde a cor amarela, foi maior para o tempo de exposição ao microondas para as amostras a pleno sol. A erva-mate sombreada apresentou maior variação com o tempo de armazenamento para as amostras *in natura* e exposta por 15 segundos, sendo que as amostras expostas por 30 segundos ou mais apresentaram intensidade de cor semelhante à apresentada no dia 0 para a amostra *in natura* e exposta por 15 segundos.

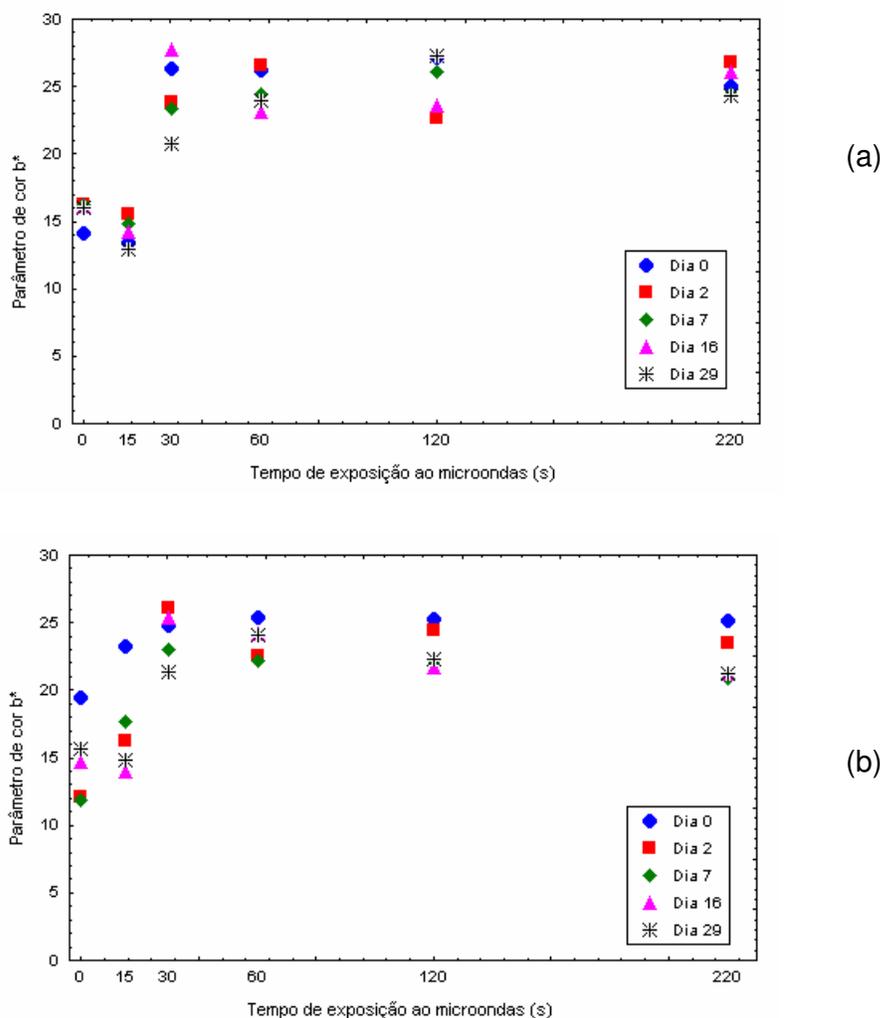


Figura 4.26 – Variação do parâmetro b^* na cor da erva-mate a pleno sol (a) e sombreada (b) exposta ao microondas.

O tempo de exposição ao microondas, tanto para as amostras a pelo sol como para as amostras sombreadas, resultou em variação para os parâmetros L^* , a^* e b^* . O tempo de armazenamento provocou maior variação no parâmetro de cor a^* . Desta forma, as amostras de erva-mate ficaram mais claras e mais verdes com o aumento do tempo de exposição ao microondas. Após 29 dias de armazenamento, mesmo com a diminuição do parâmetro a^* , a intensidade da cor verde apresentada é semelhante à erva-mate *in-natura*. Segundo Woniaczuk *et al.* (2003) e Schmalko *et al.* (2003) a variação da cor no processo convencional de beneficiamento de erva-mate é maior para a^* , apresentando pequena variação na luminosidade (L^*).

Na Tabela 4.2 estão demonstrados os resultados de cor obtidos com erva-mate a pleno sol exposta ao microondas. As análises dos parâmetros de cor no dia 0 indicaram que, quando a erva-mate não é exposta ou é exposta por 15 segundos ao microondas, as amostras são acromáticas (região de valores dos parâmetros de 0 à 20 no diagrama de cores). A partir do tempo de exposição de 30 segundos a coloração tende para o verde, proporcionalmente ao tempo de exposição. A variação de cor, do dia 0 para o 29º dia foi maior para a erva-mate *in natura*. As amostras expostas por 15 e 30 segundos apresentaram variação similar, entretanto a amostra *in natura* e a exposta 15 segundos permaneceram acromáticas.

Tabela 4.2 – Influência da secagem ao microondas de erva-mate a pleno sol nos parâmetros e na variação de cor.

Tempo de Microondas (s)	Tempo de armazenamento (dias)						
	L^*	a^*	b^*	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE
0	17,35 (±1,11)	-3,91 (±0,55)	14,17 (±1,70)	15,75	16,74	21,16	19,39
15	16,22 (±1,24)	-3,62 (±0,68)	13,46 (±1,53)	5,08	19,64	15,46	16,83
30	30,44 (±2,24)	-13,8 (±0,28)	26,32 (±0,87)	13,47	12,45	13,68	16,14
60	37,27 (±1,45)	-12,3 (±0,55)	26,20 (±0,64)	4,12	5,61	8,49	9,92
120	40,62 (±0,34)	-14,1 (±0,28)	27,13 (±1,15)	5,47	3,69	7,54	7,04
220	39,57 (±1,19)	-13,7 (±0,40)	25,01 (±0,83)	2,46	2,05	6,87	5,81

ΔE = variação da coloração em relação ao dia 0. O valor da incerteza (entre parênteses) refere-se ao desvio padrão da condição experimental.

Os resultados para a análise de cor de erva-mate sombreada estão demonstradas na Tabela 4.3. Como ocorreu para a erva-mate a pleno sol, a amostra *in natura* classifica-se como acromática. A coloração da erva-mate tendeu para o verde menos escuro com o aumento do tempo de exposição ao microondas. Conforme demonstrado pelo cálculo do ΔE , a variação da cor do dia 0 para o 29º dia foi maior para a erva-mate *in natura*, permanecendo, entretanto acromática. As demais amostras apresentaram variação de cor inversamente proporcional ao tempo de exposição ao microondas.

Tabela 4.3 – Influência da secagem ao microondas de erva-mate sombreada nos parâmetros e na variação de cor.

Tempo de Microondas (s)	Tempo de armazenamento (dias)						
	0	0	2º	7º	16º	29º	
	L*	a*	b*	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE
0	23,86 (±2,17)	-4,67 (±0,83)	19,41 (±0,72)	7,66	11,77	10,73	13,09
15	32,12 (±3,75)	-12,54 (±1,21)	23,23 (±1,15)	9,61	11,99	14,95	13,73
30	39,53 (±2,64)	-14,22 (±0,34)	24,78 (±0,40)	5,41	6,17	8,94	9,25
60	38,32 (±2,64)	-14,23 (±0,40)	25,37 (±1,04)	3,96	7,51	8,69	7,75
120	39,31 (±0,75)	-14,91 (±0,34)	25,27 (±0,45)	5,00	5,07	8,93	9,30
220	40,70 (±0,83)	-14,71 (±0,51)	25,14 (±0,83)	5,74	6,99	7,91	9,30

ΔE = variação da coloração em relação ao dia 0. O valor da incerteza (entre parênteses) refere-se ao desvio padrão da condição experimental.

Para ambas as amostras de erva-mate a variação de cor foi maior nos menores tempos de exposição ao microondas. Estes tempos de exposição também estão relacionados com maior atividade enzimática e umidade. Tempos maiores de exposição ao microondas apresentaram maior estabilidade na cor da erva-mate com o tempo de armazenamento, menor umidade e atividade das oxidases.

A análise de cor das amostras de erva-mate a pleno sol e sombreada indicou que com a exposição ao microondas ocorreu intensificação da cor verde das amostras, sendo que as mesmas adquiriram maior luminosidade que a erva-mate *in*

natura. Com tempo de armazenamento ocorreu diminuição da intensidade do verde, permanecendo, entretanto, semelhante à apresentada pela erva-mate *in natura* no dia 0. As amostras de erva-mate a pleno sol tenderam mais para o amarelo que as amostras sombreadas. Na Figura 4.27 podem ser observadas amostras de erva-mate no 29º dia de armazenamento.

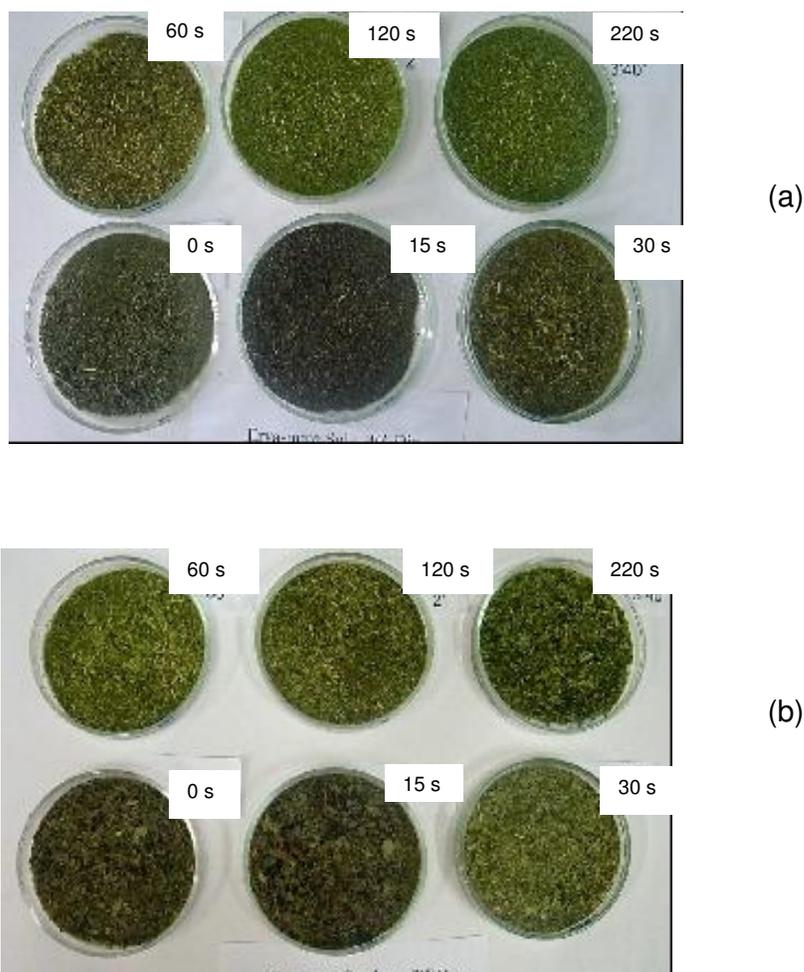


Figura 4.27 – Amostras de erva-mate a pleno sol (a) e sombreadas (b) expostas ao microondas no 29º de armazenamento.

4.4 Conclusões Parciais

A verificação da influência de microondas na atividade enzimática e coloração das amostras de erva-mate a pleno sol e sombreadas, permitiu concluir que:

- A atividade de polifenoloxidase das amostras de erva-mate *in natura* a pleno sol e sombreada decresce do dia 0 para o 7º dia, não apresentando atividade após o 16º dia;
- A exposição por 15 segundos de microondas diminui a atividade enzimática da polifenoloxidase das amostras a pleno sol e sombreada, sendo que a partir do 7º dia as amostras não apresentaram atividade enzimática;
- Exposições por 30 segundos em microondas são suficientes para inativar a polifenoloxidase das amostras a pleno sol e sombreada;
- A atividade da peroxidase de erva-mate *in natura* não é inativada mesmo com 30 dias de armazenamento;
- Exposições de 15 segundos ao microondas aumenta a atividade de peroxidase de erva-mate;
- As amostras de erva-mate expostas ao microondas por tempos de 30, 60, 120 e 220 segundos apresentam um comportamento similar, ocorrendo queda inicial da atividade com posterior regeneração;
- A exposição em microondas por 220 segundos inativou a peroxidase de erva-mate a pleno sol, entretanto não inativou a enzima de erva-mate sombreada;
- A erva-mate exposta por 220 segundos alcança a umidade requerida para o beneficiamento de erva-mate pela indústria;
- O tempo de exposição ao microondas das amostras a pleno sol e sombreadas, resultou em variação para os parâmetros L*, a* e b*;
- O tempo de armazenamento provocou maior variação no parâmetro de cor a* para as amostras de erva-mate;

- As amostras de erva-mate ficaram mais claras e mais verdes com a exposição ao microondas;
- A variação de cor com o tempo de armazenamento (ΔE) foi maior para as amostras de erva-mate *in natura* e para as expostas por 15 segundos ao microondas;
- A exposição ao microondas, por tempos superiores a 30 segundos, apresentou maior estabilidade na cor da erva-mate com o tempo de armazenamento e menores valores para a umidade e a atividade das oxidases.

4.4 Referências Bibliográficas

BERKAI, D.; BRAGA, C. A., **500 anos de história da erva-mate**. 2^a ed. Editora Cone Sul, 2000. 97p.

BERTILI, M. N.; MARSAIOLI, A., **Evaluation of short cut pasta air dehydration assisted by microwaves as compared to the conventional drying process**. Journal of Food Engineering, v.68, n.2, p. 175 – 183, 2005.

COELHO, G. C.; RACHWAL, M.; SCHNORRENBERGER, E.; SCHENKEL, E. P., **Efeito do sombreamento sobre a sobrevivência, morfologia e química de erva-mate**. In: Anais 2º Congresso Sul-americano de erva-mate. p. 396 – 399, 2000.

DEVECE, C.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; FENOLL, L. G.; TUDELA, J.; CATALÁ, J. M.; REYES, E.; GARCIA-CÁNOVAS, F., **Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: Comparison of microwaves, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity**. Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 47, p. 4506 – 4511, 1999.

DI CESARE, L. F.; FORNI, E.; VISCARDI, D.; NANI, R. C., **Changes in the chemical composition of Basil caused by different drying procedures.** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 51, p. 3575 – 3581, 2003.

ESCRIVÁ, M. V. G.; GARCIA, H. P.; MARSAIOLI, A., **Comparação das propriedades reológicas de cacau torrada convencionalmente e por microondas.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.18, n. 2, p. 218 – 233, Campinas, 1998.

ESMELINDRO, A. A.; GIRARDI, J. S.; MOSSI, A.; JACQUES, R. A.; DARIVA, C., **Influence of agronomic variables on the composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) extracts obtained from CO₂ extraction at 30°C and 175 bar.** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 52, p. 1990 – 1995, 2004.

FELLOWS, P., **Tecnología del procesado de los alimentos: Principios e prácticas.** Zaragoza:Editorial Acribia, 1994.

GULATI, A.; RAWAT, R.; SINGH, B.; RAVINDRANATH, S. D., **Application of microwave in the manufacture of enhanced-quality green tea.** Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 51, p. 4764 – 4768, 2003.

IAL – Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ª ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p. (Volume 1, Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos).

IBGE – Banco de Dados – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em <http://www.sidra.gov.br> Acesso em 20 nov 2004.

MACCARI, A. J.; SANTOS, A. P. R., **Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate**. MCT/CNPq/PADCT, Curitiba, PR, 2000.

MARSAIOLI JR.; A., **Desenvolvimento da tecnologia de aplicação de microondas em secador cilíndrico-rotativo combinado com ar quente para produtos granulados**. Campinas, 1991, 197p. Tese de Doutorado (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 1991.

MAZUCHOWSKI, J. Z., **Alternativas para o incremento da produtividade de ervas nativas**. In: Anais 2º Congresso Sul-americano de erva-mate. p. 6 – 9, 2000.

MOSELE, S. H., **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense**. Porto Alegre, 2002. 211p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Agronegócios) – Centro de Estudos e Pesquisa em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2002.

NUNES, I. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L., **Forno de microondas: solução ou problema para a saúde pública?** Higiene Alimentar, v.10, n. 42, p. 9 – 13, 1996.

OOMAH, B. D.; LIANG, J.; GODFREY, D.; MAZZA, G., **Microwave heating of grapeseed: Effect on oil quality**. Journal of Agricultural and Food Chemical, v. 46, p. 4017 – 4021, 1998.

PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; ABREU, C. M., **Secagem de material vegetal em forno de microondas para determinação de matéria seca e análises químicas**. Ciências Agotec., v. 26, n. 6, p. 1252 – 1258, 2002.

RAMALLO, L. A.; ALBANI, O. A., **Ganancia de humedad en yerba mate envasada. Predicción y determinación experimental.** Anais 3º Congresso Sul-americano da Erva Mate, 2003.

RODRIGUES, A. C., DINIZ, A. C.; FACHINELLO, J. C.; SILVA; J. B.; FARIA, J. L. C., **Peroxidasas e fenóis totais em tecidos de porta-enxertos de *Prunus sp.* nos períodos de crescimento vegetativo e de dormência.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 32, n.4, p.559 – 564, 2002.

ROY, I.; GUPTA, M. N., **Applications of microwaves in biological scienses.** Current Science, v. 85, n. 12, p. 1685 – 1693, 2003.

RUCKER, N. G. A., **A cor no controle de qualidade em erva-mate – *Ilex paraquariensis* A. ST. HIL.** Anais 2º Congresso Sul-americano da Erva Mate, p. 97 – 98, 2000.

SELMO, M. S.; TREPTOW, R. O.; ANTUNES, P. L., **Avaliação físico-química e sensorial de maçãs (*Malus doméstica*, Borkh.) branqueadas em microondas e desidratadas.** Revista Brasileira de Agrociência, v. 2, n.1, p. 33 – 38, 1996.

SCHMALKO, M. E.; ALZAMORA, S. M., **Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba maté processing.** Drying Technology, v. 19, n. 3&4, p. 599 – 610, 2001.

SCHMALKO, M. E.; SCIPIONI, P. G.; FERREIRA, D. J.; ALZAMORA, S. M., **Efecto de la actividad del agua y la temperatura en la degradación de la clorofila y el color en hojas de yerba mate.** Anais 3º Congresso Sul-americano da Erva Mate, p. 58, 2003.

VALDUGA, A. T., **Uso sustentado e processamento de *Ilex paraguariensis* St. Hil (Erva-mate)**. São Carlos, 2002. 216p. Tese de Doutorado (Doutora em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2002.

VALDUGA, A. T.; FINZER, J. R. D.; MOSELE, S. H., **Processamento de erva-mate**. Erechim : Edifapes, 2003. 182p.

WONIATCZUK, M. I.; ZIELKE, L. E.; KOTIK, A.; SCHMALHO, M. E., **Control estadístico de parámetros de calidad de la yerba mate elaborada**. Anais 3º Congresso Sul-americano da Erva Mate, p. 56, 2003.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões finais

Neste trabalho foram apresentados estudos sobre determinação da melhor condição de extração e medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate, avaliação da estabilidade térmica das enzimas e investigação da influência da exposição ao microondas na atividade das enzimas oxidativas da erva-mate.

O desenvolvimento deste trabalho permitiu concluir que a utilização de planejamento experimental possibilitou a determinação das melhores condições de extração e de medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill). As variáveis investigadas foram: massa de erva-mate (g), concentração molar do tampão fosfato de sódio (M), adição de detergente (Triton X-100) (% p/v), pH do tampão de extração, pH do tampão de medida de atividade enzimática, adição de polivinilpirrolidona (PVP K-90) (% p/p) e tempo de centrifugação (minutos).

A melhor condição de extração das oxidases de erva-mate foi definida como: 40 g de erva-mate, em 90 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, adição de 3% (p/p) de PVP K90 e tempo de centrifugação de 30 minutos. Para a enzima polifenoloxidase a medida de atividade foi realizada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 9,0 e alcançadas atividades de **1.055,95±70,85 U/mL** e **2.544,96±196,58 U/mg de proteína**. Para a enzima peroxidase a medida de atividade foi realizada com a mesma concentração molar do tampão fosfato de sódio, entretanto utilizando pH 4,0. A atividade apresentada pela peroxidase nesta condição foi de **5,61±0,26 U/mL** e **13,19±0,51U/ mg de proteína**

A estabilidade dos extratos brutos enzimáticos de erva-mate foi verificada submetendo as enzimas a armazenamento a baixas temperaturas (149 dias) e à exposição a moderadas e altas temperaturas. Pôde ser constatado que os extratos

enzimáticos de polifenoloxidase mantêm a atividade quando armazenados à -4 e -80°C . Em temperatura de 4°C a atividade é mantida nos primeiros 39 dias de armazenamento, sem apresentar diferença significativa. A enzima peroxidase apresentou queda de atividade nos primeiros dias de armazenamento em ambas as temperaturas. As amostras submetidas à -4 e -80°C tiveram sua atividade regenerada a partir do 14^o dia. Após o 19^o dia a atividade da peroxidase não difere significativamente da apresentada no 1^o dia do armazenamento. O armazenamento das oxidases em temperaturas de -4 e -80°C não diferem entre si e apresentam diferença significativa quando comparados ao armazenamento à 4°C .

A exposição a moderadas e altas temperaturas e a variação do tempo de exposição afetam significativamente a atividade enzimática das oxidases de erva-mate. A atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase se mantém quando expostas a tratamento térmico de 20°C . A polifenoloxidase tem sua atividade diminuída com o aumento do tempo de exposição em temperaturas de 40 e 60°C e é inativada após 6 minutos em tratamento térmico de 80°C . A peroxidase apresentou atividade residual de 80%, após 30 minutos de exposição à 60°C e, apesar de apresentar diminuição de atividade quando submetida à temperatura de 80°C , a enzima não é inativada mesmo quando exposta por 30 minutos.

A verificação da influência da exposição ao microondas na atividade enzimática, umidade e coloração das amostras de erva-mate a pleno sol e sombreadas, indicou que a enzima polifenoloxidase de folhas *in natura* é inativada após 16 dias de armazenamento. A atividade da peroxidase de erva-mate *in natura* não foi inativada mesmo com 29 dias de armazenamento. Exposições de 30 segundos ao microondas são suficientes para a inativação da atividade da polifenoloxidase. A exposição ao microondas por 220 segundos inativou a enzima peroxidase da amostra de erva-mate a pleno sol, mas não foi suficiente para inativar a enzima presente nas amostras de erva-mate sombreadas.

A exposição a 15 segundos de microondas diminui a atividade enzimática da polifenoloxidase das amostras a pleno sol e sombreadas, sendo que a partir do 7^o dia as amostras não apresentaram atividade enzimática. A peroxidase apresentou aumento da atividade quando submetida aos mesmos 15 segundos de microondas.

As amostras de erva-mate expostas ao microondas por tempos de 30, 60, 120 e 220 segundos apresentam um comportamento similar, ocorrendo uma queda da atividade com posterior regeneração.

Após 220 segundos de exposição ao microondas é alcançada a umidade requerida para o beneficiamento de erva-mate pela indústria, de cerca de 5%. A umidade das amostras de erva-mate tendeu ao equilíbrio, atingindo para todos os tratamentos umidade de cerca de 10% no 29º dia de armazenamento.

O tempo de exposição ao microondas das amostras de erva-mate a pelo sol e sombreada, resultou em variação para os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , enquanto que com o armazenamento ocorreu maior variação do parâmetro a^* . Desta forma, as amostras de erva-mate ficaram mais claras e mais verdes com o aumento do tempo de exposição ao microondas. A variação com do parâmetro a^* com o tempo de armazenamento provocou a diminuição da intensidade da cor, entretanto após 29 dias as amostras apresentaram intensidade de verde semelhante à apresentada pelas amostras *in natura* no dia da coleta. A exposição ao microondas por tempos maiores que 30 segundos resultou em maior estabilidade na cor da erva-mate com o tempo de armazenamento com menor umidade e atividade das oxidases.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

A partir das observações constatadas durante o desenvolvimento deste trabalho, pode-se sugerir as seguintes considerações para trabalhos futuros na área:

- Realização de eletroforese para identificação de isoenzimas de polifenoloxidase e peroxidase presente nos extratos de erva-mate;
- Determinação dos parâmetros cinéticos das oxidases de erva-mate;
- Determinação das condições para concentração dos extratos enzimáticos de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate;
- Emprego das oxidases de erva-mate em processos biotecnológicos, como para a oxidação de monotepernos;

- Verificação do comportamento das oxidases de extratos enzimáticos de erva-mate submetidos a altas pressões;
- Estudo compartilhado de inativação de enzimas oxidativas em microondas e secagem da erva-mate em secador de bandeja vibrada;
- Desenvolvimento de protótipo de microondas para inativação das enzimas oxidativas da erva-mate;
- Realização de análise sensorial de amostras de erva-mate expostas ao microondas.

APÊNDICES – DETALHAMENTO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Este Apêndice tem por objetivo demonstrar o detalhamento das tabelas utilizadas para descrever os dados experimentais das atividades de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate.

No Apêndice A estão demonstrados os resultados para a determinação das oxidases de erva-mate. Para cada plano experimental realizado construiu-se uma tabela, onde a primeira coluna apresenta o número do experimento. Para o 1º e 2º planejamentos os dados das amostras, com a identificação, o peso de erva-mate utilizado e o volume final (V.F.) do extrato enzimático após a homogeneização, são apresentados a seguir. Na coluna volume de ensaio demonstra a quantidade em μL de extrato enzimático utilizada para o ensaio. A seguir é apresentada a coluna de coeficiente angular utilizado para o cálculo da velocidade inicial (V.I.), apresentada na coluna subsequente. A seguir é apresentada a coluna com a atividade enzimática (U/mL), seguida da coluna do número de réplicas utilizadas para a medida da atividade enzimática e o valor médio da atividade enzimática. Na última coluna é apresentado o desvio padrão das réplicas em relação à média. A partir do 3º planejamento é apresentado nas tabelas, após o desvio padrão da atividade em U/mL, a coluna de mg de proteína das amostras, a atividade específica (U/mg de proteína), o valor média da atividade específica, seguida de seu desvio padrão.

No Apêndice B são apresentados os dados referentes à estabilidade das oxidases. Três tipos de tabelas compõem este apêndice. As tabelas que apresentam os dados das amostras utilizadas para a verificação da estabilidade a baixas temperaturas contêm colunas que indicam a amostra com seu peso e volume final. As atividades apresentadas pelas amostras armazenadas a baixas temperaturas foram divididas em uma tabela para cada temperatura. Nestas tabelas a primeira coluna indica o dia de armazenamento, seguida da identificação da amostra. A seguir é demonstrada a coluna volume do ensaio e de coeficiente angular. Na seqüência estão demonstradas as colunas com a atividade enzimática, mg de

proteína das amostras, atividade específica, valor média da atividade específica, número de réplicas utilizadas para a medida da atividade enzimática e desvio padrão. Para as atividades dos extratos enzimáticos submetidos a moderadas e altas temperaturas, a primeira coluna indica o tempo de exposição ao tratamento térmico a que as amostras foram submetidas. A seqüência das colunas é idêntica a apresentada anteriormente, com adição da coluna de atividade residual no final da tabela.

O Apêndice C demonstra os resultado das atividades das oxidases de erva-mate expostas ao microondas. A primeira coluna das tabelas apresenta o tempo em dias de armazenamento das amostras. A partir da segunda coluna a tabela é igual a apresentada para a atividade das enzimas submetidas a moderadas e altas temperaturas.

APÊNDICE A – DETERMINAÇÃO DE OXIDASES DE ERVA-MATE

Este Apêndice tem por objetivo apresentar os resultados detalhados obtidos na determinação da melhor condição de extração e de medida de atividade de polifenoloxidase e peroxidase de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill).

Planejamento experimental fracionário 2⁷⁻³

Tabela A1 – Planejamento experimental fracionário 2⁷⁻³ para determinação de atividade de polifenoloxidase de erva-mate.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente Angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	PFO (U/mL)	σ_p	
	Peso (g)	V.F. (mL)								
1	A	15,021	73,5	0,050	0,0027	17,36	6	108,72	1,98	
			0,075	0,0039	25,07	111,43				
			0,100	0,0049	31,50	105,00				
	B	15,059	65,0	0,050	0,0026	16,63				110,87
			0,075	0,0037	24,04	106,86				
			0,100	0,0048	30,73	102,43				
2	A	15,022	60,0	0,050	0,0032	20,57	9	138,97	7,30	
			0,075	0,0041	26,36	117,14				
			0,100	0,0048	30,86	102,86				
	B	15,035	65,0	0,050	0,0033	21,21				141,43
			0,075	0,0056	36,00	160,00				
			0,100	0,0059	37,93	126,43				
	C	15,028	60,0	0,050	0,0041	26,36				175,71
			0,075	0,0052	33,43	148,57				
			0,100	0,0066	42,43	141,43				
3	A	15,012	66,0	0,050	0,0032	20,57	9	132,30	10,47	
			0,075	0,0048	30,86	137,14				
			0,100	0,0057	36,64	122,14				
	B	15,022	65,0	0,050	0,0034	21,86				145,71
			0,075	0,0062	39,86	177,14				
			0,100	0,0082	52,71	175,71				
	C	15,021	71,0	0,050	0,0026	16,71				111,43
			0,075	0,0033	21,21	94,29				
			0,100	0,0042	27,00	90,00				
4	A	16,061	44,0	0,050	0,0032	20,57	6	117,14	5,32	
			0,075	0,0040	25,71	114,29				
			0,100	0,0052	33,43	111,43				
	B	15,069	55,0	0,050	0,0030	19,29				128,57
			0,075	0,0038	24,43	108,57				
			0,100	0,0048	30,86	102,86				

Tabela A1 – Continuação.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente Angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	PFO (U/mL)	σ_p					
	Peso (g)	V.F. (mL)												
5	A	15,020	70,0	0,050	0,0024	15,43	9	100,39	7,28					
				0,075	0,0036	23,14								
				0,100	0,0044	28,29								
	B	15,099	58,0	0,050	0,0035	22,50				150,00				
				0,075	0,0040	25,71				114,29				
				0,100	0,0044	28,29				94,29				
	C	15,006	57,0	0,050	0,0020	12,86				85,71				
				0,075	0,0028	18,00				80,00				
				0,100	0,0037	23,79				79,29				
6	A	15,047	75,7	0,050	0,0069	44,68	6	267,36	11,27					
				0,075	0,0097	62,16				276,29				
				0,100	0,0118	75,86				252,86				
	B	15,042	74,0	0,050	0,0069	44,36				295,71				
				0,075	0,0089	57,21				254,29				
				0,100	0,0106	68,14				227,14				
	7	A	15,065	53,0	0,050	0,0035				22,50	6	116,31	8,52	
					0,075	0,0042				27,00				120,00
					0,100	0,0053				34,07				113,57
B		15,003	53,0	0,050	0,0029	18,64	124,29							
				0,075	0,0035	22,50	100,00							
				0,100	0,0042	27,00	90,00							
8		A	15,018	64,5	0,050	0,0065	41,53	12	220,51	17,52				
					0,075	0,0097	62,36							277,14
					0,100	0,0119	76,50							255,00
	B	15,020	65,0	0,050	0,0043	27,65	184,29							
				0,075	0,0061	39,21	174,29							
				0,100	0,0078	50,14	167,14							
	C	15,038	56,0	0,050	0,0067	43,07	287,14							
				0,075	0,0105	67,50	300,00							
				0,100	0,0123	79,07	263,57							
	D	15,055	75,0	0,050	0,0040	25,71	171,43							
				0,075	0,0048	30,86	137,14							
				0,100	0,0071	45,64	152,14							
	9	A	35,047	45,0	0,050	0,0037	23,79				6	142,97	8,15	
					0,075	0,0058	37,29							165,71
					0,100	0,0074	47,57							158,57
B		35,066	61,0	0,050	0,0029	18,64	124,29							
				0,075	0,0045	28,93	128,57							
				0,100	0,0057	36,64	122,14							
10		A	35,053	63,5	0,050	0,0113	72,64	9	473,65	20,25				
					0,075	0,0169	108,64							482,86
					0,100	0,0201	129,21							430,71
	B	35,010	65,0	0,050	0,0128	82,29	548,57							
				0,075	0,0161	103,50	460,00							
				0,100	0,0217	139,50	465,00							
	C	35,080	63,0	0,050	0,0131	84,21	561,43							
				0,075	0,0166	106,71	474,29							
				0,100	0,0166	106,71	355,71							

Tabela A1 – Continuação.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente Angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	PFO (U/mL)	σ_p				
	Peso (g)	V.F. (mL)											
11	A	35,090	43,5	0,050	0,0074	47,44	9	243,51	14,78				
			0,075	0,0088	56,65	251,77							
			0,100	0,0083	53,36	177,86							
	B	35,010	54,0	0,050	0,0068	43,71				291,43			
			0,075	0,0088	56,57	251,43							
			0,100	0,0110	70,71	235,71							
	C	35,046	52,0	0,050	0,0061	39,21				261,43			
			0,075	0,0070	45,00	200,00							
			0,100	0,0096	61,71	205,71							
12	A	35,005	56,0	0,050	0,0100	64,28	6	353,57	27,08				
			0,075	0,0114	73,28	325,71							
			0,100	0,0138	88,71	295,71							
	B	35,076	52,0	0,050	0,0103	66,21				441,43			
			0,075	0,0120	77,14	342,86							
			0,100	0,0134	86,14	287,14							
	13	A	35,005	61,0	0,050	0,0072				46,29	9	262,73	11,09
				0,075	0,0105	67,50				300,00			
				0,100	0,0098	63,00				210,00			
B		35,070	52,0	0,050	0,0065	41,91	279,39						
			0,075	0,0081	52,07	231,43							
			0,100	0,0110	70,71	235,71							
C		35,074	62,0	0,050	0,0066	42,69	284,57						
			0,075	0,0092	59,21	263,14							
			0,100	0,0117	75,54	251,79							
14	A	35,000	70,0	0,050	0,0052	33,23	6	244,08	8,94				
			0,075	0,0087	55,77	247,89							
			0,100	0,0122	78,43	261,43							
	B	35,022	47,0	0,050	0,0061	39,21				261,43			
			0,075	0,0091	58,50	260,00							
			0,100	0,0099	63,64	212,14							
	15	A	35,020	61,5	0,050	0,0071				45,90	6	288,37	15,57
				0,075	0,0103	66,21				294,29			
				0,100	0,0121	77,98				259,93			
B		35,078	57,0	0,050	0,0082	52,71	351,43						
			0,075	0,0096	61,71	274,29							
			0,100	0,0114	73,29	244,29							
16		A	35,011	37,0	0,050	0,0052	33,12	8	213,16	12,23			
				0,075	0,0064	41,09	182,60						
				0,100	0,0090	57,98	193,29						
	B	35,002	44,0	0,050	0,0062	39,86	265,71						
			0,075	0,0082	52,71	234,29							
			0,100	0,0090	57,86	192,86							
	C	35,020	61,0	0,050	0,0058	37,29	248,57						
			0,100	0,0078	50,14	167,14							

Tabela A1 – Continuação.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente Angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	PFO (U/mL)	σ_p
	Peso (g)	V.F. (mL)							
17 A	25,020	52,0	0,050	0,0061	39,21	261,43	9	211,19	10,90
			0,075	0,0081	52,07	231,43			
			0,100	0,0092	59,14	197,14			
B	25,077	66,0	0,050	0,0048	30,86	205,71			
			0,075	0,0062	39,86	177,14			
			0,100	0,0084	54,00	180,00			
C	25,031	50,0	0,050	0,0061	39,21	261,43			
			0,075	0,0070	45,00	200,00			

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela A2 – Planejamento experimental fracionário 2⁷⁻³ para determinação de atividade de peroxidase de erva-mate.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	POD (U/mL)	σ_p								
	Peso (g)	V.F. (mL)															
1	A	15,021	73,5	0,050	0,000049	0,02	0,16	6	0,18	0,03							
				0,075	0,000052	0,03					0,13						
				0,100	0,000161	0,09					0,30						
	B	15,059	65,0	0,050	0,000043	0,02	0,16										
				0,075	0,000099	0,05	0,24										
				0,100	0,000050	0,03	0,09										
2	A	15,035	65,0	0,100	0,000001	0,01	0,04	4	0,04	0,01							
				B	15,028	60,0					0,050	0,000003	0,02	0,05			
											0,075	0,000007	0,01	0,03			
	0,100	0,000001	0,01				0,04										
	3	A	15,061	65,0	0,100	0,000100	0,05				0,18	4	0,17	0,02			
					B	15,021	71,0								0,050	0,000040	0,02
0,075								0,000050	0,03	0,12							
0,100		0,000120	0,07	0,22													
4		A	15,003	62,0	0,050	0,000000	0,00	NA	9								
					B	15,000	63,5								0,050	0,000000	0,00
	C											15,061	44,0	0,050	0,000000	0,00	NA
5		A	15,020	70,0				0,075						0,000160	0,09	0,39	8
					B	15,099	58,0	0,100						0,000296	0,16		
	0,050							0,000160				0,09	0,59				
	0,075	0,000200	0,11	0,49													
	C	15,006	57,0	0,100	0,000300	0,16	0,55										
				0,050	0,000230	0,13	0,84										
0,075				0,000210	0,12	0,51											
6	A	15,047	75,7	0,100	0,000300	0,16	0,55										
				0,050	0,00026	0,01	0,10										
				0,075	0,000041	0,02	0,10										
	B	15,002	71,0	0,100	0,000086	0,05	0,16										
				0,050	0,000028	0,02	0,10										
				0,075	0,000052	0,03	0,13										
0,100	0,000100	0,05	0,18														
7	A	15,065	53,0	0,050	0,000100	0,05	0,37	6	0,38	0,02							
				0,075	0,000130	0,07					0,32						
				0,100	0,000200	0,11					0,37						
	B	15,003	53,0	0,050	0,000100	0,05	0,37										
				0,075	0,000200	0,11	0,49										
				0,100	0,000220	0,12	0,40										
8	A	15,018	64,5	0,050	0,000030	0,02	0,11	9	0,08	0,01							
				0,075	0,000033	0,02					0,08						
				0,100	0,000045	0,02					0,08						
	B	15,020	65,0	0,050	0,000016	0,01	0,06										
				0,075	0,000014	0,01	0,03										
				0,100	0,000056	0,03	0,10										
	C	15,055	75,0	0,050	0,000020	0,01	0,07										
				0,075	0,000040	0,02	0,10										
				0,100	0,000040	0,02	0,07										

Tabela A2 – Continuação.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	POD (U/mL)	σ_p				
	Peso (g)	V.F. (mL)											
9	A	35,047	45,0	0,050	0,00022	0,12	6	1,05	0,08				
				0,075	0,00057	0,31							
				0,100	0,00050	0,27							
	B	35,066	61,0	0,050	0,00031	0,17							
				0,075	0,00040	0,22							
				0,100	0,00060	0,33							
10	A	35,008	60,0	0,050	0,00000	0,00	9	NA					
	B	35,053	63,5	0,050	0,00000	0,00	NA						
	C	35,010	65,0	0,050	0,00000	0,00	NA						
11	A	35,090	43,5	0,050	0,00025	0,14	6	1,31	0,16				
				0,075	0,00048	0,26							
				0,100	0,00110	0,60							
	B	35,026	50,0	0,050	0,00042	0,23							
				0,075	0,00045	0,25							
				0,100	0,00062	0,34							
12	A	35,021	73,0	0,050	0,00000	0,00	9	NA					
	B	35,005	56,0	0,050	0,00000	0,00	NA						
	C	35,076	52,0	0,050	0,00000	0,00	NA						
13	A	35,005	61,0	0,050	0,00018	0,10	6	0,67	0,05				
				0,075	0,00021	0,12							
				0,100	0,00035	0,19							
	B	35,070	52,0	0,050	0,00016	0,09							
				0,075	0,00030	0,16							
				0,100	0,00047	0,26							
14	A	35,022	47,0	0,050	0,00011	0,06	6	0,55	0,07				
				0,075	0,00020	0,11							
				0,100	0,00030	0,16							
	B	35,011	53,0	0,050	0,00020	0,11							
				0,075	0,00030	0,16							
				0,100	0,00020	0,11							
15	A	35,020	61,5	0,050	0,00010	0,05	4	0,37	0,01				
				0,075	0,00016	0,09							
				0,100	0,00016	0,09							
	B	35,000	58,0	0,050	0,00020	0,11							
				0,075	0,00020	0,11							
				0,100	0,00020	0,11							
D	35,078	57,0	0,050	0,00010	0,05								
			0,075	0,00010	0,05								
			0,100	0,00010	0,05								
16	A	35,011	37,0	0,050	0,00020	0,11	8	0,56	0,11				
				0,075	0,00024	0,13							
				0,100	0,00033	0,18							
				B	35,002	44,0				0,050	0,00029	0,16	
										0,075	0,00033	0,18	
										0,100	0,00033	0,18	
	D	35,020	61,0	0,050	0,00006	0,03							
				0,075	0,00028	0,15							
				0,100	0,00020	0,11							
	17	A	25,090	67,0	0,050	0,00008				0,04	6	0,49	0,12
					0,075	0,00033				0,18			
					0,100	0,00020				0,11			
B		25,031	50,0	0,050	0,00009	0,05							
				0,075	0,00010	0,05							
				0,100	0,00050	0,27							

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Planejamento experimental fatorial completo 2³Tabela A3 – Planejamento experimental fatorial completo 2³ para determinação de atividade de polifenoloxidase de erva-mate.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	PFO (U/mL)	σ_p				
	Peso (g)	V.F. (mL)											
1	A	20,036	69,0	0,050	0,0150	39,64	9	232,83	47,92				
				0,075	0,0190	42,21							
				0,100	0,0210	53,50							
	B	20,057	62,0	0,050	0,0079	50,59							
				0,075	0,0081	51,81							
				0,100	0,0121	77,79							
	C	20,066	65,0	0,050	0,0096	61,71							
				0,075	0,0128	82,29							
				0,100	0,0153	98,36							
2	A	40,040	64,0	0,050	0,0088	56,51	7	429,12	53,82				
				0,075	0,0105	67,50							
				0,100	0,0148	95,14							
	B	40,051	66,0	0,050	0,0107	68,79							
				0,075	0,0108	69,43							
				0,100	0,0148	95,14							
	C	40,062	60,0	0,050	0,0148	95,14							
				0,075	0,0213	136,93							
				0,100	0,0213	136,93							
3	A	20,020	66,0	0,050	0,0059	37,93	9	231,44	19,19				
				0,075	0,0070	45,26							
				0,100	0,0080	51,43							
	B	20,076	69,0	0,050	0,0056	36,00							
				0,075	0,0064	41,14							
				0,100	0,0077	49,50							
	C	20,015	67,0	0,050	0,0075	47,96							
				0,075	0,0110	70,71							
				0,100	0,0110	70,71							
4	A	40,047	60,0	0,050	0,0109	70,07	6	374,76	24,77				
				0,075	0,0122	78,43							
				0,100	0,0149	95,79							
	B	40,041	58,0	0,050	0,0100	64,29							
				0,075	0,0128	82,29							
				0,100	0,0149	95,79							
	5	A	20,015	63,0	0,050	0,0020				13,05	9	135,22	17,81
					0,075	0,0023				14,79			
					0,100	0,0029				18,64			
B		20,020	57,0	0,050	0,0051	32,79							
				0,075	0,0056	36,00							
				0,100	0,0076	48,86							
C		20,011	65,0	0,050	0,0041	26,36							
				0,075	0,0054	34,71							
				0,100	0,0061	39,21							

Tabela A3 – Continuação.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	PFO (U/mL)	σ_p
	Peso (g)	V.F. (mL)							
6	A	40,006	48,0	0,050	0,0052	33,43	9	254,76	17,74
				0,075	0,0072	46,29			
				0,100	0,0108	69,43			
	B	40,074	58,0	0,050	0,0088	56,57			
				0,075	0,0105	67,50			
				0,100	0,0120	77,14			
	C	40,066	50,0	0,050	0,0057	36,64			
				0,075	0,0081	52,07			
				0,100	0,0104	66,86			
7	A	20,023	57,0	0,050	0,0022	14,14	9	132,78	17,08
				0,075	0,0021	13,50			
				0,100	0,0026	16,71			
	B	20,034	65,0	0,050	0,0037	23,79			
				0,075	0,0044	28,29			
				0,100	0,0076	48,86			
	C	20,003	67,5	0,050	0,0044	28,29			
				0,075	0,0063	40,50			
				0,100	0,0079	50,79			
8	A	40,007	53,0	0,050	0,0064	41,14	9	192,10	11,44
				0,075	0,0063	40,50			
				0,100	0,0085	54,64			
	B	40,037	56,0	0,050	0,0043	27,64			
				0,075	0,0057	36,64			
				0,100	0,0073	46,93			
	C	40,042	54,0	0,050	0,0044	28,09			
				0,075	0,0072	46,48			
				0,100	0,0091	58,50			
9	A	30,040	57,0	0,075	0,0042	27,00	12	154,68	15,12
				0,100	0,0053	34,07			
	B	30,020	58,0	0,050	0,0045	32,08			
				0,075	0,0070	45,13			
	C	30,044	63,0	0,050	0,0025	16,20			
				0,075	0,0027	17,55			
				0,100	0,0041	26,29			
	D	30,027	57,5	0,075	0,0054	34,71			
				0,100	0,0075	48,21			
	E	30,022	62,0	0,050	0,0048	30,92			
				0,075	0,0080	51,56			
				0,100	0,0086	55,29			

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela A4 – Planejamento experimental fatorial completo 2^3 para determinação de atividade de peroxidase de erva-mate.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	PFO (U/mL)	σ_p	
	Peso (g)	V.F. (mL)								
1	A	20,036	69,0	0,050	0,00012	0,07	9	1,21	0,16	
				0,075	0,00028	0,15				
				0,100	0,00038	0,21				
	B	20,057	62,0	0,050	0,00047	0,26	9	1,21	0,16	
				0,075	0,00054	0,29				
				0,100	0,00082	0,45				
	C	20,066	65,0	0,050	0,00042	0,23	9	1,21	0,16	
				0,075	0,00065	0,36				
				0,100	0,00080	0,44				
2	A	40,040	64,0	0,050	0,00045	0,25	9	3,53	0,33	
				0,075	0,00175	0,96				
				0,100	0,00200	1,10				
	B	40,051	66,0	0,050	0,00084	0,46	9	3,53	0,33	
				0,075	0,00202	1,11				
				0,100	0,00254	1,39				
	C	40,062	60,0	0,050	0,00080	0,44	9	3,53	0,33	
				0,075	0,00135	0,74				
				0,100	0,00180	0,99				
3	A	20,020	66,0	0,050	0,00021	0,12	3	0,87	0,11	
				0,100	0,00040	0,22				
				0,100	0,00060	0,33				
4	A	40,047	60,0	0,050	0,00028	0,15	6	0,93	0,09	
				0,075	0,00040	0,22				
				0,100	0,00050	0,27				
	B	40,041	58,0	0,050	0,00025	0,14	6	0,93	0,09	
				0,075	0,00050	0,27				
				0,100	0,00030	0,16				
	5	A	20,015	63,0	0,050	0,00030	0,16	9	1,24	0,11
					0,075	0,00050	0,27			
					0,100	0,00050	0,27			
B		20,020	57,0	0,050	0,00030	0,16	9	1,24	0,11	
				0,075	0,00034	0,19				
				0,100	0,00060	0,33				
C		20,011	65,0	0,050	0,00050	0,27	9	1,24	0,11	
				0,075	0,00057	0,31				
				0,100	0,00090	0,49				
6	A	40,006	48,0	0,050	0,00079	0,43	9	2,85	0,25	
				0,075	0,00068	0,37				
				0,100	0,00120	0,66				
	B	40,074	58,0	0,050	0,00100	0,55	9	2,85	0,25	
				0,075	0,00140	0,77				
				0,100	0,00214	1,17				
	C	40,066	50,0	0,050	0,00064	0,35	9	2,85	0,25	
				0,075	0,00125	0,69				
				0,100	0,00140	0,79				

Tabela A4 – Continuação.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coeficiente angular	V.I. (μ mol/min)	Atividade (U/mL)	n*	PFO (U/mL)	σ_p	
	Peso (g)	V.F. (mL)								
7	A	20,023	57,0	0,050	0,00060	0,33	7	0,65	0,28	
				0,075	0,00005	0,03				
				0,100	0,00020	0,11				
	B	20,034	65,0	0,050	0,00008	0,04				
				0,075	0,00040	0,22				
				0,100	0,00010	0,05				
	C	20,003	67,5	0,050	0,00012	0,07				
	8	A	40,007	53,0	0,075	0,00029	0,16	6	0,83	0,19
					0,075	0,00016	0,09			
0,100					0,00020	0,11				
B		40,037	56,0	0,050	0,00016	0,09				
				0,075	0,00020	0,11				
				0,100	0,00030	0,16				
C		40,042	54,0	0,075	0,00070	0,38				
				0,075	0,00070	0,38				
				0,100	0,00050	0,27				
9	A	30,040	57,0	0,050	0,00017	0,09	15	1,53	0,17	
				0,075	0,00040	0,22				
				0,100	0,00056	0,31				
	B	30,020	58,0	0,050	0,00045	0,25				
				0,075	0,00081	0,44				
				0,100	0,00081	0,44				
	C	30,044	63,0	0,050	0,00017	0,09				
				0,075	0,00023	0,12				
				0,100	0,00072	0,39				
	D	30,027	57,5	0,050	0,00054	0,29				
				0,075	0,00081	0,44				
				0,100	0,00093	0,51				
	E	30,022	62,0	0,050	0,00059	0,32				
				0,075	0,00111	0,61				
				0,100	0,00122	0,67				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela A5 – Continuação.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef angular	V.I. (μ mol/ min)	Ativid. (U/mL)	PFO (U/mL)	σ_p	Atividade								
	Peso (g)	V.F. (mL)							mg ptn	Especif. (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p				
5	A	40,046	67,0	0,050	0,0136	87,43	582,86	553,88	30,53	1,19	1471,86	7	1344,23	70,21			
				0,075	0,0110	141,43	628,57		1,30	1523,08							
				0,100	0,0101	129,86	432,86			1450,55							
	B	40,017	53,0	0,050	0,0077	99,00	660,00										
				0,075	0,0110	141,43	628,57										
				0,100	0,0101	129,86	432,86										
	C	40,046	67,0	0,050	0,0067	86,14	574,29			1,19	1447,78						
				0,075	0,0090	115,71	514,29								1296,52		
				0,100	0,0113	145,29	484,29								1220,89		

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela A6 – Planejamento experimental fatorial completo 2² para determinação de atividade de peroxidase de erva-mate.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Ativid (U/mL)	POD (U/mL)	σ_p	mg ptn	Atividade					
	Peso (g)	V.F. (mL)								específ. (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p		
1	A	40,077	63,0	0,050	0,0016	0,88	5,85	4,71	0,29	1,18	14,88	10	10,86	0,74	
			0,075	0,0023	1,26	5,61	14,26								
			0,100	0,0022	1,21	4,02	10,23								
	B	40,030	51,0	0,075	0,0008	0,88	3,90	1,28		1,28	9,15				
				0,100	0,0012	1,32	4,39				10,29				
	C	40,077	66,0	0,050	0,0017	0,93	6,22	1,48		1,48	12,61				
				0,075	0,0021	1,15	5,12				10,38				
				0,100	0,0022	1,21	4,02				8,16				
	D	40,030	51,0	0,050	0,0010	0,53	3,55	1,28		1,28	8,32				
				0,075	0,0018	0,99	4,39				10,29				
	2	A	40,020	53,0	0,050	0,0007	0,38	2,56	2,20	0,23	1,21	6,35	14	4,71	0,45
				0,075	0,0009	0,52	2,29	5,68							
0,100				0,0012	0,65	2,18	5,40								
B		40,016	56,0	0,050	0,0008	0,46	3,04	1,44		1,44	6,34				
				0,075	0,0011	0,62	2,76				5,74				
				0,100	0,0015	0,82	2,74				5,72				
C		40,087	66,0	0,075	0,0003	0,16	0,73	1,32		1,32	1,66				
				0,100	0,0009	0,49	1,65				3,74				
D		40,080	60,0	0,050	0,0007	0,38	2,56	1,55		1,55	4,96				
				0,075	0,0013	0,71	3,17				6,14				
E		40,087	66,0	0,075	0,0002	0,22	0,98	1,32		1,32	2,22				
				0,100	0,0002	0,22	0,73				1,66				
F		40,087	66,0	0,075	0,0005	0,55	2,44	1,55		1,55	4,72				
				0,100	0,0008	0,88	2,93				5,66				
3		A	40,057	55,0	0,050	0,0022	1,21	6,90	5,65	0,20	1,53	15,78	13	11,66	0,52
				0,075	0,0028	1,54	6,59	13,39							
				0,100	0,0026	1,43	4,76	9,33							
		B	40,020	57,0	0,050	0,0014	0,77	5,12	1,35		1,35	11,38			
	0,075				0,0018	0,99	4,39	9,76							
	C	40,049	57,0	0,050	0,0015	0,82	5,49	1,47		1,47	11,20				
				0,075	0,0025	1,37	6,10				12,44				
				0,100	0,0028	1,54	5,12				10,45				
	D	40,057	55,0	0,075	0,0013	1,43	6,34	1,53		1,53	12,43				
				0,100	0,0018	1,98	6,06				12,91				
	E	40,020	57,0	0,050	0,0008	0,88	5,85	1,35		1,35	13,01				
				0,075	0,0009	0,99	5,39				9,76				
				0,100	0,0012	1,32	5,39				9,76				

Tabela A6 – Continuação.

Ex	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Ativid (U/mL)	POD (U/mL)	σ_p	mg ptn	Atividade				
	Peso (g)	V.F. (mL)								especif. (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	
4	A	40,026	58,0	0,050	0,0006	0,33	2,20	2,89	0,21	1,23	5,35	11	5,92	0,63
			0,075	0,0009	0,49	2,20	5,35							
	B	40,050	55,0	0,050	0,0010	0,55	3,66	1,53			7,17			
				0,075	0,0014	0,77	3,41				6,70			
	C	40,012	55,0	0,050	0,0007	0,38	2,56	1,59			4,83			
				0,075	0,0008	0,44	1,95				3,68			
	D	40,026	58,0	0,075	0,0005	0,55	2,44			1,23	5,95			
	E	40,012	55,0	0,100	0,0008	0,88	2,93			1,59	5,52			
	F	40,050	55,0	0,050	0,0005	0,55	3,66	1,53			7,17			
				0,075	0,0008	0,88	3,90				7,65			
				0,100	0,0008	0,88	2,93				5,74			
	5	A	40,017	53,0	0,050	0,0018	0,99	6,59	4,40	0,29	1,29	15,31	10	10,62
0,075				0,0020	1,10	4,88	11,34							
B		40,046	67,0	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,19			10,16			
				0,075	0,0020	1,10	4,88				12,32			
				0,100	0,0023	1,26	4,21				10,62			
C		40,017	53,0	0,050	0,0006	0,66	4,39	1,29			10,21			
				0,075	0,0008	0,88	3,90				9,08			
				0,100	0,0011	1,21	4,02				9,36			
D		40,046	67,0	0,075	0,0007	0,77	3,41	1,19			8,61			
				0,100	0,0010	1,10	3,66				9,22			

n* número de réplicas para medida de atividade.

Determinação da melhor condição de extração e medida de atividade de polifenoloxidase

Tabela A7 – Extração e medida de atividade de polifenoloxidase de erva-mate em pH de medida de atividade 8,0, com 3 e 7% de PVP K90.

Ex	Amostras		Volum. Ensaio (µL)	Coef. angul.	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	PFO (U/mL)	σ _p	mg ptn	Atividade		σ _p	
	Peso (g)	V.F. (mL)								mg ptn	n*		PFO (U/mg ptn)
1	A	40,028	58,0	0,050	0,0134	86,14	574,29	712,02	67,13	1,43	1204,80	12	1693,94
			0,075	0,0149	95,79	425,71	893,11						
			0,100	0,0123	158,14	527,14	1061,36						
	B	40,068	50,0	0,050	0,0191	122,79	818,57			1,36	1805,67		
				0,075	0,0095	122,14	542,86			1,49	1093,00		
				0,100	0,0123	158,14	527,14			1061,36			
	D	40,068	50,0	0,050	0,0122	156,86	1045,71			1,36	2306,72		
				0,075	0,0197	253,29	1125,71			2483,19			
				0,100	0,0187	243,00	810,00			1786,76			
	E	40,082	64,0	0,050	0,0110	70,71	471,43			1,49	949,19		
	F	40,027	63,0	0,050	0,0110	141,43	942,86			0,98	2886,30		
				0,075	0,0117	150,43	668,57			2046,65			
0,100				0,0138	177,43	591,43	1810,50						
2	A	40,027	63,0	0,050	0,0088	56,57	377,14	476,11	66,57	1,58	716,09	9	1149,00
				0,075	0,0108	69,43	308,57				1305,66		
				0,100	0,0153	98,36	327,86				1387,27		
	C	40,035	57,0	0,050	0,0093	119,57	797,14			1,58	1513,56		
				0,075	0,0127	163,29	725,71			1377,94			
				0,100	0,0153	196,71	655,71			1245,03			
	D	40,023	57,0	0,050	0,0061	39,21	261,43			1,70	461,34		
	E	40,035	57,0	0,075	0,0084	108,00	480,00			1,70	847,06		

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela A8 – Extração e medida de atividade de polifenoloxidase de erva-mate em pH de medida de atividade 9,0.

Amostras	Vol. ens. (µL)	Coef. angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	PFO (U/mL)	σ _p	Atividade		σ _p			
							mg ptn	n*		PFO (U/mg ptn)		
A	40,085	60,0	0,050	0,0146	93,86	1251,43	1055,95	70,85	0,60	3128,57	6	2544,96
			0,075	0,0217	139,50	1240,00				3100,00		
			0,100	0,0206	132,43	882,86				2207,14		
B	40,008	60,0	0,050	0,0131	84,21	1122,86	0,65	2591,21				
			0,075	0,0171	109,93	977,14	2254,95					
			0,100	0,0201	129,21	861,43	1987,91					

n* número de réplicas para medida de atividade.

APÊNDICE B – ESTABILIDADE DE OXIDASES DE ERVA-MATE

Neste apêndice estão demonstradas as atividades das oxidases de erva-mate armazenadas a baixas temperaturas (4, -4 e -80°C) e submetidas a moderadas e altas temperaturas (20, 40, 60 e 80°C).

Oxidases de erva-mate armazenadas a baixas temperaturas

Polifenoloxidase

Tabela B1 – Relação das amostras de extrato de polifenoloxidase de erva-mate para verificação da atividade de polifenoloxidase armazenada a baixas temperaturas.

Amostra	A	B	C
Peso (g)	40,066	40,073	40,048
V.F. (mL)	61,0	65,0	68,0

Tabela B2 – Atividade de polifenoloxidase erva-mate armazenada à 4°C.

Dia	Am	Volume ensaio (µL)	Coef. angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ _p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27	9	1362,59	86,82	100
		0,075	0,0075	48,21	642,86		1367,78				
		0,100	0,0091	58,50	585,00		1244,68				
	B	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27				
		0,075	0,0078	50,14	668,57		1422,49				
		0,100	0,0095	61,07	610,71		1299,39				
	C	0,050	0,0061	39,21	784,29	0,55	1425,97				
		0,075	0,0078	50,14	668,57		1215,58				
		0,100	0,0100	64,29	642,86		1168,83				
1	A	0,050	0,0060	38,57	771,43	0,47	1641,34	9	1394,44	111,22	102
		0,075	0,0075	48,21	642,86		1367,78				
		0,100	0,0091	58,50	585,00		1244,68				
	B	0,050	0,0061	39,21	784,29	0,47	1668,69				
		0,075	0,0077	49,50	660,00		1404,26				
		0,100	0,0096	61,71	617,14		1313,07				
	C	0,050	0,0065	41,79	835,71	0,55	1519,48				
		0,075	0,0080	51,36	684,86		1245,19				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1145,45				

Tabela B2 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_P	Atividade residual (%)
2	A	0,075	0,0081	52,07	694,29	0,47	1477,20	8	1481,67	107,42	109
		0,100	0,0093	59,79	597,86		1272,04				
		0,050	0,0060	38,57	771,43	0,47	1641,34				
	B	0,075	0,0081	52,07	694,29		1477,20				
		0,100	0,0122	78,43	784,29		1668,69				
		0,050	0,0069	44,36	887,14	0,55	1612,99				
	C	0,075	0,0094	60,43	805,71		1464,94				
		0,100	0,0106	68,14	681,43		1238,96				
4	A	0,050	0,0059	37,93	758,57	0,47	1613,98	6	1553,76	55,27	114
		0,075	0,0082	52,71	702,86		1495,44				
		0,100	0,0112	72,00	720,00		1531,91				
	B	0,075	0,0083	53,36	711,43	0,47	1513,68				
		0,100	0,0112	72,00	720,00		1531,91				
		0,050	0,0071	45,64	912,86	0,55	1659,74				
	C	0,100	0,0129	82,93	829,29		1507,79				
9	A	0,050	0,0055	35,36	707,14	0,47	1504,56	8	1310,74	96,13	96
		0,075	0,0070	45,00	600,00		1276,60				
		0,100	0,0086	55,29	552,86		1176,29				
	B	0,050	0,0056	36,00	720,00	0,47	1531,91				
		0,100	0,0089	57,21	572,14		1217,33				
		0,050	0,0058	37,29	745,71	0,55	1355,84				
	C	0,075	0,0082	52,71	702,86		1277,92				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1145,45				
14	A	0,050	0,0059	37,93	758,57	0,47	1613,98	9	1438,45	98,55	106
		0,075	0,0078	50,14	668,57		1422,49				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1340,43				
	B	0,050	0,0041	26,36	527,14	0,47	1121,58				
		0,075	0,0088	56,57	754,29		1604,86				
		0,100	0,0105	67,50	675,00		1436,17				
	C	0,050	0,0068	43,71	874,29	0,55	1589,61				
		0,075	0,0096	61,71	822,86		1496,10				
		0,100	0,0113	72,64	726,43		1320,78				
19	A	0,050	0,0056	36,00	720,00	0,47	1531,91	9	1369,96	103,38	101
		0,075	0,0065	41,79	557,14		1185,41				
		0,100	0,0085	54,64	546,43		1162,61				
	B	0,050	0,0060	38,57	771,43	0,47	1641,34				
		0,075	0,0077	49,50	660,00		1404,26				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1340,43				
	C	0,050	0,0065	41,79	835,71	0,55	1519,48				
		0,075	0,0086	55,29	737,14		1340,26				
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1203,90				
24	A	0,050	0,0046	29,57	591,43	0,47	1258,36	9	1290,41	84,54	95
		0,075	0,0063	40,50	540,00		1148,94				
		0,100	0,0082	52,71	527,14		1121,58				
	B	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27				
		0,075	0,0071	45,64	608,57		1294,83				
		0,100	0,0099	63,64	636,43		1354,10				
	C	0,050	0,0061	39,21	784,29	0,55	1425,97				
		0,075	0,0080	51,43	685,71		1246,75				
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1203,90				

Tabela B2 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_P	Atividade residual (%)
29	A	0,050	0,0052	33,43	668,57	0,47	1422,49	8	1361,81	71,27	100
		0,075	0,0072	46,29	617,14		1313,07				
		0,100	0,0088	56,57	565,71		1203,65				
	B	0,075	0,0081	52,07	694,29	0,47	1477,20				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1340,43				
		C	0,050	0,0065	41,79		835,71				
	0,075		0,0087	55,93	745,71	1355,84					
	0,100		0,0108	69,43	694,29	1262,34					
	39	A	0,050	0,0040	25,71	514,29	0,47				
0,075			0,0060	38,57	514,29	1094,22					
B			0,050	0,0046	29,57	591,43		0,47	1258,36		
		0,075	0,0064	41,14	548,57	1167,17					
		0,100	0,0077	49,50	495,00	1053,19					
C		0,050	0,0054	34,71	694,29	0,55	1262,34				
		0,075	0,0074	47,57	634,29		1153,25				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1145,45				
49		A	0,050	0,0043	27,64	552,86	0,47	1176,29	9	1136,07	42,15
	0,075		0,0062	39,86	531,43	1130,70					
	0,100		0,0077	49,50	495,00	1053,19					
	B	0,050	0,0047	30,21	604,29	0,47	1285,71				
		0,075	0,0058	37,29	497,14		1057,75				
		0,100	0,0083	53,36	533,57		1135,26				
	C	0,050	0,0048	30,86	617,14	0,55	1122,08				
		0,075	0,0074	47,57	634,29		1153,25				
		0,100	0,0095	61,07	610,71		1110,39				
59	A	0,050	0,0035	22,50	450,00	0,47	957,45	8	1102,92	93,60	81
		0,075	0,0068	43,71	582,86		1240,12				
		0,100	0,0066	42,43	424,29		902,74				
	B	0,050	0,0044	28,29	565,71	0,47	1203,65				
		0,075	0,0065	41,79	557,14		1185,41				
		0,100	0,0068	43,71	437,14		930,09				
	C	0,075	0,0077	49,50	660,00	0,55	1200,00				
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1203,90				
74	A	0,050	0,0035	22,50	450,00	0,47	957,45	7	921,67	32,96	68
		0,075	0,0049	31,50	420,00		893,62				
		0,100	0,0059	37,93	379,29		806,99				
	B	0,050	0,0038	24,43	488,57	0,47	1039,51				
		0,075	0,0052	33,43	445,71		948,33				
		0,100	0,0064	41,14	411,43		875,38				
	C	0,050	0,0040	25,59	511,71	0,55	930,39				
		0,075	0,0050	32,21	429,43		780,78				
99	A	0,050	0,0036	23,14	462,86	0,47	984,80	7	898,07	32,98	66
		0,075	0,0048	30,86	411,43		875,38				
		0,100	0,0061	39,21	392,14		834,35				
	B	0,075	0,0054	34,71	462,86	0,47	984,80				
		0,100	0,0072	46,29	462,86		984,80				
		C	0,050	0,0036	23,14		462,86				
	0,075		0,0050	32,21	429,43	780,78					

Tabela B2 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_P	Atividade residual (%)
149	A	0,050	0,0025	16,07	321,43	0,47	683,89	9	699,28	40,87	51
		0,075	0,0038	24,43	325,71		693,01				
		0,100	0,0052	33,43	334,29		711,25				
	B	0,050	0,0029	18,64	372,86	0,47	793,31				
		0,075	0,0043	27,64	368,57		784,19				
		0,100	0,0067	43,07	430,71		916,41				
	C	0,050	0,0026	16,71	334,29	0,55	607,79				
		0,075	0,0042	27,00	360,00		654,55				
		0,100	0,0057	36,64	366,43		666,23				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B3 – Atividade de polifenoloxidase erva-mate armazenada à -4°C .

Dia	Am	Volume ensaio (μL)	Coef. angular	V.I. ($\mu\text{mol}/$ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27	9	1362,59	86,82	100
		0,075	0,0075	48,21	642,86		1367,78				
		0,100	0,0091	58,50	585,00		1244,68				
	B	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27				
		0,075	0,0078	50,14	668,57		1422,49				
		0,100	0,0095	61,07	610,71		1299,39				
	C	0,050	0,0061	39,21	784,29	0,55	1425,97				
		0,075	0,0078	50,14	668,57		1215,58				
		0,100	0,0100	64,29	642,86		1168,83				
1	A	0,050	0,0064	41,14	822,86	0,47	1750,76	8	1459,68	125,38	107
		0,075	0,0085	54,64	728,57		1550,15				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1340,43				
	B	0,050	0,0068	43,71	874,29	0,47	1860,18				
		0,075	0,0088	56,57	754,29		1604,86				
		0,100	0,0096	61,71	617,14		1313,07				
	C	0,050	0,0067	43,07	861,43	0,55	1566,23				
		0,075	0,0088	56,57	754,29		1371,43				
		0,100	0,0101	64,93	649,29		1180,52				
2	A	0,075	0,0077	49,50	660,00	0,47	1404,26	7	1498,48	79,06	110
		0,100	0,0104	66,86	668,57		1422,49				
		0,050	0,0059	37,93	758,57		0,47				
	B	0,075	0,0085	54,64	728,57	1550,15					
		0,100	0,0105	67,50	675,00	1436,17					
		C	0,050	0,0071	45,64	912,86	0,55				
	0,075		0,0090	57,86	771,43	1402,60					
	0,100		0,0101	64,93	649,29	1180,52					
	4	A	0,075	0,0086	55,29	737,14	0,47				
0,100			0,0103	66,21	662,14	1408,81					
0,050			0,0058	37,29	745,71	0,47		1586,63			
B		0,075	0,0083	53,36	711,43		1513,68				
		0,100	0,0107	68,79	687,86		1463,53				
		0,050	0,0068	43,71	874,29	0,55	1589,61				
C		0,075	0,0093	59,79	797,14		1449,35				
		0,100	0,0123	79,07	790,71		1437,66				
		9	A	0,050	0,0062	39,86	797,14	0,47	1696,05	9	1398,50
0,075	0,0075			48,21	642,86	1367,78					
0,100	0,0092			59,14	591,43	1258,36					
B	0,050		0,0058	37,29	745,71	0,47	1586,63				
	0,075		0,0079	50,79	677,14		1440,73				
	0,100		0,0090	57,86	578,57		1231,00				
C	0,050		0,0070	44,81	896,14	0,55	1629,35				
	0,075		0,0082	52,71	702,86		1277,92				
	0,100		0,0094	60,43	604,29		1098,70				
14	A	0,075	0,0091	58,50	780,00	0,47	1659,57	8	1520,57	75,62	112
		0,100	0,0108	69,43	694,29		1477,20				
		0,050	0,0060	38,57	771,43		0,47				
	B	0,075	0,0087	55,93	745,71	1586,63					
		0,100	0,0105	67,50	675,00	1436,17					
		C	0,050	0,0068	43,71	874,29	0,55				
	0,075		0,0091	58,50	780,00	1418,18					
	0,100		0,0116	74,57	745,71	1355,84					

Tabela B3 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)					
19	A	0,050	0,0059	37,93	758,57	0,47	1613,98	9	1499,87	73,46	110					
		0,075	0,0081	52,07	694,29		1477,20									
		0,100	0,0106	68,14	681,43		1449,85									
	B	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27									
		0,075	0,0081	52,07	694,29		1477,20									
		0,100	0,0123	79,07	790,71		1682,37									
	C	0,050	0,0066	42,43	848,57	0,55	1542,86									
		0,075	0,0092	59,14	788,57		1433,77									
		0,100	0,0108	69,43	694,29		1262,34									
24	A	0,075	0,0093	59,79	797,14	0,47	1696,05	7	1536,25	98,42	113					
		0,100	0,0114	73,29	732,86		1559,27									
	B	0,075	0,0083	53,36	711,43	0,47	1513,68									
		0,100	0,0102	65,57	655,71		1395,14									
	C	0,050	0,0073	46,93	938,57	0,55	1706,49									
		0,075	0,0098	63,00	840,00		1527,27									
		0,100	0,0116	74,57	745,71		1355,84									
	29	A	0,075	0,0095	61,07	814,29	0,47					1732,52	7	1600,29	94,92	117
			0,100	0,0111	71,36	713,57						1518,24				
B		0,075	0,0089	57,21	762,86	0,47	1623,10									
		0,100	0,0116	74,57	745,71		1586,63									
C		0,050	0,0076	48,86	977,14	0,55	1776,62									
		0,075	0,0101	64,93	865,71		1574,03									
		0,100	0,0119	76,50	765,00		1390,91									
39		A	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27	8	1419,71	72,51	104				
			0,075	0,0080	51,43	685,71		1458,97								
	0,100		0,0095	61,07	610,71	1299,39										
	B	0,050	0,0054	34,71	694,29	0,47	1477,20									
		0,075	0,0084	54,00	720,00		1531,91									
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1408,81									
	C	0,075	0,0088	56,57	754,29	0,55	1371,43									
		0,100	0,0107	68,79	687,86		1250,65									
		49	A	0,050	0,0056		36,00	720,00					0,47	1531,91	9	1432,04
0,075	0,0077			49,50	660,00	1404,26										
0,100	0,0096			61,71	617,14	1313,07										
B	0,050		0,0053	34,07	681,43	0,47	1449,85									
	0,075		0,0081	52,07	694,29		1477,20									
	0,100		0,0104	66,86	668,57		1422,49									
C	0,050		0,0066	42,43	848,57	0,55	1542,86									
	0,075		0,0096	61,71	822,86		1496,10									
	0,100		0,0107	68,79	687,86		1250,65									
59	A	0,075	0,0086	55,29	737,14	0,47	1568,39	8	1433,29	85,20	105					
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1408,81									
	B	0,050	0,0056	35,94	718,71	0,47	1529,18									
		0,075	0,0085	54,64	728,57		1550,15									
		0,100	0,0095	61,07	610,71		1299,39									
	C	0,050	0,0063	40,50	810,00	0,55	1472,73									
		0,075	0,0092	59,14	788,57		1433,77									
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1203,90									

Tabela B3 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μL)	Coef. angular	V.I. ($\mu\text{mol}/$ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
74	A	0,050	0,0053	34,07	681,43	0,47	1449,85	9	1374,37	93,21	101
		0,075	0,0075	48,21	642,86		1367,78				
		0,100	0,0091	58,50	585,00		1244,68				
	B	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27				
		0,075	0,0078	50,14	668,57		1422,49				
		0,100	0,0090	58,05	580,50		1235,11				
	C	0,050	0,0070	44,87	897,43	0,55	1631,69				
		0,075	0,0079	50,79	677,14		1231,17				
		0,100	0,0105	67,50	675,00		1227,27				
99	A	0,050	0,0065	41,79	835,71	0,47	1778,12	9	1460,16	118,82	107
		0,075	0,0085	54,64	728,57		1550,15				
		0,100	0,0121	77,79	777,86		1655,02				
	B	0,050	0,0051	32,79	655,71	0,47	1395,14				
		0,075	0,0085	54,64	728,57		1550,15				
		0,100	0,0101	64,93	649,29		1381,46				
	C	0,050	0,0061	39,21	784,29	0,55	1425,97				
		0,075	0,0080	51,49	686,57		1248,31				
		0,100	0,0099	63,64	636,43		1157,14				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B4 – Atividade de polifenoloxidase erva-mate armazenada à -80°C .

Dia	Am	Volume ensaio (μL)	Coef. angular	V.I. ($\mu\text{mol}/$ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27	9	1362,59	86,82	100
		0,075	0,0075	48,21	642,86		1367,78				
		0,100	0,0091	58,50	585,00		1244,68				
	B	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27				
		0,075	0,0078	50,14	668,57		1422,49				
		0,100	0,0095	61,07	610,71		1299,39				
	C	0,050	0,0061	39,21	784,29	0,55	1425,97				
		0,075	0,0078	50,14	668,57		1215,58				
		0,100	0,0100	64,29	642,86		1168,83				
1	A	0,050	0,0063	40,50	810,00	0,47	1723,40	9	1484,17	120,77	109
		0,075	0,0080	51,43	685,71		1458,97				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1340,43				
	B	0,050	0,0064	41,14	822,86	0,47	1750,76				
		0,075	0,0084	54,00	720,00		1531,91				
		0,100	0,0096	61,71	617,14		1313,07				
	C	0,050	0,0072	46,29	925,71	0,55	1683,12				
		0,075	0,0086	55,29	737,14		1340,26				
		0,100	0,0104	66,86	668,57		1215,58				
2	A	0,050	0,0059	37,93	758,57	0,47	1613,98	9	1453,72	86,17	107
		0,075	0,0081	52,07	694,29		1477,20				
		0,100	0,0098	63,00	630,00		1340,43				
	B	0,050	0,0058	37,29	745,71	0,47	1586,63				
		0,075	0,0077	49,50	660,00		1404,26				
		0,100	0,0092	59,14	591,43		1258,36				
	C	0,050	0,0070	45,00	900,00	0,55	1636,36				
		0,075	0,0095	61,07	814,29		1480,52				
		0,100	0,0110	70,71	707,14		1285,71				
4	A	0,050	0,0061	39,21	784,29	0,47	1668,69	7	1518,32	106,27	111
		0,075	0,0091	58,50	780,00		1659,57				
		0,100	0,0104	66,86	668,57		1422,49				
	B	0,050	0,0060	38,57	771,43	0,47	1641,34				
		0,075	0,0084	54,00	720,00		1531,91				
		0,100	0,0102	65,57	655,71		1395,14				
	C	0,075	0,0084	54,00	720,00	0,55	1309,09				
		0,050	0,0060	38,57	771,43		1641,34				
		0,075	0,0086	55,29	737,14		1568,39				
9	A	0,050	0,0060	38,57	771,43	0,47	1641,34	9	1421,22	92,67	104
		0,075	0,0086	55,29	737,14		1568,39				
		0,100	0,0095	61,07	610,71		1299,39				
	B	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27				
		0,075	0,0074	47,57	634,29		1349,54				
		0,100	0,0093	59,79	597,86		1272,04				
	C	0,050	0,0064	41,14	822,86	0,55	1496,10				
		0,075	0,0089	57,79	770,57		1401,04				
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1203,90				
14	A	0,050	0,0058	37,29	745,71	0,47	1586,63	8	1485,33	97,45	109
		0,075	0,0080	51,43	685,71		1458,97				
		0,100	0,0109	70,07	700,71		1490,88				
	B	0,075	0,0088	56,57	754,29	0,47	1604,86				
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1408,81				
		0,050	0,0074	47,57	951,43		1729,87				
	C	0,075	0,0083	53,36	711,43	0,55	1293,51				
		0,100	0,0112	72,00	720,00		1309,09				

Tabela B4 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μL)	Coef. angular	V.I. ($\mu\text{mol}/$ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)	
19	A	0,050	0,0062	39,86	797,14	0,47	1696,05	9	1487,74	87,44	109	
		0,075	0,0087	55,93	745,71		1586,63					
		0,100	0,0106	68,14	681,43		1449,85					
	B	0,050	0,0067	43,07	861,43	0,47	1832,83					
		0,075	0,0083	53,36	711,43		1513,68					
		0,100	0,0107	68,79	687,86		1463,53					
	C	0,050	0,0066	42,43	848,57	0,55	1542,86					
		0,075	0,0089	57,21	762,86		1387,01					
		0,100	0,0108	69,43	694,29		1262,34					
24	A	0,075	0,0087	55,93	745,71	0,47	1586,63	8	1523,73	90,46	112	
		0,100	0,0105	67,50	675,00		1436,17					
	B	0,050	0,0062	39,86	797,14	0,47	1696,05					
		0,075	0,0082	52,71	702,86		1495,44					
	C	0,100	0,0114	73,29	732,86	0,55	1559,27					
		0,050	0,0074	47,57	951,43		1729,87					
		0,075	0,0093	59,79	797,14		1449,35					
	29	A	0,075	0,0093	59,79	797,14	0,47	1696,05	8	1586,36	100,53	116
			0,100	0,0108	69,43	694,29		1477,20				
0,050			0,0063	40,50	810,00	1723,40						
B		0,075	0,0088	56,57	754,29	0,47	1604,86					
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1408,81					
		0,050	0,0077	49,50	990,00		1800,00					
C		0,075	0,0102	65,57	874,29	0,55	1589,61					
		0,100	0,0119	76,50	765,00		1390,91					
		0,050	0,0060	38,57	771,43		1641,34					
39	A	0,075	0,0102	65,57	874,29	0,47	1860,18	9	1508,46	87,72	111	
		0,100	0,0104	66,86	668,57		1422,49					
		0,050	0,0050	32,14	642,86		1367,78					
	B	0,075	0,0086	55,29	737,14	0,47	1568,39					
		0,100	0,0102	65,57	655,71		1395,14					
		0,050	0,0067	43,07	861,43		1566,23					
	C	0,075	0,0092	59,14	788,57	0,55	1433,77					
		0,100	0,0113	72,64	726,43		1320,78					
		0,050	0,0059	37,93	758,57		1613,98					
49	A	0,075	0,0088	56,57	754,29	0,47	1604,86	9	1458,64	80,60	107	
		0,100	0,0104	66,86	668,57		1422,49					
		0,050	0,0058	37,29	745,71		1586,63					
	B	0,075	0,0085	54,64	728,57	0,47	1550,15					
		0,100	0,0102	65,57	655,71		1395,14					
		0,050	0,0056	36,00	720,00		1309,09					
	C	0,075	0,0088	56,57	754,29	0,55	1371,43					
		0,100	0,0109	70,07	700,71		1274,03					
		0,050	0,0051	32,79	655,71		1395,14					
59	A	0,075	0,0083	53,36	711,43	0,47	1513,68	8	1436,78	43,35	105	
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1408,81					
		0,075	0,0077	49,50	660,00		1404,26					
	B	0,100	0,0101	64,93	649,29	0,47	1381,46					
		0,050	0,0067	43,07	861,43		1566,23					
		0,075	0,0092	59,14	788,57		1433,77					
	C	0,100	0,0119	76,50	765,00	0,55	1390,91					

Tabela B4 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
74	A	0,075	0,0085	54,64	728,57	0,47	1550,15	8	1471,32	88,58	108
		0,100	0,0099	63,64	636,43		1354,10				
	B	0,050	0,0057	36,64	732,86	0,47	1559,27				
		0,075	0,0080	51,49	686,57		1460,79				
		0,100	0,0097	62,36	623,57		1326,75				
	C	0,050	0,0072	46,29	925,71	0,55	1683,12				
		0,075	0,0098	63,00	840,00		1527,27				
		0,100	0,0112	72,00	720,00		1309,09				
	99	A	0,075	0,0087	55,93	745,71	0,47				
0,100			0,0100	64,29	642,86	1367,78					
B		0,050	0,0063	40,50	810,00	0,47	1723,40				
		0,075	0,0088	56,57	754,29		1604,86				
		0,100	0,0103	66,21	662,14		1408,81				
149		A	0,050	0,0058	37,29	745,71	0,47	1586,63	6	1402,74	137,59
	0,075		0,0076	48,86	651,43	1386,02					
	0,100		0,0088	56,57	565,71	1203,65					
	B	0,050	0,0059	37,93	758,57	0,47	1613,98				
		0,075	0,0075	48,21	642,86		1367,78				
		0,100	0,0092	59,14	591,43		1258,36				

* número de réplicas para medida de atividade.

Peroxidase

Tabela B5 – Relação das amostras de extrato de peroxidase de erva-mate para verificação da atividade de peroxidase armazenada a baixas temperaturas.

Amostra	A	B	C
Peso (g)	40,048	40,005	40,085
V.F. (mL)	60,0	50,0	51,0

Tabela B6 – Atividade de peroxidase de erva-mate armazenada à 4°C.

Dia	Am	Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	Atividade			PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)					
						mg Ptn	específica (U/mg ptn)	n*								
0	A	0,050	0,0018	0,99	6,59	1,25	15,80	8	14,55	0,72	100					
		0,075	0,0025	1,37	6,10	14,63										
		0,100	0,0037	2,03	6,77	16,24										
	B	0,050	0,0016	0,88	5,85	1,24	14,16									
		0,100	0,0032	1,76	5,85	14,16										
	C	0,050	0,0017	0,93	6,22	1,29	14,46									
		0,075	0,0025	1,37	6,10	14,18										
		0,100	0,0030	1,65	5,49	12,76										
	1	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,25					10,54	7	9,41	0,95	65
0,075			0,0019	1,04	4,63	11,12										
0,100			0,0025	1,37	4,57	10,98										
B		0,075	0,0015	0,82	3,66	1,24	8,85									
		0,100	0,0021	1,15	3,84	9,29										
C		0,075	0,0015	0,82	3,66	1,29	8,51									
		0,100	0,0021	1,15	3,84	8,93										
2		B	0,075	0,0011	0,60	2,68	1,24	6,49	4	6,50	1,02	45				
	0,100		0,0012	0,66	2,20	5,31										
	C	0,075	0,0013	0,71	3,17	1,29	7,37									
		0,100	0,0016	0,88	2,93	6,81										
	4	A	0,050	0,0004	0,22	1,46	1,25	3,51					8	5,11	0,82	35
			0,075	0,0009	0,49	2,20	5,27									
0,100			0,0012	0,66	2,20	5,27										
B		0,075	0,0007	0,38	1,71	1,24	4,13									
		0,100	0,0010	0,55	1,83	4,43										
C		0,050	0,0009	0,49	3,29	1,29	7,66									
	0,075	0,0009	0,49	2,20	5,10											
	0,100	0,0013	0,71	2,38	5,53											

* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B7 – Atividade de peroxidase de erva-mate armazenada à -4°C .

Dia	Am	Volume ensaio (μL)	Coef. angular	V.I. ($\mu\text{mol}/$ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0018	0,99	6,59	1,25	15,80	8	14,55	0,71	100
		0,075	0,0025	1,37	6,10		14,63				
		0,100	0,0037	2,03	6,77		16,24				
	B	0,050	0,0016	0,88	5,85	1,24	14,16				
		0,100	0,0032	1,76	5,85		14,16				
		C	0,050	0,0017	0,93	6,22	1,29	14,46			
	0,075		0,0025	1,37	6,10		14,18				
	0,100		0,0030	1,65	5,49		12,76				
	1	A	0,050	0,0009	0,49	3,29	1,25	7,90			
0,075			0,0021	1,15	5,12		12,29				
0,100			0,0016	0,88	2,93		7,02				
B		0,050	0,0008	0,44	2,93	1,24	7,08				
		0,075	0,0022	1,21	5,37		12,98				
		0,100	0,0026	1,43	4,76		11,51				
C		0,075	0,0017	0,93	4,15	1,29	9,64				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		9,78				
		2	A	0,050	0,0009	0,49	3,29	1,25	7,90	8	9,18
0,075	0,0014			0,77	3,41		8,20				
0,100	0,0023			1,26	4,21		10,10				
B	0,050		0,0007	0,38	2,56	1,24	6,20				
	0,075		0,0019	1,04	4,63		11,21				
	0,100		0,0021	1,15	3,84		9,29				
C	0,075		0,0016	0,88	3,90	1,29	9,08				
	0,100		0,0027	1,48	4,94		11,49				
	4		A	0,050	0,0009	0,49	3,29	1,25	7,90	7	
0,075		0,0016		0,88	3,90		9,37				
0,100		0,0023		1,26	4,21		10,10				
B		0,050	0,0007	0,38	2,56	1,24	6,20				
		0,075	0,0019	1,04	4,63		11,21				
		0,100	0,0026	1,43	4,76		11,51				
C		0,075	0,0015	0,82	3,66		8,51				
		0,100	0,0022	1,21	4,02		9,36				
		9	A	0,050	0,0007	0,38	2,56	1,25	6,15	9	5,94
0,075	0,0010			0,55	2,44		5,85				
0,100	0,0017			0,93	3,11		7,46				
B	0,050		0,0005	0,27	1,83	1,24	4,43				
	0,075		0,0010	0,55	2,44		5,90				
	0,100		0,0016	0,88	2,93		7,08				
C	0,050		0,0005	0,27	1,83	1,29	4,25				
	0,075		0,0010	0,53	2,37		5,50				
	0,100		0,0016	0,88	2,93		6,81				

Tabela B7 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μL)	Coef. angular	V.I. ($\mu\text{mol}/$ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
14	A	0,050	0,0006	0,33	2,20	1,25	5,27	9	7,72	1,12	53
		0,075	0,0013	0,71	3,17		7,61				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		10,10				
	B	0,050	0,0007	0,38	2,56	1,24	6,20				
		0,075	0,0014	0,77	3,41		8,26				
		0,100	0,0022	1,21	4,02		9,74				
	C	0,050	0,0006	0,33	2,20	1,29	5,10				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,08				
		0,100	0,0019	1,04	3,48		8,08				
19	A	0,050	0,0010	0,55	3,66	1,25	8,78	9	8,96	0,74	52
		0,075	0,0017	0,93	4,15		9,95				
		0,100	0,0024	1,32	4,39		10,54				
	B	0,050	0,0010	0,55	3,66	1,24	8,85				
		0,075	0,0018	0,99	4,39		10,62				
		0,100	0,0017	0,93	3,11		7,52				
	C	0,050	0,0009	0,49	3,29	1,29	7,66				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,08				
		0,100	0,0018	0,99	3,29		7,66				
24	A	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,25	9,66	9	9,41	0,53	65
		0,075	0,0018	0,99	4,39		10,54				
		0,100	0,0021	1,15	3,84		9,22				
	B	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,24	9,74				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,44				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		10,18				
	C	0,050	0,0009	0,49	3,29	1,29	7,66				
		0,075	0,0015	0,82	3,66		8,51				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		9,78				
29	A	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,25	9,66	9	10,41	0,55	72
		0,075	0,0018	0,99	4,39		10,54				
		0,100	0,0021	1,15	3,84		9,22				
	B	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,24	10,62				
		0,075	0,0020	1,10	4,88		11,80				
		0,100	0,0026	1,43	4,76		11,51				
	C	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,29	9,36				
		0,075	0,0019	1,04	4,63		10,78				
		0,100	0,0024	1,32	4,39		10,21				
39	A	0,075	0,0018	0,99	4,39	1,25	10,54	7	10,08	0,80	69
		0,100	0,0022	1,21	4,02		9,66				
	B	0,075	0,0014	0,77	3,41	1,24	8,26				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		10,18				
	C	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,29	10,21				
		0,075	0,0021	1,15	5,12		11,91				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		9,78				

Tabela B7 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μL)	Coef. Angular	V.I. ($\mu\text{mol}/$ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
49	A	0,075	0,0018	0,99	4,39	1,25	10,54	4	10,10	0,69	69
		0,100	0,0024	1,32	4,39		10,54				
	B	0,075	0,0017	0,93	4,15	1,24	10,03				
		0,100	0,0021	1,15	3,84		9,29				
59	A	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,25	9,66	6	9,95	0,65	68
		0,075	0,0018	0,99	4,39		10,54				
	B	0,075	0,0018	0,99	4,39	1,24	10,62				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		10,18				
	C	0,075	0,0018	0,99	4,39	1,29	10,21				
		0,100	0,0020	1,10	3,66		8,51				
74	A	0,075	0,0016	0,88	2,93	1,25	9,37	5	10,58	0,67	73
		0,100	0,0025	1,37	4,57	1,24	11,06				
	C	0,050	0,0013	0,71	4,76	1,29	11,06				
		0,075	0,0019	1,04	4,63		10,78				
		0,100	0,0025	1,37	4,57		10,64				
99	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,25	10,54	9	11,54	0,69	79
		0,075	0,0023	1,26	5,61		13,46				
		0,100	0,0028	1,54	5,12		12,29				
	B	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,24	10,62				
		0,075	0,0022	1,21	5,37		12,98				
	C	0,100	0,0026	1,43	4,76		11,51				
		0,050	0,0012	0,66	4,39	1,29	10,21				
		0,075	0,0019	1,04	4,63		10,78				
0,100	0,0027	1,48	4,94		11,49						

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B8 – Atividade de peroxidase de erva-mate armazenada à -80°C .

Dia	Am	Volume ensaio (μL)	Coef. angular	V.l. ($\mu\text{mol}/$ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0018	0,99	6,59	1,25	15,80	8	14,55	0,72	100
		0,075	0,0025	1,37	6,10		14,63				
		0,100	0,0037	2,03	6,77		16,24				
	B	0,050	0,0016	0,88	5,85	1,24	14,16				
		0,100	0,0032	1,76	5,85		14,16				
	C	0,050	0,0017	0,93	6,22	1,29	14,46				
		0,075	0,0025	1,37	6,10		14,18				
		0,100	0,0030	1,65	5,49		12,76				
	1	A	0,050	0,0010	0,55	3,66	1,25	8,78	9	9,30	0,98
0,075			0,0019	1,04	4,63		11,12				
0,100			0,0028	1,54	5,12		12,29				
B		0,050	0,0009	0,49	3,29	1,24	7,97				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,44				
C		0,100	0,0021	1,15	3,84		9,29				
		0,050	0,0008	0,44	2,93	1,29	6,81				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,08				
2		A	0,050	0,0009	0,49	3,29	1,25	7,90	8	8,28	1,05
	0,075		0,0016	0,88	3,90		9,37				
	0,100		0,0021	1,15	3,84		9,22				
	B	0,050	0,0008	0,44	2,93	1,24	7,08				
		0,075	0,0019	1,04	4,63		11,21				
	C	0,100	0,0017	0,93	3,11		7,52				
4	A	0,050	0,0010	0,54	3,59	1,25	8,60	8	8,79	0,81	60
		0,075	0,0019	1,04	4,63		11,12				
		0,100	0,0019	1,04	3,48		8,34				
	B	0,050	0,0008	0,44	2,93	1,24	7,08				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,44				
	C	0,100	0,0019	1,04	3,48		8,41				
9	A	0,075	0,0009	0,49	2,20	1,25	5,27	8	5,94	0,64	41
		0,100	0,0011	0,55	1,83		4,39				
		0,050	0,0007	0,38	2,56	1,24	6,20				
	B	0,075	0,0010	0,55	2,44		5,90				
		0,100	0,0016	0,88	2,93		7,08				
	C	0,050	0,0008	0,44	2,93	1,29	6,81				
14	A	0,075	0,0008	0,44	1,95	1,25	4,68	8	6,02	1,54	42
		0,100	0,0009	0,49	1,65		3,95				
		0,050	0,0004	0,22	1,46	1,24	3,54				
	B	0,075	0,0012	0,66	2,93		7,08				
		0,100	0,0020	1,10	3,66		8,85				
	C	0,050	0,0004	0,23	1,54	1,29	3,57				
	0,075	0,0014	0,77	3,41		7,94					
	0,100	0,0020	1,10	3,66		8,51					

Tabela B8 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
19	A	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,25	9,66	9	9,59	0,91	66
		0,075	0,0013	0,71	3,17		7,61				
		0,100	0,0022	1,21	4,02		9,66				
	B	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,24	9,74				
		0,075	0,0022	1,21	5,37		12,98				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		10,18				
	C	0,050	0,0010	0,55	3,66	1,29	8,51				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,08				
		0,100	0,0021	1,15	3,84		8,93				
24	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,25	10,54	9	10,25	0,91	70
		0,075	0,0019	1,04	4,63		11,12				
		0,100	0,0019	1,04	3,48		8,34				
	B	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,24	10,62				
		0,075	0,0019	1,04	4,63		11,21				
		0,100	0,0024	1,32	4,39		10,62				
	C	0,050	0,0009	0,49	3,29	1,29	7,66				
		0,075	0,0021	1,15	5,12		11,91				
		0,100	0,0024	1,32	4,39		10,21				
29	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,25	10,54	9	10,19	0,48	70
		0,075	0,0019	1,08	4,78		11,47				
		0,100	0,0024	1,32	4,39		10,54				
	B	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,24	10,62				
		0,075	0,0018	0,99	4,39		10,62				
		0,100	0,0021	1,15	3,84		9,29				
	C	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,29	10,21				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,08				
		0,100	0,0022	1,21	4,02		9,36				
39	A	0,075	0,0016	0,88	3,90	1,25	9,37	3	9,22	0,88	63
	B	0,075	0,0016	0,88	3,90	1,24	9,44				
	0,100	0,0022	1,21	4,02		9,74					
49	A	0,075	0,0016	0,88	3,90	1,25	9,37	4	9,27	0,08	64
		0,100	0,0021	1,15	3,84		9,22				
	B	0,075	0,0016	0,86	3,80	1,24	9,21				
		0,100	0,0021	1,15	3,84		9,29				
59	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,25	10,54	5	9,74	0,44	67
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,37				
	B	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,24	9,74				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,44				
	C	0,075	0,0017	0,93	4,15	1,29	9,64				
74	A	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,25	9,66	9	10,74	0,57	74
		0,075	0,0020	1,10	4,88		11,71				
		0,100	0,0025	1,37	4,57		10,98				
	B	0,050	0,0011	0,60	4,02	1,24	9,74				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		9,44				
		0,100	0,0026	1,43	4,76		11,51				
	C	0,050	0,0013	0,71	4,76	1,29	11,06				
		0,075	0,0021	1,15	5,12		11,91				
		0,100	0,0025	1,37	4,57		10,64				

Tabela B8 – Continuação.

Dia	Am	Volume ensaio (μ L)	Coef. Angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg Ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
99	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,25	10,54	8	11,24	1,56	77
		0,075	0,0025	1,37	6,10		14,63				
		0,100	0,0031	1,70	5,67		13,61				
	B	0,050	0,0015	0,82	5,49	1,24	13,28				
		0,100	0,0024	1,32	4,39		10,62				
	C	0,050	0,0012	0,66	4,39	1,29	10,21				
		0,075	0,0015	0,82	3,66		8,51				
		0,100	0,0020	1,10	3,66		8,51				
	149	A	0,050	0,0013	0,71	4,76	1,25				
0,075			0,0014	0,77	5,12	12,39					
0,100			0,0024	1,32	5,85	14,16					
B		0,050	0,0014	0,77	5,12	1,24	12,39				
		0,075	0,0024	1,32	5,85		14,16				
C		0,050	0,0012	0,66	4,39	1,29	10,21				
		0,075	0,0018	0,99	4,39		10,21				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Oxidases de erva-mate expostas a moderadas e altas temperaturas*Polifenoloxidase*

Tabela B9 – Atividade de polifenoloxidase de extrato bruto de erva-mate exposta à temperatura de 20°C.

Tempo expos. (min)	Am	Volume ensaio (µL)	Coef. angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ _p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0029	93,21	621,43	0,83	2246,13	5	2249,41	71,46	100
		0,075	0,0045	144,64	642,86		2323,58				
	B	0,050	0,0020	63,64	424,29	0,59	2157,38				
		0,075	0,0032	102,86	457,14		2324,46				
		0,100	0,0040	129,54	431,79		2195,52				
2	A	0,050	0,0028	90,00	600,00	0,77	2337,66	6	2347,83	31,34	104
		0,075	0,0041	131,79	585,71		2282,00				
		0,100	0,0057	183,21	610,71		2379,41				
	B	0,050	0,0019	61,07	407,14	0,52	2348,90				
		0,075	0,0029	93,21	414,29		2390,11				
		0,100	0,0038	122,14	407,14		2348,90				
4	A	0,050	0,0027	86,79	578,57	0,78	2225,27	6	2305,26	99,11	102
		0,075	0,0039	125,36	557,14		2142,86				
		0,100	0,0057	183,54	611,79		2353,02				
	B	0,050	0,0020	64,29	428,57	0,55	2337,66				
		0,075	0,0032	102,86	457,14		2493,51				
		0,100	0,0039	125,36	417,86		2279,22				
6	A	0,050	0,0029	93,21	621,43	0,77	2421,15	5	2369,35	87,63	105
		0,100	0,0056	180,00	600,00		2337,66				
	B	0,050	0,0018	57,86	385,71	0,52	2225,27				
		0,075	0,0029	93,21	414,29		2390,11				
		0,100	0,0040	128,57	428,57		2472,53				
8	A	0,050	0,0025	80,36	535,71	0,66	2435,06	5	2370,26	71,64	105
		0,075	0,0035	112,50	500,00		2272,73				
		0,100	0,0049	157,50	525,00		2386,36				
	B	0,050	0,0019	61,07	407,14	0,5	2442,86				
		0,075	0,0027	86,79	385,71		2314,29				
10	A	0,050	0,0026	83,57	557,14	0,71	2354,12	5	2296,23	52,72	102
		0,100	0,0051	163,93	546,43		2308,85				
	B	0,050	0,0019	61,07	407,14	0,55	2220,78				
		0,075	0,0029	93,21	414,29		2259,74				
		0,100	0,0040	128,57	428,57		2337,66				
15	A	0,050	0,0029	93,21	621,43	0,8	2330,36	4	2339,99	22,27	104
		0,100	0,0058	186,43	621,43		2330,36				
	B	0,075	0,0031	99,64	442,86	0,57	2330,83				
		0,100	0,0042	135,00	450,00		2368,42				
30	A	0,050	0,0027	86,79	578,57	0,74	2345,56	6	2424,32	51,01	108
		0,075	0,0041	131,79	585,71		2374,52				
		0,100	0,0057	183,21	610,71		2475,87				
	B	0,050	0,0019	61,07	407,14	0,5	2442,86				
		0,075	0,0028	90,00	400,00		2400,00				
		0,100	0,0039	125,36	417,86		2507,14				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B9 – Atividade de polifenoloxidase de extrato bruto de erva-mate exposta à temperatura de 40°C.

Tempo expos. (min)	Am	Volume ensaio (µL)	Coef. Angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)						
0	A	0,050	0,0028	90,00	600,00	0,81	2222,22	6	2106,73	59,80	100						
		0,075	0,0038	122,14	542,86		2010,58										
		0,100	0,0054	173,57	578,57		2142,86										
	B	0,050	0,0028	88,39	589,29	0,85	2079,83										
		0,075	0,0041	131,79	585,71		2067,23										
		0,100	0,0056	180,00	600,00		2117,65										
2	A	0,050	0,0024	77,14	514,29	0,79	1952,98	4	1896,44	67,56	90						
		0,100	0,0045	144,64	482,14		1830,92										
	B	0,075	0,0042	135,00	600,00		1935,48										
		0,100	0,0054	173,57	578,57		1866,36										
		A	0,075	0,0030	96,43	428,57	0,70					1810,87	4	1853,80	75,55	88	
			0,100	0,0043	138,21	460,71						1946,68					
B	0,050	0,0025	80,36	535,71	0,90	1847,29											
	0,100	0,0049	157,50	525,00		1810,34											
	6	A	0,075	0,0034	109,29	485,71	0,80	1942,86	5	1824,51	67,07	87					
			0,100	0,0042	135,00	450,00		1800,00									
B		0,050	0,0027	86,79	578,57	0,95	1827,07										
		0,075	0,0039	125,36	557,14		1759,40										
0,100	0,0053	170,36	567,86		1793,23												
8	A	0,050	0,0026	83,57	557,14	0,90	1921,18	4					1865,29	95,28	88		
		0,075	0,0039	125,36	557,14		1921,18										
	B	0,075	0,0040	128,57	571,43	0,98	1749,27										
		0,100	0,0057	183,21	610,71		1869,53										
		10	A	0,050	0,0019	61,07	407,14		0,70	1744,90	5	1756,90				37,90	83
				0,075	0,0028	90,00	400,00			1714,29							
0,100	0,0039			125,36	417,86		1790,82										
B	0,075		0,0035	112,50	500,00	0,90	1724,14										
	0,100		0,0049	157,50	525,00		1810,34										
15	A	0,075	0,0023	73,93	328,57	0,60	1792,21	5	1816,69	57,30	86						
		0,100	0,0032	102,86	342,86		1870,13										
	B	0,050	0,0019	61,07	407,14	0,70	1823,03										
		0,075	0,0027	86,79	385,71		1727,08										
		0,100	0,0039	125,36	417,86		1871,00										
		30	A	0,100	0,0032	102,86	342,86					0,60	1804,51	4	1852,23	41,60	88
0,050	0,0019			61,07	407,14	0,70	1879,12										
B	0,075		0,0028	90,00	400,00		1846,15										
	0,100		0,0038	122,14	407,14		1879,12										

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B10 – Atividade de polifenoloxidase de extrato bruto de erva-mate exposta à temperatura de 60°C.

Tempo expos. (min)	Am	Volume ensaio (µL)	Coef. angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ _p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0026	83,57	557,14	0,80	2089,29	6	2155,51	51,98	100
		0,075	0,0042	135,00	600,00		2250,00				
		0,100	0,0055	176,79	589,29		2209,82				
	B	0,050	0,0024	77,14	514,29	0,72	2142,86				
		0,075	0,0036	115,71	514,29		2142,86				
		0,100	0,0047	151,07	503,57		2098,21				
2	A	0,075	0,0025	64,29	285,71	0,59	1452,78	5	1410,80	98,62	65
		0,100	0,0036	92,57	308,57		1569,01				
		0,050	0,0019	48,86	325,71		0,71				
	0,075	0,0028	72,00	320,00	1352,11						
	0,100	0,0036	92,57	308,57	1303,82						
	4	A	0,075	0,0020	51,43	228,57	0,70	1023,45	4	1104,92	105,01
0,100			0,0032	82,29	274,29	1228,14					
B		0,075	0,0022	56,57	251,43	0,68	1109,24				
		0,100	0,0028	72,00	240,00		1058,82				
6	A	0,075	0,0029	55,93	248,57	0,81	920,63	4	932,97	25,07	43
		0,100	0,0039	75,21	250,71		928,57				
	B	0,075	0,0025	48,21	214,29	0,70	918,37				
		0,100	0,0035	67,50	225,00		964,29				
8	A	0,050	0,0025	32,14	214,29	0,72	892,86	4	886,36	39,77	41
		0,100	0,0052	66,86	222,86		928,57				
	B	0,050	0,0020	38,57	257,14	0,88	876,62				
		0,075	0,0029	55,93	248,57		847,40				
10	A	0,075	0,0036	46,29	205,71	0,7	857,14	5	887,26	50,32	41
		0,100	0,0048	61,71	205,71		857,14				
		0,050	0,0027	34,71	231,43		0,7				
	0,075	0,0041	52,71	234,29	949,81						
	0,100	0,0048	61,71	205,71	833,98						
	15	A	0,050	0,0021	27,00	180,00	0,69	782,61	5	789,12	20,29
0,075			0,0032	40,76	181,14	787,58					
0,100			0,0041	52,71	175,71	763,98					
B		0,050	0,0016	30,86	205,71	0,75	822,86				
		0,075	0,0023	44,36	197,14		788,57				
		0,050	0,0028	18,00	120,00		0,65	553,85			
0,075	0,0038	24,43	108,57	501,10							
0,100	0,0051	32,79	109,29	504,40							
30	B	0,050	0,0028	18,00	120,00	0,71	507,04	4	516,60	29,32	23

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B11 – Atividade de polifenoloxidase de extrato bruto de erva-mate exposta à temperatura de 80°C.

Tempo expos. (min)	Am	Volume ensaio (µL)	Coef. angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0018	57,86	385,71	0,52	2225,27	5	2108,59	155,75	100
		0,075	0,0028	90,00	400,00		2307,69				
		0,100	0,0032	102,86	342,86		1978,02				
	B	0,050	0,0025	80,36	535,71	0,76	2114,66				
		0,075	0,0034	109,29	485,71		1917,29				
		<hr/>									
2	A	0,075	0,0047	90,64	402,86	0,88	1373,38	5	1444,57	73,25	68
		0,100	0,0062	119,57	398,57		1358,77				
		<hr/>									
	B	0,050	0,0027	52,07	347,14	0,69	1509,32				
		0,075	0,0041	79,07	351,43		1527,95				
		0,100	0,0052	100,29	334,29		1453,42				
<hr/>											
4	A	0,075	0,0031	59,79	265,71	0,80	1035,25	5	1095,26	90,27	52
		0,100	0,0044	84,86	282,86		1102,04				
		<hr/>									
	B	0,050	0,0018	34,71	231,43	0,70	1036,25				
		0,075	0,0027	52,07	231,43		1036,25				
		0,100	0,0044	84,86	282,86		1266,52				
<hr/>											
6	A	0,050	0,0000	0,00	NA	0,70	NA	9			
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
	B	0,050	0,0000	0,00	NA	0,70	NA				
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
<hr/>											
8	A	0,050	0,0000	0,00	NA	0,70	NA	9			
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
	B	0,050	0,0000	0,00	NA	0,90	NA				
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
<hr/>											
10	A	0,050	0,0000	0,00	NA	0,80	NA	9			
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
	B	0,050	0,0000	0,00	NA	0,80	NA				
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
<hr/>											
15	A	0,050	0,0000	0,00	NA	0,70	NA	9			
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
	B	0,050	0,0000	0,00	NA	0,80	NA				
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
<hr/>											
30	A	0,050	0,0000	0,00	NA	0,50	NA	9			
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				
	B	0,050	0,0000	0,00	NA	0,60	NA				
		0,075	0,0000	0,00	NA		NA				
		0,100	0,0000	0,00	NA		NA				

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Peroxidase

Tabela B12 – Atividade de peroxidase de extrato bruto de erva-mate exposta à temperatura de 20°C.

Tempo expos. (min)	Am	Volume ensaio (µL)	Coef. angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ _p	Atividade residual (%)						
0	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	0,83	15,89	4	16,25	0,53	100						
		0,075	0,0018	0,99	4,39		15,89										
		0,100	0,0025	1,37	4,57		16,53										
	B	0,100	0,0018	0,99	3,29	0,59	16,74										
		2	A	0,050	0,0011	0,60	4,02					0,77	15,68	5	16,03	0,49	99
				0,075	0,0017	0,93	4,15					16,16					
0,100	0,0022	1,21		4,02	15,68												
B	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,52	16,89											
	0,075	0,0011	0,61	2,73	15,76												
	4	A	0,050	0,0011	0,60	4,02	0,78	15,48	4	15,13	1,59	93					
0,075			0,0014	0,77	3,41	13,13											
0,100			0,0012	0,66	2,92	0,55	15,96										
B		0,075	0,0016	0,88	2,93	15,96											
		6	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	0,77					17,10	5	16,68	0,38	103
				0,075	0,0017	0,93	4,15	16,15									
0,100	0,0023			1,26	4,21	16,39											
B	0,075		0,0012	0,66	2,93	0,52	16,89										
	0,100		0,0016	0,88	2,93	16,89											
	8		A	0,050	0,0010	0,55	3,69	0,66	16,80	4	16,12	0,69	99				
0,100		0,0019		1,07	3,57	16,21											
0,075		0,0011		0,60	2,68	0,50	16,10										
B		0,100	0,0014	0,77	2,56	15,37											
		10	A	0,050	0,0011	0,60	4,02	0,71	17,00					5	17,40	0,95	107
				0,075	0,0017	0,93	4,15	17,52									
0,100	0,0021			1,15	3,84	16,23											
B	0,075		0,0013	0,71	3,17	0,55	17,29										
	0,100		0,0019	1,04	3,48	18,96											
	15		A	0,050	0,0012	0,66	4,39	0,80	16,46	5	16,28	0,48	100				
0,100		0,0024		1,32	4,39	16,46											
0,050		0,0008		0,44	2,93	0,57	15,40										
B		0,075	0,0013	0,71	3,17	16,69											
		0,100	0,0017	0,93	3,11	16,37											
		30	A	0,050	0,0011	0,60	4,02	0,74	16,31					5	15,82	0,29	97
0,075	0,0016			0,88	3,90	15,82											
0,100	0,0021			1,15	3,84	15,57											
B	0,075		0,0013	0,71	3,17	0,60	15,85										
	0,100		0,0017	0,93	3,11	15,55											

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B13 – Atividade de peroxidase de extrato bruto de erva-mate exposta à temperatura de 40°C.

Tempo expos. (min)	Am	Volume ensaio(μL)	Coef. Angular	V.I. (μmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ _p	Atividade residual (%)
0	A	0,100	0,0019	1,04	3,48	0,81	12,87	4	15,86	2,84	100
	B	0,050	0,0012	0,66	4,39	0,85	15,49				
		0,075	0,0019	1,04	4,63		16,36				
		0,100	0,0029	1,59	5,30		18,72				
2	A	0,075	0,0015	0,82	3,66	0,79	13,89	4	13,93	1,80	88
		0,100	0,0022	1,21	4,02		15,28				
	B	0,075	0,0015	0,82	3,66	0,93	11,80				
		0,100	0,0025	1,37	4,57		14,75				
4	A	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,71	12,37	4	12,51	1,13	79
		0,100	0,0018	0,99	3,29		13,91				
	B	0,075	0,0014	0,77	3,41	0,87	11,77				
		0,100	0,0019	1,04	3,48		11,98				
6	A	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,75	11,71	3	11,27	1,27	71
		0,075	0,0012	0,66	2,93		11,71				
	B	0,100	0,0018	0,99	3,29	0,95	10,40				
8	A	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,63	13,94	4	14,71	3,07	93
		0,075	0,0016	0,88	3,90		18,58				
	B	0,075	0,0018	0,99	4,39	0,98	13,44				
		0,100	0,0023	1,26	4,21		12,88				
10	A	0,075	0,0018	0,99	4,39	0,70	18,82	4	15,32	3,07	97
	B	0,050	0,0010	0,55	3,66	0,87	12,62				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		13,46				
		0,100	0,0026	1,43	4,76		16,40				
15	A	0,050	0,0007	0,38	2,56	0,55	13,97	4	15,71	2,36	99
	B	0,050	0,0009	0,49	3,29	0,67	14,74				
		0,075	0,0017	0,93	4,15		18,57				
		0,100	0,0019	1,04	3,48		15,56				
30	A	0,075	0,0009	0,49	2,20	0,57	11,55	4	15,79	4,12	99
		0,100	0,0020	1,10	3,66		19,26				
	B	0,075	0,0016	0,88	3,90	0,65	18,01				
		0,100	0,0017	0,93	3,11		14,35				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B14 – Atividade de peroxidase de extrato bruto de erva-mate exposta à temperatura de 60°C.

Tempo expos. (min)	Am	Volume ensaio (µL)	Coef. Angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
0	A	0,075	0,0018	0,99	4,39	0,80	16,46	5	15,85	0,44	100
		0,100	0,0023	1,26	4,21		15,78				
	B	0,050	0,0009	0,49	3,29	0,65	15,20				
		0,075	0,0014	0,77	3,41		15,76				
		0,100	0,0019	1,04	3,48		16,04				
2	A	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,59	14,88	5	14,84	0,33	94
		0,075	0,0012	0,66	2,93		14,88				
	B	0,050	0,0010	0,55	3,66	0,77	14,25				
		0,075	0,0016	0,88	3,90		15,20				
		0,100	0,0021	1,15	3,84		14,97				
4	A	0,050	0,0009	0,49	3,29	0,67	14,74	5	15,50	0,91	98
		0,075	0,0014	0,77	3,41		15,29				
	B	0,100	0,0021	1,13	3,75	0,68	16,79				
		0,050	0,0009	0,49	3,29		14,53				
		0,100	0,0020	1,10	3,66		16,14				
6	A	0,050	0,0012	0,66	4,39	0,85	15,49	4	15,23	1,03	96
		0,075	0,0019	1,04	4,63		16,36				
	B	0,050	0,0010	0,55	3,66	0,73	15,04				
		0,075	0,0014	0,77	3,41		14,03				
8	A	0,050	0,0009	0,49	3,29	0,72	13,72	6	13,96	0,53	89
		0,075	0,0014	0,77	3,41		14,23				
	B	0,100	0,0019	1,04	3,48	0,77	14,48				
		0,050	0,0010	0,55	3,66		14,25				
		0,075	0,0015	0,82	3,66		14,25				
		0,100	0,0018	0,99	3,29		12,83				
10	A	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,72	12,20	5	13,48	0,45	85
		0,075	0,0013	0,71	3,17		13,21				
	B	0,100	0,0018	0,99	3,29	0,77	13,72				
		0,075	0,0014	0,77	3,41		13,30				
		0,100	0,0021	1,15	3,84		14,97				
15	A	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,69	12,73	4	13,57	0,93	86
		0,075	0,0013	0,71	3,17		13,79				
	B	0,075	0,0010	0,55	2,44	0,56	13,07				
		0,100	0,0015	0,82	2,74		14,70				
30	A	0,050	0,0006	0,33	2,20	0,55	11,97	5	13,09	0,71	83
		0,075	0,0010	0,55	2,44		13,30				
	B	0,100	0,0014	0,77	2,56	0,60	13,97				
		0,050	0,0007	0,38	2,56		12,80				
		0,075	0,0011	0,60	2,68		13,41				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela B15 – Atividade de peroxidase de extrato bruto de erva-mate exposta à temperatura de 80°C.

Tempo expos. (min)	Am	Volume ensaio (µL)	Coef. angular	V.I. (µmol/min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Atividade residual (%)
0	A	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,52	16,89	5	16,79	0,82	100
		0,100	0,0017	0,93	3,11		17,94				
	B	0,050	0,0011	0,60	4,02	0,76	15,89				
		0,075	0,0018	0,99	4,39		17,33				
		0,100	0,0022	1,21	4,02		15,89				
2	A	0,050	0,0008	0,44	2,93	0,88	9,98	4	10,42	0,56	62
		0,075	0,0012	0,66	2,93		9,98				
	B	0,050	0,0007	0,38	2,56	0,69	11,13				
		0,075	0,0010	0,55	2,44		10,60				
4	A	0,050	0,0005	0,27	1,83	0,77	7,13	5	9,20	1,29	55
		0,075	0,0010	0,55	2,44		9,50				
		0,100	0,0014	0,77	2,56		9,98				
	B	0,075	0,0008	0,44	1,95	0,67	8,74				
		0,100	0,0013	0,71	2,38		10,65				
6	A	0,050	0,0003	0,16	1,10	0,71	4,64	6	4,71	0,69	28
		0,075	0,0005	0,27	1,22		5,15				
		0,100	0,0006	0,33	1,10		4,64				
	B	0,050	0,0002	0,11	0,73	0,70	3,14				
		0,075	0,0005	0,27	1,22		5,23				
	0,100	0,0007	0,38	1,28		5,49					
8	A	0,050	0,0002	0,11	0,73	0,73	3,01	6	3,80	0,55	23
		0,075	0,0003	0,16	0,73		3,01				
		0,100	0,0006	0,33	1,10		4,51				
	B	0,050	0,0003	0,16	1,10	0,88	3,74				
		0,075	0,0005	0,27	1,22		4,16				
	0,100	0,0007	0,38	1,28		4,37					
10	A	0,050	0,0002	0,11	0,73	0,81	2,71	6	3,93	0,91	24
		0,075	0,0004	0,22	0,98		3,61				
		0,100	0,0008	0,44	1,46		5,42				
	B	0,050	0,0003	0,16	1,10	0,79	4,17				
		0,075	0,0003	0,16	0,73		2,78				
	0,100	0,0007	0,38	1,28		4,86					
15	A	0,050	0,0003	0,16	1,10	0,67	4,91	5	4,04	1,18	24
		0,075	0,0003	0,16	0,73		3,28				
		0,100	0,0007	0,38	1,28		5,73				
	B	0,050	0,0002	0,11	0,73	0,79	2,78				
		0,100	0,0005	0,27	0,91		3,47				
30	A	0,050	0,0001	0,05	0,37	0,48	2,29	5	2,78	1,01	17
		0,075	0,0002	0,10	0,46		2,90				
		0,100	0,0004	0,22	0,73		4,57				
	B	0,075	0,0002	0,11	0,49	0,75	1,95				
		0,100	0,0003	0,16	0,55		2,20				

n* número de réplicas para medida de atividade.

APÊNDICE C – INFLUÊNCIA DO MICROONDAS SOBRE AS OXIDASES DE ERVA-MATE

Neste Apêndice estão apresentadas as atividades de polifenoloxidase e peroxidase apresentadas pelas amostras de erva-mate expostas ao microondas, e o comportamento das mesmas com os dias de armazenamento.

Polifenoloxidase em erva-mate a pleno-sol

Tabela C1 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate *in natura* e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)	
	Peso (g)	V.F. (mL)											
0	A	40,078	63	0,050	0,0053	102,21	681,43	0,77	2654,92	5	2455,13	119,61	100
				0,075	0,0072	138,86	617,14	2404,45					
				0,100	0,0087	167,79	559,29	2363,18					
	B	40,064	63	0,050	0,0046	88,71	591,43	0,71	2498,99				
				0,075	0,0065	125,36	557,14	2354,12					
				0,100	0,0087	167,79	559,29	2363,18					
2	A	40,008	56	0,050	0,0041	79,07	527,14	0,61	2592,51	6	2327,09	130,05	95
				0,075	0,0056	108,00	480,00	2360,66					
				0,100	0,0076	146,57	488,57	2402,81					
	B	40,061	49	0,050	0,0037	71,36	475,71	0,65	2195,60				
				0,075	0,0056	108,00	480,00	2215,38					
				0,100	0,0074	142,71	475,71	2195,60					
7	A	40,041	50	0,075	0,0016	10,29	45,71	0,60	228,57	4	308,80	96,35	13
				0,050	0,0009	5,79	38,57	0,43	269,10				
				0,075	0,0016	10,29	45,71	318,94					
	B	40,038	60	0,050	0,0009	5,79	38,57	0,43	269,10				
				0,075	0,0016	10,29	45,71	318,94					
				0,100	0,0028	18,00	60,00	418,60					
16	A	40,058	51	0,050	0,0000	0,00	NA	0,60	NA	9			
				0,075	0,0000	0,00	NA	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA	NA					
	B	40,053	45	0,050	0,0000	0,00	NA	0,66	NA				
				0,075	0,0000	0,00	NA	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA	NA					
29	A	40,062	55	0,050	0,0000	0,00	NA	0,54	NA	9			
				0,075	0,0000	0,00	NA	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA	NA					
	B	40,024	62	0,050	0,0000	0,00	NA	0,40	NA				
				0,075	0,0000	0,00	NA	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA	NA					

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Tabela C2 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate exposta por 15 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)										
0	A	40,003	68	0,050	0,0011	21,21	141,43	0,40	6	995,66	60,98	41
				0,075	0,0014	27,00	120,00					
				0,100	0,0020	38,57	128,57					
	B	40,091	68	0,050	0,0010	19,29	128,57	0,35	6	995,66	60,98	41
				0,075	0,0013	25,07	111,43					
				0,100	0,0018	34,71	115,71					
2	A	40,075	50	0,050	0,0008	5,14	34,29	0,25	4	430,42	19,77	18
				0,075	0,0013	8,36	37,14					
				0,100	0,0019	12,21	40,71					
	B	40,041	52	0,075	0,0015	9,64	42,86	0,29	4	430,42	19,77	18
				0,075	0,0015	9,64	42,86					
				0,100	0,0019	12,21	40,71					
7	A	40,065	53	0,050	0,0000	0,00	NA	0,17	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,065	56	0,050	0,0000	0,00	NA	0,17	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
16	A	40,015	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,21	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,090	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,21	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
29	A	40,069	52	0,050	0,0000	0,00	NA	0,24	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,054	57	0,050	0,0000	0,00	NA	0,23	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Tabela C3 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate exposta por 30 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volum ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)										
0	A	40,033	64	0,050	0,0000	0,00	NA	0,31	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,031	62	0,050	0,0000	0,00	NA	0,21	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
2	A	40,028	53	0,050	0,0000	0,00	NA	0,29	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,039	51	0,050	0,0000	0,00	NA	0,28	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
7	A	40,007	49	0,050	0,0000	0,00	NA	0,20	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,072	54	0,050	0,0000	0,00	NA	0,16	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
16	A	40,014	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,18	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,076	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,14	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
29	A	40,062	51	0,050	0,0000	0,00	NA	0,25	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,028	55	0,050	0,0000	0,00	NA	0,23	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Tabela C4 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate exposta por 60 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)										
0	A	40,090	58	0,050	0,0000	0,00	NA	0,21	9	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,075	58	0,050	0,0000	0,00	NA	0,23	NA	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
2	A	40,023	45	0,050	0,0000	0,00	NA	0,35	9	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,022	45	0,050	0,0000	0,00	NA	0,35	NA	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
7	A	40,162	52	0,050	0,0000	0,00	NA	0,21	9	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,053	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,22	NA	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
16	A	40,023	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,19	9	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,065	52	0,050	0,0000	0,00	NA	0,21	NA	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
29	A	40,059	51	0,050	0,0000	0,00	NA	0,29	9	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,172	52	0,050	0,0000	0,00	NA	0,23	NA	NA		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Polifenoloxidase em erva-mate sombreada

Tabela C5 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate *in natura* e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.l. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)										
0	A	40,034	60	0,050	0,0052	102,95	0,76	2654,92	4	2478,12	155,41	100
				0,075	0,0074	141,16		2425,45				
				0,100	0,0085	163,93		2128,94				
	B	40,014	65	0,050	0,0046	88,71	0,65	2498,99	5	2164,13	72,02	87
				0,075	0,0064	123,47		2362,32				
				0,100	0,0085	163,93		2128,94				
2	A	40,038	64	0,050	0,0041	79,07	0,66	2053,80	5	2164,13	72,02	87
				0,075	0,0067	129,21		2237,48				
				0,100	0,0085	163,93		2128,94				
	B	40,032	74	0,050	0,0041	79,07	0,53	2227,36	5	163,32	43,55	7
				0,075	0,0060	115,71		2173,04				
				0,100	0,0085	163,93		2128,94				
7	A	40,069	49	0,050	0,0011	7,07	0,60	183,67	5	163,32	43,55	7
				0,075	0,0019	12,21		211,50				
				0,100	0,0023	14,79		192,02				
	B	40,050	53	0,050	0,0010	6,43	0,56	120,72	5	163,32	43,55	7
				0,075	0,0012	7,71		108,65				
				0,100	0,0012	7,71		108,65				
16	A	40,019	51	0,050	0,0000	0,00	0,60	NA	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00		NA				
				0,100	0,0000	0,00		NA				
	B	40,014	54	0,050	0,0000	0,00	0,66	NA	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00		NA				
				0,100	0,0000	0,00		NA				
29	A	40,037	50	0,050	0,0000	0,00	0,52	NA	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00		NA				
				0,100	0,0000	0,00		NA				
	B	40,070	55	0,050	0,0000	0,00	0,42	NA	9	NA	NA	NA
				0,075	0,0000	0,00		NA				
				0,100	0,0000	0,00		NA				

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Tabela C6 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate exposta por 15 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)	
	Peso (g)	V.F. (mL)											
0	A	40,097	65	0,050	0,0012	22,21	135,53	0,30	6	967,56	58,98	42	
				0,075	0,0013	26,50							124,05
				0,100	0,0020	38,57							128,57
	B	40,012	64	0,050	0,0010	19,59	129,85	0,43	6	1109,58	58,98	42	
				0,075	0,0013	25,89							112,31
				0,100	0,0019	34,81							116,41
2	A	40,053	60	0,050	0,0011	7,07	47,14	0,21	5	353,57	22,75	15	
				0,075	0,0016	10,29							45,71
				0,100	0,0022	14,14							47,14
	B	40,072	53	0,050	0,0011	7,07	47,14	0,20	5	404,08	22,75	15	
				0,075	0,0016	10,29							45,71
				0,100	0,0020	12,86							42,86
7	A	40,061	49	0,050	0,0000	0,00	NA	0,24	9	NA	NA	NA	
				0,075	0,0000	0,00							NA
				0,100	0,0000	0,00							NA
	B	40,044	49	0,050	0,0000	0,00	NA	0,28	9	NA	NA	NA	
				0,075	0,0000	0,00							NA
				0,100	0,0000	0,00							NA
16	A	40,032	53	0,050	0,0000	0,00	NA	0,22	9	NA	NA	NA	
				0,075	0,0000	0,00							NA
				0,100	0,0000	0,00							NA
	B	40,027	52	0,050	0,0000	0,00	NA	0,18	9	NA	NA	NA	
				0,075	0,0000	0,00							NA
				0,100	0,0000	0,00							NA
29	A	40,053	59	0,050	0,0000	0,00	NA	0,54	9	NA	NA	NA	
				0,075	0,0000	0,00							NA
				0,100	0,0000	0,00							NA
	B	40,034	53	0,050	0,0000	0,00	NA	0,57	9	NA	NA	NA	
				0,075	0,0000	0,00							NA
				0,100	0,0000	0,00							NA

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Tabela C7 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate exposta por 30 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	N*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)										
0	A	40,015	65	0,050	0,0000	0,00	NA	0,27	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,038	63	0,050	0,0000	0,00	NA	0,17	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
2	A	40,003	60	0,050	0,0000	0,00	NA	0,13	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,043	60	0,050	0,0000	0,00	NA	0,18	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
7	A	40,006	49	0,050	0,0000	0,00	NA	0,20	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,047	47	0,050	0,0000	0,00	NA	0,16	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
16	A	40,026	53	0,050	0,0000	0,00	NA	0,24	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,038	53	0,050	0,0000	0,00	NA	0,10	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
29	A	40,080	43	0,050	0,0000	0,00	NA	0,21	NA	9		
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					
	B	40,032	44	0,050	0,0000	0,00	NA	0,28	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA					
				0,100	0,0000	0,00	NA					

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Tabela C8 – Atividade de polifenoloxidase de erva-mate exposta por 60 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	PFO (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)	
	Peso (g)	V.F. (mL)											
0	A	40,066	58	0,050	0,0000	0,00	NA	0,12	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
	B	40,038	55	0,050	0,0000	0,00	NA	0,19	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
2	A	40,033	54	0,050	0,0000	0,00	NA	0,16	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
	B	40,038	51	0,050	0,0000	0,00	NA	0,17	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
7	A	40,048	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,21	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
	B	40,034	49	0,050	0,0000	0,00	NA	0,22	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
16	A	40,027	52	0,050	0,0000	0,00	NA	0,19	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
	B	40,002	51	0,050	0,0000	0,00	NA	0,24	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
29	A	40,078	53	0,050	0,0000	0,00	NA	0,24	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
	B	40,061	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,20	9	NA			
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Peroxidase em erva-mate a pleno sol

Tabela C9 – Atividade de peroxidase de erva-mate *in natura* e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)	
	Peso (g)	V.F. (mL)											
0	A	40,078	63	0,050	0,0013	0,71	4,76	0,77	18,53	5	19,39	0,27	100
				0,100	0,0028	1,54	5,12	19,96					
	B	40,064	63	0,050	0,0012	0,66	4,39	0,71	18,55				
				0,075	0,0020	1,10	4,88	20,61					
			0,100	0,0025	1,37	4,57	19,32						
2	A	40,008	56	0,050	0,0011	0,60	4,02	0,61	19,79	4	20,12	1,23	104
				0,075	0,0017	0,93	4,15	20,39					
				0,100	0,0021	1,15	3,84	18,89					
	B	40,061	49	0,075	0,0019	1,04	4,63	0,65	21,39				
7	A	40,041	50	0,050	0,0006	0,33	2,20	0,60	10,98	5	11,37	0,94	59
				0,100	0,0012	0,66	2,20	10,98					
				B	40,038	60	0,050	0,0004	0,22				
	0,075	0,0007	0,38	1,71	11,91								
			0,100	0,0010	0,55	1,83	12,76						
16	A	40,058	51	0,050	0,0005	0,27	1,83	0,60	9,15	6	9,69	0,74	50
				0,075	0,0008	0,44	1,95	9,76					
				0,100	0,0012	0,66	2,20	10,98					
	B	40,053	45	0,050	0,0005	0,27	1,83	0,66	8,31				
			0,075	0,0009	0,49	2,20	9,98						
			0,100	0,0012	0,66	2,20	9,98						
29	A	40,062	55	0,050	0,0002	0,14	0,95	0,54	5,28	6	5,67	0,85	29
				0,075	0,0003	0,18	0,78	4,34					
				0,100	0,0005	0,27	0,91	5,08					
	B	40,024	62	0,050	0,0002	0,11	0,73	0,40	5,49				
			0,075	0,0003	0,21	0,93	6,95						
			0,100	0,0005	0,27	0,91	6,86						

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C10 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 15 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular (μ mol/m in)	V.I.	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica		n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)						(U/mg ptn)	(U/mg ptn)				
0	A	40,003	68	0,050	0,0007	0,38	2,56	0,40	19,21	5	19,87	1,04	102
				0,075	0,0010	0,55	2,44	18,29					
				0,100	0,0015	0,82	2,74	20,58					
	B	40,091	68	0,075	0,0010	0,55	2,44	0,35	20,91				
				0,100	0,0013	0,71	2,38	20,38					
2	A	40,075	50	0,075	0,0004	0,22	0,98	0,25	11,71	5	11,60	0,60	60
				0,100	0,0005	0,27	0,91	10,98					
				0,050	0,0003	0,16	1,10	0,29	11,35				
	B	40,041	52	0,075	0,0005	0,27	1,22		12,62				
				0,100	0,0006	0,33	1,10	11,35					
7	A	40,065	53	0,075	0,0001	0,07	0,29	0,17	5,16	4	5,78	0,43	30
				0,100	0,0002	0,11	0,37	6,46					
				0,075	0,0001	0,06	0,27	0,17	4,73				
	B	40,065	56	0,100	0,0002	0,12	0,38		6,78				
16	A	40,015	50	0,050	0,0001	0,04	0,29	0,21	4,18	5	4,56	0,41	24
				0,075	0,0001	0,07	0,32	4,53					
				0,100	0,0002	0,09	0,29	4,18					
	B	40,090	50	0,050	0,0001	0,05	0,33	0,21	4,70				
				0,075	0,0002	0,08	0,37	5,23					
29	A	40,069	52	0,075	0,0001	0,03	0,15	0,24	1,83	4	2,05	0,29	11
				0,100	0,0001	0,05	0,16	2,06					
				0,075	0,0001	0,03	0,15	0,23	1,91				
	B	40,054	57	0,100	0,0001	0,05	0,18		2,39				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C11 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 30 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica		n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)						(U/mg ptn)	(U/mg ptn)				
0	A	40,033	64	0,075	0,0004	0,2195	0,98	0,31	9,44	5	10,28	0,45	53
				0,100	0,0006	0,3293	1,10	10,62					
	B	40,031	62	0,050	0,0002	0,1098	0,73	0,21	10,45				
				0,075	0,0003	0,1646	0,73	10,45					
			0,100	0,0004	0,2195	0,73		10,45					
2	A	40,028	53	0,050	0,0001	0,0549	0,37	0,29	3,78	5	4,05	0,64	21
				0,075	0,0001	0,0768	0,34	3,53					
				0,100	0,0002	0,1098	0,37	3,78					
	B	40,039	51	0,050	0,0001	0,0549	0,37	0,28	3,92				
0,075				0,0002	0,1098	0,49	5,23						
7	A	40,007	49	0,075	0,0001	0,0823	0,37	0,20	5,49	4	5,66	0,40	29
				0,100	0,0002	0,1098	0,37	5,49					
	B	40,072	54	0,075	0,0001	0,0659	0,29	0,16	5,49				
				0,100	0,0002	0,0988	0,33	6,17					
16	A	40,014	50	0,050	0,0002	0,0878	0,59	0,18	9,76	5	9,40	0,55	48
				0,075	0,0002	0,1207	0,54	8,94					
				0,100	0,0003	0,1756	0,59	9,76					
	B	40,076	50	0,050	0,0001	0,0604	0,40	0,14	8,62				
0,075				0,0002	0,1043	0,46	9,93						
29	A	40,062	51	0,050	0,0001	0,0604	0,40	0,25	4,83	5	5,39	0,63	28
				0,075	0,0002	0,0988	0,44	5,27					
				0,100	0,0003	0,1591	0,53	6,37					
	B	40,028	55	0,050	0,0001	0,0659	0,44	0,23	5,73				
0,100				0,0002	0,1098	0,37	4,77						

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C12 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 60 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade				n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)				Atividade (U/mL)	mg específica (U/mg ptn)	Atividade mg específica (U/mg ptn)					
0	A	40,090	58	0,050	0,0001	0,05	0,37	0,21	5,23	4	5,29	0,24	27
				0,075	0,0002	0,09	0,39	5,57					
	B	40,075	58	0,050	0,0001	0,06	0,40	0,23	5,25				
				0,075	0,0002	0,09	0,39	5,09					
2	A	40,023	45	0,050	0,0001	0,03	0,22	0,35	1,88	6	2,12	0,34	11
				0,075	0,0001	0,04	0,20	1,67					
				0,100	0,0002	0,08	0,27	2,35					
	B	40,022	45	0,050	0,0001	0,05	0,33	0,35	2,82				
				0,075	0,0001	0,05	0,24	2,09					
				0,100	0,0001	0,07	0,22	1,88					
7	A	40,162	52	0,050	0,0001	0,03	0,18	0,21	2,61	5	3,93	1,19	20
				0,075	0,0001	0,05	0,24	3,48					
				0,100	0,0002	0,11	0,37	5,23					
	B	40,053	50	0,075	0,0001	0,05	0,24	0,22	3,33				
				0,100	0,0002	0,11	0,37	4,99					
				0,075	0,0001	0,05	0,24	3,33					
16	A	40,023	50	0,075	0,0002	0,14	0,61	0,19	9,63	5	9,13	0,68	47
				0,100	0,0003	0,19	0,62	9,82					
				0,075	0,0002	0,14	0,61	8,71					
	B	40,065	52	0,050	0,0002	0,10	0,66	0,21	9,41				
				0,075	0,0002	0,14	0,61	8,71					
				0,100	0,0003	0,17	0,57	8,10					
29	A	40,059	51	0,075	0,0002	0,12	0,51	0,29	5,30	5	5,62	0,30	29
				0,100	0,0003	0,15	0,51	5,30					
				0,075	0,0002	0,10	0,46	6,04					
	B	40,172	52	0,050	0,0001	0,07	0,44	0,23	5,73				
				0,075	0,0002	0,10	0,46	6,04					
				0,100	0,0002	0,13	0,44	5,73					

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C13 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 120 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica n*		POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)	
	Peso (g)	V.F. (mL)						(U/mg ptn)	n*				
0	A	40,036	56	0,075	0,00007	0,04	0,17	0,23	2,23	5	2,15	0,31	11
				0,100	0,00010	0,05	0,18	2,39					
	B	40,038	53	0,050	0,00004	0,02	0,15	0,22	2,00				
				0,075	0,00005	0,03	0,12	1,66					
			0,100	0,00010	0,05	0,18	2,49						
2	A	40,022	41	0,050	0,00002	0,01	0,07	0,37	0,59	5	1,36	0,28	7
				0,075	0,00005	0,03	0,12	0,99					
				0,100	0,00008	0,04	0,15	1,19					
	B	40,022	42	0,050	0,00004	0,02	0,15	0,31	1,42				
				0,075	0,00006	0,03	0,15	1,42					
7	A	40,143	47	0,075	0,00005	0,05	0,22	0,17	3,87	4	3,66	0,17	19
				0,100	0,00010	0,06	0,20	3,55					
	B	40,047	51	0,075	0,00010	0,05	0,24	0,20	3,66				
				0,100	0,00010	0,07	0,24	3,57					
16	A	40,132	50	0,075	0,00020	0,11	0,49	0,18	8,13	5	8,48	0,33	44
				0,100	0,00030	0,16	0,53	8,84					
	B	40,016	54	0,050	0,00020	0,08	0,55	0,19	8,66				
				0,075	0,00020	0,12	0,51	8,09					
				0,100	0,00030	0,16	0,55	8,66					
29	A	40,069	54	0,050	0,00010	0,06	0,40	0,24	5,03	5	5,28	0,28	27
				0,075	0,00020	0,09	0,41	5,18					
				0,100	0,00020	0,12	0,40	5,03					
	B	40,042	56	0,050	0,00010	0,05	0,33	0,18	5,49				
				0,075	0,00010	0,08	0,34	5,69					

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C14 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 220 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)	
	Peso (g)	V.F. (mL)											
0	A	40,002	50	0,050	0,0000	0,00	NA	0,22	NA	9		0	
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
	B	40,069	55	0,050	0,0000	0,00	NA	0,22	NA				
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
2	A	40,025	45	0,050	0,0000	0,00	NA	0,36	NA	9		0	
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
	B	40,026	53	0,050	0,0000	0,00	NA	0,3	NA				
				0,075	0,0000	0,00	NA						
				0,100	0,0000	0,00	NA						
7	A	40,023	50	0,075	0,0001	0,05	0,22	0,21	3,14	4	3,13	0,10	16
				0,100	0,0001	0,07	0,22		3,14				
				0,075	0,0001	0,04	0,17	0,17	3,01				
	B	40,018	53	0,075	0,0001	0,04	0,17	0,17	3,01				
				0,100	0,0001	0,05	0,18		3,23				
16	A	40,038	51	0,050	0,0001	0,05	0,37	0,14	7,84	4	7,72	0,54	40
				0,075	0,0002	0,08	0,37		7,84				
				0,100	0,0002	0,10	0,33		7,06				
	B	40,034	54	0,075	0,0002	0,11	0,49	0,18	8,13				
29	A	40,038	50	0,075	0,0002	0,10	0,46	0,20	6,95	4	7,10	0,17	37
				0,100	0,0003	0,15	0,48		7,27				
				0,075	0,0002	0,12	0,54	0,23	7,00				
	B	40,032	52	0,075	0,0002	0,12	0,54	0,23	7,00				
				0,100	0,0003	0,16	0,55		7,16				

n* número de réplicas para medida de atividade. NA = não apresentou atividade.

Peroxidase em erva-mate sombreada

Tabela C15 – Atividade de peroxidase de erva-mate *in natura* e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)	
	Peso (g)	V.F. (mL)											
0	A	40,034	60	0,050	0,0011	0,60	4,02	0,76	15,89	5	16,02	0,51	100
				0,075	0,0016	0,88	3,90	15,40					
				0,100	0,0022	1,21	4,02	15,89					
	B	40,014	65	0,050	0,0010	0,55	3,66	0,65	16,89	5	18,18	0,32	113
				0,100	0,0019	1,04	3,48	16,04					
				0,050	0,0010	0,55	3,66	0,66	16,63				
2	A	40,038	64	0,075	0,0017	0,93	4,15		18,85	5	18,18	0,32	113
				0,100	0,0021	1,15	3,84	17,46					
				0,050	0,0009	0,49	3,29	0,53	18,64				
7	A	40,069	49	0,075	0,0005	0,27	1,22	0,60	6,10	4	6,32	0,21	39
				0,100	0,0007	0,36	1,19	6,37					
				0,050	0,0003	0,18	1,17	0,56	6,27				
16	A	40,019	51	0,075	0,0004	0,21	0,93	0,52	5,35	4	5,27	0,07	33
				0,100	0,0005	0,27	0,91	5,28					
				0,050	0,0002	0,11	0,73	0,42	5,23				
29	A	40,037	50	0,100	0,0004	0,22	0,73		5,23	6	3,94	0,28	25
				0,050	0,0002	0,11	0,73	0,54	4,07				
				0,075	0,0003	0,14	0,61	3,39					
7	B	40,050	53	0,075	0,0005	0,27	1,22		6,53	4	6,32	0,21	39
				0,100	0,0007	0,36	1,19	6,37					
				0,050	0,0003	0,18	1,17	0,56	6,27				
16	B	40,014	54	0,050	0,0002	0,11	0,73	0,42	5,23	4	5,27	0,07	33
				0,100	0,0004	0,22	0,73		5,23				
				0,050	0,0002	0,11	0,73	0,54	4,07				
29	A	40,037	50	0,075	0,0003	0,14	0,61		3,39	6	3,94	0,28	25
				0,100	0,0004	0,22	0,73	4,07					
				0,050	0,0002	0,11	0,73	0,57	3,85				
7	B	40,070	55	0,075	0,0003	0,16	0,73		3,85	6	3,94	0,28	25
				0,100	0,0005	0,25	0,84	4,43					
				0,050	0,0002	0,11	0,73	0,57	3,85				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C16 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 15 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/m in)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica		n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)						(U/mg ptn)	(U/mg ptn)				
0	A	40,097	65	0,075	0,0010	0,55	2,44	0,30	24,39	4	22,11	0,50	138
				0,100	0,0012	0,66	2,20	21,95					
	B	40,012	64	0,075	0,0012	0,66	2,93	0,43	20,42				
				0,100	0,0017	0,93	3,11	21,70					
2	A	40,053	60	0,075	0,0002	0,13	0,56	0,21	8,01	4	8,92	0,93	56
				0,100	0,0003	0,18	0,60	8,62					
	B	40,072	53	0,075	0,0002	0,14	0,61	0,20	9,15				
				0,100	0,0004	0,20	0,66	9,88					
7	A	40,061	49	0,050	0,0002	0,08	0,55	0,24	6,86	4	6,57	0,43	41
				0,075	0,0002	0,11	0,49	6,10					
				0,100	0,0003	0,16	0,55	6,86					
	B	40,044	49	0,100	0,0003	0,18	0,60	0,28	6,47				
16	A	40,032	53	0,050	0,0001	0,03	0,18	0,22	2,49	5	3,04	0,41	19
				0,075	0,0001	0,05	0,24	3,33					
				0,100	0,0001	0,08	0,26	3,49					
	B	40,027	52	0,075	0,0001	0,04	0,17	0,18	2,85				
0,100				0,0001	0,05	0,18	3,05						
29	A	40,053	59	0,075	0,0001	0,02	0,10	0,17	1,72	4	1,92	0,31	12
				0,100	0,0001	0,03	0,09	1,61					
	B	40,034	53	0,075	0,0001	0,03	0,12	0,16	2,29				
				0,100	0,0001	0,03	0,11	2,06					

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C17 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 30 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/m in)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)		n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)											
0	A	40,020	65	0,050	0,0003	0,16	1,10	0,27	12,20	4	12,89	0,65	80
				0,075	0,0005	0,27	1,22	13,55					
	B	40,040	63	0,050	0,0002	0,11	0,73	0,17	12,91	12,91			
2	A	40,000	60	0,075	0,0001	0,05	0,24	0,13	5,63	4	5,53	0,53	34
				0,100	0,0001	0,08	0,26	5,91					
	B	40,040	60	0,050	0,0001	0,04	0,29	0,18	4,88	5,69			
7	A	40,010	49	0,050	0,0001	0,04	0,26	0,33	2,33	5	2,78	0,45	17
				0,100	0,0002	0,11	0,37	3,33					
	B	40,050	47	0,050	0,0001	0,04	0,29	0,33	2,66	2,22	3,33		
16	A	40,030	53	0,050	0,0001	0,05	0,33	0,24	4,12	4	4,41	0,55	28
				0,075	0,0001	0,07	0,32	3,96					
	B	40,040	53	0,050	0,0001	0,03	0,18	0,11	4,99	4,57			
29	A	40,080	43	0,075	0,0001	0,03	0,12	0,21	1,74	5	1,89	0,22	12
				0,100	0,0001	0,04	0,15	2,09					
	B	40,030	44	0,050	0,0001	0,02	0,15	0,28	1,57	2,09	1,96		

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C18 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 60 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/ min)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica		n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)						(U/mg ptn)	(U/mg ptn)				
0	A	40,066	58	0,075	0,0001	0,07	0,29	0,12	7,32	4	7,63	0,37	48
				0,100	0,0002	0,09			7,77				
	B	40,038	55	0,075	0,0002	0,11	0,49	0,19	7,70				
				0,100	0,0003	0,15			7,80				
2	A	40,033	54	0,075	0,0002	0,08	0,37	0,16	6,86	4	6,74	0,42	42
				0,100	0,0002	0,12			0,38				
	B	40,038	51	0,075	0,0002	0,08	0,37	0,17	6,46				
				0,100	0,0002	0,11			6,46				
7	A	40,048	50	0,050	0,0001	0,04	0,26	0,23	3,34	6	2,91	0,51	18
				0,075	0,0001	0,05			0,24				
	B	40,034	49	0,050	0,0001	0,03	0,22	0,29	2,27				
				0,075	0,0001	0,05			2,52				
				0,100	0,0002	0,11			3,78				
16	A	40,027	52	0,050	0,0001	0,05	0,37	0,19	5,78	5	5,56	0,30	35
				0,075	0,0002	0,08			0,37				
	B	40,002	51	0,050	0,0001	0,06	0,40	0,24	5,03				
				0,100	0,0003	0,14			5,72				
29	A	40,078	53	0,050	0,0001	0,03	0,22	0,24	2,74	4	2,56	0,15	16
				0,075	0,0001	0,04			0,20				
	B	40,061	50	0,075	0,0001	0,04	0,17	0,20	2,56				
				0,100	0,0001	0,04			2,56				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C19 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 120 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.I. (μ mol/mi n)	Atividade (U/mL)	mg ptn	Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)	
	Peso (g)	V.F. (mL)											
0	A	40,042	47	0,075	0,0001	0,06	0,27	0,16	5,03	4	5,64	0,48	35
				0,100	0,0002	0,09	0,31		5,83				
	B	10,037	52	0,075	0,0001	0,06	0,29	0,15	5,85				
				0,100	0,0002	0,09	0,29		5,85				
2	A	40,021	50	0,050	0,0001	0,05	0,33	0,18	5,49	4	5,08	0,58	32
				0,075	0,0001	0,06	0,27		4,47				
	B	40,060	48	0,050	0,0001	0,05	0,33	0,18	5,49				
				0,075	0,0001	0,06	0,29		4,88				
7	A	40,020	47	0,075	0,0001	0,07	0,32	0,33	2,88	4	2,93	0,12	18
				0,100	0,0002	0,09	0,31		2,83				
	B	40,042	48	0,050	0,0001	0,04	0,26	0,25	3,07				
				0,075	0,0001	0,05	0,24		2,93				
16	A	40,020	53	0,050	0,0001	0,05	0,33	0,19	5,20	5	6,08	0,13	38
				0,075	0,0002	0,09	0,39		6,16				
	B	40,072	50	0,100	0,0002	0,11	0,37		5,78				
				0,050	0,0001	0,03	0,26	0,12	6,40				
				0,100	0,0002	0,08	0,27		6,86				
29	A	40,009	48	0,050	0,0001	0,03	0,22	0,19	3,47	5	3,39	0,24	21
				0,075	0,0001	0,04	0,19		3,08				
				0,100	0,0001	0,06	0,20		3,18				
	B	40,069	49	0,075	0,0001	0,07	0,32	0,26	3,66				
				0,100	0,0002	0,09	0,31		3,59				

n* número de réplicas para medida de atividade.

Tabela C20 – Atividade de peroxidase de erva-mate exposta por 220 segundos ao microondas e armazenada por 29 dias.

Dia	Amostras		Volume ensaio (μ L)	Coef. angular	V.l. (μ mol/ min)	Atividade		Atividade específica (U/mg ptn)	n*	POD (U/mg ptn)	σ_p	Ativid. residual (%)
	Peso (g)	V.F. (mL)				e (U/mL)	mg ptn					
0	A	40,143	48	0,050	0,0001	0,05	0,37	0,22	5	5,19	0,04	32
				0,075	0,0002	0,09	0,41					
				0,100	0,0002	0,10	0,35					
	B	40,064	45	0,050	0,0001	0,04	0,29	0,18	5	3,10	0,15	19
				0,075	0,0001	0,08	0,34					
				0,100	0,0001	0,05	0,18					
2	A	40,003	46	0,050	0,0001	0,03	0,18	0,17	5	3,10	0,15	19
				0,075	0,0001	0,04	0,17					
				0,100	0,0001	0,05	0,18					
	B	40,053	45	0,050	0,0001	0,03	0,22	0,23	5	3,10	0,15	19
				0,075	0,0001	0,05	0,24					
				0,100	0,0001	0,05	0,24					
7	A	40,034	43	0,050	0,0001	0,03	0,22	0,29	6	2,36	0,24	15
				0,075	0,0001	0,05	0,24					
				0,100	0,0001	0,05	0,18					
	B	40,043	47	0,050	0,0001	0,03	0,22	0,25	6	2,36	0,24	15
				0,075	0,0001	0,05	0,22					
				0,100	0,0001	0,05	0,18					
16	A	40,025	50	0,050	0,0001	0,05	0,33	0,23	4	4,64	0,36	29
				0,100	0,0002	0,11	0,37					
				0,100	0,0002	0,11	0,37					
	B	40,083	50	0,050	0,0001	0,05	0,33	0,22	4	4,64	0,36	29
				0,100	0,0002	0,11	0,37					
				0,100	0,0002	0,11	0,37					
29	A	40,014	45	0,050	0,0001	0,03	0,22	0,27	5	2,75	0,18	17
				0,075	0,0001	0,05	0,24					
				0,100	0,0001	0,08	0,26					
	B	40,022	47	0,075	0,0001	0,03	0,12	0,13	5	2,75	0,18	17
				0,075	0,0001	0,03	0,12					
				0,100	0,0001	0,04	0,13					

n* número de réplicas para medida de atividade.