



**Universidade de Aveiro**

Departamento de Química

Ano 2016/2017

**Lisa Vanessa da  
Silva Barbosa**

**Qualificação do sumo concentrado de baga de  
sabugueiro**



**Universidade de Aveiro**

Departamento de Química

Ano 2016/2017

**Lisa Vanessa da  
Silva Barbosa**

**Qualificação do sumo concentrado de baga de  
sabugueiro**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Coelho, investigadora Pós-Doc do QOPNA no Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e supervisão na empresa do Engenheiro Oswaldo António Sancho Trábulo, Diretor Geral da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A

Dedico este trabalho à minha mãe e a todos aqueles que a cada dia acreditam em mim e me desafiam a ser melhor.

## **o júri**

### **Presidente**

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

Investigador Auxiliar da Universidade de Aveiro

### **orientadora**

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho

Investigadora Pós-Doc do QOPNA da Universidade de Aveiro

### **Arguente**

Professor Doutor Fernando Herminio Ferreira Milheiro Nunes

Professor auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

## **agradecimentos**

Um agradecimento muito especial a todos aqueles que sempre acreditaram que seria capaz, mesmo quando as coisas pareciam não ser possíveis. Este percurso académico que fiz parecia ser todo ele cheio de impossibilidades, mas este trabalho espelha bem o mar de possibilidades em que este se tornou.

Aos meus orientadores, Professor Manuel António Coimbra e à Doutora Elisabete Coelho agradeço toda a disponibilidade, ensinamentos e paciência demonstrados no decorrer deste trabalho.

Ao Engenheiro Oswaldo Trabulo agradeço a oportunidade de me permitir contactar pela primeira vez com o mundo empresarial, bem como toda a disponibilidade, compreensão e apoio fornecidos.

A todos os colaboradores da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A. pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado, mas acima de tudo pela sua autenticidade e generosidade. Gostaria de deixar um especial agradecimento à Engenheira Andreia Lopes e Ana Paixão pelo apoio e amizade demonstrados ao longo dos últimos meses.

Dedico a todos aqueles que mesmo não estando aqui o seu nome referenciado sabem o quão importante são.

**Palavras-chave**

Concentrado de baga de sabugueiro, turbidez, antocianinas, armazenamento, dióxido enxofre, congelação, refrigeração, temperatura ambiente

**Resumo**

A conservação do sumo concentrado de baga de sabugueiro é um dos principais desafios da Indumape. O sumo concentrado de baga de sabugueiro apresentou um teor em sólidos solúveis totais de 65°Brix, pH 4,49, acidez de 2% (m/m, eq. ácido cítrico), turbidez de 1608 NTU, teor de antocianinas monoméricas de 10 g/L (eq. cianidina 3-glucósido) e açúcares redutores de 30 g/L (eq. glucose). O trabalho desenvolvido na Indumape teve como objetivo avaliar a conservação do sumo concentrado de sabugueiro ao nível microbiológico e das propriedades físico-químicas ao longo do tempo de armazenamento a diferentes temperaturas (-18, 8 e 25°C). A temperatura de refrigeração e congelação minimizou as alterações físico-químicas ao longo de 4 meses de armazenamento. Com o objetivo de avaliar a possibilidade de conservação do concentrado de sumo de sabugueiro à temperatura ambiente, foi testado o efeito da adição de diferentes teores (10, 25 e 50 ppm) de SO<sub>2</sub> na sua estabilidade microbiológica e físico-química. Ao longo do armazenamento a alteração mais significativa, deu-se ao nível da diminuição do teor de antocianinas monoméricas, quer com a adição de SO<sub>2</sub>, quer sem a adição deste agente antimicrobiano, mostrando que o SO<sub>2</sub> se ligou às antocianinas, não exercendo a sua atividade antimicrobiana. Assim, nas condições avaliadas o armazenamento à temperatura ambiente não foi uma opção viável para este concentrado. A quantificação do etanol produzido pelos microrganismos nos sumos concentrados de sabugueiro armazenados à temperatura ambiente ao fim do primeiro mês foi de 1,37% (V / V), sendo inferior para os sumos com adição de SO<sub>2</sub> 1,18%, 0,6% e 0,08% (V / V) para 10, 25 e 50 ppm de SO<sub>2</sub>, respetivamente, o que perspetiva que concentrações maiores de SO<sub>2</sub> possam exercer um efeito antimicrobiano permitindo que o sumo seja armazenado à temperatura ambiente.

**Keywords**

Elderberry concentrate, turbidity, anthocyanins, storage, sulfur dioxide, freezing, refrigeration, room temperature

**Abstract**

The conservation of elderberry juice is one of the main challenges of Indumape. Elderberry concentrate juice showed a total soluble solids of 65° Brix, pH 4.49, the acidity was 2 % (w/w, citric acid eq.), turbidity 1608 NTU, monomeric anthocyanins 10 g/L (cyanidin 3-glucoside eq.), and 30 g/L reducing sugars (glucose eq.). The objective of the work developed at Indumape was to evaluate the conservation of elderberry concentrate at the microbiological level, anthocyanin content and physico-chemical properties during storage time at different temperatures (-18, 8 and 25°C). Refrigeration and freezing of the elderberry juice allowed to minimize physical chemical changes along the forth months of storage. Aiming to evaluate the conservation of juice concentrate at room temperature the effect of different contents (10, 25 and 50 ppm) of SO<sub>2</sub> was tested. Along the storage the most significant change was the decrease of level of monomeric anthocyanins, either with the addition of SO<sub>2</sub> or without the addition of this antimicrobial agent. These results showed that the SO<sub>2</sub> bound the anthocyanins preventing its antimicrobial activity. Under the evaluated conditions, the room temperature storage was not a reliable option for this juice concentrate. The quantification of ethanol in the elderberry juice stored at room temperature at the end of the first month was 1,37% (V / V), being lower for the SO<sub>2</sub> addition, 1,18%, 0,60% and 0,08% (V /V) for 10, 25 and 50 ppm SO<sub>2</sub>, respectively. These results showed that higher SO<sub>2</sub> concentrations may have an antimicrobial effect, allowing the storage of elderberry juice concentrate at room temperature.

# Índice

<b>Lista de símbolos e abreviaturas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Capítulo 1- A empresa de acolhimento e o processo de produção de sumos concentrados .....</b>	<b>3</b>
1.1. Apresentação da empresa Indumape- Industrialização de Fruta, S.A. ....	3
1.2. Etapas do processo de produção de sumo concentrado de baga de sabugueiro.....	3
<b>Capítulo 2- Composição do fruto e sumo concentrado de baga de sabugueiro .....</b>	<b>5</b>
2.1. Sabugueiro .....	5
2.2. Compostos fenólicos.....	8
2.2.1. Flavonóides .....	9
2.2.1.1. Antocianidinas e antocianinas .....	10
2.2.1.2. Taninos .....	15
2.2.1.3. Flavonóis .....	16
2.3. Compostos não flavonóides .....	16
2.3.1. Ácidos fenólicos.....	16
2.4. Hidratos de carbono .....	17
2.5. Aminoácidos e proteínas.....	18
2.6. Ácidos orgânicos.....	18
<b>Capítulo 3-Critérios de qualidade dos sumos concentrados de baga de sabugueiro ..</b>	<b>19</b>
3.1. Sólidos Solúveis Totais.....	19

3.2. Acidez titulável e pH .....	20
3.3. Cor .....	20
3.4. Turbidez .....	22
3.4.1. Enzimas no rendimento do sumo .....	23
<b>Capítulo 4- Efeitos do processamento e armazenamento nas antocianinas e cor de sumos concentrados.....</b>	<b>27</b>
4.1. Copigmentação .....	27
4.2. Oxidação degradativa, tratamento térmico e clarificação influência na estabilização de antocianinas.....	28
4.3. Efeitos do processamento e armazenamento em sumo concentrado de baga de sabugueiro.....	30
<b>Capítulo 5- Métodos de conservação e seus efeitos no sumo concentrado de baga de sabugueiro .....</b>	<b>33</b>
5.1. Congelação.....	33
5.2. Adição de dióxido de enxofre .....	34
<b>Capítulo 6- Materiais e Métodos .....</b>	<b>39</b>
6.1. Amostragem.....	40
6.2. Método diferencial de pH para determinação de antocianinas monoméricas.....	41
6.3. Determinação dos sólidos solúveis totais (SST).....	42
6.4. Determinação do pH e da acidez titulável .....	42
6.5. Determinação da turbidez .....	43
6.6. Análise microbiológica .....	43

6.7. Adição e análise de SO <sub>2</sub> em sumo concentrado de baga de sabugueiro.....	44
6.7.1. Determinação de SO <sub>2</sub> total .....	45
6.8. Análise de açúcares.....	45
6.8.1. Açúcares redutores .....	45
6.8.2. Açúcares neutros .....	46
6.9. Análise de ácidos urónicos .....	47
6.10. Identificação e quantificação de etanol por SPME /GC-FID .....	48
6.11. Análise estatística .....	49
<b>Capítulo 7- Resultados e Discussão .....</b>	<b>51</b>
7.1. Caracterização físico-química do sumo concentrado de baga de sabugueiro.....	51
7.1.1. Teor de antocianinas monoméricas .....	51
7.1.2. Turbidez .....	54
7.1.3. Teor de açúcares redutores .....	55
7.1.4. Teor de sólidos solúveis .....	56
7.1.5. pH e acidez.....	58
7.1.6. Análise microbiológica .....	60
7.2. Efeito da adição de diferentes níveis de SO <sub>2</sub> nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do sumo concentrado de baga de sabugueiro.....	61
7.2.1. Relação do teor de antocianinas monoméricas com a adição de diferentes concentrações de SO <sub>2</sub> .....	61

7.2.2. Relação da turbidez com a temperatura de armazenamento com a adição de diferentes concentrações de SO <sub>2</sub> .....	64
7.2.3. Conservação microbiológica com adição de diferentes concentrações de SO <sub>2</sub> .	66
7.3. Análise da composição em açúcares do material polimérico dos sumos concentrados de baga de sabugueiro .....	69
<b>Capítulo 8- Conclusão e perspectivas futuras.....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo 9- Referências Bibliográficas .....</b>	<b>73</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>81</b>

## Índice de figuras

Figura 1- Região do Vale do Varosa, onde é predominante a produção de baga de sabugueiro (Neto, 2007). .....	5
Figura 2 - Arbusto da árvore de sabugueiro (DRAPN, 2007).....	6
Figura 3 - Baga da árvore de sabugueiro (DRAPN, 2007).....	6
Figura 4 - Estrutura química das subclasses de flavonóides (Dai et al., 2010). .....	10
Figura 5 -Estrutura de antocianidinas (Wrolstad et al., 2005).....	11
Figura 6 - Principais antocianinas presentes na baga de sabugueiro, cianidina 3-glicosídeo (R-glucose) e cianidina 3-sambubiosídeo (R-xilose-glucose; 2-O-β-D-xilosil-D-glucosídeo) (Seabra et al., 2010).....	12
Figura 7 - Transformação estrutural de antocianinas num sistema aquoso (Hubbermann et al., 2006). .....	14
Figura 8 - Quercetina 3-rutinosídeo (R-rutinoose; 6-O-α-L-ramnosil-D-glucose) (Seabra et al., 2010). .....	16
Figura 9 - Estrutura de um ácido hidroxibenzóico, o ácido gálico, e de dois ácidos hidroxicinâmicos, o ácido ferúlico e o cafeico (Dai et al., 2010).....	17
Figura 10 - Representação do modo de ação da poligalacturonase (PG) e polimetilgalacturonase (PMG) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécticos. (Jayani et al., 2005). .....	24
Figura 11- Representação do modo de ação da pectina metilesterase (PME) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécticos. As setas mostram o local onde a enzima exerce a sua atividade sobre a substância péctica (Jayani et al., 2005).....	25
Figura 12 - Representação do modo de ação da pectina liase (PL) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécticos. As setas mostram o local onde as enzimas exercem a sua atividade sobre a substância péctica. Representação do modo de ação da poligalacturonase liase (PGL) (Jayani et al., 2005).....	25

Figura 13 - Degradação térmica de antocianinas (Patras et al., 2010). .....	29
Figura 14 -Etapas do processo de obtenção de sumo concentrado de baga de sabugueiro à escala laboratorial Adaptado de (Szalóki-Dorkó et al., 2015). .....	31
Figura 15 - Reação entre antocianinas e $\text{HSO}_3^-$ (Bridle, 1967). .....	35
Figura 16 - Evolução do teor de antocianinas monoméricas ao longo do armazenamento. *- Temperatura ambiente ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0; #- Refrigeração ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0; +- Congelamento ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0. ....	52
Figura 17 - Evolução da turbidez ao longo do período e armazenamento *- Temperatura ambiente ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0.....	54
Figura 18- Evolução do teor de açúcares redutores ao longo do período de armazenamento. *- Temperatura ambiente ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0; #- Refrigeração ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0.....	55
Figura 19- Evolução do teor de sólidos solúveis ao longo do período de armazenamento. *- Temperatura ambiente ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0. ....	57
Figura 20 - Evolução do pH ao longo do período de armazenamento. ....	58
Figura 21 - Evolução da acidez ao longo do período de armazenamento. ....	59
Figura 22 -Impacto da concentração de $\text{SO}_2$ no teor de antocianinas após um mês de armazenamento. ....	62
Figura 23 - Impacto das diferentes concentrações de $\text{SO}_2$ no teor de antocianinas monoméricas após 3 meses de armazenamento. ....	63
Figura 24 - Impacto de diferentes concentrações de $\text{SO}_2$ na turbidez às diferentes temperaturas de armazenamento para o sumo concentrado de baga de sabugueiro. ....	65
Figura 25 - Impacto da temperatura de armazenamento na turbidez do sumo concentrado de baga de sabugueiro. ....	66

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Diferentes antocianidinas encontradas na natureza. (Krenn et al., 2007). .....	11
Tabela 2- Comparação da quantidade de antocianinas entre fruto, sumo diluído e concentrado ( Szalóki-Dorkó, 2016; Veberic et al., 2009).....	13
Tabela 3- Diluição utilizada para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.....	39
Tabela 4- Limites microbiológicos para bolores e leveduras e contagens totais em sumo concentrado de baga de sabugueiro.....	44
Tabela 5- Valores obtidos das análises microbiológicas realizadas ao sumo concentrado de baga de sabugueiro após produção e após um mês de armazenamento.....	61
Tabela 6- Resultados microbiológicos obtidos para as amostras armazenadas à temperatura ambiente durante o período de armazenamento para sumo concentrado de baga de sabugueiro armazenado com diferentes concentrações de SO <sub>2</sub> , 10, 25 e 50 ppm. ....	67
Tabela 7- Valores de etanol quantificados por SPME/ GC-FID nas amostras à temperatura ambiente com e sem SO <sub>2</sub> . ....	68
Tabela 8- Composição em açúcares dos polissacarídeos das amostras 1, 2 e 3 isoladas dos sumos concentrados.....	69

## Lista de símbolos e abreviaturas

°Brix- unidade do teor de sólidos solúveis totais	PPO- polifenoloxidase
a*- valores vermelho-verde	SO <sub>2</sub> - dióxido de enxofre
Ara – Arabinose	SPME- microextração em fase sólida
b*- valores amarelo-azul	UFC – unidades formadoras de colónias
C*ab- Chroma	Xyl- xilose
CP- cor polimérica	
DC- densidade de cor	
DNS – ácido dinitrosalicílico	
FD- fator de diluição	
Fuc- fucose	
Gal-galactose	
GalA – Ácido galacturónico	
Glc- glucose	
GC-FID- cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama	
L*-luminosidade	
NTU- unidades nefelométricas de turbidez	
PMG- poligalacturonase	

## **Objetivos e enquadramento teórico**

A qualificação do sumo de baga de sabugueiro em termos de composição e quantidade dos seus componentes é um aspeto fundamental para a valorização do concentrado. O sumo concentrado de baga de sabugueiro produzido pela Indumape, ao contrário dos outros sumos concentrados já em produção (maçã, pera e uva branca) não se conserva à temperatura ambiente, iniciando um processo de fermentação, resultante do metabolismo de leveduras e bactérias. O °Brix é o parâmetro tecnológico que determina a estabilidade microbiológica destes produtos, no caso do sumo concentrado de baga de sabugueiro, não garante a sua conservação devido à presença de uma elevada quantidade de antocianinas para além dos açúcares solúveis. Assim torna-se importante perceber qual a metodologia de conservação mais eficiente e economicamente viável para a empresa. Atualmente as empresas, refrigeram o concentrado para validades curtas e congelam para validades mais longas. A utilização de anidrido sulfuroso como antimicrobiano para a conservação do sumo torna-se uma alternativa que vale a pena ser explorada. Para além disso, o uso de anidrido sulfuroso é previsto e permitido pela Comissão Europeia, sendo utilizado numa gama variada de produtos, onde constam também os sumos. Sendo este um subproduto resultante da dessulfitação do mosto rececionada na unidade fabril, esta torna-se uma alternativa económica viável. Neste trabalho irão ser avaliados diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>, a diferentes temperaturas de conservação, temperatura ambiente, refrigeração e congelação. O trabalho baseou-se na hipótese apresentada de seguida.

**Hipótese:** Será o sumo concentrado de sabugueiro armazenado à temperatura ambiente com a adição de anidrido sulfuroso estável a nível físico-químico e microbiológico ao longo do período e armazenamento estudado? Qual a melhor metodologia de conservação do concentrado, sendo 3 temperaturas estudadas com e sem adição de diferentes níveis de anidrido sulfuroso. Será necessário o aumento dos açúcares solúveis no sumo concentrado? Quais os polissacarídeos presentes no concentrado que contribuiriam para o aumento da concentração?

Os objetivos apresentados resultam da proposta de resolução de problemas e implementação de melhorias apresentadas pela Indumape à Universidade de Aveiro. Desta forma os objetivos são:

- Certificação do sumo concentrado de baga de sabugueiro com base em critérios físico-químicos, como etanol, °Brix, acidez, pH, turbidez, teor de antocianinas monoméricas e microbiológicos, como bolores e leveduras e aeróbios mesófilos totais;
- Estudo do impacto do tempo e temperatura de armazenamento em compostos relevantes da matriz de baga de sabugueiro, como as antocianinas, como a diminuição da sua forma monomérica por aumento da sua forma polimerizada;
- Estudo de alternativas para a conservação, como por exemplo a utilização de dióxido de enxofre a temperaturas de congelação, refrigeração e temperatura ambiente.

## **Capítulo 1- A empresa de acolhimento e o processo de produção de sumos concentrados**

### **1.1. Apresentação da empresa Indumape- Industrialização de Fruta, S.A.**

A Indumape, Industrialização de Fruta S.A. é uma empresa portuguesa do setor alimentar que se dedica à transformação de frutas como maçã, pera, uva e mais recentemente baga de sabugueiro em sumos concentrados. A sua sede situa-se no Parque Industrial Manuel da Mota, Pombal, Portugal. Os primórdios desta empresa remontam a 1978. Ao fim de 28 anos, a Outubro de 2007, surge a Indumape, Industrialização de Fruta S.A., como a conhecemos hoje, dando início à sua atividade industrial numa fábrica nova e mais moderna e com a tecnologia necessária para responder às necessidades do mercado internacional. Ao longo dos últimos anos tem adquirido várias certificações que reconhecem o seu desempenho económico- financeiro e de gestão. A empresa é especialista na produção de sumos concentrados de uva, maçã e pera nacional. Iniciou a produção de concentrado de uva a partir de mosto amuado em 2014. O mosto amuado usado para a produção do sumo concentrado de uva é dessulfitado prestando este serviço a diversas adegas e vinicultores nacionais. Para além disso produz ainda aromas de maçã e pera. Atualmente, está a investir na investigação e desenvolvimento de um novo produto, o sumo concentrado de baga de sabugueiro. Os produtos finais obtidos destinam-se ao fabrico de sumos, néctares, vinagres e cidras. No ano de 2016, a Indumape é a maior transformadora de fruta de origem nacional. É de real importância evidenciar que grande parte da produção é exportada, principalmente, para países como Alemanha, Inglaterra, Espanha.

### **1.2. Etapas do processo de produção de sumo concentrado de baga de sabugueiro.**

Sumo de fruta pode ser definido como o conteúdo em fluídos extraídos de células ou tecidos vegetais de uma ou mais espécies, obtidos a partir de um processo mecânico de esmagamento ou prensagem. O sumo pode ser clarificado ou concentrado e, posteriormente reconstituído à sua consistência inicial através da adição de água, assegurando e mantendo a composição e qualidade do sumo (Bates *et al.*, 2001).

O sumo de fruta concentrado é resultado de um processo industrial no qual a fruta é submetida a uma etapa de evaporação de água através da transferência de calor e

vácuo, sendo que as pressões aplicadas são negativas. O objetivo é obter-se um produto com melhores condições em termos de cor e sabor, facilitando e melhorando também o seu transporte, armazenamento e preservação (Bermúdez-Soto *et al*, 2004).

A produção de sumo concentrado de baga de sabugueiro tem início na chegada da matéria- prima à unidade fabril. A baga de sabugueiro é recebida pela Indumape já na forma de mosto de baga de sabugueiro refrigerado, sendo que o seu transporte é feito em cisterna refrigerada. À sua chegada a carga é pesada, medido o seu °Brix e acidez e ainda é feita uma avaliação à documentação do fornecedor. As variedades utilizadas pelo fornecedor da Indumape, a RégieFrutas, são a Sabugueira, Sabugueiro e Bastardeira. Posteriormente a baga é descarregada e encaminhada para o moinho, onde se inserem enzimas, Fructozym Color, de maceração. Seguidamente, a polpa é levada para os tanques com agitação onde estão durante 2-3h a macerar. O objetivo é aumentar a eficiência de extração do sumo no decorrer da prensagem, deste modo conseguindo tirar maior proveito do sumo, sendo que nesta etapa são adicionadas também enzimas de maceração. Estas soluções enzimáticas vão facilitar a ação dos tratamentos enzimáticos posteriores e, ao mesmo tempo, aumentar o rendimento da prensagem (Falguera *et al*, 2014). Na prensagem é adicionada água até obter um °Brix de 6 ou 7, sendo este o °Brix ideal para o processo de concentração, onde ocorre a remoção de caroços e películas. Na etapa de desaromatização é feita recuperação de aroma que atualmente não apresenta valor comercial para a Indumape. Chegada a etapa de clarificação/despectinização são adicionadas também enzimas pectinolíticas. Aqui as enzimas são adicionadas para a despolimerização dos polissacarídeos pécticos. Passo este que influência diretamente a turbidez do produto final, diminuindo-a. Na etapa de ultrafiltração o sumo é clarificado num ultrafiltrador tangencial, seguidamente vai ao evaporador onde é concentrado a 65°Brix. No final o sumo é homogeneizado e armazenado a 8-9°C.

## Capítulo 2- Composição do fruto e sumo concentrado de baga de sabugueiro

### 2.1. Sabugueiro

As atividades propostas neste trabalho estão maioritariamente focadas na baga de sabugueiro e na produção de sumo concentrado a partir da mesma. Como tal, grande parte da revisão bibliográfica será focada neste fruto e nas suas características físicas e químicas capazes de influenciar a qualidade do concentrado.

Em Portugal, esta espécie tem particular interesse económico na região do Vale da Varosa, figura 1, concelhos de Tarouca, Armamar, Lamego, Tabuaço e Moimenta da Beira, onde existem numerosas populações silvestres cultivadas (Silva *et al.*, 2014).

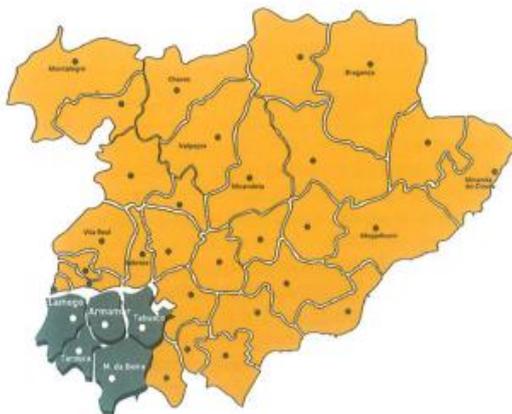


Figura 1- Região do Vale do Varosa, onde é predominante a produção de baga de sabugueiro (Neto, 2007).

A baga de sabugueiro, figura 3, pertence ao género *Sambucus*, sendo que é frequentemente inserida na família *Caprifoliaceae*, mas estudo recentes associam esta planta à família *Adoxaceae*. Esta espécie é um arbusto, figura 2, ou pequena árvore, atingindo usualmente 5-6 m, com tronco irregular e onde se inserem ramos opostos, todos eles cobertos de uma casca rugosa de cor cinzento esbranquiçada. As folhas apresentam cor verde escuro na página superior e mais clara na página inferior. Usualmente, emergem em fevereiro ou março e o seu arbusto floresce por volta de maio-junho dependendo da localização geográfica e área de cultivo (Atkinson *et al.*, 2002; Neto, 2007). O processo de amadurecimento da baga ocorre num período de 1 a 2 meses, sendo colhida nos finais de agosto ou início de setembro. Esta começa por ser de cor verde e quando colhida adquire coloração roxo escuro. É uma planta que manifesta

reduzida exigência em nutrientes, mas a sua produtividade é melhorada quando cresce em solos férteis, irrigados e fertilizados adequadamente (Neto, 2007). No estágio de amadurecimento, cada cacho contém centenas de bagas de coloração roxo escuro. Cada baga, individualmente, tem um diâmetro que ronda os 5,0 a 6,5 mm (Salvador *et al.*, 2016).



Figura 2 - Arbusto da árvore de sabugueiro (DRAPN, 2007).

A baga de sabugueiro é constituída aproximadamente por 79,80 g de água, 18,40 g de hidratos de carbono, 0,66 g de proteínas e 0,50 g lípidos, minerais e vitaminas, sendo estes valores por 100g de fruto e expressos em base húmida (USDA, 2016). As vitaminas presentes na baga de sabugueiro fresca são: vitamina C (36 mg), tiamina (0,070 mg), riboflavina (0,060 mg), niacina (0,500 mg), ácido pantoténico (0,140 mg), vitamina B6 80,230 mg), sendo este valores também expressos para 100g de fruto (Vlachojannis *et al.*, 2009; USDA, 2016).



Figura 3 - Baga da árvore de sabugueiro (DRAPN, 2007).

De acordo com a literatura, os açúcares redutores glucose e frutose são os mais comuns nos frutos selvagens, sendo que representam cerca de 90% da quantidade total de açúcares e a sacarose aparece, mas em pequenas quantidades. Durante todas as

etapas de processamento da baga de sabugueiro, nomeadamente na produção de sumo, os açúcares redutores dominam sendo que o seu conteúdo total aumenta depois da etapa de prensagem (8,51%) e adicionalmente depois da concentração (20,05%) (Galić *et al.*, 2009). As antocianinas encontram-se na sua maioria na casca e polpa do fruto, assim se justifica o seu aumento durante etapas como a prensagem (Garofulić *et al.*, 2012).

O sabugueiro recentemente tem adquirido um elevado interesse a nível nutricional, como nutracêutico devido ao elevado teor em compostos bioativos, com benefícios para a saúde, particularmente, compostos fenólicos (antocianinas, flavonóis, favanóis), vitaminas, minerais, substâncias pécticas, ácidos orgânicos e compostos monoterpénicos, sesquiterpénicos, triterpénicos e esteróis. Uma larga gama de propriedades biológicas, em diversas matrizes, estão reportadas para estes metabolitos secundários, que para além dos potenciais benefícios para a saúde apresenta também um papel relevante na proteção e metabolismo de plantas. A vantagem do uso do sabugueiro é que ele cresce em condições naturais sem necessidade de grande intervenção humana direta, embora nos últimos anos se tenha procedido ao seu cultivo para o melhoramento de características como a acidez e o teor de sólidos solúveis (Garofulić *et al.*, 2012; Salvador *et al.*, 2016).

Por estes motivos, o sabugueiro tem também adquirido maior importância a nível alimentar, principalmente como corante natural de bebidas e antioxidantes (Netzel *et al.*, 2005). Hoje em dia, o sabugueiro é maioritariamente comercializado na sua forma processada. As flores, usualmente secas, e as bagas, preferencialmente frescas, são apropriadas para o processo, sendo amplamente utilizadas na Europa do Norte e Central, assim como na América do Norte (Kaack *et al.*, 1998). O processamento industrial de sabugueiro é maioritariamente representativo em países do Norte da Europa. Os cultivares desta zona apresentam sabor pronunciado, menos de 1% de acidez titulável, alto teor de antocianinas e os sólidos solúveis, como açúcares (10%) que são principalmente aproveitados pela indústria de sumos (Dawidowicz *et al.*, 2006). Devido ao aumento do interesse industrial para diferentes propósitos, têm também aumentado os pedidos para a produção de mais variedades de baga de sabugueiro com diferentes características de qualidade incluindo o sabor e o aroma. O sabor das bagas está muito relacionado com o seu conteúdo em açúcares e ácidos. As características do seu aroma devem-se à presença de compostos voláteis. Os mais importantes incluem aldeídos

como o pentanal, heptanal, octanal, nonanal e (*E*) - 2 hexenal, os álcoois 2-metil-1-propanol, 2- e 3-metil-1-butanol, os ésteres etil-2-metil-butirato, etil isovalerato, metil heptanoato, etil octanoato e metil nonanoato e também terpenos como 6-metil-5-hepten-2-ona e  $\beta$ -damascenona (Kaack *et al.*, 2005).

Atualmente a baga de sabugueiro é usada na preparação de produtos alimentares, como geleias, tartes, molhos, sumos e vinhos (Charlebois, 2007). O sumo concentrado de baga de sabugueiro é uma alternativa natural aos corantes artificiais usados em alimentos devido ao seu elevado conteúdo em antocianinas (Kaack *et al.*, 1998).

## **2.2. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo. Eles estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são os metabolitos secundários mais abundantes nas plantas (Dai *et al.*, 2010). Uma das matrizes onde os podemos encontrar são os frutos, sendo que estes metabolitos são específicos do fruto onde se encontram. Eles desenvolvem-se durante o período de maturação, sendo que contribuem de forma significativa para as propriedades sensoriais e, como resultado de processos tecnológicos estão sujeitos a reações oxidativas enzimáticas e não enzimáticas. A diferença na composição e quantidade de fenóis depende de muitos fatores, entre os quais a área geográfica de crescimento, grau de maturação, variedade, clima, e especialmente as condições e métodos de processamento das matérias-primas (Garofulić *et al.*, 2012). Atualmente, existem mais de 8000 estruturas fenólicas conhecidas, que englobam moléculas como os ácidos fenólicos e substâncias altamente polimerizadas tais como os taninos. Os compostos fenólicos das plantas incluem ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e os menos comuns, estilbenos e lenhinas. Em muitas plantas os compostos fenólicos são polimerizados em grandes moléculas como as proantocianidinas ou taninos condensados, e lenhina (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). Os compostos fenólicos das plantas estão envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta ou agressão por patogênicos, parasitas e predadores, sendo que também contribuem para as cores exibidas pelas plantas. São ubíquos em todos os órgãos das plantas e, portanto são parte integrante da dieta humana. Os compostos fenólicos são constituintes de alimentos vegetais, como frutas, cereais, leguminosas e bebidas, como chá, café, cerveja, vinho, e parcialmente responsáveis pelas propriedades organolépticas gerais dos alimentos vegetais ( Dai *et al.*, 2010).

Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os grupos mais importantes de metabolitos e compostos bioativos em plantas. Os ácidos fenólicos são extensivamente dispersos pelo reino vegetal. Estes compostos integram um grupo diversificado que inclui ácidos como o hidroxibenzóico e o hidroxicinâmico que são amplamente distribuídos na natureza (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). As antocianinas e outros flavonóides mostram propriedades antioxidantes, antibacterianas, antivirais, entre outras. (Garofulic *et al.*, 2012). Os fitoquímicos presentes em maior quantidade nas bagas são as antocianinas e as proantocianidinas (Wu *et al.*, 2015).

### **2.2.1. Flavonóides**

Os flavonóides são os compostos mais abundantes na nossa dieta. A estrutura básica dos flavonóides é um núcleo de flavano, que contém 15 átomos de carbono e 3 anéis (C6-C3-C6). Estes dividem-se em seis subgrupos: flavona, flavonóis, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas, figura 3, de acordo com o estado de oxidação do anel central. A sua variação estrutural em cada subgrupo é em parte devido ao grau de hidroxilação, metoxilação e glicosilação. Os flavonóides mais abundantes em frutos de baga, como o mirtilo, framboesa e sabugueiro são derivados de cianidina glicosilada. O grupo de compostos fenólicos de plantas conhecidos como flavonóides são responsáveis pelas variadas cores que muitos frutos e vegetais apresentam (Dai *et al.*, 2010).

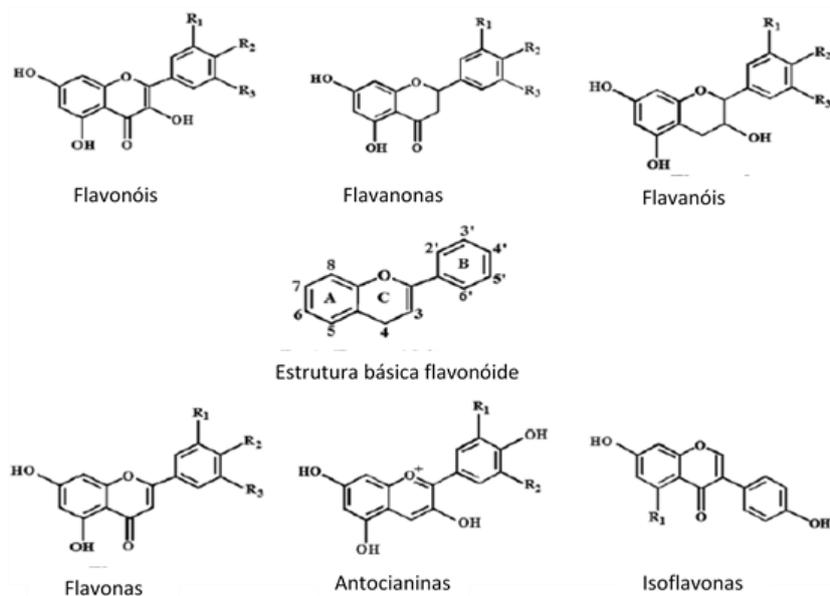


Figura 4 - Estrutura química das subclasses de flavonóides (Dai *et al.*, 2010).

Os flavonóides são sintetizados pela via do fenilpropanóide e o precursor é a fenilalanina. A maioria dos compostos flavonóides estão frequentemente acumulados nos vacúolos das plantas na forma glicosilada. Todos os flavonóides partilham o esqueleto estrutural básico C6-C3-C6, constituído por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico (C) que contém um átomo de oxigénio (Ghasemzadeh *et al.*, 2011).

### 2.2.1.1. Antocianidinas e antocianinas

O estudo de corantes naturais é uma área extensa e ativa de investigação devido ao crescente interesse de substituir corantes sintéticos com efeitos tóxicos em seres humanos. As antocianinas são solúveis em água e são extraídas a partir de uma série de frutos e legumes. Antocianinas (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) são os pigmentos mais importantes das plantas vasculares, são de fácil incorporação em meio aquoso, o que as torna interessantes para utilização como corantes naturais solúveis em água. Estes pigmentos são responsáveis pelas várias cores em flores e frutos de algumas plantas.

Na tabela 1 estão representadas algumas antocianidinas que na forma glicosilada originam as antocianinas.

Tabela 1- Diferentes antocianidinas encontradas na natureza. (Krenn et al., 2007).

Antocianidina	R1	R2
Pelargonidina	H	H
Cianidina	H	OH
Delfinina	OH	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Quando as antocianidinas são encontradas na sua forma glicosilada, ligadas a açúcares, elas são conhecidas como antocianinas. (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). Estas consistem num anel aromático [A] ligado a um anel heterocíclico de [C], que contém oxigénio, ligado por uma ligação C-C com um terceiro anel aromático [B], sendo que estas se encontram representadas na figura 5 (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

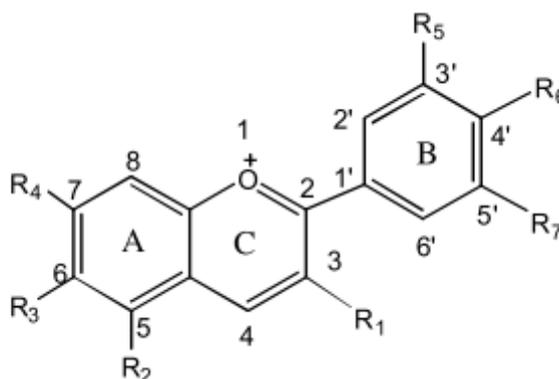


Figura 5 -Estrutura de antocianidinas (Wrolstad *et al.*, 2005).

A cor exibida por estas moléculas foi explicada pela primeira vez por Pauling, em 1939, que propôs que a estrutura de ressonância do ião flavílio causa intensidade da sua cor (Wrolstad *et al.*, 2005). Há uma enorme variedade de antocianinas espalhadas na natureza. As principais diferenças entre elas são o número de grupos hidroxilados, natureza e o número de açúcares ligados à sua estrutura, os carboxilatos alifáticos ou aromáticos ligados à molécula de açúcar e a posição dessas ligações (Kong *et al.*, 2003). O isolamento das antocianinas é muito instável e altamente suscetível à degradação. A

sua estabilidade é afetada por vários fatores tais como pH, temperatura de armazenamento, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes, na presença de enzimas, flavonóides, proteínas e iões metálicos, sendo que o mais importante é o pH (Hubbermann *et al.*, 2006; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Metais como o Fe, Al, Cu, Sn e Mg, formam complexos de coordenação corados bastante estáveis com as antocianinas que possuem mais do que um grupo hidroxilo no anel B (delfinidina, petunidina e a cianidina) (Pasteur *et al.*, 1990). Deste modo, a estabilização química de antocianinas é o foco principal de estudos recentes devido às suas potenciais e variadas aplicações, por exemplo a sua utilização como alternativa aos corantes artificiais como referido anteriormente (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

No caso específico do sabugueiro, as antocianinas são os compostos fenólicos predominantes. As antocianinas encontradas no sabugueiro, são maioritariamente, derivadas de antocianidinas de base cianidina. Os valores variam entre 200 e 1000 mg / 100 g de peso fresco (Bridle *et al.*, 1997). As antocianinas encontram-se na sua maioria na casca e polpa do fruto, sendo que o valor encontrado no sumo e vinho produzido a partir deste fruto irá depender das condições de maceração utilizadas para extração das antocianinas (Garofulić *et al.*, 2012).

A cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-sambubiosídeo, figura 6, são as principais antocianinas presentes na baga de sabugueiro. Também presentes na baga de sabugueiro, mas em menores quantidades estão a cianidina 3-sambubiosídeo-5-glicosídeo, cianidina-3,5-diglicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-sambubiosídeo (Nakajima *et al.*, 2004).

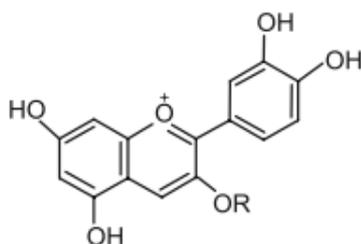


Figura 6 - Principais antocianinas presentes na baga de sabugueiro, cianidina 3-glicosídeo (R-glucose) e cianidina 3-sambubiosídeo (R-xilose-glucose; 2-O-β-D-xilosil-D-glucosídeo) (Seabra *et al.*, 2010).

No mosto utilizado para a produção do concentrado de sumo de sabugueiro as antocianinas quantificadas são a cianidina 3-sambubiosídeo (397,55 mg/L), cianidina 3-sambubiosídeo-5-glucosídeo (58,99mg/L), cianidina 3,5-diglucosídeo (139,46 mg/L), cianidina 3-glucosídeo (350,07 mg/L) e a cianidina 3-rutinosídeo (19,22 mg/L) (Schmitzer *et al.*, 2010). Em sumo concentrado de baga de sabugueiro a concentração de antocianinas determinada é 11,5 g/L (Bermúdez-Soto *et al.*, 2004). Na tabela 2 podemos ver a comparação entre as quantidades de antocianinas presentes no fruto, no sumo concentrado e sumo diluído obtido a partir do concentrado.

Tabela 2- Comparação da quantidade de antocianinas entre fruto, sumo diluído e concentrado ( Szalóki-Dorkó, 2016; Veberic *et al.*, 2009).

Antocianina	Fruto (mg/kg, peso fresco)	Sumo reconstituído 10°Brix (mg/kg)	Sumo concentrado a 65°Brix (mg/kg)
Cianidina 3-glucosídeo	403,6	52,4	340,9
Cianidina 3-sambubiosídeo	470,0	147,4	958,4
Cianidina 3-sambubiosídeo-5-glucosídeo	334,0	121,4	789,1
Cianidina 3,5-diglucosídeo	157,0	12,4	80,8

Os pigmentos de antocianinas são compostos instáveis que são submetidos a uma série de reações de degradação. A sua estabilidade é altamente variável dependendo da sua estrutura e da composição da matriz em que elas se inserem. O aumento da substituição glicosídica aumenta a estabilidade do pigmento (Wrolstad *et al.*, 2005). Também a acilação dos resíduos de açúcar com ácidos, por exemplo com ácido cinâmico vai aumentar a estabilidade do pigmento, tornando-o mais estável do que o correspondente pigmento não acilado (Bridle *et al.*, 1997).

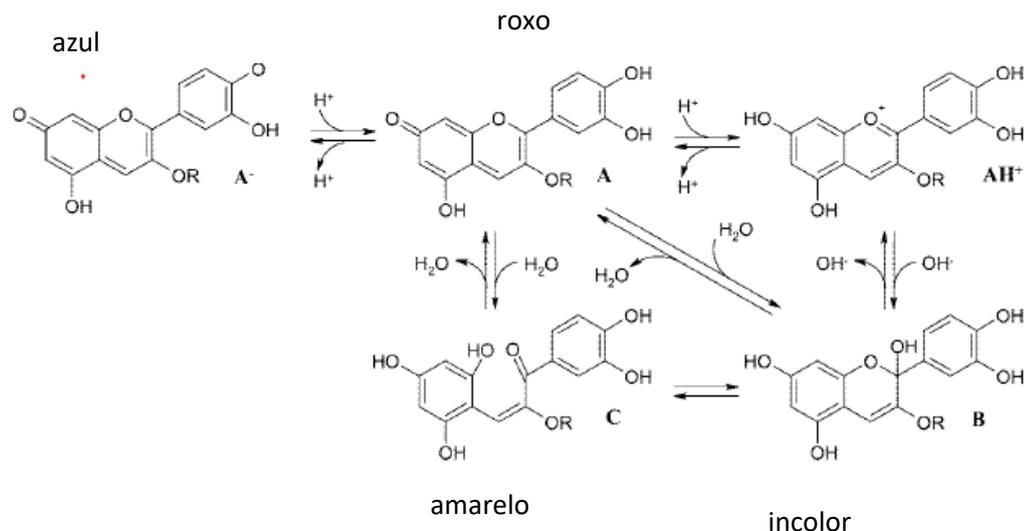


Figura 7 - Transformação estrutural de antocianinas num sistema aquoso.  $AH^+$  é o catião flavílio,  $A$  é a base quinoidal,  $A^-$  é a base anidro,  $B$  é a pseudobase e  $C$  é a calcona (Hubbermann et al., 2006).

Num sistema aquoso existe um equilíbrio de quatro cromóforos de antocianinas, figura 7, que é determinado pelo pH (Hubbermann *et al.*, 2006). De acordo com o pH em solução, as antocianinas podem existir sob diversas formas de equilíbrio. A pH 1, as antocianinas encontram-se maioritariamente na forma de catião flavílio ( $AH^+$ ) e apresentam coloração vermelha. Com o aumento do pH, ocorre a hidratação do catião flavílio levando ao aparecimento da forma de base carbinol incolor ( $B$ ). A partir de valores de pH 2 começam a surgir as formas de calcona de cor amarela ( $C$ ) e a proporção de catião flavílio diminui bruscamente, traduzindo-se numa diminuição considerável da coloração vermelha da solução. A pH entre 3 e 4, a forma predominante é a base carbinol incolor ( $B$ ), embora todas as outras formas de equilíbrio se encontrem presentes. Também entre os valores de pH 4 e 7 predomina a forma de base carbinol incolor ( $B$ ), sendo a fração molar do catião flavílio insignificante. A pH neutro ou alcalino ocorre uma desprotonação rápida do catião flavílio originando a base quinoidal ( $A$ ) de cor violeta (Brouillard *et al.*, 1990).

### 2.2.1.2. Taninos

Os taninos são um grupo de compostos fenólicos que integram as nossas dietas e são usualmente subdivididos em dois grupos, taninos hidrolisáveis e os taninos condensados (Dai *et al.*, 2010).

A unidade estrutural fundamental nestes grupos é o núcleo fenólico flavan-3-ol. Na maioria dos tecidos das plantas, os polímeros representam uma quantidade significativa, mas também é usual encontrar uma gama de espécies moleculares solúveis, monómeros, dímeros, trímeros (Haslam, 1996). Os taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular variando de 500 Da a mais de 3000 Da que se podem ser encontrados nas folhas das plantas, casca, fruta, madeira e raízes localizados ao nível dos vacúolos dos tecidos das plantas (Hassanpour *et al.*, 2011).

Os taninos são um grupo quimicamente diverso de fenóis solúveis em água, à exceção de alguns compostos com estrutura de elevado peso molecular, que ligam proteínas para formar complexos solúveis ou insolúveis (Hagerman *et al.*, 1992; Kabera *et al.*, 2014). Os taninos são compostos fenólicos que para além de ligarem proteínas e precipitá-las, consegue ainda formar complexos com amido, celulose e minerais. Eles são sintetizados pela via do ácido chiquímico, também conhecida como via fenilpropanóide. A mesma via leva à formação de outros fenóis como as isoflavonas, cumarinas, lenhinas e aminoácidos aromáticos. Os taninos hidrolisáveis são compostos que contêm um núcleo central de glucose ou outro poliol esterificado com ácido gálico, também chamados de galotaninos, ou com ácido hexahidroxidifénico, também chamados de elagitaninos. A elevada variedade de estruturas destes compostos é devido às elevadas possibilidades de formação de ligações oxidativas (Dai *et al.*, 2010).

Falando concretamente do grupo de maior relevância para este trabalho, visto que fazem parte da matriz de baga de sabugueiro, as proantocianidinas, também designadas de taninos condensados são os percursos incolores das antocianidinas. Elas ocorrem como dímeros, oligómeros ou polímeros de flavan-3-óis. O tamanho das moléculas de proantocianidinas pode ser descrito pelo seu grau de polimerização. As proantocianidinas contêm como subunidades epi(galocatequina) ou (epi)catequina e são denominadas por procianidinas ou prodelfininas, respetivamente (Wu *et al.*, 2004). No

concentrado de baga de sabugueiro, a literatura consultada revela que o valor de flavan-3-óis, como proantocianidinas é de  $1,1 \times 10^{-2}$  g/L (Bermúdez-Soto *et al.*, 2004).

### 2.2.1.3. Flavonóis

Os flavonóis contêm uma estrutura molecular que consiste num “esqueleto de flavona” triciclíco C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, sendo que estão amplamente distribuídos nas plantas onde ocorrem normalmente na sua forma O-glicosilada. Quercitina, canferol, miricetina e isoramnetina são dos flavonóis identificados comumente encontrados em frutos (Jakobek *et al.*, 2007). Os flavonóis maioritariamente presentes nos frutos de baga de sabugueiro são quercitina, quercitina-3-rutinosídeo (rutina), figura 8, e quercitina-3-glucosídeo (Topol'ská *et al.*, 2015). No concentrado de baga de sabugueiro, a literatura consultada revela que o valor de flavonóis é de 2,9 g/L (Bermúdez-Soto *et al.*, 2004).

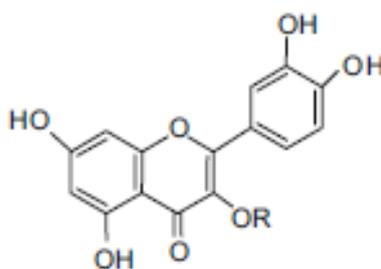


Figura 8 - Quercetina 3-rutinosídeo (R-rutinosose; 6-O- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucose) (Seabra *et al.*, 2010).

## 2.3. Compostos não flavonóides

### 2.3.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são metabolitos secundários extensivamente dispersos pelo reino vegetal. As suas funções têm sido alvo de muitos estudos a nível biológico, químico e medicinal (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). Os ácidos fenólicos podem dividir-se em duas classes, derivados do ácido benzóico como o ácido gálico e os derivados do ácido cinâmico tais como os ácidos cumárico, cafeico e ferúlico (Dai *et al.*, 2010).

Os ácidos hidroxibenzoicos, figura 9, incluem ácido gálico, que está presente em frutas, chá e vinho e é a unidade base de muitos compostos complexos, como o ácido elágico e os taninos hidrolisáveis, incluindo galotaninos e elagitaninos encontrados em frutos como romãs e grãos de cereais (Manach, 2004; Serrano *et al.*, 2009).

Os ácidos hidroxicinâmicos, figura 9, consistem principalmente em ácidos como o *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, e sinápico, sendo que estes podem ser encontrados na forma glicosilada ou conjugados com ácido quínico, chiquímico e tartárico (Pandey *et al.*, 2009; Manach, 2004). O ácido clorogénico é um éster de ácidos, cafeico e quínico, sendo que pode ser encontrado em vários frutos e vegetais (Manach, 2004).



Figura 9 - Estrutura de um ácido hidroxibenzoico, o ácido gálico, e de dois ácidos hidroxicinâmicos, o ácido ferúlico e o cafeico (Dai *et al.*, 2010).

Os ácidos fenólicos presentes em baga de sabugueiro são principalmente ácidos hidroxicinâmicos com um esqueleto de fenilpropeno, comumente esterificados com ácido quínico. O 5-cafeiolquínico é o principal ácido fenólico presente na matriz da baga de sabugueiro (Salvador *et al.*, 2016). De acordo com a literatura consultada, os derivados de ácido hidroxicinâmico encontram-se no sumo concentrado de baga de sabugueiro com uma concentração de 0,82 g/L (Bermúdez-Soto *et al.*, 2004).

#### 2.4. Hidratos de carbono

O sumo obtido de baga de sabugueiro contém muitos metabolitos primários, incluindo açúcares e ácidos orgânicos. Os hidratos de carbono presentes nas diferentes variedades de baga de sabugueiro têm sido alvo de estudo por Veberic, os valores determinados em base húmida foram: frutose (45,25 g/kg), glucose (43,8 g/kg) e sacarose (1,14 g/kg), sendo que esta última é detetada em pequenas quantidades.

Para além disso, às antocianidinas, bem como outros fenólicos presentes nas bagas existem uma série de açúcares que podem estar associados, como: monossacarídeos (glucose, galactose, ramnose, galactose, xilose ou arabinose);

dissacarídeos (rutinose, sambubiose, soforose) (Jackman *et al.*, 1987; Manganaris *et al.*, 2014).

Os estudos sobre caracterização de polissacarídeos em baga de sabugueiro detetam a presença de monossacarídeos neutros, como arabinose, ramnose, galactose e ácidos urónicos (ácido galacturónico e glucorónico). A presença destes monossacarídeos indica a possibilidade da presença de polissacarídeos pécnicos na baga de sabugueiro. Para além destes foram ainda detetadas manose, xilose, glucose e 4-*O*-Me-GlcA. A presença de elevado conteúdo em xilose e glucose, segundo alguns autores, pode ser a explicação para a presença de xiloglucanas. Este pode também ser o caso dos frutos de *S. nigra*, o que pode explicar o elevado teor de glucose (46,6% mol) e xilose (18,8% mol) determinados. Outro polissacarídeo purificado foi arabinogalactana-II que possivelmente se encontra ligada a um esqueleto de ramnogalacturonana (Barsett *et al.*, 2012).

## **2.5. Aminoácidos e proteínas**

A baga de sabugueiro contém elevada proteína, sendo 2,84g/100mL, tendo presente na sua constituição 16 aminoácidos dos quais 7 são essenciais. Os aminoácidos encontrados foram a lisina, alanina, treonina, glicina, valina, serina, prolina, isoleucina, leucina, metionina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico e aspártico, cisteína e tirosina (Vulić *et al.*, 2008; USDA, 2016).

### 2.6. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos presentes são o málico (1,13 g/kg), fumárico (0,18 g/kg), cítrico (3,64 g/kg) e chiquímico (0,39 g/kg) (Veberic *et al.*, 2009; Topol'ská *et al.*, 2015). O ácido cítrico foi o ácido orgânico mais abundante nas variedades estudadas, seguido de ácido málico e em menores concentrações o ácido chiquímico e fumárico (Veberic *et al.*, 2009). Em sumo concentrado obtido a partir de baga de sabugueiro selvagem, a acidez das bagas determinada foi de 1,24%, nas bagas branqueadas foi de 1,32%, no sumo obtido da prensagem, 1,32%, sendo que no sumo concentrado a acidez final foi de 3,04%. A acidez determinada no sumo concentrado demonstra que parte dos ácidos do fruto é preservada no concentrado (Galić *et al.*, 2009).

## Capítulo 3-Critérios de qualidade dos sumos concentrados de baga de sabugueiro

### 3.1. Sólidos Solúveis Totais

O teor de sólidos solúveis relaciona-se diretamente com os açúcares e ácidos das frutas, já que estes são os principais constituintes das suas matrizes. Pectinas, pectato de cálcio, arabinogalactanas, xiloglucanas e sais de metais (sódio, potássio, magnésio, cálcio, etc.), quando presentes podem também contribuir para a determinação dos sólidos solúveis totais. Embora os sólidos solúveis possam ser determinados gravimetricamente a partir de uma amostra de sumo (filtrada, se necessário, a partir de quaisquer sólidos em suspensão), a determinação mais acessível consiste na medição do valor do °Brix. A determinação do °Brix em sumos concentrados é feita com recurso a um refratómetro ótico que expressa os resultados em % m/m de sacarose, sendo que poderão existir outros componentes no sumo que interfiram com este valor, como é o caso dos ácidos presentes em muitas frutas. Deste modo, se o desvio se apresentar significativo deve ser considerado para o cálculo. Como tal existe uma tabela que dá uma correção para a obtenção do °Brix a partir de leituras de refratómetro de sumos ou outras soluções de açúcares contendo ácidos (Philip, 2013). A produção de concentrado de sabugueiro recorre a variedades de bagas com alto teor de sólidos solúveis totais e antocianinas. Quanto maior o teor de sólidos solúveis menos água deve ser evaporada para obter o sumo concentrado. Nas variedades estudadas em diferentes estados de maturação, determinou-se o °Brix e concluiu-se que o teor de sólidos solúveis aumenta com o amadurecimento. Para além do estado de maturação outro fator que contribui para o teor de sólidos solúveis é o ano de cultivo (Szalóki-Dorkó *et al.*, 2015). Os sumos concentrados de baga de sabugueiro atualmente comercializados apresentam valores de °Brix entre 63-67. No entanto, este valor de °Brix não tem somente a contribuição de açúcares, mas também de antocianinas e, por isso esta concentração pode não ser efetiva no que diz respeito à conservação deste concentrado.

### 3.2. Acidez titulável e pH

O carácter ácido de um sumo contribui para o tipo de sabor que este apresenta. O teor de ácido (% m/m) é determinado por titulação direta contra uma solução alcalina padronizada (por exemplo 0,1 M de hidróxido de sódio) usando um medidor de pH, até um ponto final de pH 8,1. Quando o sumo for naturalmente claro, ou tiver sido clarificado, e for de baixa intensidade de cor, o ponto final pode ser determinado usando fenolftaleína como indicador. Embora existam outros ácidos presentes no sumo de frutas (oxálico, iso-cítrico, tartárico) é comum registar a acidez em termos de ácido cítrico, tanto para sumos de citrinos como para a maioria dos sumos de frutas. Regra geral, a acidez dos sumos irá diminuir com o aumento da maturidade do fruto, ou com níveis crescentes de açúcares no sumo resultante do processamento do fruto. Assim, a proporção de sólidos solúveis é um valor importante para a acidez na avaliação da qualidade do sumo (Philip, 2013). Os sumos concentrados de baga de sabugueiro atualmente comercializados apresentam valores de pH entre 3,5-4,4. A literatura consultada determina valores entre 0,6 a 1,7g/100 g de acidez titulável para sumo de baga de sabugueiro não concentrado (Kaack *et al.*, 2008). Este pH é elevado comparativamente aos valores encontrados para outros sumos de fruta na ordem dos 2,5-3,8 (Philip, 2013). Assim, este pH pode contribuir de forma crítica para o armazenamento/conservação.

### 3.3. Cor

A cor é um dos principais atributos sensoriais dos alimentos, particularmente de frutas e seus produtos processados. O seu tom e intensidade indicam o grau de maturação, textura, sabor e aroma das matérias-primas. A perda de cor intrínseca tem um efeito direto na sua aparência e é tipicamente associada à deterioração de outras características sensoriais como o sabor e aroma. Como já mencionado anteriormente, as antocianinas são responsáveis pelas diferentes cores em diferentes partes da planta. Sendo que estas cores dependem do tipo de antocianidinas presentes, no caso da baga de sabugueiro as antocianinas são maioritariamente de base cianidina, ligados a açúcares como o monossacarídeo glucose e o dissacarídeo sambubiose. O tom de cor das antocianinas depende do pH do meio (Walkowiak-Tomczak *et al.*, 2016). Assim, um dos métodos usados para determinar antocianinas monoméricas em sumos, corantes naturais, vinhos é o método do pH diferencial, sendo este um método oficial do AOAC (

Wrolstad *et al.*, 2005). As antocianinas reversivelmente mudam de cor com o pH, o que limita a sua utilização eficaz como corantes de alimentos para muitas aplicações, mas também proporciona um método simples para a quantificação total do pigmento. Para a determinação por via deste método a cianidina-3-glucosídeo foi selecionada para o cálculo, uma vez que é o pigmento mais comum de antocianina presente na natureza. No caso do sumo de sabugueiro o valor determinado recorrendo a esta metodologia é 3006, 8 mg/L (Lee *et al.*, 2005). A determinação da percentagem de cor polimérica é determinada em sumos de sabugueiro com recurso ao método descrito por Giusti e Wrolstad. Neste método as amostras são tratadas com uma solução de metabissulfito de potássio. A absorvância é lida a 420, 510 e 700 nm, antes e após a adição de metabissulfito de sódio. A densidade de cor (DC) é calculada utilizando a amostra controlo de acordo com equação  $DC = [(A_{420}-A_{700}) + (A_{510}-A_{700})] \times FD$ , sendo FD o fator de diluição.

Para o cálculo da cor polimérica (CP) é usado a amostra tratada com metabissulfito de potássio, de acordo com a equação

$$CP = [(A_{420}-A_{700}) + (A_{510}-A_{700})] \times FD.$$

Para a obtenção da percentagem de cor polimérica (%CP) é usada a equação  $\%CP = (CP/DC) \times 100$  (Wrolstad *et al.*, 2001). Os resultados obtidos por Casati *et al.* em estudos com sumo de sabugueiro demonstram que a densidade de cor diminuir durante o período de armazenamento e que durante o mesmo ocorreu um aumento da percentagem de cor polimérica. Sendo que as alterações maiores se verificaram durante os primeiros 30 dias de armazenamento (Casati *et al.*, 2015). Outra metodologia utilizada para a determinação de cor é a utilização do sistema CIEL \*a\* \*b\* \*. Embora este sistema não seja necessariamente uma medição precisa de cor, este é eficaz na medição e deteção de diferenças de cor, assim como no rastreamento da cor durante o processamento e armazenamento. Os índices de cor derivados das medições do CIEL\*a\*b\* são cada vez mais usados para corantes naturais. Instrumentalmente é medido o L\*, que é o valor da luminosidade e de duas coordenadas a\* e b\*. Os valores positivos de a\* indicam cor vermelha, enquanto valores negativos indicam cor verde. Os valores positivos de b\* indicam cor amarela e valores negativos cor azul. Casati *et al.* observou durante os seus estudos de armazenamento de sumo de sabugueiro que os

valores de  $a^*$  diminuía ao longo do período de armazenamento e que os valores de  $b^*$  aumentavam (Casati *et al.*, 2015). Os parâmetros correlacionados com a percepção da cor, chamadas as coordenadas polares chroma ( $C^*_{ab}$ ) e o ângulo de tonalidade ( $h_{ab}$ ) são determinadas de acordo com as equações,

$$C^*_{ab} = \frac{\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}}{e}$$

$$h_{ab} = \tan^{-1}(b^*/a^*).$$

As diferenças de cor são calculadas com base na equação, (Berké *et al.*, 2007)

$$\Delta E^* = \frac{\sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta C^{*2} + \Delta H^{*2}}}{e}, \text{ onde } \Delta L^* = L^*(\text{amostra}) - L^*(\text{ref}), \Delta C^* = C^*_{ab}(\text{amostra}) - C^*_{ab}(\text{ref}) \text{ e } \Delta H^* (\text{diferença de tonalidade}) = 2 \sin(\Delta h_{ab}/2)(C^*_{ab}(\text{ref}) \times C^*_{ab}(\text{amostra})), \text{ com } \Delta h_{ab} = h_{ab}(\text{amostra}) - h_{ab}(\text{ref}) (\text{diferença ângulo de tonalidade}).$$

Casti *et al.* observou também durante os seus estudos que  $h_{ab}$  foi o parâmetro que mais aumentou durante o tempo total de armazenamento, demonstrando uma mudança para tons de castanho, semelhante ao observado durante o tratamento térmico (Casati *et al.*, 2015).

### 3.4. Turbidez

Os sumos de fruta contêm colóides que podem levar a problemas durante o processo de filtração. Os colóides podem fazer parte da própria fruta, sendo que podem ser agregados de polissacarídeos com proteínas ou compostos fenólicos provenientes do processo de amadurecimento, ou do próprio processamento do fruto. As suas estruturas fibrosas dificultam o processo de clarificação ao reduzirem significativamente o fluxo e o rendimento do sumo. Os polissacáridos pécicos causam problemas na indústria de alimentos como turbidez e viscosidade durante a extração, filtração e clarificação de sumos de fruta. A presença de substâncias pécicas nos sumos de fruta provoca um aumento considerável da sua viscosidade impedindo assim a filtração e os subsequentes processos de concentração. Estes problemas podem ser resolvidos através da adição de preparações enzimáticas industriais (Falguera *et al.*, 2014). Ainda assim, caso a quantidade de enzima aplicada seja em excesso podem formar-se agregados insolúveis que contribuem para o aumento da turbidez, portanto torna-se importante conhecer a

composição em polissacarídeos para selecionar as enzimas e quantidades adequadas das mesmas. Os estudos de Landbo *et al.* sobre a turbidez em sumo de baga de sabugueiro determinaram valores de 120-161 NTU (Nephelometric Turbidity Units) com adição enzimática de uma preparação enzimática contendo pectina liase, pectinaesterase e poligalacturonase e, portanto, foi menor do que as amostras produzidas sem adição enzimática, que tinham níveis de turbidez variando entre 191-212 NTU. Assim, a turbidez é uma das características de qualidade importantes no processamento do sumo de sabugueiro e depende principalmente do tratamento enzimático aplicado à matéria-prima utilizada (Landbo *et al.*, 2007).

Sumos turvos são frequentemente associados também com altas concentrações de agregados de polifenóis e proteínas ou polissacarídeos que podem ser encontrados em baga de sabugueiro. No entanto, não se sabe quais os polifenóis associados à turbidez ou se desempenham um papel significativo neste parâmetro de qualidade (Christensen *et al.*, 2008).

#### **3.4.1. Enzimas no rendimento do sumo**

Na produção industrial de sumos de bagas a adição de pectinases na fase de pré-prensagem é relevante, uma vez que a adição destas enzimas aumenta o rendimento do sumo através da quebra das pectinas que estão nas paredes celulares das plantas e na lamela média das células vegetais. Para além de promover a extração de sumo, estudos realizados em sumo de groselha demonstram que o tratamento enzimático de pré-prensagem com preparações de pectinases multicompetentes pode ser otimizado para melhorar a libertação de antocianinas e outros compostos fenólicos para o sumo. A turbidez imediata nos sumos de frutas é geralmente devido à presença de pectina e outras frações de compostos fenólicos, como antocianinas da parede celular dos frutos. Os estudos com sumo de groselha mostraram que o tratamento enzimático pré-prensagem, com o aumento da quantidade de enzima e prolongamento do tempo de reação podem também melhorar a claridade do sumo. Assim, os estudos que têm sido realizados com sumo de sabugueiro são feitos no sentido de otimizar o tratamento enzimático de pré-prensagem do sumo permitindo a diminuição da turbidez do mesmo, ao mesmo tempo que é maximizado o seu rendimento e é aumentada a libertação de antocianinas, derivados de ácido hidroxicinâmico, flavonóis e flavanóis no sumo. Na literatura encontra-se referenciada a utilização de preparações enzimáticas

multicompetente, Pectinex BE3L, produzidas por uma estirpe de *Aspergillus* clonada. As enzimas presentes na preparação enzimática BE3L são pectina metilesterase (EC 3.1.1.11), pectina liase (EC 4.2.2.10) e poligalacturonase (EC 3.2.1.15). A poligalacturonase, figura 10, atua sobre a pectina com baixo grau de esterificação e hidrolisa ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre resíduos de ácido galacturónico não metilados (Landbo *et al.*, 2007). A PMG consegue atuar sobre o GalA metil esterificado, o que é representado na figura ao substituir o R por um grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ). O mesmo não acontece com a PG, que apenas exerce a sua função catalítica em resíduos com baixo grau de esterificação (R corresponde a um H). A seta mostra o local onde as enzimas exercem a sua atividade sobre a substância pectica (Jayani *et al.*, 2005).

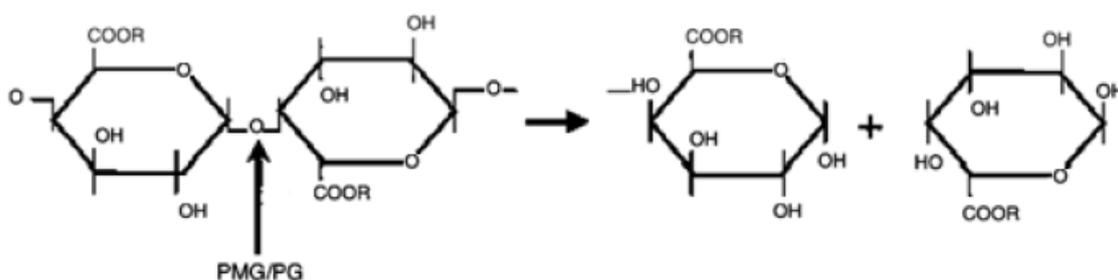


Figura 10 - Representação do modo de ação da poligalacturonase (PG) e polimetilgalacturonase (PMG) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pecticos. (Jayani *et al.*, 2005).

A pectina metilesterase, figura 11, catalisa a hidrólise de ligações éster dos grupos metil éster de resíduos de ácido galacturónico, sendo que esta ação melhora o efeito da poligalacturonase e, portanto o efeito sinérgico da utilização combinada da atividade destas duas enzimas é possível. Se a desmetoxilação for demasiado rápida ou demasiado extensa, a gelatinização pode ocorrer via interação com cálcio, que se encontra presente nos frutos (Landbo *et al.*, 2007).

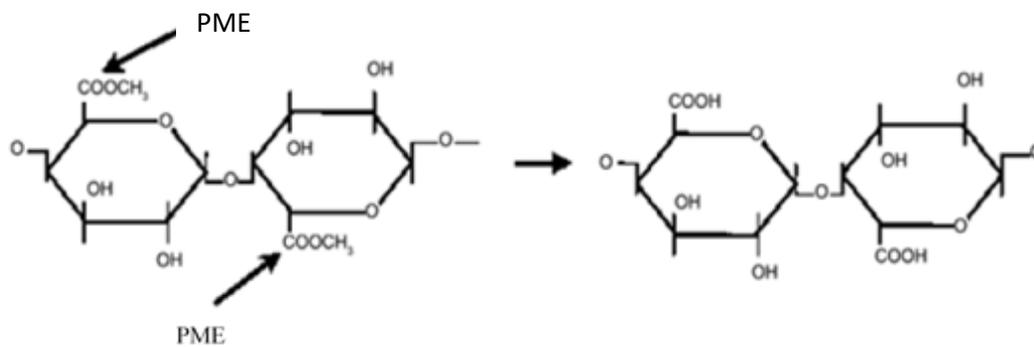


Figura 11- Representação do modo de ação da pectina metilesterase (PME) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécnicos. As setas mostram o local onde a enzima exerce a sua atividade sobre a substância pécnica (Jayani *et al.*, 2005).

A pectina liase, figura 12, é uma endo-enzima que atua nas ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturónico metilados. Quando a cadeia de poligalacturonato se encontra metil esterificada, a atividade catalítica é realizada pela poligalacturonase liase (PGL), situação em que R corresponde a H (Landbo *et al.*, 2007).

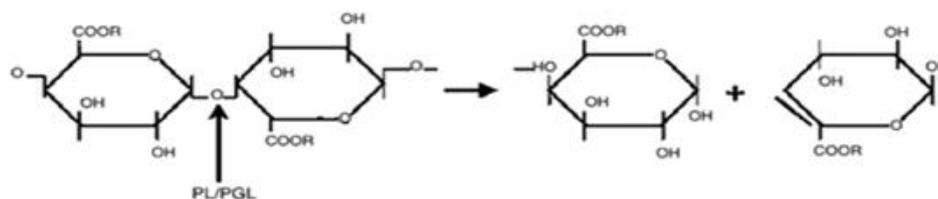


Figura 12 - Representação do modo de ação da pectina liase (PL) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécnicos. As setas mostram o local onde as enzimas exercem a sua atividade sobre a substância pécnica. Representação do modo de ação da poligalacturonase liase (PGL) (Jayani *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados na literatura para a produção experimental de sumo de sabugueiro mostram que o aumento das enzimas pectinolíticas aliadas a um maior tempo de maceração e temperatura de reação têm efeitos significativamente positivos na produção do sumo aumentando o seu rendimento e diminuindo os níveis de turbidez. O aumento da quantidade de enzima e da temperatura de maceração contribui também para o aumento e melhoramento do rendimento do sumo, de antocianinas no sumo de sabugueiro e níveis de turbidez mais baixos. O máximo rendimento de sumo obtido foi 77% (m/m) em relação à baga inicialmente prensada e o rendimento de antocianinas foi 2380 mg/kg, sendo que o valor de turbidez obtido foi de 128 NTU (Kumar, 2015; Landbo *et al.*, 2007).



## **Capítulo 4- Efeitos do processamento e armazenamento nas antocianinas e cor de sumos concentrados**

Os estudos realizados sobre o processamento e armazenamento de frutos, embora por vezes escassos, demonstram que do processamento podem resultar perdas significativas de compostos fenólicos solúveis em água, especialmente antocianinas que afetam a cor e qualidade dos frutos e seus produtos derivados. (Brownmiller *et al.*, 2008).

### **4.1. Copigmentação**

Os efeitos do armazenamento na cor em sumos concentrados contendo antocianinas relatam baixa estabilidade de antocianinas não aciladas, como acontece com as antocianinas do sumo concentrado de baga de sabugueiro. Sabe-se que a acilação de antocianinas aumenta a sua estabilidade. No entanto, contrariamente à baixa estabilidade antocianinas não aciladas, estas têm elevada biodisponibilidade quando comparadas às antocianinas aciladas. Os estudos mostram que a taxa de degradação de antocianinas foi mais lenta em sumo não clarificado do que em sumo clarificado em todas as temperaturas (-23, 5, 12 e 20 °C) de armazenamento estudadas. A taxa de degradação de antocianinas durante o armazenamento é afetada pelas razões molares entre antocianinas outros compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e procianidinas, formação de radicais livres secundários e outras reações oxidativas tais como a formação de *O*-quinona envolvendo compostos fenólicos, como ácido ferúlico, ácido siríngico, quercetina, entre outros e antocianinas. Para além disso, a degradação depende ainda da composição específica de agliconas e açúcares das antocianinas, bem como composição da matriz alimentar em sólidos solúveis. A estabilidade da cor de pigmentos de antocianinas pode ser melhorada por via de mecanismos de copigmentação onde a molécula de antocianina interage com flavonóides e também alcalóides e aminoácidos diretamente ou através de interações fracas que resulta num aumento da estabilização da cor (Turfan *et al.*, 2012). Rein demonstra que o enriquecimento em compostos fenólicos, como ácido ferúlico, ácido siríngico, quercetina 3-rutinosídeo, melhora e estabiliza a cor dos sumos de bagas como o sabugueiro durante o armazenamento devido a mecanismos de copigmentação. A copigmentação ocorre por variados mecanismos, sendo o mais frequente em sumos de

baga como o sabugueiro, a copigmentação intermolecular que se estabelece maioritariamente por ligações por pontes de hidrogénio entre um pigmento corado, como a antocianina e outros flavonóides como é o caso da quercetina e do ácido ferúlico (Rein *et al.*, 2004). Os efeitos adversos do aumento da temperatura no decorrer do processamento a pH 2-4 induzem a hidrólise da ligação glicosídica entre o açúcar e a antocianidina, afetando a ligação de copigmentação, podendo provocar a hidrólise da mesma. O mecanismo de degradação de antocianinas está assim dependente da temperatura, assim como do pH (Patras *et al.*, 2010; Rein *et al.*, 2004).

#### **4.2. Oxidação degradativa, tratamento térmico e clarificação influência na estabilização de antocianinas**

Os estudos de Brownmiller *et al.* avaliaram o efeito do armazenamento prolongado sobre antocianinas monoméricas totais em sumos de mirtilos. Os autores relataram que mais de 50% das antocianinas foram perdidas após 6 meses de armazenamento. A perda de antocianinas monoméricas foi acompanhada pelo aumento dos valores de cor polimérica, as antocianinas tendem a polimerizar de forma extensiva ao longo do período de armazenamento. O aumento de antocianinas polimerizadas pode ser devido a vários fatores, incluindo atividade enzimática residual ou reações de condensação de antocianinas com outros fenólicos tais como procianidinas para formar pigmentos poliméricos, levando assim à diminuição do total de antocianinas monoméricas. As antocianinas presentes em sumos de mirtilo clarificados e não clarificados diminuem em ambos os casos quando os sumos são pasteurizados (Brownmiller *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram observados por outros autores. Hager *et al.* verificaram que as antocianinas monoméricas totais em sumos de framboesa não clarificados diminuíram linearmente durante o armazenamento com perdas superiores a 60% ao longo de 6 meses de armazenamento. Em sumos clarificados, perdas semelhantes foram observadas durante os meses de armazenamento. As condições do tratamento térmico contribuíram para a alteração da quantidade de antocianinas monoméricas em sumos de framboesa durante o processamento. Outra razão, também já verificada em outros estudos, deve-se a reações de condensação de antocianinas com outros compostos fenólicos, incluindo flavan-3-óis ou poliflavan-3-óis. Existe também relatado na literatura que compostos fenólicos, como ácido ferúlico e ácido siríngico também formam complexos com antocianinas em sumos de framboesa, morango e outras bagas como o sabugueiro. No entanto, é importante notar

que assim como as antocianinas, outros compostos fenólicos são facilmente oxidados e, deste modo suscetíveis à degradação oxidativa durante as várias etapas do processamento e armazenamento (Patras *et al.*, 2010).

A degradação é principalmente causada pela oxidação, clivagem de ligações ou reações de oxidação reforçadas pelo tratamento térmico que ocorre durante o processamento. A degradação térmica, figura 13, das antocianinas pode resultar numa variedade de espécies dependendo do tipo de tratamento térmico. A degradação térmica de antocianinas de base cianidina, como as encontradas em baga de sabugueiro está representada na figura e a formação de vários compostos intermediários (Patras *et al.*, 2010).

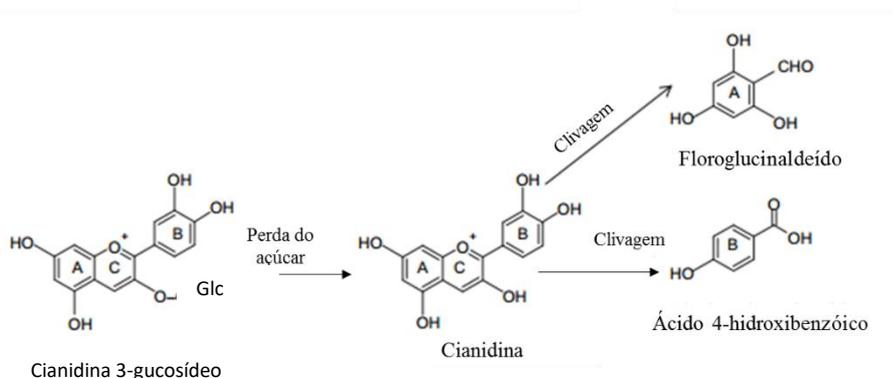


Figura 13 - Degradação térmica de antocianinas (Patras *et al.*, 2010).

A taxa de degradação de antocianinas aumenta durante o processamento e armazenamento à medida que a temperatura aumenta. Existem autores que sugerem a abertura do anel piról e a formação da calcona como primeiro passo da degradação de antocianinas. Por outro lado, existem autores que propõem que há a hidrólise da antocianina, com a consequente formação da aglicona como passo inicial da degradação possivelmente devido à formação de aductos-cíclicos. Os estudos relatam ainda que as antocianinas iriam decompor-se numa estrutura de calcona por aquecimento, sendo esta última transformada num derivado de cumarina glicosídeo com perda do anel B (Patras *et al.*, 2010).

O oxigénio também desempenha um papel importante no processo de degradação de antocianinas. A presença de oxigénio pode contribuir para acelerar a degradação de antocianinas quer através de um mecanismo oxidativo direto quer através da ação oxidativa de enzimas (Patras *et al.*, 2010).

Os estudos em sumos e néctares de morango e cenoura preta revelam que o seu armazenamento à temperatura ambiente contribui de forma acelerada para a degradação de antocianinas, sendo a perda de 69% após 60 dias de armazenamento. Ainda se verificou um aumento da percentagem de cor polimérica de 7,2% para 27,4% no sumo. Mais uma vez, o aumento do valor da percentagem de cor pomimérica indica a ocorrência de reações de condensação com compostos fenólicos como procianidinas para formar pigmentos poliméricos. Sendo que a temperaturas de refrigeração levam ao aumento da estabilização da cor destes produtos. A degradação é muito mais rápida em sumos e néctares armazenados a temperaturas de 37° C, enquanto a refrigeração resultou numa degradação muito mais lenta das antocianinas. Antocianinas de base cianidina revelaram ser estáveis durante 12 meses de armazenamento a uma temperatura de 8° C. As transformações a baixa temperatura, 4° C numa atmosfera inerte podem induzir um processo lento de degradação de antocianinas. Maior estabilidade das antocianinas pode ser alcançada usando temperaturas mais baixas e aquecimento de curta duração durante o processamento. Assume-se, portanto, que o tratamento térmico de sumos que possuam na sua matriz antocianinas sofre degradação mais acentuada durante o processamento (Patras *et al.*, 2010).

#### **4.3. Efeitos do processamento e armazenamento em sumo concentrado de baga de sabugueiro**

A estabilidade das antocianinas foi estudada durante as várias etapas do processamento de baga de sabugueiro de diferentes variedades para obtenção de sumo concentrado, de modo a perceber quais as etapas com maior impacto na quantidade de antocianinas.

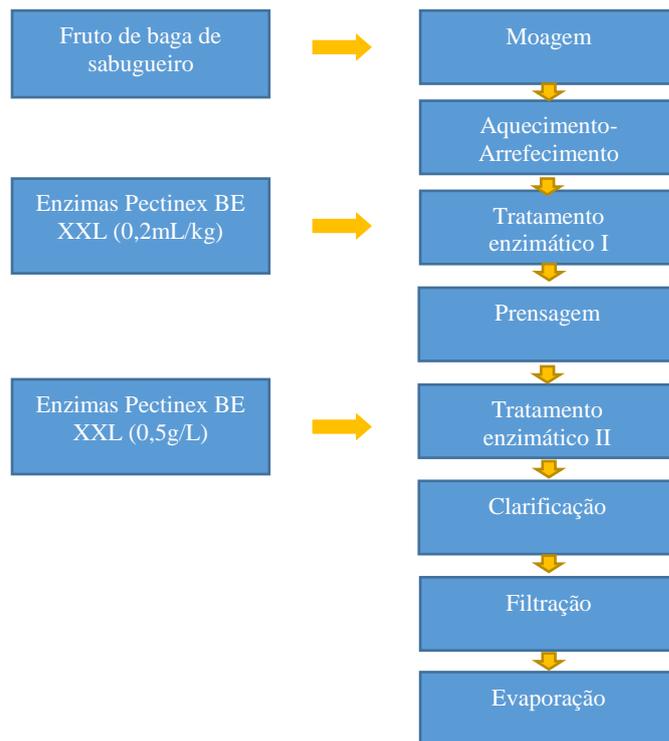


Figura 14 -Etapas do processo de obtenção de sumo concentrado de baga de sabugueiro à escala laboratorial Adaptado de (Szalóki-Dorkó *et al.*, 2015).

As etapas de tratamento térmico, assim como as etapas de tratamento enzimático revelam ter impacto no conteúdo final de antocianinas. Na etapa de aquecimento de polpa, ocorre uma perda ligeira de pigmento, não sendo esta estaticamente significativa, no entanto não está de acordo com outros estudos realizados em morango, mirtilo e cassis que relatam sensibilidade de antocianinas durante o tratamento térmico (Patras *et al.*, 2010; Turfan *et al.*, 2012; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Alguns autores relatam resultados contraditórios no uso de enzimas antes da etapa de prensagem, nem sempre os teores de antocianinas totais foram maiores após este primeiro processamento com enzimas pectinolíticas (Christensen *et al.*, 2008; Szalóki-Dorkó *et al.*, 2015). Na etapa de prensagem é descrito um aumento do teor de antocianinas, sendo de aproximadamente 20%. O aumento pode ser devido à libertação dos pigmentos que se encontram nas películas de baga de sabugueiro através da disrupção da membrana e da parede celular. No segundo tratamento enzimático, antes da clarificação, das duas variedades estudadas, *Haschberg* e *Samocco*, numa ocorreu um aumento significativo, 38%, do teor de antocianinas, enquanto na outra variedade o seu conteúdo praticamente não foi afetado. As diferenças significativas observadas são provavelmente devido às diferenças entre as estruturas dos frutos e, portanto na composição dos sumos das duas variedades

que influenciam a eficácia da libertação enzimática de mais antocianinas. Uma tendência decrescente nos conteúdos de antocianinas, em ambas as variedades, foi observada nas etapas de clarificação, filtração e evaporação. Comparando as variedades *Haschberg* e *Samocco* a perda de antocianinas após a filtração foi de aproximadamente de 8% em relação ao sumo não clarificado para a variedade *Hashberg*, enquanto na variedade *Samocco* o decréscimo foi muito mais significativo sendo de aproximadamente 26%. No entanto este estudo decorreu a nível laboratorial, infere-se que o decréscimo de antocianinas na etapa de clarificação deve-se ao uso do papel de filtro na etapa de filtração sob vácuo (10 mBa), levando à adsorção dos pigmentos ao papel. Estes procedimentos não são aplicados a nível industrial, mas permitem perceber quais as dificuldades que podem ocorrer durante o processamento, uma vez que são usadas membranas de ultrafiltração constituídas por polímeros à base de celulose. O estudo conclui que a metodologia de conceção do processamento deve ter em conta a as variedades de bagas utilizadas. A utilização de variedades diferentes de bagas de sabugueiro cultivadas deve-se às diferenças encontradas na capacidade corante e perfil de antocianinas distinto entre variedades. O perfil de antocianinas estudado antes e após o processamento mostra que a estabilidade das antocianinas à base de cianidina conjugadas com porções de dissacarídeos e diss substituições e em maior número, como é o caso da cianidina 3-sambubiosídeo-5-glucosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo, encontradas maioritariamente em sumos concentrados a 65°Brix, são mais estáveis durante o processamento. A estabilidade destes compostos fenólicos correlaciona-se positivamente com o número de açúcares e seu grau de polimerização ligados à estrutura da cianidina aglicona. Os estudos realizados revelam a formação de estruturas poliméricas de antocianinas através de reações de condensação ao longo do processamento. No entanto, no produto final obtido a quantidade de antocianinas diméricas é diminuta quando comparada com etapas do processo anteriores. Isto sugere que as antocianinas diméricas são instáveis em sumo de baga de sabugueiro. Considerando a sua baixa concentração e instabilidade, concluí-se que estas não contribuem de forma notória para o teor total de antocianinas no produto final (Szalóki-Dorkó *et al.*, 2015).

## **Capítulo 5- Métodos de conservação e seus efeitos no sumo concentrado de baga de sabugueiro**

As frutas frescas são propensas a contaminação por fungos durante a colheita, o transporte e a sua comercialização. Assim, torna-se importante identificar contaminantes fúngicos em frutas frescas porque fungos podem desenvolver-se e produzirem micotoxinas que causam alergias ou infeções (Tournas *et al.*, 2005).

As bagas como o sabugueiro contêm açúcares e outros nutrientes, o que as torna particularmente suscetíveis à deterioração fúngica, deste modo a forma mais frequente de armazenamento é na sua forma seca. É sabido que as bagas frescas contêm um elevado nível de fungos, pelo que a deterioração pode ocorrer quando os produtos são armazenados em condições inadequadas. Assim a concentração do seu sumo torna-se importante, uma vez que diminui a quantidade de água livre que promoveria o desenvolvimento microbiano (Červenka, 2011). A maioria dos sumos de fruta que apresentam pH na ordem 2,5-3,8 (Philip, 2013). No entanto o sumo concentrado de baga de sabugueiro apresenta um pH elevado de aproximadamente 4,5 o que contribui para o desenvolvimento de microrganismos deteriorativos. A presença de aminoácidos e de açúcares como descrito por vários autores contribuem também para a suscetibilidade do sumo no que diz respeito ao desenvolvimento de microrganismos (Veberic *et al.*, 2009; USDA, 2016; Vulić *et al.*, 2008).

### **5.1. Congelação**

Na indústria de alimentos, a temperatura de armazenamento de -18 °C reduz eficazmente a deterioração microbiana de alimentos (Mirsaeedghazi *et al.*, 2014). O congelamento é caracterizado por uma redução da temperatura do alimento abaixo do seu ponto de congelação, com a formação de cristais de gelo, aumentando assim o tempo de preservação por redução da atividade da água (Schaschke, 2012).

A congelação em termos microbiológicos é um método que permite preservar sumo concentrado de sabugueiro, minimizando também as reações que possam ocorrer entre os vários componentes da matriz. Para sumos produzidos com diferentes génotipos de baga de sabugueiro, apresentam quantidades distintas de compostos fenólicos. Os estudos sugerem que o génotipo, estação de cultivo, localização e armazenamento afetam o conteúdo em antocianinas de baga de sabugueiro, assim como

a quantidade de compostos fenólicos totais presentes. O armazenamento estudado com recurso a génotipos diferentes mostrou diferenças na quantidade de compostos fenólicos e a diminuição de antocianinas. Portanto, outros compostos fenólicos que não antocianinas apresentam maior estabilidade durante longos períodos de armazenamento. A quantidade de antocianinas monoméricas determinada em diferentes génotipos revelou ser diferente entre eles, mais uma vez sugere que o génotipo é um fator que influencia o conteúdo de antocianinas no sumo de baga de sabugueiro. As antocianinas são mais suscetíveis a alterações quando comparadas com outros polifenóis, como quercetina, quercetina 3-rutinosídeo, presentes no sumo de baga de sabugueiro, como ácidos fenólicos, flavanóis e flavonóis. A estabilidade das antocianinas é afetada durante a congelação, pois existe uma variedade de reações enzimáticas e não enzimáticas que podem causar a diminuição no conteúdo de antocianinas monoméricas durante o seu armazenamento congelado. Neste caso, uma dos mecanismos apresentados para a degradação das antocianinas é a degradação por via enzimática, caso o sumo não tenha sido sujeito a tratamento térmico as enzimas mantêm-se ativas como a PPO. A polimerização não enzimática também é possível devido às reações de condensação entre antocianinas e proantocianidinas (Johnson *et al.*, 2015). Para além disso, os açúcares ligados às antocianidinas, o seu número e tipo de açúcar e ligação glicosídica estabelecida desempenham um papel importante na estabilidade das antocianinas durante o armazenamento (Szalóki-Dorkó *et al.*, 2015). Os açúcares previnem a formação de compostos de cor poliméricos e atenuam a ocorrência de reações de acastanhamento (Nikkhah *et al.*, 2007). A estrutura de antocianina forma-se pela ligação da aglicona aos açúcares, sendo essa mais frequência no C3, C5 ou C7 (Welcha *et al.*, 2009).

## **5.2. Adição de dióxido de enxofre**

As propriedades antissépticas do dióxido de enxofre fazem com que este seja usado como conservante em diferentes tipos de alimentos, podendo ser aplicado na sua forma gasosa pura ou por intermédio dos seus diferentes sais após dissolução em água (Wedzicha, 1984). O dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) é largamente utilizado na produção dos vinhos, atuando como antioxidante e como inibidor do crescimento microbiano. No entanto, o SO<sub>2</sub> descolora as antocianinas formando compostos estáveis e aductos incolores (Bridle, 1967).

O dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) em solução aquosa dá origem ao anião bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) que se liga rapidamente ao carbono 4 do catião flavílio de um modo reversível, originando um produto incolor como pode ser visto na figura 15. Quantidades pequenas de SO<sub>2</sub> podem descorar grandes quantidades de antocianinas (Bridle, 1967; Ough *et al.*, 2005). Das 4 estruturas de antocianinas existentes em soluções ácidas aquosas apenas AH<sup>+</sup> e calcona podem reagir com HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pois possuem um local de adição nucleofílica, posição 4, e no caso da calcona uma função carbonilo (Brouillard *et al.*, 1980).

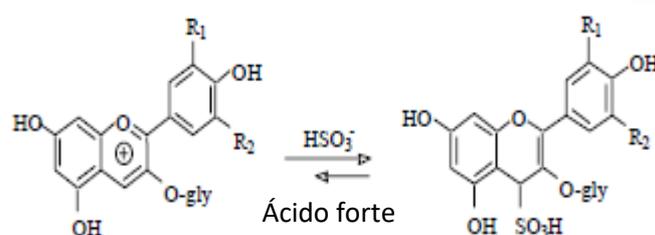


Figura 15 - Reação entre antocianinas e HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Bridle, 1967).

A cor, entretanto, pode ser regenerada por acidificação, contudo, altas concentrações de sulfito (>10 g/kg) provoca a destruição irreversível das antocianinas e calconas (Bridle, 1967).

Lee *et al.* estudou a utilização de SO<sub>2</sub> na produção de sumo de mirtilo. O processamento do sumo de mirtilo foi feito com três tipos diferentes de tratamento: usando o calor, usando SO<sub>2</sub>, sem nenhum tratamento. Os resultados mostraram que a perda de antocianinas foi menor no caso do uso de calor e pré-tratamento de SO<sub>2</sub>. A adição de SO<sub>2</sub> sugere que a retenção de antocianinas é maior em etapas críticas do processo para a perda das mesmas, como é o caso da pasteurização e da clarificação. Os sumos de mirtilo pasteurizados, que não tinham sido tratados com SO<sub>2</sub>, tinham maiores quantidades de antocianinas poliméricas do que os produtos não tratados (Kårlund *et al.*, 2014). Para além do aquecimento, também a adição de dióxido de enxofre demonstrou ser eficaz na inibição da atividade de enzimas como polifenoloxidase (PPO). Bakker e outros autores mostraram também que a adição de SO<sub>2</sub> aumentou a extração de antocianinas durante a produção de vinho tinto (Lee *et al.*, 2002).

Já em estudos com medronho, os dois sumos tratados termicamente (branqueamento e pasteurização) apresentaram significativamente mais antocianinas do que o sumo tratado com SO<sub>2</sub>. A razão pode ser que o tratamento térmico não inibiu apenas a atividade de PPO mas também causou a degradação dos tecidos de medronho levando ao aumento da permeabilidade celular, o que levou à extração de mais antocianinas. O tratamento com SO<sub>2</sub> inibiu a atividade de PPO e reduziu a degradação de antocianinas, mas nenhum dano foi causado aos tecidos de medronho, o que não contribuiu para uma maior extração de antocianinas. No entanto, este resultado contraria o estudo de Lee *et al.*, que relataram que não houve diferenças significativas entre adição de SO<sub>2</sub> e tratamento térmico na recuperação de antocianinas. No que diz respeito à cor, embora os sumos tratados termicamente fossem mais escuros que os sumos tratados com SO<sub>2</sub>, não existiam diferenças significativas entre eles para os valores de L\*. Os ângulos de tonalidade (h°) aumentaram lentamente para todas as amostras durante o processamento do sumo, o que faz com que a cor da amostra passe de vermelho para amarelo. A cor global das amostras tratadas com calor e SO<sub>2</sub> era visualmente mais vermelha do que os sumos controlo (sem adição de SO<sub>2</sub> e tratamento térmico). Em relação à quantidade de compostos fenólicos, as amostras recolhidas em cada etapa de processamento de pasteurização e branqueamento, revelam ser significativamente mais elevadas do que as amostras controlo e tratadas com SO<sub>2</sub> (Fang *et al.*, 2006). Lee *et al.* relataram que 60-65% dos compostos fenólicos de mirtilo foram perdidos durante as etapas iniciais do processamento, mas não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos de calor e SO<sub>2</sub> e o controlo. Em comparação com os tratamentos térmicos, o tratamento com SO<sub>2</sub> não foi muito eficaz no retardamento da degradação polifenólica, embora o conteúdo polifenólico em amostras tratadas com SO<sub>2</sub> fosse superior ao do controlo. (Lee *et al.*, 2002).

A adição de anidrido sulfuroso encontra-se regulamentada podendo ser consultada no Regulamento do Jornal Europeu nº1129/2011, sendo que os valores definidos são para produtos processados de frutas. Para além disso, foi consultado um manual que indica o uso de anidrido sulfuroso em sumos de frutas numa gama de 10-100 ppm e no caso de polpas de frutas entre os 50-500 ppm (Ough *et al.*, 2005).

Estes métodos de reforço podem ser considerados pelas indústrias alimentares que podem manter o valor nutritivo e cor intensa de antocianinas de frutas durante o processamento de sumo (Lee *et al.*, 2002).



## Capítulo 6- Materiais e Métodos

A qualificação do sumo concentrado de baga de sabugueiro foi um dos objetivos deste trabalho, pois é importante para assegurar a qualidade do produto final. O trabalho experimental consistiu na análise de diferentes parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do sumo concentrado produzido na Indumape, como a turbidez, açúcares, antocianinas monoméricas, pH, acidez, teor em sólidos solúveis totais (°Brix), sendo este sujeito a três tipologias de armazenamento diferentes, congelamento, refrigeração e temperatura ambiente, quer na presença de diferentes níveis (10, 25 e 50 ppm) de SO<sub>2</sub>, quer na sua ausência. A tabela 3 mostra a diluição usada para análise de cada parâmetro.

Tabela 3- Diluição utilizada para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Parâmetro	Diluição
Teor de sólidos solúveis	Sem diluição
Turbidez	≈11°Brix
pH	≈11°Brix
Acidez	≈11°Brix
% Etanol	1:50
Microbiologia	1:200;1:400;1:2000

Para além da qualificação, foi também estudadas várias metodologias de armazenamento para perceber qual a mais adequada para conservar o sumo concentrado de sabugueiro, para que este seja estável microbiologicamente e organoleticamente. Foram estudadas três formas de armazenamento, temperatura ambiente, refrigeração e congelação. Foram avaliadas amostras controlo às três temperaturas estudadas e, para além disso armazenaram-se amostras também a estas três temperaturas, mas com adição de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>, para avaliar o seu impacto nas características físico-químicas e microbiológicas do sumo concentrado de baga de sabugueiro, sendo este um conservante frequentemente utilizado na indústria alimentar. As amostras de sumo foram armazenadas com as seguintes concentrações de SO<sub>2</sub>, 10, 25 e 50 ppm. O sumo concentrado utilizado para estas análises resulta do reprocessamento realizado em fevereiro de 2017 pela Indumape, onde o lote produzido se obteve a partir da mistura do lote produzido em 2015 e do lote produzido em 2016.

Para além disto foi efetuada a quantificação da percentagem de etanol produzida por leveduras em amostras de sumo concentrado de baga de sabugueiro como resultado do processo fermentativo.

A metodologia aplicada para a quantificação da percentagem de etanol foi o SPME /GC-FID como podemos ver descrito na secção 6.10. Numa primeira fase procedeu-se à construção de uma curva de calibração recorrendo a etanol 96%, seguida da análise das amostras de sumo concentrado de baga de sabugueiro.

É importante salientar, que todo o trabalho experimental foi desenvolvido nas instalações da Indumape, assim como todas as amostras utilizadas neste trabalho foram produzidas e fornecidas pela empresa.

### **6.1. Amostragem**

O concentrado de baga de sabugueiro é originado a partir de mosto refrigerado comercializado pela Régiefrutas, uma empresa sediada em Dalvares. As variedades utilizadas para obtenção deste mosto são classificadas pelos produtores da região como Bastardeira, Sabugueiro e Sabugueira. As amostras alvo de estudo no decorrer deste trabalho são resultado do processamento de baga de sabugueiro com vista à obtenção de sumo concentrado. Abaixo segue a denominação atribuída a cada amostra que resulta de períodos diferentes de processamento. A amostragem para este trabalho consiste em três amostras de sumo concentrado de sabugueiro, sendo que a amostra 1 designa o sumo concentrado de baga de sabugueiro produzido em 2015, a amostra 2 o sumo concentrado de baga de sabugueiro produzido em 2016 e a amostra 3 o sumo concentrado de baga de sabugueiro reprocessado em 2017 (mistura da amostra 1 e 2).

A recolha da amostra 3 foi feita no final da etapa de concentração do sumo, sendo que o sumo foi armazenado em frascos de 100 mL estéreis. Na recolha da amostra teve-se em conta possíveis veículos de contaminação e, como tal usou-se etanol para desinfetar a torneira à saída do sumo do tanque. Os estudos de conservação foram realizados somente com recurso à amostra 3, sendo esta a última produção de sumo concentrado de sabugueiro produzido pela Indumape. Assim como as análises microbiológicas e o teor de etanol. A análise da composição do material polimérico

resultante da diálise, nomeadamente análise de açúcares neutros e ácidos urónicos foram realizadas para as 3 amostras de sumo concentrado de sabugueiro.

## **6.2. Método diferencial de pH para determinação de antocianinas monoméricas**

O método diferencial de pH é um método comumente utilizado na quantificação de antocianinas monoméricas em sumos quer durante o processamento, quer durante o armazenamento. Os pigmentos de antocianinas monoméricas mudam de forma reversível com alterações de pH. A forma de íão flavílio predomina a pH 1 e a forma de calcona a pH 4,5 não apresentando coloração. A diferença de absorvância dos pigmentos a 520 nm é proporcional à concentração do pigmento. Os resultados são expressos em cianidina-3-glucosídeo. As antocianinas na forma polimérica são resistentes à alteração de cor independentemente do pH e, deste modo não se incluem nesta quantificação, pois absorvem a ambos os pH's, 1 e 4,5.

Os tampões usados na determinação são preparados como descrito de seguida. Para o tampão pH 1,0, pesou-se 0,1864g de cloreto de potássio num copo e adicionou-se água destilada. De seguida, mediu-se o pH e ajustou-se até obter pH 1,0 com HCl (~0,6 mL). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e perpez-se até aos 100 mL com água destilada.

Para o tampão pH 4,5, pesou-se 3,2810g de acetato de sódio num copo e adicionou-se água destilada. De seguida, mediu-se o pH e ajustou-se até obter pH 4,5 com HCl (~10 mL). Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e perpez-se até aos 100 mL com água destilada.

Para a determinação preparam-se duas diluições da amostra de sumo concentrado de baga de sabugueiro com fator de diluição de 500 em balões volumétricos de 100mL, uma com tampão pH 1 e outra com tampão pH 4,5 preparados previamente. A diluição da amostra a pH 1 deve assegurar que o valor de absorvância medido está dentro da gama de linearidade do espectrofotómetro utilizado. Assim com o auxílio de uma micropipeta ou pipeta graduada medir 0,1mL da amostra de sumo concentrado para o balão volumétrico de 100 mL e perfazer até aos 100mL com tampão acetato de sódio pH 1,0. Para o tampão cloreto de potássio medir igualmente 0,1mL da amostra para o

balão volumétrico de 100 mL e perfazer até aos 100mL com a solução acetato de sódio, pH4,5.

A concentração do pigmento é calculada e expressa em equivalentes de cianidina-3-glucósido, como pode ser visto a seguir na fórmula,

Pigmento (equivalentes de cianidina-3-glucósido, mg/L) =  $A \times PM \times DF \times 10^3 / (\epsilon \times l)$ ,

Onde  $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$ ; PM (peso molecular= 449,2 g/mol) para cianidina-3-glucósido; FD= fator de diluição estabelecido (500); l= percurso ótico em cm;  $\epsilon=26900$  coeficiente de extinção molar, em L/mol/cm, para cianidina-3-glucósido, .

### **6.3. Determinação dos sólidos solúveis totais (SST)**

A determinação dos sólidos solúveis totais é um parâmetro relevante na indústria alimentar, especialmente na indústria de sumos de fruta. A medição do índice de refração permite analisar a concentração de sólidos presentes numa dada solução, como por exemplo, hidratos de carbono, proteínas, e outros. Este parâmetro na indústria de sumos concentrados é muito importante para avaliar o nível de concentração do produto, sendo normalmente uma medida da quantidade de açúcares, pois constituem maioritariamente os sólidos solúveis. O parâmetro é expresso em °Brix, sendo que para o concentrado de baga de sabugueiro produzido pela Indumape apresenta *ca.* 65 °Brix. A quantificação é feita com recurso a um refratómetro automático Reichert AR6 Series, previamente calibrado com recurso a água destilada. Para executar a análise deve-se colocar uma pequena quantidade de amostra com o auxílio de uma vareta, de modo a que óculo do refratómetro fique coberto, procedendo de seguida à leitura do valor. Esta leitura deve ser realizada o número de vezes necessárias até que se obtenha reprodutibilidade no valor determinado.

### **6.4. Determinação do pH e da acidez titulável**

A determinação do pH é feita com recurso a um potenciómetro Thermo Orion 3 Star acoplado a um elétrodo com sensor de temperatura incorporado. Assim torna-se possível fazer a correção do valor de pH face à temperatura obtida. Antes da sua utilização deve confirmar-se que o elétrodo se encontra higienizado e devidamente

calibrado com soluções pH 7 e 4. O valor de pH é lido após a imersão do eletrodo na solução da qual se pretende obter o valor de pH. No caso do concentrado de baga de sabugueiro a titulação com solução NaOH padronizada (0,1 M) com hidrogenoftalato de potássio irá ocorrer até pH 8,1. A diluição preparada para esta quantificação é de 10 g de concentrado de baga de sabugueiro para 40 g de água destilada. O valor de acidez titulável é expressa em equivalentes de ácido cítrico, uma vez que tal como descrito na literatura este é o ácido orgânico predominante.

### **6.5. Determinação da turbidez**

A determinação da turbidez é um parâmetro que permite avaliar a presença de colóides em suspensão, de tamanho e natureza variadas. A presença destes compostos origina a dispersão e absorção da luz que atravessa a amostra, contrariando a sua transmissão em linha reta. Deste modo, a turbidez é a expressão desta propriedade ótica e é indicada em unidades de turbidez. A calibração é executada com recurso a um kit de calibração específico da marca, que compreende um conjunto de seis padrões de formazinha em diferentes concentrações (<0,1 NTU a 7500 NTU). Para esta determinação a amostra de sumo concentrado de baga de sabugueiro foi diluída a 11°Brix, sendo que este é o valor estipulado para um sumo diluído a partir do sumo concentrado de baga de sabugueiro. A diluição é obtida através da pesagem de 11g de sumo concentrado de baga de sabugueiro numa balança de precisão Shimadzu UX620H e, posterior adição de água destilada. O volume de água destilada adicionado foi determinado subtraindo ao valor do °Brix determinado para o sumo concentrado, o valor do °Brix estipulado para o sumo de baga de sabugueiro diluído a partir do concentrado. A mistura é homogeneizada numa placa de agitação magnética Heidolph MR 3001, sendo em seguida colocado numa célula de 95 mm × 25 mm um volume de aproximadamente 30 mL. De seguida a célula é colocada no interior do turbidímetro HACH 2100AN, sendo o valor da turbidez lido em NTU.

### **6.6. Análise microbiológica**

As amostras, como já referido foram recolhidas em frascos estéreis de 100 mL e uma vez abertas foram sempre manipuladas à chama ou no interior da câmara de fluxo laminar vertical Telstar Bio-II-A. Para a análise de bolores e leveduras, na câmara de fluxo laminar e com o auxílio de uma balança analítica, pesou-se 1g de amostra para um

frasco de vidro esterilizado e perfazendo um volume de 200mL com água destilada. O mesmo procedimento foi realizado para a determinação de mesófilos aeróbios totais. Estas diluições foram ajustadas com o decorrer do trabalho, uma vez que houve necessidade de aumentar as diluições em algumas amostras que ao fim de 1 mês de armazenamento já se encontravam com valores incontáveis e, por isso não conformes. As diluições são inoculadas em petrifilms. Os petrifilms para contagens de mesófilos totais são incubados durante 48h numa estufa a 35°C e os petrifilms para a contagem de bolores e leveduras são incubados durante 120h numa estufa a 25°C. Para a realização das análises microbiológicas foi utilizada uma amostra por análise.

Os valores estabelecidos em certificados de outros produtores de sumo concentrado de baga de sabugueiro para estes parâmetros microbiológicos estão representados na tabela 4.

Tabela 4- Limites microbiológicos para bolores e leveduras e contagens totais em sumo concentrado de baga de sabugueiro.

<b>Microrganismos</b>	<b>Limite</b>
<b>Mesófilos aeróbios totais</b>	<1000ufc/g
<b>Bolores</b>	<100 ufc/g
<b>Leveduras</b>	<100 ufc/g

### **6.7. Adição e análise de SO<sub>2</sub> em sumo concentrado de baga de sabugueiro**

O SO<sub>2</sub> é utilizado como metodologia de conservação do sumo concentrado de baga de sabugueiro com o intuito de promover uma maior estabilidade do produto ao longo do tempo. Para a adição de SO<sub>2</sub> fez-se a previsão de um valor teórico a adicionar a um determinado volume de concentrado, neste caso 100 mL, assim como a concentração final de SO<sub>2</sub> pretendida no sumo. As concentrações adicionadas e avaliadas correspondem a ≈10, 25, 50 ppm. Para a verificação da concentração adicionada recorreu-se ao método iodométrico como se encontra descrito na secção 6.7.1.

### 6.7.1. Determinação de SO<sub>2</sub> total

A determinação de SO<sub>2</sub> total é feita através de titulação iodométrica, sendo que numa primeira fase é adicionado hidróxido de sódio (NaOH) para alcalinizar o meio, segue-se 15 minutos de espera para que se dê a hidrólise alcalina. De seguida acidifica-se o meio com a adição de ácido sulfúrico e, por último a titulação com iodo que permite assim a quantificação do SO<sub>2</sub>, como podemos ver na equação,



O método consiste em usar 20mL de amostra num erlenmeyer, seguida da adição de 20mL de hidróxido de sódio ( NaOH). De seguida, esperam-se 15 minutos para que se dê a reação. Posteriormente, procede-se à adição de 5mL de cozimento de amido 5% e 10mL de ácido sulfúrico 33%. Titula-se este preparado com o auxílio de uma solução de iodo 0,02 M.

## 6.8. Análise de açúcares

### 6.8.1. Açúcares redutores

O método utilizado para a quantificação de açúcares com poder redutor baseia-se na reação com o ácido 3,5-dinitrossalicílico. Neste método a quantificação dos açúcares com poder redutor é feita com base na oxidação do grupo aldeído dos açúcares redutores com redução do DNS. Os grupos carbonilo do açúcar do açúcar são oxidados a carboxilos, obtendo-se ácidos aldónicos, enquanto o DNS é convertido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. Este composto apresenta coloração vermelho-acastanhada, sendo a intensidade de cor medida por método colorimétrico a 540nm. A absorvância é diretamente proporcional à concentração dos açúcares redutores na amostra.

Inicialmente procedeu-se à preparação do reagente DNS: adicionaram-se 5 g de DNS (Acros Organics) em 100 mL de solução hidróxido de sódio 2 M. Paralelamente, dissolveu-se por aquecimento 150 g de tartarato de sódio e potássio em 250 mL de água destilada e aquecer até à completa dissolução. Num balão de 500 mL juntaram-se as duas soluções e perfaz-se o volume com água destilada. O reagente foi então conservado num frasco opaco, devidamente rolhado, uma vez que este reagente é bastante instável à presença de luz.

Em seguida preparou-se a solução padrão de glucose 5,0 mmol/L. Da solução anteriormente preparada, transferiu-se 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,70; 0,90 e 1,0 mL para tubos e ensaio e fez-se o volume total de cada tubo até 1,0 mL com água destilada. Preparou-se um duplicado para cada concentração. No tubo com o branco utilizou-se 1,0 mL de água destilada. A cada concentração adicionou-se 1,0 mL de solução de DNS. Os tubos foram então homogeneizados e aquecidos num banho em ebulição (Heating Mantles Nahita Model 655) durante 5,0 minutos. Em seguida, foram arrefecidos e diluídos até 10,0 mL com água destilada. Efetuou-se a leitura no espectrofotómetro (Lange DR 500 UV/Vis) a 540 nm. Procedeu-se também à leitura da diluição preparada, FD=500, para efetuar desconto do pigmento, antocianinas, uma vez a este comprimento de onda, para além do DNS também estas absorvem.

## **6.8.2. Açúcares neutros**

### **6.8.2.1. Isolamento de material polimérico**

Para a diálise de cada uma das amostras foi colocado numa manga de diálise de 12 kDa *ca.* 30 mL de sumo concentrado de baga de sabugueiro para isolamento do material polimérico. A diálise decorreu num período de *ca.* 72 horas sob agitação constante e com a adição de dióxido de enxofre para evitar eventuais contaminações microbiológicas.

### **6.8.2.2. Determinação**

Os teores em açúcares neutros da fração dialisada (10-12 kDa) e liofilizada das amostras 1, 2 e 3 foram analisados. Os monossacarídeos foram obtidos com recurso a hidrólise ácida, seguida de redução e posterior acetilação. Para a hidrólise, pesou-se cerca de 2mg de cada amostra em tubos de cultura, ao qual foram adicionados 200 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%, seguindo-se de uma período de incubação de 3 horas à temperatura ambiente, com agitação ocasional. Após este período de incubação, adicionou-se 2,2 mL de água destilada, procedendo-se a uma hidrólise a 100°C, num bloco de aquecimento, durante 2,5 horas. Após a primeira hora, das 2,5 horas anteriormente referidas, colocaram-se os tubos num banho de água fria e retirou-se 0,5 mL de hidrolisado que posteriormente será utilizado para análise de ácidos urónicos. A hidrólise continuou por mais 1,5 horas no bloco de aquecimento. No final do período de incubação, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo (Selvendran, *et al.*, 1979).

Para a redução e acetilação, após a adição de 200  $\mu\text{L}$  de padrão interno (2-desoxiglucose 1 mg/mL), foram transferidos 1 mL de cada amostra anteriormente hidrolisada para um novo tubo de cultura, os quais foram neutralizados por 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_3$  a 25%, procedendo-se a uma confirmação do valor de pH. Posteriormente, procedeu-se à redução, pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$  (15% (m/v) em  $\text{NH}_3$  3M) e incubou-se num bloco de aquecimento a 30°C durante uma hora. Findo o período de incubação, as amostras são arrefecidas num banho de gelo e adicionados duas vezes 50  $\mu\text{L}$  a cada tubo uma solução de ácido acético glacial. Posteriormente, transferiu-se 300  $\mu\text{L}$  da solução anterior para tubos de SOVIREL, num banho de gelo, procedeu-se à adição de 450  $\mu\text{L}$  de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético. Após uma rápida agitação, colocou-se os tubos a incubar num bloco de aquecimento a 30°C, durante 30 minutos. Após o período de incubação, colocou-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclometano, seguindo-se de uma forte agitação. As amostras foram centrifugadas cerca de 30 segundos a 3000 rpm, seguindo-se de uma aspiração da fase aquosa por sucção. Repetiu-se este mesmo procedimento mais duas vezes e uma terceira vez pela adição de 3,0 mL de água destilada até remover totalmente a fase aquosa, sem deixar água na parede dos tubos (Coimbra, *et al.*, 1996). A fase orgânica de cada amostra foi então transferida para tubos *speedvac* e colocados num evaporador centrífugo (UNIVAPO 100H), a fim de evaporar o diclometano. De seguida, foram adicionados 1 mL de acetona anidra às amostras e voltou-se a evaporar. Procedeu-se à repetição deste procedimento.

A análise dos acetatos de alditol provenientes dos açúcares neutros foi realizada por cromatografia de fase gasosa (GC-FID) (Coimbra, *et al.*, 1996; Selvendran, *et al.*, 1979). Os acetatos de alditol foram dissolvidos com 50  $\mu\text{L}$  de acetona anidra e analisados por GC-FID, no cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400, usando uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15  $\mu\text{m}$  de espessura).

### **6.9. Análise de ácidos urónicos**

A análise de ácidos urónicos das amostras 1, 2 e 3 foi realizada consoante o método colorimétrico modificado do *m*-fenilfenol (Selvendran, *et al.*, 1979; Coimbra, *et al.*, 1996). A hidrólise foi realizada em simultâneo com a análise dos açúcares neutros. Durante esta etapa foi recolhida uma alíquota de 0,5 mL de hidrolisado de cada amostra,

após a primeira hora de incubação, para a realização da análise dos ácidos urónicos. A este volume de hidrolisado recolhido são adicionados 3,0 mL de água destilada (Selvendran, et al., 1979). A curva de calibração foi preparada utilizando concentrações crescentes de uma solução padrão de ácido galacturónico. Foram preparados três tubos para cada amostra (um branco e duas réplicas) com 0,5 mL da amostra diluída. Os tubos foram colocados num banho de gelo, onde se procedeu à adição de 3,0 mL de borato de sódio 50 mM, preparado com ácido sulfúrico concentrado, procedendo à agitação vigorosa da solução. Após este passo, os tubos foram selados e colocados num banho a 100°C, durante 10 minutos. Findo esse tempo, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo. Após esse arrefecimento, no escuro, adicionou-se 100 µL de MFF (*m*-fenilfenol 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH) a dois dos três tubos anteriormente referidos. Os tubos foram agitados e permaneceram no escuro durante 30 minutos. A leitura da absorvância de cada tubo foi feita a 520 nm num espectrofotómetro (Coimbra, et al., 1996).

#### **6.10. Identificação e quantificação de etanol por SPME /GC-FID**

Inicialmente foi traçado um perfil da amostra de sumo concentrado de baga de sabugueiro por SPME, utilizando um programa de temperatura pré-estabelecido para a análise de metanol. O etanol utilizado para esta quantificação tinha uma pureza de 96% (V/V). Para a realização deste ensaio preparou-se uma solução mãe de concentração 4,8% (V/V) a partir da qual se tomaram várias alíquotas para obter uma curva de calibração de diferentes concentrações de etanol. Após extração dos compostos voláteis para a fibra de SPME, esta foi introduzida e exposta no injetor do equipamento GC Agilent 7820A durante 3 minutos. O injetor do equipamento está equipado com um liner de 0,75 mm de diâmetro interno e septos pré furados Thermogreen da Supelco. Neste método, trabalhou-se em modo *splitless*, com o injetor a 250°C, um caudal de purga de 15 mL/min ao fim de 2 minutos e uma pressão de 13,71 Psi. Para além disso, foi utilizada uma coluna Agilent HP-5 (5% polaridade) com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro internos e 0,25 µm de espessura de filme. Para a quantificação do etanol, foi utilizado um programa que tinha uma temperatura inicial do forno de 25°C durante 5 minutos. Seguiu-se um aumento desta temperatura a uma taxa de 5°C por minuto, até aos 65°C e de 40°C até 220°C, durante 1 minuto. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a uma pressão constante de 13,71 psi. Por outro lado, o detetor de ionização

por chama foi mantido a 250°C e a chama foi alimentada por 400 mL/min de ar purificado e 30 mL/min de hidrogénio. O tempo total de cada ensaio realizado foi de  $\approx$  18 minutos.

### **6.11. Análise estatística**

As diferenças de cada parâmetro ao longo dos meses avaliados face ao controlo foram determinadas através do teste de Tukey. Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Ambos os testes foram realizados recorrendo ao *software Graphpad Prism 5*.



## **Capítulo 7- Resultados e Discussão**

### **7.1. Caracterização físico-química do sumo concentrado de baga de sabugueiro**

Durante o período de armazenamento podem surgir alterações a nível físico-químico e microbiológico. A avaliação de alguns desses parâmetros permite avaliar qual ou quais sofrem uma alteração mais significativa ao longo do tempo. Os resultados obtidos para os parâmetros analisados serão apresentados de seguida sob a forma gráfica.

#### **7.1.1. Teor de antocianinas monoméricas**

O método diferencial de pH é a metodologia proposta para a determinação do teor de antocianinas monoméricas totais no sumo concentrado de baga de sabugueiro. A metodologia implícita ao método do pH diferencial é de fácil implementação, rápida e de poucos custos e que atende aos recursos disponíveis na empresa. Inicialmente foram realizados diversos ensaios otimizando parâmetros como o fator de diluição a usar na quantificação das antocianinas monoméricas, para que a absorvância determinada estivesse dentro da gama de linearidade do espectrofotómetro (Lee *et al.*, 2005). O fator de diluição utilizado para a determinação de antocianinas monoméricas foi de 500. Por alteração do pH, a absorvância é lida a 520 nm que corresponde ao valor do comprimento de onda de absorção máxima de antocianinas (Lee *et al.*, 2005).

Ao longo do período de armazenamento o teor de antocianinas monoméricas é um dos parâmetros que mais se alterou como pode ser visto na figura 16.

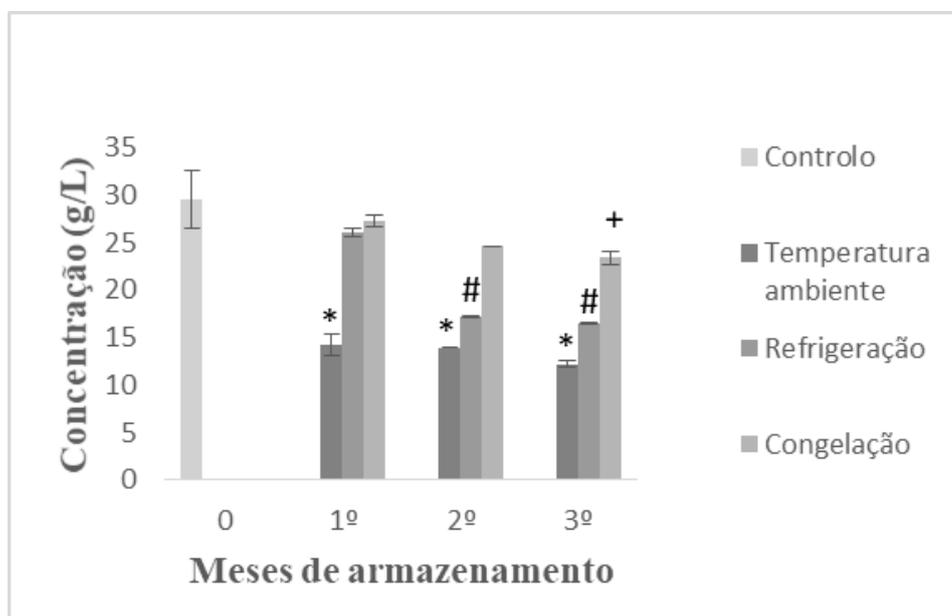


Figura 16 - Evolução do teor de antocianinas monoméricas ao longo do armazenamento. \*- Temperatura ambiente ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0; #- Refrigeração ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0; +- Congelação ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0.

No 1º mês podemos ver que nas amostras armazenadas à temperatura ambiente, *ca.* 25°C, ocorre uma maior diminuição do teor de antocianinas monoméricas, quando comparado com as amostras refrigeradas (*ca.* 8°C) e congeladas (*ca.* -18°C). Segundo a análise estatística realizada a diminuição do teor de antocianinas monoméricas é mais significativo no 1º mês de armazenamento para as amostras armazenadas à temperatura ambiente. A percentagem de diminuição de antocianinas monoméricas face ao valor inicial é de *ca.* 35%. Do primeiro mês para o 2º mês de armazenamento a diminuição foi de *ca.* 13%. Do 2º mês para o 3º mês de armazenamento a percentagem de diminuição foi de *ca.* 6%. De acordo com a análise estatística, a diminuição do teor de antocianinas monoméricas foi estatisticamente significativa,  $p < 0,05$ , à temperatura ambiente e também à temperatura de refrigeração, comparando com o período inicial de armazenamento, mês 0). A congelação não revelou sofrer alterações estatisticamente diferentes até ao segundo mês de armazenamento, revelando haver diferença estatística face ao mês 0 no terceiro mês de armazenamento avaliado, pois temperaturas mais baixas diminuem as

reações de polimerização entre antocianinas e entre antocianinas e outros compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonóis e procianidinas (Fang *et al.*, 2006).

À temperatura de armazenamento de 37° C existe uma diminuição mais acelerada do teor de antocianinas monoméricas em sumos e néctares, enquanto os sumos refrigerados apresentam uma diminuição mais lenta das antocianinas (Patras *et al.*, 2010). Para várias matrizes de frutos, usados na produção de sumo, foi relacionado o aumento da temperatura com a diminuição do teor de antocianinas monoméricas (Prommakool *et al.*, 2016).

Os mecanismos de copigmentação ocorrem entre antocianinas, entre antocianinas e outros compostos fenólicos, como ácido cafeico, ferúlico, quercetina, bem como iões metálicos (Patras *et al.*, 2010). Os mecanismos de copigmentação encontram-se reportados por diversos autores e os estudos relatam que a sua ocorrência também contribui para a diminuição do teor de antocianinas monoméricas ao longo do tempo de armazenamento, ao mesmo tempo que os valores de cor polimérica aumentam (Brownmiller *et al.*, 2008). Para além disso, a diluição utilizada neste trabalho para a determinação do teor de antocianinas monoméricas é muito elevada contribuindo para a diminuição dos fenómenos de copigmentação. A determinação da turbidez ao longo do tempo de armazenamento é um indicador do aumento desses valores de cor polimérica, uma vez que os fenómenos de polimerização promovem a formação de agregados insolúveis que se traduzem num aumento da turbidez. Este aumento pode ser visto na secção 7.1.2., onde podemos ver que o aumento mais pronunciado e significativo ocorre nas amostras armazenadas à temperatura ambiente, o que mais uma vez vai ao encontro da literatura que reporta que a temperatura ambiente promove uma diminuição mais acelerada das antocianinas monoméricas (Patras *et al.*, 2010).

O uso como corante alimentar é a principal aplicação do sumo concentrado de sabugueiro, assim a preservação das antocianinas durante longos períodos de tempo torna-se importante e, como tal o armazenamento do sumo deve ser feito a temperaturas mais baixas, como as praticadas na refrigeração e congelação, pois o impacto na cor será menor.

### 7.1.2. Turbidez

A turbidez do sumo concentrado de baga de sabugueiro depende das técnicas de clarificação utilizadas. A presença de pectinas assim como interações entre proteínas e fenólicos desempenham um papel importante para os valores de turbidez do sumo (Falguera *et al.*, 2014). A figura 17 mostra os valores médios obtidos da determinação da turbidez entre os meses de Fevereiro e Maio.

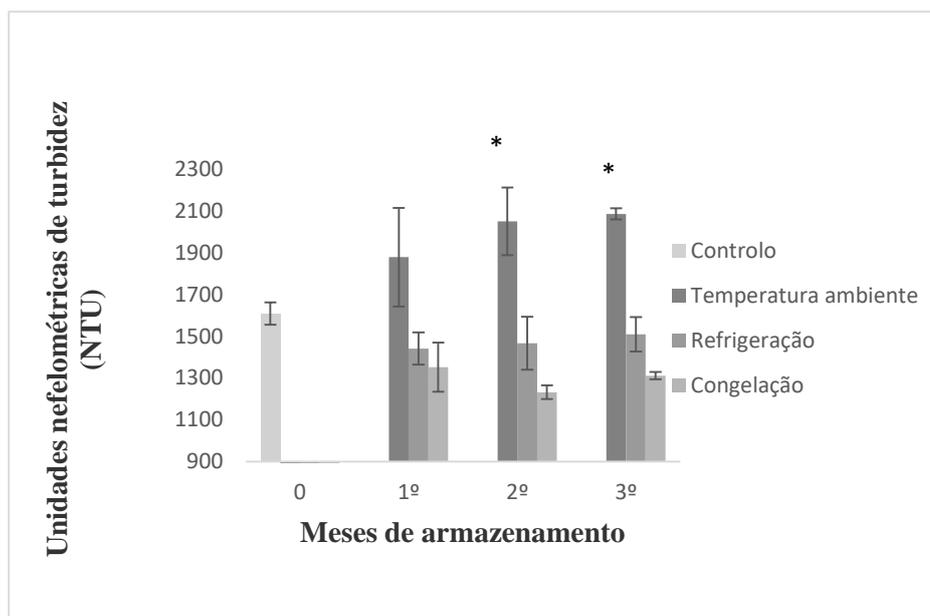


Figura 17 - Evolução da turbidez ao longo do período e armazenamento \*- Temperatura ambiente ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0.

No que diz respeito à turbidez os valores determinados ao longo do tempo mostram que as amostras que apresentam maior valor de NTU são as amostras armazenadas à temperatura ambiente, o que mais uma vez comprova que a temperatura à qual o sumo é armazenado promove as reações de polimerização entre as moléculas presentes na matriz da baga de sabugueiro como descrito por vários autores (Sadilova *et al.*, 2009; Sadilova, *et al.*, 2007). A análise estatística,  $p < 0,05$ , revela que aumento de turbidez ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente é estatisticamente diferente, tendo como ponto de comparação o tempo inicial (mês 0), ao fim de dois e três meses de armazenamento. Nas amostras de sumo armazenadas à temperatura de refrigeração e congelação, os valores de turbidez determinados são igualmente elevados, no entanto, quando comparados com os valores obtidos para o sumo armazenado à temperatura ambiente são mais baixos, uma vez que a temperaturas mais baixas as reações de polimerização ocorrem mais lentamente (Patras *et al.*, 2010).

Segundo a literatura e os estudos que existem com outras matrizes, como o sumo de cereja o mais provável é a existência de proteínas e a interação destas com outros compostos da matriz levam à formação de complexos que contribuem também para o aumento de turbidez ( Meyer *et al.*, 2010).

### 7.1.3. Teor de açúcares redutores

O parâmetro açúcares redutores é um dos parâmetros que mais varia ao longo do tempo. Como pode ser visto na figura 18, o teor de açúcares redutores foi avaliado em amostras armazenadas a três temperaturas diferentes, durante um período de 4 meses (Fevereiro a Maio).

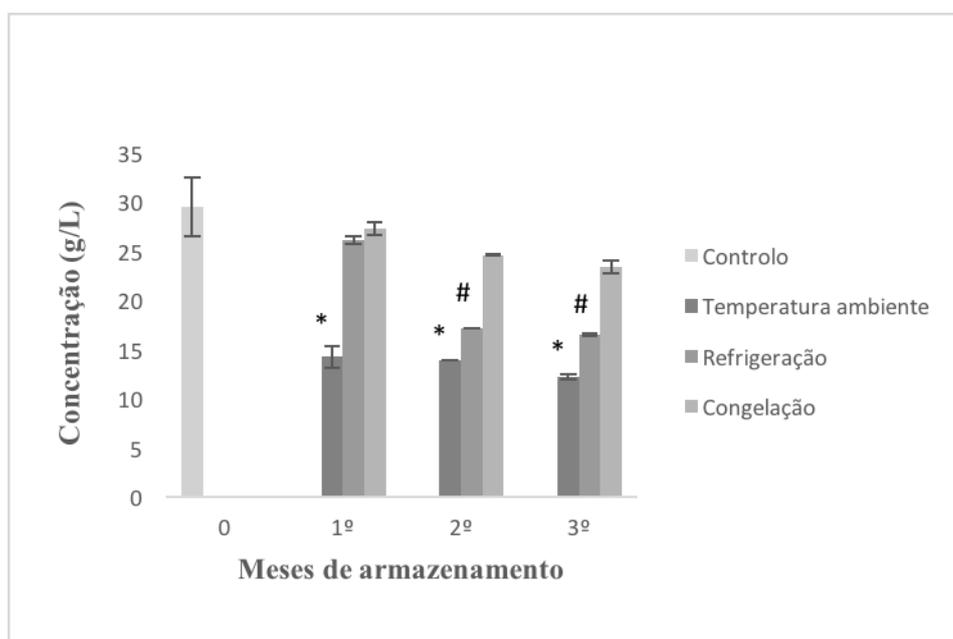


Figura 18- Evolução do teor de açúcares redutores ao longo do período de armazenamento. \*- Temperatura ambiente ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0; #- Refrigeração ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0.

No caso das amostras armazenadas à temperatura ambiente observou-se uma diminuição estatisticamente significativa do teor de açúcares redutores entre Fevereiro (mês 0) e Março (mês 1), considerando um  $p < 0,05$ . O valor inicial determinado no mês 0 foi de *ca.* 30g/L, ao fim de um mês de armazenamento o valor determinado era de *ca.* 14g/L, sendo a diminuição observada de *ca.* 52%. Nos meses seguintes esta diminuição ocorreu, no entanto essa variação não se revelou estatisticamente significativa. A

percentagem de diminuição entre o segundo mês e o terceiro mês foi de 2,3%, sendo o valor do segundo mês de *ca.* 14g/L e no terceiro mês de 13,94g/L e entre o terceiro e o quarto mês a percentagem de diminuição foi de 12,3%, sendo que no quarto mês o valor determinado de *ca.* 12g/L. A esta temperatura estão reunidas as condições ótimas para o desenvolvimento de microrganismos que os utilizam para o seu metabolismo energético (Mohd *et al.*, 2017). A literatura revela que os principais açúcares redutores presentes na matriz de baga de sabugueiro são a frutose e glucose (Veberic *et al.*, 2009). No entanto, à medida que o tempo decorre, a taxa de consumo de açúcares parece diminuir, uma vez que possivelmente a produção de etanol contribui para a inibição do metabolismo de leveduras. A diminuição do teor de açúcares nas amostras refrigeradas também foi significativa entre o 1º e o 2º mês, considerando um  $p < 0,05$ , tal pode ser justificado pela reação de açúcares e aminoácidos, ocorrência de reações de Maillard e pela ocorrência de crescimento microbiano que embora ocorra a uma taxa mais lenta continua a acontecer.

#### **7.1.4. Teor de sólidos solúveis**

O sumo concentrado a 65-70°Brix, que é o parâmetro tecnológico que determina a estabilidade microbiológica destes produtos, no caso do sumo concentrado de baga de sabugueiro, não garante a sua conservação devido à presença de uma elevada quantidade de antocianinas para além dos açúcares solúveis. Assim sendo, torna-se erróneo dizer que o teor de sólidos solúveis são principalmente açúcares, sendo que as antocianinas também contribuem significativamente no caso do sumo concentrado de baga de sabugueiro, assim como outros compostos fenólicos que podem ser encontrados na matriz complexa que caracteriza este fruto.

Os valores médios obtidos para o teor de sólidos solúveis de Fevereiro a Maio estão representados na figura 19.

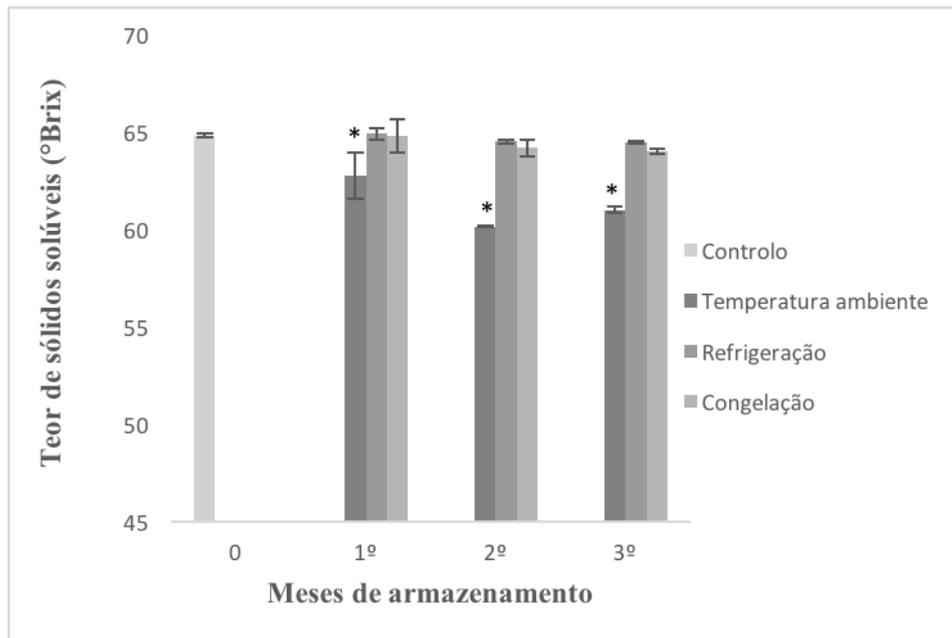


Figura 19- Evolução do teor de sólidos solúveis ao longo do período de armazenamento. \*- Temperatura ambiente ao longo dos meses de armazenamento estatisticamente diferente do mês 0.

O valor inicial de açúcares redutores indica que apenas *ca.* 29g/L da composição deste concentrado são açúcares e, como tal grande parte do teor de sólidos solúveis é também devido à presença de antocianinas na matriz. O valor de antocianinas monoméricas inicialmente determinado após produção do concentrado foi de *ca.* 10g/L. Observa-se que ao longo do período de armazenamento as amostras armazenadas à temperatura ambiente sofrem uma diminuição mais acentuada do teor de sólidos solúveis quando comparado com as amostras armazenadas à temperatura de refrigeração e congelação, cuja variação ao longo do tempo de armazenamento não é significativa. Inicialmente, mês 0, o valor de sólidos solúveis determinado era de *ca.* 65 °Brix, no mês 1 de *ca.* 62 °Brix, no mês 3 de *ca.* 60 °Brix e no mês 4 de *ca.* 61 °Brix. No entanto, este decréscimo é mínimo face à percentagem de diminuição determinada para o teor de antocianinas monoméricas e teor de açúcares redutores, pois para o índice de refração contribuem também ácidos. Como visto na secção 7.1.5 ocorre um ligeiro aumento da acidez nas amostras armazenadas à temperatura ambiente e, deste modo podem haver ácidos que contribuam também para esta variação do teor de sólidos solúveis.

Considerando um  $p < 0,05$  concluímos que variação ao longo dos meses avaliados das amostras à temperatura ambiente é estatisticamente significativa tendo como referência o valor inicial, mês 0. A diminuição pode ser justificada quer pelo consumo

de açúcares pelos microrganismos, como já descrito na secção 7.1.3., quer pelas reações de polimerização que ocorrem entre antocianinas tornando-as insolúveis, como vimos pelo aumento da turbidez na secção 7.1.2.

### 7.1.5. pH e acidez

Os valores de pH determinados ao longo do tempo para as diferentes temperaturas de armazenamento estudadas estão representados na figura 20. Os valores de pH determinados ao longo do período de armazenamento variam entre 4,42-4,59. O valor de pH determinado para o mês 0 foi de 4,49, no mês 1, 2 e 3, foi de 4,43, 4,53 e 4,52, respetivamente. O valor de pH determinado para o concentrado de baga de sabugueiro produzido pela Indumape está de acordo com os valores de outros produtores de sumo concentrado de baga de sabugueiro, cujos valores variam entre 3,5-4,4.

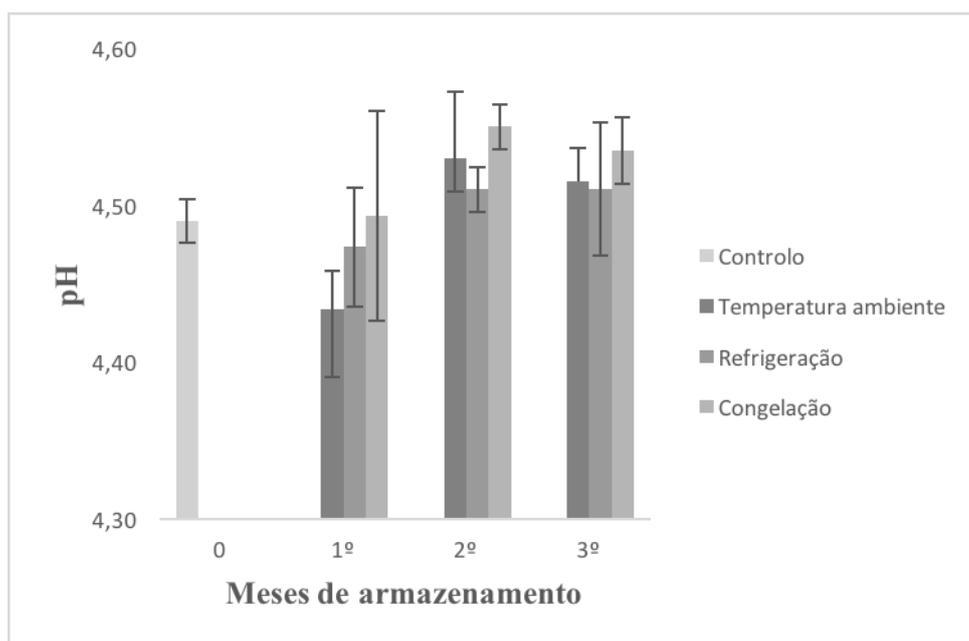


Figura 20 - Evolução do pH ao longo do período de armazenamento.

O pH é um dos fatores com maior impacto na estabilidade do pigmento como previsto pela literatura. A intensidade da cor apresentada pelo produto final também é condicionada pelo pH do produto final, pois como a literatura nos indica o comportamento das diferentes formas de antocianinas varia de acordo com as alterações

de pH impostas pelo meio onde as antocianinas se encontram. As antocianinas como demonstrado por alguns autores apresentam boa estabilidade em condições ácidas, mas em condições de processamento e armazenamento, por exemplo à temperatura de *ca.* 25°C, rapidamente se convertem em derivados incolores e consequentemente em pigmentos castanhos insolúveis (Nikkhah *et al.*, 2007). A variação dos valores de pH pode ser justificada pela variedade de baga de sabugueiro utilizada (genótipo) no processamento e com o seu estado de maturação, assim como condições de crescimento e localização (Thomas *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015). Com base na análise estatística realizada,  $p < 0,05$ , pela análise comparativa de médias ao longo dos meses e entre temperaturas, este parâmetro não sofre alterações significativas ao longo do período de armazenamento avaliado.

A acidez determinada varia entre 2,29-2,44g/100 g de ácido cítrico, sendo que os valores maiores de acidez foram encontrados nas amostras armazenadas à temperatura ambiente. Os valores determinados para a acidez ao longo do tempo estão representados na figura 21. Como já referido o metabolismo de microrganismos pode ser responsável por este ligeiro aumento ao longo do tempo, mas que por análise estatística,  $p < 0,05$ , revela-se insignificante. O ácido cítrico é o ácido mais abundante na baga de sabugueiro, sendo o que contribui mais para a acidez titulável (Veberic *et al.*, 2009).

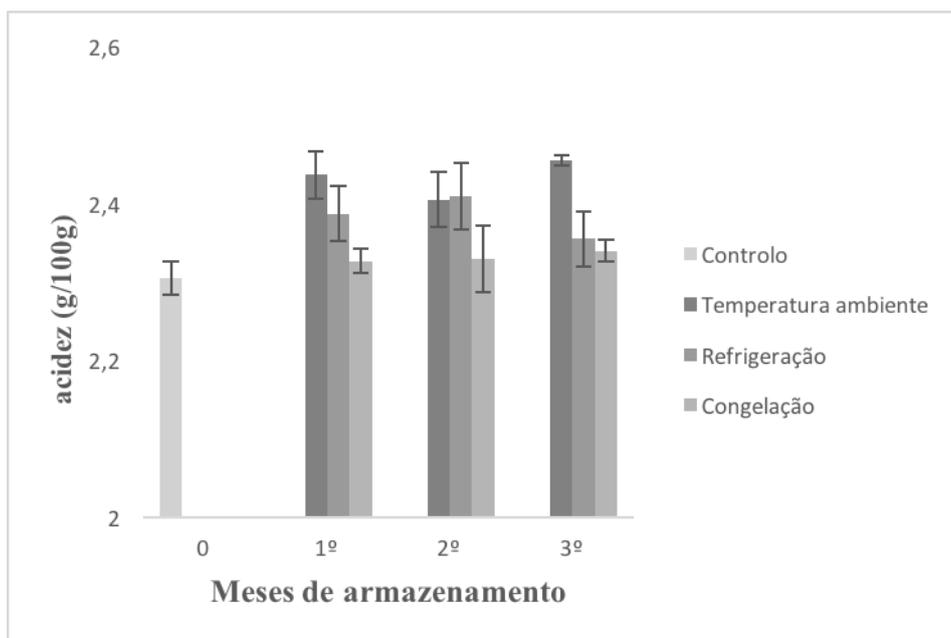


Figura 21 - Evolução da acidez ao longo do período de armazenamento.

O pH natural do sumo é propício ao crescimento e desenvolvimento de uma gama variada de microrganismos e uma vez aliado a uma temperatura ótima de desenvolvimento microbiano, o metabolismo dos microrganismos é favorecido. O valor de pH assim como a acidez são parâmetros que dependem do estado de maturação da matéria-prima utilizada na produção do sumo concentrado, das suas condições de crescimento e localização como já visto (Wu *et al.*, 2015).

#### **7.1.6. Análise microbiológica**

Os resultados microbiológicos para as contagens totais e bolores e leveduras ao longo do tempo revelam a conformidade das amostras refrigeradas e congeladas recolhidas após o processamento. Ao fim de um mês de armazenamento as amostras de baga de sabugueiro refrigeradas e congeladas mostram-se estáveis microbiologicamente (Tabela 5). No entanto, nas amostras à temperatura ambiente, apesar das diluições realizadas (200 e 400 vezes) não foi possível efetuar contagens de leveduras, com a diluição de 2000 vezes já não foi observado crescimento de bolores e leveduras. Para diluições de 800 vezes não havia coerência nos resultados, ora incontáveis ora ausência de crescimento. Assim, procedeu-se a uma metodologia indireta para avaliar o crescimento de leveduras, a quantificação de etanol no sumo concentrado de baga de sabugueiro. Tendo sido quantificado na amostra à temperatura ambiente ao fim de um mês de armazenamento 1,37% (V/V), o que corresponde a um produto fermentado com elevado teor de etanol e, deste modo corroborando com os resultados microbiológicos obtidos com fator de diluição de 400 (incontáveis). No entanto, as amostras de sumo concentrado de baga de sabugueiro refrigeradas e congeladas não apresentaram crescimento de colónias de bolores e leveduras (Tabela 5), assim como ao fim do tempo de armazenamento avaliado como pode ser visto na tabela em anexo.

Tabela 5- Valores obtidos das análises microbiológicas realizadas ao sumo concentrado de baga de sabugueiro após produção e após um mês de armazenamento.

Mês de armazenamento	0		1	
	CT(ufc/g)	B+L(ufc/g)	CT(ufc/g)	B+L(ufc/g)
<b>Temperatura ambiente</b>	conforme	conforme	conforme	<b>incontáveis</b>
<b>Refrigeração</b>	conforme	conforme	conforme	conforme
<b>Congelação</b>	conforme	conforme	conforme	conforme

## 7.2. Efeito da adição de diferentes níveis de SO<sub>2</sub> nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do sumo concentrado de baga de sabugueiro

### 7.2.1. Relação do teor de antocianinas monoméricas com a adição de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>

A proposta sugerida para a resolução do problema de conservação do sumo concentrado de sabugueiro foi a adição de anidrido sulfuroso como agente antimicrobiano, ao mesmo tempo avaliando o seu impacto nas propriedades físico-químicas e microbiológicas. Na figura 22 podemos ver, após o primeiro mês de armazenamento, a relação entre a adição de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub> e o seu impacto no valor determinado de antocianinas monoméricas.

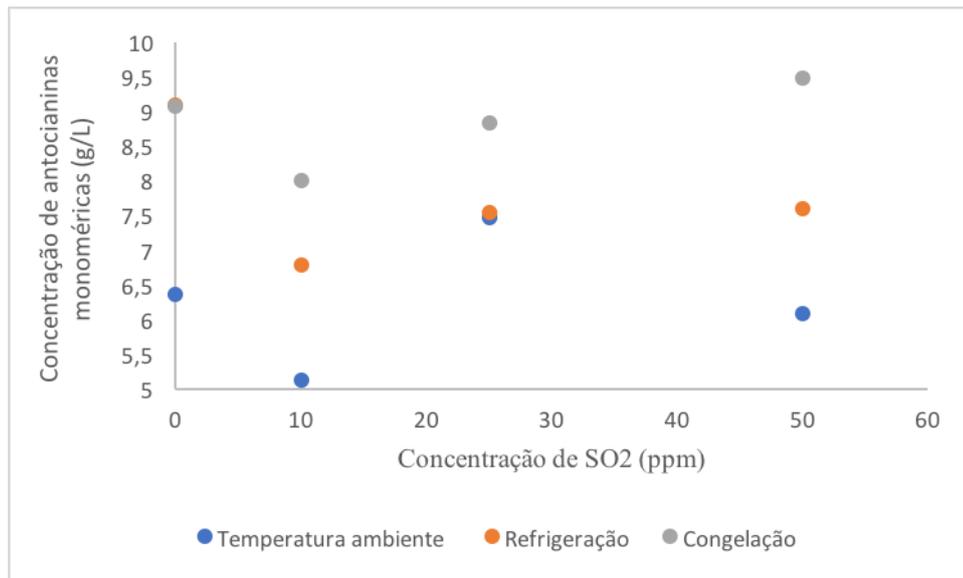


Figura 22 -Impacto da concentração de SO<sub>2</sub> no teor de antocianinas após um mês de armazenamento.

Com base nos valores determinados pode ser observado que não existe uma relação direta entre o aumento da concentração de SO<sub>2</sub> adicionado ao concentrado e o valor de antocianinas determinado. Segundo a literatura, o SO<sub>2</sub> descolora as antocianinas formando compostos estáveis e aductos incolores. O dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) em solução aquosa dá origem ao anião bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) que se liga rapidamente ao carbono 4 do catião flavílio de modo reversível, originando um produto incolor. O bissulfito pode também ligar-se à posição 4 da antocianina resultando igualmente numa estrutura sem cor como descrito na literatura. (Bridle, 1967). Seria expectável que uma maior concentração de SO<sub>2</sub> promovesse uma maior descoloração de antocianinas, o que se traduziria num teor de antocianinas monoméricas menor, pois a pH 1 diminui a forma de HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> aumentando a forma de SO<sub>2</sub> levando à diminuição da estrutura formada com as antocianinas. Ainda assim é no armazenamento à temperatura ambiente que se observa uma maior diminuição do valor de antocianinas monoméricas quando comparado com a refrigeração e a congelação, o que permite dizer que esta diminuição nas antocianinas monoméricas não estarão relacionadas com mecanismos de descoloração mas sim com fenómenos de polimerização, que são mais promovidas à temperatura ambiente.

Ao fim de 3 meses de armazenamento, figura 23, continuamos a observar uma relação entre a temperatura de armazenamento e o valor de antocianinas monoméricas

determinado, sendo observado que à temperatura ambiente o valor de antocianinas monomérico determinado é inferior quando comparado com a temperatura de refrigeração e congelamento.

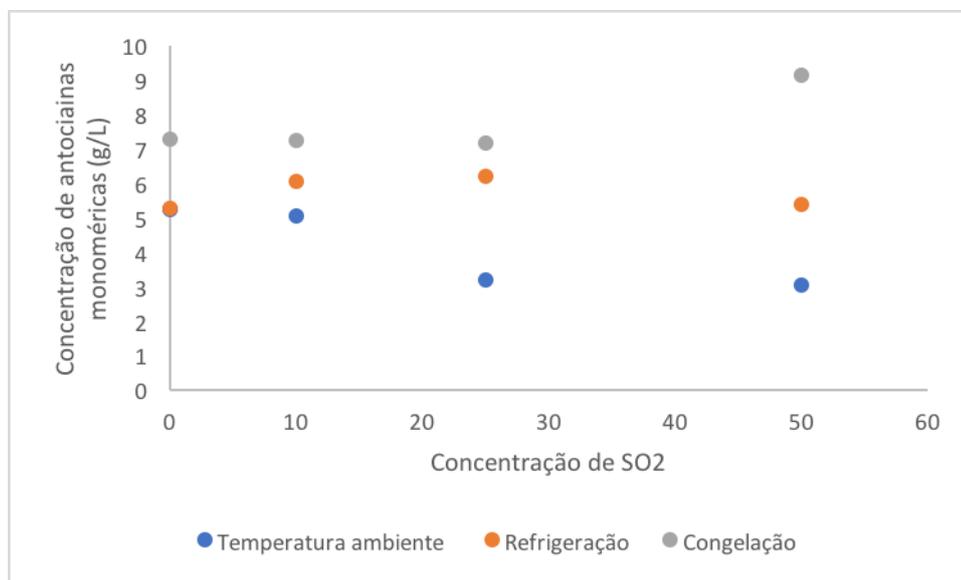


Figura 23 - Impacto das diferentes concentrações de SO<sub>2</sub> no teor de antocianinas monoméricas após 3 mês de armazenamento.

No entanto, ao fim de 3 meses de armazenamento já parece perceptível haver uma relação entre a concentração de SO<sub>2</sub> adicionada ao concentrado e o valor de antocianinas monoméricas determinado, sendo que para concentrações maiores de SO<sub>2</sub> o valor determinado de antocianinas monoméricas é inferior.

A temperatura pode levar à diminuição da estabilidade de antocianinas o que é suportado pela diminuição da absorvância a 520nm, pois a temperatura influencia as reações de oxidação de antocianinas. Portanto confirma-se que a temperatura afeta o equilíbrio das reações de oxidação de antocianinas (Patras et al., 2010). Assim é esperado que ao longo do período de armazenamento o valor de absorvância determinado seja inferior para níveis de SO<sub>2</sub> maiores que terão maior impacto na cor final, descorando mais antocianinas. Pela figura 23 podemos ver que as amostras armazenadas à temperatura ambiente foram mais afetadas no que diz respeito ao teor de antocianinas monoméricas ao longo do tempo. Para além disso o aumento da concentração de SO<sub>2</sub> parece ter um impacto mais pronunciado no teor total de

antocianinas monoméricas. As amostras congeladas sofreram alterações menos significativas, pois a temperaturas mais baixas os fenómenos de polimerização são diminuídos (Patras *et al.*, 2010). Como reportado na literatura adição de SO<sub>2</sub> tendo em conta diversos fatores como o pH, assim como a concentração em compostos capazes de se ligarem com o SO<sub>2</sub>. No caso específico do sumo de baga de sabugueiro, esta matriz é rica em compostos fenólicos, como antocianinas, o SO<sub>2</sub> tem a capacidade de se ligar a elas. Em geral, um pH= 4 leva a um aumento da pseudobase incolor das antocianinas em relação à forma vermelha de catião flavílio (Sims *et al.*, 1984).

### **7.2.2. Relação da turbidez com a temperatura de armazenamento com a adição de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>**

Segundo a literatura o aumento da turbidez e cor polimérica são devidos a fenómenos de condensação entre antocianinas (Jackman *et al.*, 1987). O tratamento de sumo com SO<sub>2</sub> durante o processamento uma diminuição na percentagem de cor polimérica (Lee, *et al.*, 2002). No entanto, o estudo realizado no sumo concentrado de baga de sabugueiro com adição de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub> não revelou existir relação entre a concentração de SO<sub>2</sub> adicionada e a diminuição dos níveis de cor polimérica que contribuem para o aumento da turbidez. Como seria previsto pela literatura em outros estudos, a adição de SO<sub>2</sub> em sumos faria com que estes no final do processamento apresentassem quantidades menores de antocianinas poliméricas (Kårlund *et al.*, 2014). A figura 24 demonstra que nas amostras armazenadas à temperatura ambiente os valores de turbidez são mais elevados ao fim de 3 meses de armazenamento quando comparada com as amostras refrigeradas e congeladas.

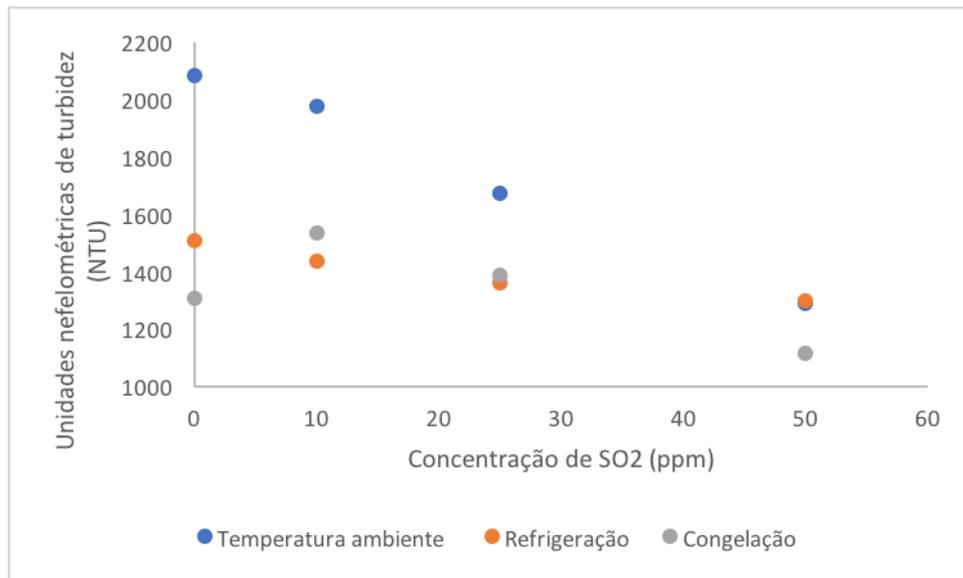


Figura 24 - Impacto de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub> na turbidez às diferentes temperaturas de armazenamento para o sumo concentrado de baga de sabugueiro.

Assim, é possível concluir que a formação de cor polimérica e, conseqüentemente turbidez é mais afetada pela temperatura de armazenamento do que pelas concentrações de SO<sub>2</sub> adicionadas ao sumo. Como podemos ver na figura 24, após 3 meses de armazenamento os valores de turbidez determinados são mais elevados nas amostras armazenadas à temperatura ambiente quando comparada com a as amostras refrigeradas e congeladas independentemente da concentração de SO<sub>2</sub> adicionada, mas a 50 ppm existe um efeito positivo na diminuição da turbidez. Na figura 25 vê-se que 50 ppm e 25 ppm à temperatura ambiente já minimizam os fenómenos de polimerização. Para além disso o HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> também reage com proteínas e polissacarídeos.

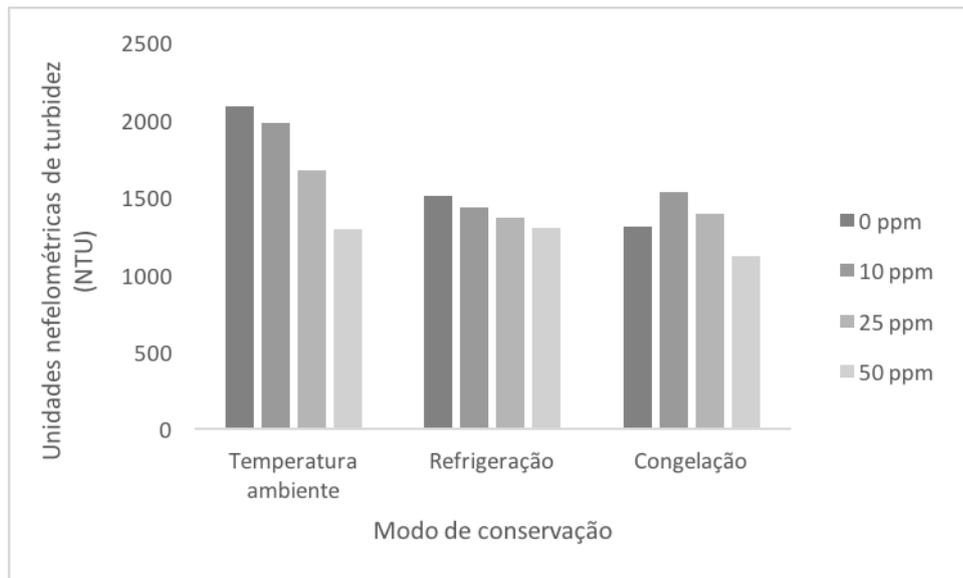


Figura 25 - Impacto da temperatura de armazenamento na turbidez do sumo concentrado de baga de sabugueiro.

### 7.2.3. Conservação microbiológica com adição de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>

#### 7.2.3.1. Análise microbiológica

A avaliação microbiológica da adição de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub> ao sumo concentrado de sabugueiro revelou que ao fim de um mês de armazenamento, uma maior concentração de SO<sub>2</sub> apresentou uma diminuição do número de colónias formadas. O sumo com a concentração de 10 ppm apresentou valores incontáveis, com diluição 200 vezes, e 25 e 50 ppm, determinou-se 4000 e 2200 (ufc/g), respetivamente, igualmente com diluição de 200 vezes. No entanto, para os dois meses restantes estes resultados não se mostram coerentes como pode ser visto na Tabela 6. Assim, recorreu-se à metodologia indireta para avaliar o crescimento de leveduras, a quantificação de etanol no sumo concentrado de baga de sabugueiro após um mês de armazenamento.

Tabela 6- Resultados microbiológicos obtidos para as amostras armazenadas à temperatura ambiente durante o período de armazenamento para sumo concentrado de baga de sabugueiro armazenado com diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>, 10, 25 e 50 ppm.

Meses de armazenamento	Concentração de SO <sub>2</sub> adicionada (ppm)					
	10		25		50	
	CT (ufc/g)	B+L (ufc/g)	CT (ufc/g)	B+L (ufc/g)	CT (ufc/g)	B+L (ufc/g)
1	conforme	incontável	conforme	4000	conforme	2200
2	conforme	incontável	conforme	10000	conforme	incontável
3	conforme	1800	conforme	40000	conforme	conforme

CT: contagens totais; B+L: bolores e leveduras

Através destes resultados inferimos que à temperatura ambiente nas três concentrações de SO<sub>2</sub> avaliadas o produto não é estável microbiologicamente ao longo do tempo. Estes resultados justificam-se pela elevada quantidade de antocianinas presentes no sumo, estando o SO<sub>2</sub> na forma ligada, perdendo a sua efetividade antimicrobiana (Bridle, 1967). Assim seria importante avaliar outras concentrações de SO<sub>2</sub> atendendo ao elevado pH natural do sumo.

### 7.2.3.2. Quantificação do etanol produzido

O etanol presente no sumo concentrado de sabugueiro foi quantificado por SPME/GC-FID em espaço de cabeça. Inicialmente realizaram-se alguns ensaios para otimizar o método de quantificação por cromatografia em fase gasosa do etanol produzido pelos microrganismos presentes nas amostras de sumo concentrado de baga de sabugueiro. Como descrito na literatura, um dos produtos originados a partir do metabolismo destes microrganismos é o etanol, sendo que as leveduras podem fermentar diretamente açúcares simples, como glucose, frutose e xilose, presentes no sumo concentrado de baga de sabugueiro, em etanol (Mohd *et al.*, 2017). Existem microrganismos com a capacidade de usar glucose para produzir energia, na ausência de oxigénio, produzindo

etanol e dióxido de carbono (Zabed *et al.*, 2014). Assim, o crescimento de microrganismos deteriorativos é aumentado podendo ter impacto negativo nas características do produto final (Chandra *et al.*, 2015).

O etanol foi quantificado pela metodologia de SPME/GC FID nas amostras em que se verificou desenvolvimento microbiano ao fim de um mês de armazenamento. Apenas as amostras armazenadas à temperatura ambiente com e sem adição de SO<sub>2</sub> apresentaram desenvolvimento de microrganismos. Como os resultados microbiológicos não se mostraram coerentes, podendo ser vistos em anexo, ao longo do tempo, esta metodologia foi utilizada para confirmar que efetivamente as amostras apresentavam crescimento microbiano e que os resultados obtidos por análise microbiológica não se tratavam de falsos positivos. A literatura diz que a quantidade de SO<sub>2</sub> a ser adicionada depende de fatores como o pH, no caso do sumo de sabugueiro o pH é de aproximadamente 4,5 e, deste modo a quantidade de SO<sub>2</sub> a ser adicionada deveria ter sido superior para exercer efeito inibitório mais pronunciado sobre os microrganismos (Bozoglu *et al.*, 2015). A concentração de SO<sub>2</sub> a adicionar depende também da concentração de compostos aos quais o SO<sub>2</sub> se possa ligar (Herrero *et al.*, 2003). O sumo concentrado de baga de sabugueiro apresenta elevada concentração de antocianinas, compostos aos quais o SO<sub>2</sub> apresenta capacidade para se ligar e, deste modo o seu efeito como antimicrobiano deixa de ser efetivo.

Tabela 7- Valores de etanol quantificados por SPME/ GC-FID nas amostras à temperatura ambiente com e sem SO<sub>2</sub>.

Temperatura ambiente	Área (mV)	Concentração (%v/v)
<b>Controlo</b>	699,05±38,5	1,37
<b>10</b>	602,75±0,07	1,18
<b>25</b>	302,25±32,2	0,60
<b>50</b>	31,95±1,3	0,08

Ainda assim, embora a quantidade de SO<sub>2</sub> possa não ser suficiente, a tabela 7 mostra que a maior percentagem de etanol surge na amostra armazenada à temperatura ambiente, sem qualquer adição de SO<sub>2</sub>, sendo a concentração determinada de 1,37% (v/v). Em relação às amostras onde se adicionou SO<sub>2</sub> é possível concluir que um aumento da concentração leva a uma produção de etanol menor, nas amostras de sumo

com 10 ppm obtivemos uma concentração de 1,18% (v/v), nas amostras com 25 ppm 0,60% (v/v) e com 50 ppm 0,08% (v/v). Embora ainda exista etanol a ser produzido, o aumento da concentração de SO<sub>2</sub> levou à inibição do crescimento de algumas leveduras, pois como já visto grande parte do SO<sub>2</sub> liga-se a compostos da matriz, as antocianinas e, deste modo a sua efetividade como antimicrobiano é diminuída (Bridle, 1967).

### 7.3. Análise da composição em açúcares do material polimérico dos sumos concentrados de baga de sabugueiro

A caracterização da composição em ácidos urónicos e açúcares neutros presentes no material polimérico isolado dos diferentes sumos concentrados de baga de sabugueiro, amostras 1, 2 e 3, estão apresentadas na tabela 8. A tabela ilustra as principais diferenças presentes ao nível da composição em açúcares nos concentrados obtidos em diferentes anos de produção. Os resultados apresentados mostram que todas as amostras de sumo possuem polissacarídeos pécticos.

Tabela 8- Composição em açúcares dos polissacarídeos das amostras 1, 2 e 3 isoladas dos sumos concentrados.

Amostra	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
Açúcares neutros	% mol	(µg/mg)	% mol	(µg/mg)	% mol	(µg/mg)
Rha	2±2	10±10	13±16	44±51	2±0,1	7±0,4
Ara	7±0,4	23±6	2±0,3	6±1	2±0,1	5±0,8
Fuc	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Xyl	27±4	92±20	22±5	68±15	30±2	87±6
Man	2±2	9±9	3±0,6	11±3	0,8±0,2	3±1
Gal	3±3	14±13	3±0,3	10±1	1±0,8	4±3
Glc	51±4	215±82	48±10	178±41	56±3	198±35
Ácido urónico	8±2	113±74	9±0,2	118±77	9±1	72±19
Total	100,00	476	100,00	435	100,00	376

A elevada quantidade de glucose e de xilose indica a existência de polissacarídeos hemicelulósicos, possivelmente xilanas e xiloglucanas, como já reportado na literatura para extratos do fruto de baga de sabugueiro (Barsett *et al.*, 2012). As frações dialisadas revelam a presença de ácido urónico, 113 (µg/mg), 118 (µg/mg) e 72 (µg/mg) nas frações 1, 2, e 3 respetivamente, possivelmente com origem nos polissacarídeos pécticos. A fração 3 é a fração mais pobre em ácido urónico. As cadeias laterais presentes nos polissacarídeos pécticos podem incluir na sua constituição arabinose e galactose ou xilose. A ramnose também está presente na cadeia principal dos

polissacarídeos pécnicos. A origem dos açúcares presentes no material polimérico pode dever-se, para além dos polissacarídeos, aos açúcares presentes nas antocianinas. Os compostos fenólicos, como as antocianinas e flavonóis ficam retidos no interior da membrana de diálise, como por exemplo a rutinose que é um dissacarídeo de ramnose com glucose (6-*O*- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucose) que se encontra ligado a compostos, como a quercetina, que podemos encontrar no mosto de baga de sabugueiro, assim como no concentrado (Schmitzer et al., 2010). A amostra 1 apresenta mais xilose 92 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), e glucose 215 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), no material polimérico o que pode ser indicativo de que ocorreu polimerização de antocianinas contendo estes açúcares e, deste modo ficaram retidas no interior da membrana, ainda que mesmo não estando polimerizadas podem ficar retidas ( Szalóki-Dorkó *et al.*, 2015). A xilose encontra-se ligada a uma das principais antocianinas presentes no sumo, a cianidina 3-sambubiosídeo que contém o dissacarídeo sambubiose (2-*O*- $\beta$ -D-xilosil-D-glucosídeo).

## Capítulo 8- Conclusões e perspectivas futuras

Os parâmetros de qualidade do sumo concentrado de baga de sabugueiro são a acidez, o pH, o teor de sólidos solúveis, turbidez e o teor de antocianinas monoméricas. Tendo sido estes critérios quantificados e avaliados para o sumo produzido pela Indumape. Este trabalho permitiu concluir que a temperatura de armazenamento afeta a estabilidade das propriedades físico-químicas e microbiológicas ao longo do tempo. As temperaturas de armazenamento mais elevadas provocam a diminuição do teor de antocianinas monoméricas e o teor de açúcares redutores, assim como do teor de sólidos solúveis de modo mais pronunciado. Os parâmetros mais afetados ao longo do período de armazenamento foram o teor de antocianinas monoméricas, açúcares redutores e o teor de sólidos solúveis. A maior percentagem de inibição ocorreu logo após o primeiro mês de armazenamento, no caso do teor de antocianinas monoméricas a diminuição face ao valor inicial foi de  $\approx 35\%$  e no caso dos açúcares redutores observou-se uma diminuição de  $\approx 52\%$ . A metodologia que permite preservar de forma mais eficaz as características do sumo concentrado de baga de sabugueiro são a congelação e a refrigeração, pois embora ocorra uma diminuição do teor de antocianinas monoméricas é menor em comparação com o sumo armazenado à temperatura ambiente. Em termos microbiológicos o sumo armazenado à temperatura de refrigeração e de congelação ao longo dos meses de armazenamento revelou ser estável, ao contrário do que se observou com o sumo à temperatura ambiente. Assim, foi estudada a possibilidade de utilizar  $\text{SO}_2$  antimicrobiano e de que forma afetava as propriedades físico-químicas e microbiológicas.

O trabalho apresentado é inovador na medida em que não existem na literatura estudos de conservação com  $\text{SO}_2$  em sumo concentrado de baga de sabugueiro. O uso de  $\text{SO}_2$  tem consequências diretas nas propriedades físicas e químicas, principalmente no teor de antocianinas monoméricas, no entanto economicamente torna-se, uma alternativa viável face a outros métodos de conservação numa perspetiva económica. Foi também observado que a adição de  $\text{SO}_2$  contribui para a minimização da turbidez durante o armazenamento. A nível microbiológico a adição de  $\text{SO}_2$  não foi conclusiva, na medida em que deveriam ser avaliados outros níveis de  $\text{SO}_2$ , que assegurassem uma concentração de  $\text{SO}_2$  livre no meio que fosse eficiente na sua ação antimicrobiana. As concentrações avaliadas permitiram concluir que grande parte combina-se com

inúmeras moléculas, como antocianinas que estão presentes naturalmente na matriz de baga de sabugueiro perdendo a sua efetividade como antimicrobiano. Assim, numa próxima etapa do trabalho seria importante o estudo de outras concentrações para perceber a sua vantagem como antimicrobiano, atendendo também ao pH natural do sumo. No entanto, a quantificação de etanol revelou que o aumento da concentração de  $\text{SO}_2$  levou à inibição de leveduras, pois para as amostras armazenadas à temperatura ambiente com concentrações crescentes de  $\text{SO}_2$ , o etanol quantificado diminuiu. O valor de etanol quantificado nos sumos concentrados de sabugueiro armazenados à temperatura ambiente ao fim do 1º mês foi de 1,37% (v/v), sendo inferior para os sumos com adição de  $\text{SO}_2$  1,18%, 0,60% e 0,08 % (v/v) para 10, 25 e 50 ppm de  $\text{SO}_2$ , respetivamente.

A monitorização do transporte da matéria-prima até à unidade fabril também poderá ser um aspeto importante a ser abordado e melhorado, portanto a adição de  $\text{SO}_2$  ainda à baga na forma de mosto pode também ser uma alternativa que depois facilitará a obtenção de um produto estável durante e após processamento da baga. Além disso, seria um processo reversível, uma vez que a Indumape possui um equipamento que permite a dessulfitação de mosto, deste modo seria aumentada a segurança e qualidade microbiológica do mosto durante o transporte e teríamos um impacto negativo de alteração da cor reversível.

## Capítulo 9- Referências Bibliográficas

Atkinson, M. D.; Atkinson, E. *Sambucus nigra* L. **Journal of Ecology**, 2002, 90, 895-923.

Barsett, H. *et al.* Comparison of carbohydrate structures and immunomodulating properties of extracts from berries and flowers of *Sambucus nigra* L. **European Journal of Medicinal Plants**, 2012, 2, 216–229.

Bates, R. P.; Morris, J. R.; Crandall, P. G. Principle and practises small and medium scale fruit juice processing. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2001, 1–226.

Berké, B.; De Freitas, V. A colorimetric study of oenin copigmented by procyanidins. **Journal of Scientific Food Agricultural** , 2007 13, 125–135.

Bermudéz-Soto, M. J.; Tomás-Barberán, F. A. Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. **European Food Research and Technology**, 2004, 219:133–141.

Brilde, P.; Timberlake, C.F. Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins. **Journal of Science Food Agriculture**, 1967, 18, 480-485.

Brilde, P.; Timberlake, C.F. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. **Food Chemistry**, 1997, 58, 103–109.

Brouillard, R.; Lang, J. The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. **Canadian Journal Chemistry**, 2000.

Brownmiller, C.; Howard, L. R.; Prior, R. L. Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. **Journal of Food Science**, .2008, 56, 689-695.

Casati, C.B.; Baeza, R.; Sanchez, V.; Catalano, A.; López, P.; Zamora, M.C. Thermal degradation kinetics of monomeric anthocyanins, colour changes and storage effect in elderberry juices. **Journal of Berry Research**, 2015, 5, 29-39.

Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, Ma.Lourdes; Páez-Hernández, Ma. Elena; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, 2009, 859-871.

Červenka, L. Moisture adsorption characteristics of black currant (*Ribes Nigrum* L.), black elderberry (*Sambucus Nigra* L.) and Chokeberry (*Aronia melanocarpa*, [MINCHX.] ELL.) samples at different temperatures. **Journal of Food Process Engineering**, 2011, 1419-1434.

Charlebois, D. Elderberry as a medicinal plant. **J. Issues in new crops and new uses**, 2007, 284–292.

Christensen, L. P.; Kaack, K.; Fretté, X. C. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids. **European Food Research and Technology**, 227, 293–305.

Coimbra, M. A., Degadillo, I., Waldron, K. W., Selvendran, R. R., 1996. Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. **Modern Methods of Plant Analysis**, 17, 19-44.

Dai, J.; Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, Review. **Molecules**, 2010, 15, 7313–7352.

Dawidowicz, A. L.; Wianowska, D.; Baraniak, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). **Food Science and Technology**, 2006, 308–315.

DRAPN-Programa de desenvolvimento rural, 2007. **Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte**.

Falguera, V.; Ibarz, A. Juice Processing: Quality, Safety and Value-Added Oportunities. **Juice Processing: Quality, Safety and Value-Added Oportunities**, 2014, London : CRC Press Taylor & Francis, 374.

Fang, Z.; Zhang, M.; Sun., Y.; Sun, J. How To Improve Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) Juice Color Quality: Effect of Juice Processing on Bayberry Anthocyanins and Polyphenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, 54, 99–106.

Fellows, P.J. **Food Processing: Principles and Practise**, 2000, second edition, CRC Press 1–107.

Galic, A.; Dragovic-Uzelac, V.; Levaj, B. The polyphenols stability, enzyme activity and physico-chemical parameters during producing wild elderberry concentrated juice. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, 2009 , 74, 181–186.

Garofulić, I.; Kovačević Ganić, K.; Galić, I.; Dragović-Uzelac, V.; Savić, Zvonivir. The influence of processing on physico-chemical parameters, phenolics, antioxidant activity and sensory attributes of elderberry (*Sambucus nigra* L.) Fruit Wine. **Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition**, 2012, 9–13.

Ghasemzadeh, N.; Ghasemzadeh, A. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, 2011, 6697-6703.

Hagerman, A.; Robbins, C.; Weerasuriya, Y.; Wilson, T.; McArthur, C. Tannin chemistry in relation to digestion. **Journal of Range Management**, 1992, 45, 57–62.

Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, 1996, 59, 205–215..

Hassanpour, S. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, 2011, 1, 47–53.

Hellstrom, J.; Matilda, P.; Karjalainen, R. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2013, 31, 12–19.

Hubbermann, E. M.; Heins, A.; Stockmann; Schwarz, K. Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. **European Food Research and Technology**, 2006, 223, 83–90.

Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, 2005, 40, 2931–2944.

Jakobek, L.; Seruga, M.; Novak, I.; Medvidovic-Kosanovic, M. Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. **Deulsche Lebensmittel-Ru**, 2007.

Johnson, M.; Thomas, A.; Greenlief, M. Impact of frozen storage on the anthocyanin and polyphenol content of american elderberry fruit juice. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 2015, 63, 5653-5659.

Kaack, K. *et al.* The relationship between sensory quality and volatile compounds in raw juice processed from elderberries (*Sambucus nigra* L.). **European Food Research and Technology**, 2005, 221, 244–254.

- Kaack, K.; Austed, T. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. **Plant Foods for Human Nutrition**, 1998, 52, 187–198.
- Kabera, J.; Semana, E.; Mussa, A.; He, X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2014, 2, 377–392.
- Karlund, A.; Moor, U.; Sandell; Karjalainen; O. The impact of harvesting, storage and processing factors on health-promoting phytochemicals in berries and fruits. **Processes**, 2014, 2, 596–624.
- Kong, J. M.; Goh, N.; Chia, T.; Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, 2003, 64, 923–933.
- Krenn, L.; Steitz, M.; Kurth, H.; Gaedcke, F. Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements-analysis with problems. **Pharmazie**, 2007, 62, 803–812.
- Kumar, S. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. **Pelagia Research Library**, 2015, 6, 114–124.
- Landbo, A. K.; Kaack, K.; Meyer, A. S. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2007, 8, 135–142.
- Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments. **Journal of Food Science**, 2002, 67, 1660–1667.
- Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. - Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, 2005, 88, 1269–1278.
- Manach, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2004, 79, 727:47.
- Manganaris, G. A.; Goulas, V.; Vicente, A.; Terry, L. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013, 94 825–833.

Mirsaeedghazi, H.; Emam-Djomeh, Z.; Ahmadkhaniha, R. - Effect of frozen storage on the anthocyanins and phenolic components of pomegranate juice. **Journal of Food Science and Technology**, 2014, *51*, 382–386. doi.

Nakajima, J. I.; Tanaka, I.; Yamazaki, M., Saito, K. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2004, 241–247.

Neto, F. C. Sabugueiro, suas potencialidades. **Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte**, 2007.

Netzel, M.; Herbst, M.; Dietrich; Bitsch, R.; Bitsch, I.; Franl, T. The excretion and biological antioxidant activity of elderberry antioxidants in healthy humans. **Food Research International**, 2005, *38*, 905–910.

Pandey, K. B.; Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2009, *2*, 270–8.

Patras, A.; Brunton, N.; O'Donnell, C.; Tiwari, B. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science and Technology**, 2010, *21*, 3–11.

Philip, R. A. **Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruits**, 2005, Blackwell Publishing, UK., second edition, vol. 53, 374.

Pisoschi, A. M.; Cheregi, M. C.; Danet, A. F. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: Electrochemical and spectrophotometrical approaches. **Molecules**, 2009, *14*, 480–493.

Rein, M. J.; Heinomen, M. Stability and Enhancement of Berry Juice Color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2004, *52*, 3106–3114.

Sadilova, E.; Stintzing, C.; Kammerer, D.; Carle, R.. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. **Food Research International**, 2009, *42*, 1023–1033.

Salvador, Â. C.; Silvestre, A. J. D.; Rocha, S. M. *Sambucus nigra* L. A potential source of health-promoting components. **Frontiers in Natural Product Chemistry**, 342–392.

Seabra, I. J.; Braga, M.; Batista, M.; Sousa, H. Fractioned high pressure extraction of anthocyanins from elderberry (*Sambucus nigra* L.) pomace. **Food and Bioprocess Technology**, 2008, 3, 674–683.

Serrano, J.; Puupponen-Pimia, R.; Dauer, A.; Aura, A.; Saura-Calixto, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition and Food Research**, 53, 310–329.

Silva, E.; Bacelar, E.; Gonçalves, B.; Ferreira, H.; Moutinho-Pereira, J.; Correia, C., Nunes, F. Caracterização morfo-fisiológica de populações de *Sambucus nigra* L. da região do Vale do Varosa. **3º Simpósio Nacional de Fruticultura**, 2014.

Szalóki-Dorkó, L.; Stéger-Máté, M.; Abrankó, L. Effects of fruit juice concentrate production on individual anthocyanin species in elderberry. **International Journal of Food Science and Technology**, 2016, 51, 641–648.

Szalóki-Dorkó, L.; Stéger-Máté, M.; Abrankó, L. Evaluation of colouring ability of main European elderberry (*Sambucus nigra* L.) varieties as potential resources of natural food colourants. **International Journal of Food Science and Technology**, 2015, 50, 1317–1323.

Topol'ská, D.; Valachová, K.; Raptá, P.; Šilhár S.; Panghyová, E.; Horváth, A.; Šoltés, L. Antioxidative properties of *Sambucus nigra* extracts. doi: 10.1515/chempap-2015-0138.

Turfan, Ö.; Turkyilmaz, M.; Yemis, O. Anthocyanins and color of pomegranate juice concentrates. **Journal of Food Quality**, 2012, 1–11.

USDA, **United States Department of Agriculture -National Nutrient Database**, 2016.

Veberic, R.; Jakopic, J.; Stampar, F.; Schmitzer, V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. **Food Chemistry**, 2009, 114, 511–515.

Vlachojannis, J.E. D.; Cameron, M.; Chrubasik, S. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza radix* and its bioactive compounds. **Phytotherapy Research**, 2009, 24:1-8.

Vulić, J. J.; Vračar, L. O.; Šumić, Z. M. Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit. **Acta Periodica Technologica**, 2008, 39, 85–90.

Walkowiak-Tomczak, D.; Czapski, J.; Mlynarczyk, K. Assessment of colour changes during storage of elderberry juice concentrate solutions using the optimization method. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria** ,2016, 15, 299–309.

Wedzicha, B. L. (1984), Sulphur dioxide in foods:– chemical interactions. Nutrition Bulletin, 9: 155–164.

Wrolstad, R.E.; Giusti, M.- Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.

Wrolstad, R. E.; Durst, W.; Lee, J. - Tracking color and pigment changes in anthocyanin products, Review.**Food Science and Tehnology**, 2005, 16, 423–428.

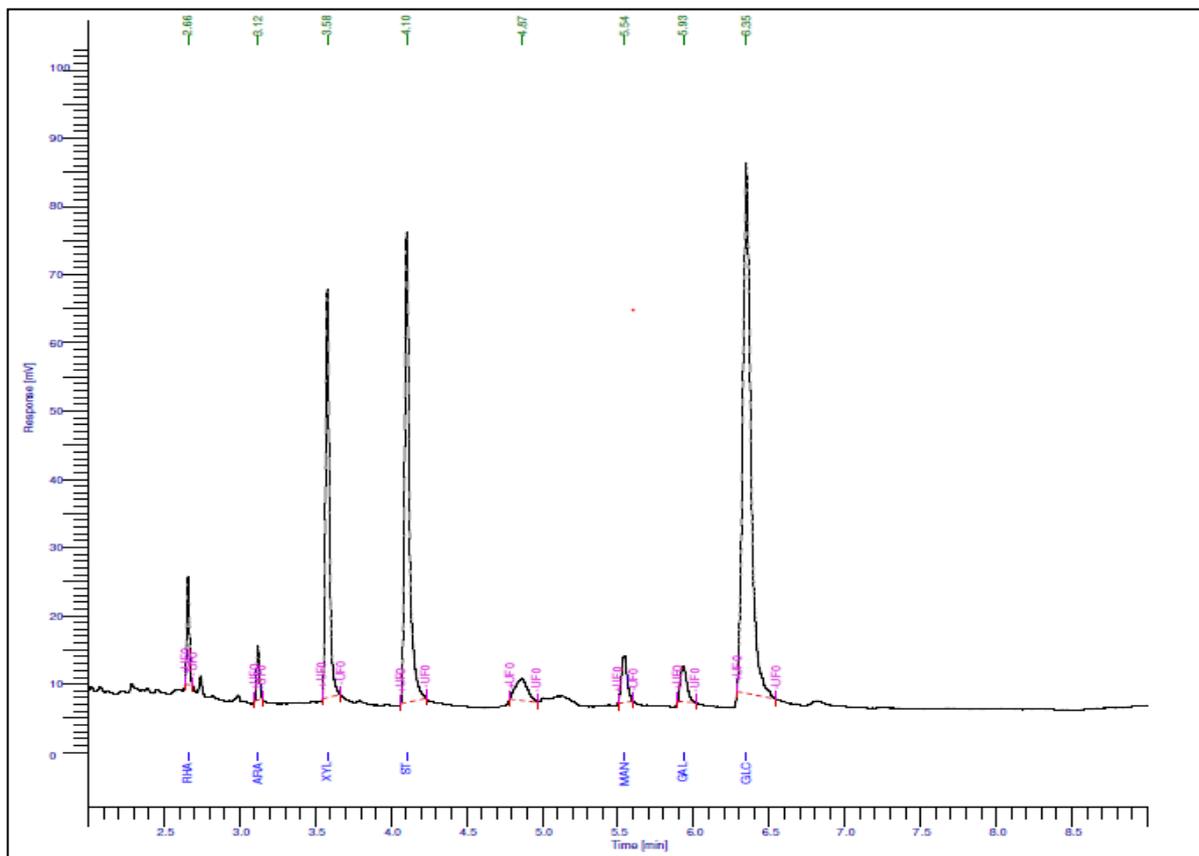
Wu, H.; Lu, C.H.; Fritsche, K.L.; Thomas, A.L.; Cai, Z.; Greenlief, C.M. Determination of Anthocyanins and Total Polyphenols in a Variety of Elderberry Juices by UPLC-MS/MS and Other Methods. **Acta horticulturae.**, 2015, 1061:43–51.

Wu, X.; Gu, L.; Prior, R.; McKay, S. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of *Ribes* , *Aronia* , and *Sambucus* and Their Antioxidant Capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2004, 52, 7846–7856.

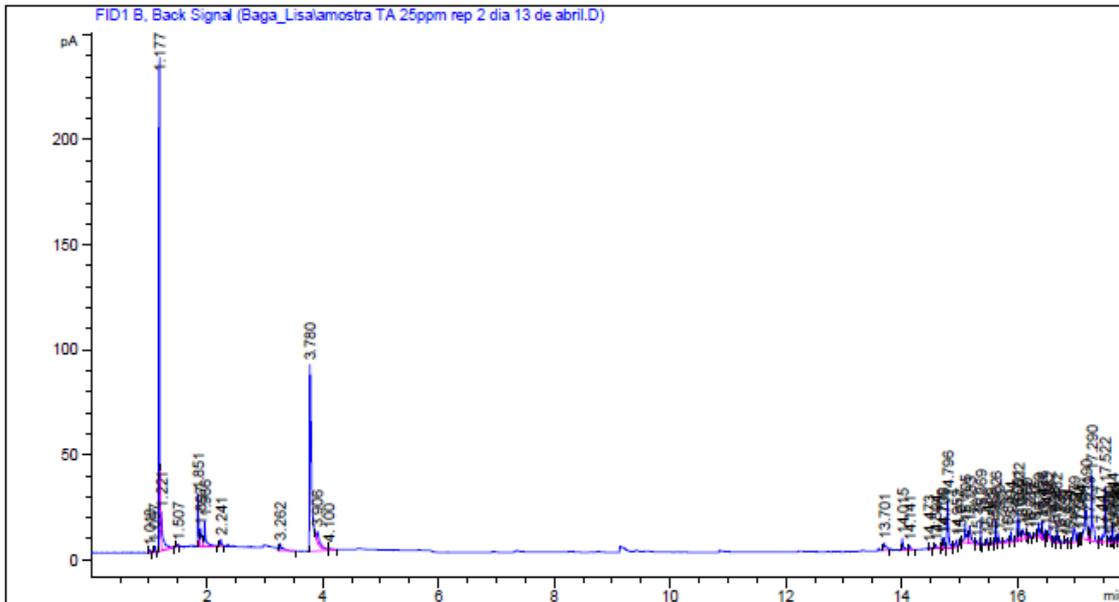


## Anexos

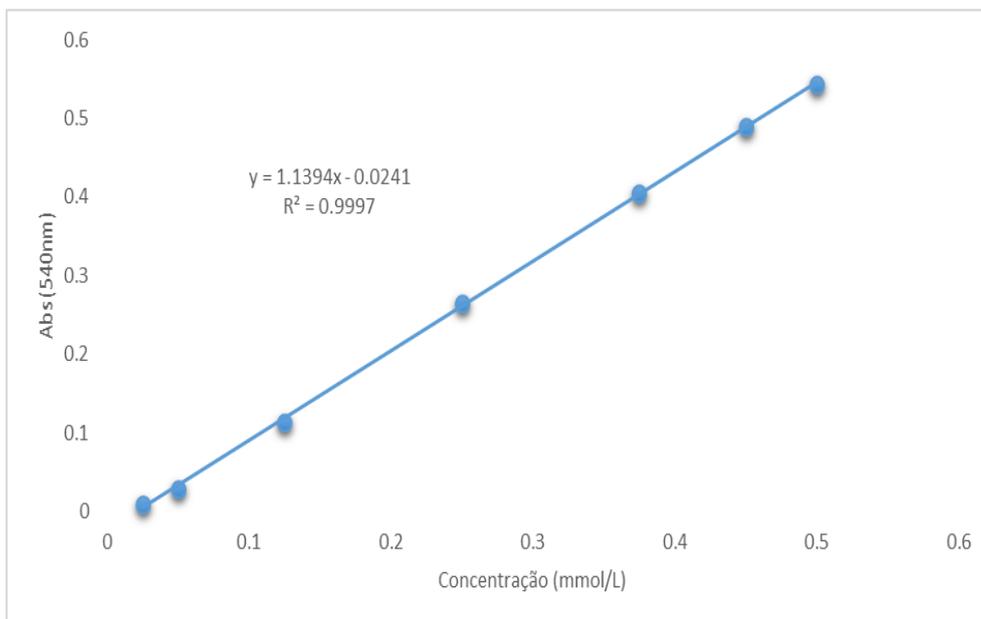
Cromatograma obtido por GC-FID de açúcares neutros



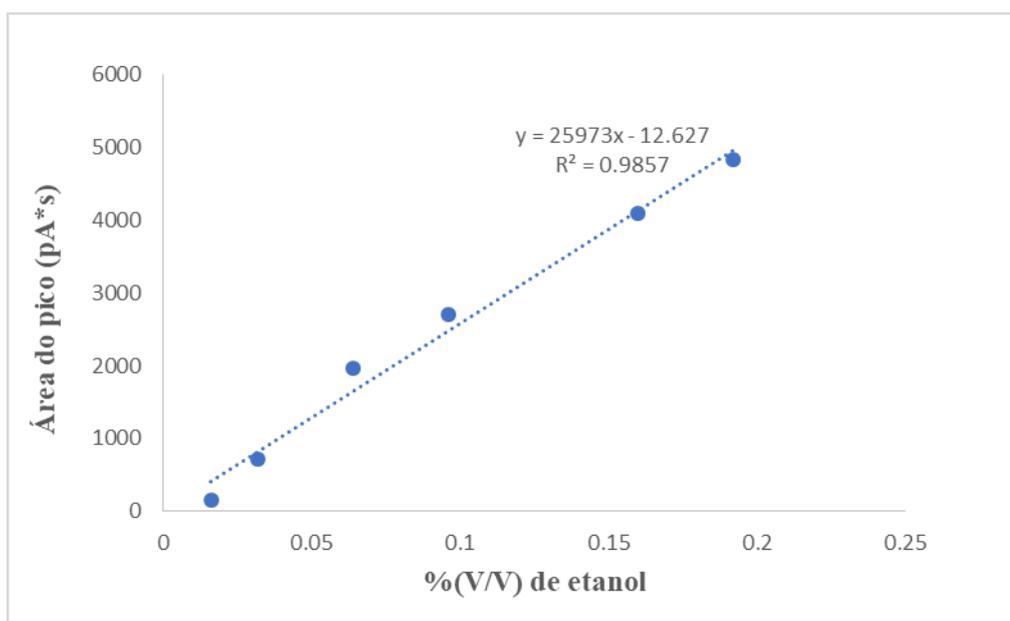
## Cromatograma obtido por GC-FID de etanol



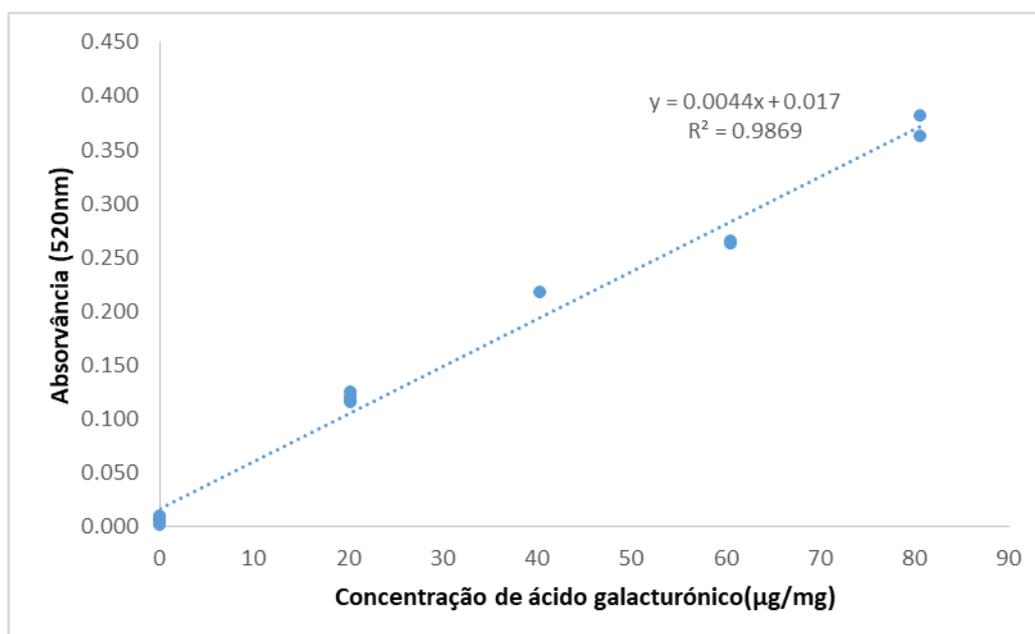
## Curva de calibração de glucose para a determinação dos açúcares redutores



### Curva de calibração de etanol



### Curva de calibração de ácidos urônicos



**Tabela parâmetros físico-químicos**

Modo de armazenamento	Parâmetro	Meses de armazenamento			
		Fevereiro	Março	Abril	Maiο
Temperatura ambiente (≈25°C)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	64,81 ±0,10	62,74±1,16	60,13±0,02	61,00±0,14
	pH	4,49±0,01	4,43±0,02	4,53±0,04	4,52±0,02
	Acidez %(m/m)	2,31±0,02	2,44±0,03	4,41±0,03	2,46±0,01
	Turbidez (NTU)	1608,00±74,95	1878,33±236,12	2049,50±161,93	2085,50±26,16
	Teor de antocianinas monoméricas (g/L)	9,84±0,12	6,37±1,10	5,57±0,02	5,26±0,28
	Acúcares redutores (g/L)	29,50±2,99	14,27±1,92	13,94±0,79	12,22±1,13
Refrigeração (≈8°C)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	64,81 ±0,10	64,90 ±0,30	64,51 ±0,08	64,47 ±0,09
	pH	4,49±0,01	4,47 ±0,03	4,51 ±0,01	4,51 ±0,04
	Acidez %(m/m)	2,31±0,02	2,39 ±0,04	2,41 ±0,04	2,36 ±0,04
	Turbidez (NTU)	1608,00±74,95	1440,67 ±76,57	1465,50 ±126,57	1508,50 ±82,73
	Teor de antocianinas monoméricas (g/L)	9,84±0,12	9,09 ±0,41	6,21 ±0,02	5,29 ±0,03
	Acúcares redutores (g/L)	29,50±2,99	26,10 ±1,12	17,17 ±0,09	16,54 ±1,26
Congelamento (≈ -18°C)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	64,81 ±0,10	64,78 ±0,85	64,17 ±0,43	64,00 ±0,14
	pH	4,49±0,01	4,49 ±0,07	4,55 ±0,01	4,54 ±0,02
	Acidez %(m/m)	2,31±0,02	2,33 ±0,02	2,33 ±0,04	2,34 ±0,01
	Turbidez (NTU)	1608,00±74,95	1351 ±117,85	1231,50 ±33,23	1310,50±17,68
	Teor de antocianinas monoméricas (g/L)	9,84±0,12	9,09 ±0,65	8,97 ±0,03	7,29 ±0,64
	Acúcares redutores (g/L)	29,50±2,99	27,30 ±0,50	24,63 ±0,63	23,36 ±0,99

## Tabela parâmetros microbiológicos

Mês	Temperatura ambiente		Refrigeração		Congelação	
Março	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)
2	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
15	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
29	200	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
Abril						
13	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
26	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
Maio						
26	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
Mês	Temperatura ambiente 10 ppm		Refrigeração 10 ppm		Congelação 10 ppm	
Março	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)
3	200	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
16	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
30	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
Abril						
5	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
13	1800	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
Maio						
12	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
Mês	Temperatura ambiente 25 ppm		Refrigeração 25 ppm		Congelação 25 ppm	
Março	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)
9	conforme	4000	conforme	conforme	conforme	conforme
23	conforme	incontável	conforme	conforme	200	conforme
Abril						
6	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
21	conforme	10000	conforme	conforme	conforme	conforme
Maio						
12	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
19	conforme	40000	conforme	conforme	conforme	conforme
Mês	Temperatura ambiente 50 ppm		Refrigeração 50 ppm		Congelação 50 ppm	
Março	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)	Contagens totais (UFC/g)	Bolores e leveduras(UFC/g)
8	conforme	conforme	200	conforme	conforme	conforme
22	conforme	2200	conforme	conforme	conforme	conforme
Abril						
5	conforme	incontável	conforme	conforme	conforme	conforme
18	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
Maio						
19	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme