



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa



DESENVOLVIMENTO DE POLPA DE HORTOFRUTÍCOLAS

Polpa Verde com elevada bioatividade

Diana Isa de Oliveira Santos

Dissertação para obtenção do Grau Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Professora Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Coorientador: Engenheira Maria Joaquina da Cunha Pinheiro

Júri:

Presidente: Doutor Victor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Sara Maria Martins Beirão da Costa Teixeira de Barros, Professora Auxiliar Convidada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Licenciada Maria Joaquina da Cunha Pinheiro, Bolseira de Investigação do Instituto Superior de Agronomia

Lisboa, 2012

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram e de algum modo contribuíram para a elaboração do presente trabalho de forma direta ou indireta.

À Professora Doutora Margarida Moldão Martins pela orientação científica, pela disponibilidade, pela transmissão de conhecimentos e pela colaboração ao longo deste trabalho.

À Engenheira Joaquina Pinheiro pela coorientação, pelo esclarecimento de todas as dúvidas, pela disponibilidade, pela ajuda indispensável no laboratório e por todo o conhecimento teórico e prático transmitido.

À Professora Doutora Luísa Castro e Brito pela transmissão de conhecimento, pelas sugestões e apoio prestado na parte microbiológica.

À D. Graziela Rodrigues e à D. Júlia Barata por todo o conhecimento, apoio e boa disposição transmitidos durante a realização da parte prática.

A todas as pessoas do laboratório de microbiologia, em especial à Engenheira Ana Carla Silva, pela transmissão de conhecimento, pela disponibilidade e pelo apoio prestado.

Ao Bruno Sales pela constante e indispensável colaboração, pela ajuda e disponibilidade, pela amizade, companheirismo e apoio incondicional durante os últimos anos e em especial durante a realização deste trabalho.

À Denise Lopes e à Sara Silva pela amizade, pelo companheirismo, pelo convívio e por todo o apoio ao longo dos últimos anos.

À Liliana e à Patrícia Almeida pela amizade, pelo companheirismo e pela ajuda imprescindível ao longo dos últimos anos.

À Maria João Bule, à Cátia Hipólito, ao Nuno Castanheiro e à Alexandra Costa pelo convívio, pela ajuda e pela animação durante a execução da parte experimental do trabalho.

À Viviana Monteiro e ao Sandro Martins pelo apoio nas análises microbiológicas, pelo companheirismo e pela amizade ao longo da elaboração do presente trabalho.

À Joana Santos, ao Duarte Fernandes e ao Luís Miguel pela ajuda, pela amizade e pelo encorajamento para prosseguir.

À Susana Faia, à Inês Ribolhos, à Ana João, à Ana Carvalho e à Patrícia Moura pelo convívio, pelo companheirismo e pelo entusiasmo.

À Andreia Ferreira pela motivação, pela amizade, pela coragem, pela dedicação, pela confidencialidade e pelo apoio incondicional.

Ao Manata pela colaboração e ajuda indispensável, pelo apoio informático e pela dedicação.

A toda a minha família, em especial aos meus pais e avós que sempre apoiaram, encorajaram e incentivaram.

Muito obrigada a todos!

Resumo

O trabalho centrou-se na (1) seleção do binómio de temperatura/tempo do pré-tratamento térmico realizado às matérias-primas, (2) otimização da formulação de polpas de hortofrutícolas, (3) seleção das condições de pasteurização a aplicar no produto final e (4) avaliação das alterações de qualidade da polpa sem tratamento (ST) e pasteurizada (TT) acondicionada em embalagem transparente (T) e opaca (O), e mantida sob condições de refrigeração ou congelação. As polpas foram avaliadas em termos físico-químicos, bioquímicos, microbiológicos, reológicos e sensoriais. A polpa otimizada é constituída por uma base de maçã (41 %) e ananás (31 %), na qual se introduziu couve (8%), abóbora (10%) e banana (10%). Foram aplicados os seguintes binómios temperatura/tempo dos pré-tratamentos térmicos: 100 °C/5 minutos para a couve, 90 °C/ 6 minutos para a abóbora e 100 °C/ 1 minuto para a maçã *Fuji* e 1,5 minutos para variedade *Granny Smith*. O binómio tempo/temperatura de pasteurização estabelecido foi de 75 °C/ 90 segundos. Sob refrigeração a polpa desenvolvida apresentou um período de vida útil de 7 e 14 dias para as embalagens transparente e opaca, respetivamente. Na condição de congelação a qualidade foi mantida sem alterações significativas durante 60 dias.

Palavras-chave: Polpa de hortofrutícolas, componente bioativa, tratamento térmico, refrigeração, congelação, qualidade.

Abstract

The present study consisted of (1) selection of pre-treatment adequate temperature/time binomial applied to the raw material, (2) optimization of fruit and vegetables pulps formulation, (3) selection of pasteurization conditions to be applied to the end product, (4) evaluation of untreated pulp (ST) and pasteurized pulp (TT) modifications, with utilization of transparent (T) and opaque (O) packaging, and maintained in refrigerated or in frozen conditions. Pulps were monitored for physicochemical, biochemical, microbiological, rheological and sensory parameters. The optimized pulp consists in an apple base (41 %) and pineapple (31 %), to which cabbage (8%), pumpkin (10%) and banana (10%) were introduced. The temperature/time binomial of the thermal pre-treatments are specific for each raw-material (100 °C/ 5 minutes for cabbage, 90 °C/ 6 minutes for pumpkin and 100 °C/ 1 minute for "Fuji" apple and 1,5 minutes for the *Granny Smith* variety). The established pasteurization temperature/time binomial was 75 °C/ 90 seconds. The developed pulp in transparent and opaque packaging under refrigeration showed a shelf-life of 7 and 14 days, respectively. In frozen storage, quality maintenance is more dependent of storage time and no significant changes were observed for 60 days.

Keywords: Fruit and vegetables pulp, bioactive component, thermal treatment, refrigeration, freezing, quality.

Extended Abstract

Consumers have been showing an increasing concern with health and nowadays they are more and more aware of the benefits of fruits and vegetables. Fresh and minimally processed products consumption is in expansion because consumers have found in these products a way to maintain or improve their wellness. Fruit and vegetable pulps arise as high quality products, safe, practical, nutritive, tasty and chemical preservatives and colorants free.

Production process, like milling, accelerates degradation reactions by allowing contact of different cellular components. In order to minimize this, it is essential to establish unitary conservation operations.

The present work goals were: (1) selection of pre-treatment adequate temperature/time binomial applied to the raw material, (2) optimization of fruit and vegetables pulps formulation, (3) selection of pasteurization conditions to be applied to the pulp that induces minor nutritional alterations (vitamin C), bioactive compounds (total phenolic compounds), color and greater reduction of microbial load, and also (4) evaluation of untreated pulp (ST) and pasteurized pulp (TT) modifications, with utilization of transparent (T) and opaque (O) packaging, and maintained in refrigerated or in frozen conditions.

The pre-treatments (steam and water immersion) and pasteurization treatments (water immersion) were stabilization processes used to reduce microbial load and enzymatic activity. The experimental development started with raw material characterization followed by the evaluation of thermal pre-treatments impact on the degree of color degradation, peroxidase (POD) enzymatic activity and cabbage, pumpkin and apple bioactive compounds modification.

Subsequently, pulps were submitted to different thermal treatment conditions in order to define the temperature/time binomial that preserves fresh pulp characteristics, maintaining bioactive component integrity (total phenolic content and antioxidant activity), nutritional (vitamin C), color stability and reducing microbial load. The pasteurization temperature/time binomial that fulfilled the previous requirements was 75 °C/ 90 seconds.

The analytical protocol included physicochemical analysis (color, soluble solids content, pH, phenolic compounds, antioxidant activity, ascorbic acid and phase's separation), sensory analysis [(color, aroma (fruity and sweet), taste (acidity and sweet), texture (lumpiness and homogeneity), global appreciation and buying intention], biochemical [(enzymatic activity of peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO)], microbiological (total mesophilic count, yeast and molds), rheological (viscosity) during refrigerated storage (0, 3, 7 e 14 days) and frozen storage (0, 30 e 60 days).

Storage conditions and packaging are essential factors to control product quality during storage, reducing degradation reactions. Samples in refrigerated conditions ($\approx 5^{\circ}\text{C}$) showed some changes, caused by storage time, only limited by sensory evaluation of the product. Transparent packages maintained acceptable conditions for consumption until day 7, while opaque packages reached 14 days of storage.

In frozen storage ($\approx -18^{\circ}\text{C}$) fresh product characteristics and pulps integrity were influenced by the time of storage, independently of the type treatment and packaged used. Freezing allowed a more efficient conservation towards refrigeration with respect to color and bioactive compounds.

The present study allowed to develop a fruit and vegetables pulp, which is stable and has a good acceptance by the tasters.

Keywords: Fruit and vegetables pulp, bioactive component, thermal treatment, refrigeration, freezing, quality

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	III
EXTENDED ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....	2
1 PRODUTOS HORTOFRUTÍCOLAS E DERIVADOS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA.....	2
2 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	2
2.1 <i>Compostos fenólicos</i>	3
2.2 <i>Carotenóides</i>	3
2.3 <i>Clorofilas</i>	6
2.4 <i>Glucosinolatos</i>	9
2.5 <i>Ácido ascórbico</i>	10
3 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.....	13
3.1 <i>Maçã</i>	13
3.2 <i>Ananás</i>	13
3.3 <i>Couve</i>	13
3.4 <i>Abóbora</i>	14
3.5 <i>Banana</i>	14
3.6 <i>Kiwi</i>	14
4 PROCESSOS DEGRADATIVOS DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS HORTOFRUTÍCOLAS. IMPLICAÇÕES E PROCESSOS DE CONSERVAÇÃO.....	15
4.1 <i>Degradação enzimática</i>	16
4.2 <i>Degradação microbiológica</i>	17
DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	18
5 MATERIAIS E MÉTODOS ANALÍTICOS.....	18
5.1 <i>Matérias-primas</i>	18
5.2 <i>Métodos analíticos</i>	18
5.2.1 <i>Determinações Físico-químicas</i>	18
5.2.1.1 <i>Cor</i>	18
5.2.1.2 <i>Teor de sólidos solúveis (TSS)</i>	19

5.2.1.3	pH	19
5.2.1.4	Preparação do extrato para a determinação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante ¹⁹	
5.2.1.4.1	Compostos fenólicos	20
5.2.1.4.2	Capacidade antioxidante	20
5.2.1.5	Humidade	20
5.2.1.6	Ácido ascórbico	20
5.2.1.7	Separação de fases	20
5.2.2	Determinações bioquímicas	20
5.2.2.1	Análise qualitativa da atividade enzimática da peroxidase (POD)	20
5.2.2.2	Análise quantitativa da enzima polifenoloxidase (PPO)	21
5.2.3	Determinações microbiológicas	21
5.2.3.1	Mesófilos totais	21
5.2.3.2	Bolores e leveduras	21
5.2.4	Determinações reológicas	22
5.2.5	Análise sensorial	22
5.2.6	Tratamento estatístico dos resultados	22
6	CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS	23
6.1	<i>Resultados e discussão</i>	23
6.1.1	Cor	23
6.1.2	Teor de sólidos solúveis (TSS) e pH	24
6.1.3	Compostos fenólicos	24
6.1.4	Capacidade Antioxidante	25
6.1.5	Humidade	25
6.1.6	Balanço intercalar	25
7	ESTABELECIMENTO DE PRÉ-TRATAMENTOS TÉRMICOS DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA	26
7.1	<i>Resultados e discussão</i>	26
7.1.1	Teste da peroxidase	26
7.1.1.1	Maçã	26
7.1.1.2	Couve	28
7.1.1.3	Abóbora	28
7.1.2	Compostos fenólicos	29
7.1.3	Capacidade antioxidante	29
7.1.4	Balanço intercalar	30
8	DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES	31
8.1	<i>Resultados e discussão</i>	32
8.1.1	Análise Sensorial	33
8.1.2	Cor	34
8.1.3	Teor de sólidos solúveis (TSS) e pH	35
8.1.4	Compostos fenólicos	36
8.1.5	Capacidade antioxidante	37
8.1.6	Balanço intercalar	37

9	ESTABELECIMENTO DO BINÓMIO TEMPO-TEMPERATURA DE PASTEURIZAÇÃO DA POLPA	38
9.1	<i>Resultados e discussão</i>	38
9.1.1	Cor	38
9.1.2	Ácido ascórbico	40
9.1.3	Mesófilos totais	41
9.1.4	Análise multivariada	42
9.1.5	Balanço intercalar	44
10	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA ÚTIL DE POLPA EMBALADA EM DOIS TIPOS DE MATERIAL, SOB CONDIÇÕES DE REFRIGERAÇÃO E DE CONGELAÇÃO	45
10.1	<i>Polpa conservada sob refrigeração</i>	45
10.1.1	Resultados e discussão	45
10.1.1.1	Cor	46
10.1.1.2	Determinações reológicas	47
10.1.1.3	Compostos fenólicos	47
10.1.1.4	Capacidade antioxidante	48
10.1.1.5	Análise sensorial	49
10.1.1.6	Teor de sólidos solúveis (TSS) e pH	50
10.1.1.7	Separação de fases	51
10.1.1.8	Mesófilos totais	51
10.1.1.9	Bolores e leveduras	52
10.1.1.10	Ácido ascórbico	53
10.1.1.11	Atividade enzimática: Polifenoloxidase (PPO)	53
10.1.1.12	Análise multivariada	54
10.1.1.13	Balanço intercalar	57
10.2	<i>Polpa conservada sob congelação</i>	57
10.2.1	Resultados e discussão	57
10.2.1.1	Cor	57
10.2.1.2	Determinações reológicas	58
10.2.1.3	Compostos fenólicos	58
10.2.1.4	Capacidade antioxidante	59
10.2.1.5	Análise sensorial	59
10.2.1.6	Teor de sólidos solúveis (TSS) e pH	60
10.2.1.7	Separação de fases	61
10.2.1.8	Mesófilos totais	62
10.2.1.9	Bolores e Leveduras	62
10.2.1.10	Ácido ascórbico	63
10.2.1.11	Atividade enzimática: Polifenoloxidase (PPO)	64
10.2.1.12	Análise multivariada	64
10.2.1.13	Balanço intercalar	67
11	CONCLUSÕES GERAIS	68
12	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
13	BIBLIOGRAFIA	70

ANEXOS I

ANEXO I - FOLHA DE ANÁLISE SENSORIAL DAS POLPAS HORTOFRUTÍCOLAS. II

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Critérios de classificação da diferença total de cor (DTC).....	19
Tabela 2 - Resultado/Interpretação da coloração ou não das amostras.....	21
Tabela 3 - Tabela de valores de pH e teor de sólidos solúveis (° Brix) das matérias-primas.....	24
Tabela 4 - Teor de humidade (%) das matérias-primas.....	25
Tabela 5 - Tabela de valores de pH e teor de sólidos solúveis (TSS, ° Brix) das polpas.....	36
Tabela 6 – Binómios de temperatura/tempo testados no tratamento térmico de pasteurização.....	38
Tabela 7 - Valores próprios e extração das componentes principais.....	42
Tabela 8 - Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e as duas primeiras componentes principais.....	42
Tabela 9 - Valores próprios e extração das componentes principais.....	54
Tabela 10 - Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.....	55
Tabela 11 - Valores próprios e extração das componentes principais.....	65
Tabela 12 - Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e as duas primeiras componentes principais.....	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação das estruturas isopreno (A), Licopeno (B), β -ionona (C), luteína (D), α - caroteno (E) e β - caroteno (F).....	4
Figura 2 - Relação dos carotenóides com a prevenção de doenças crónicas.....	5
Figura 3 - Representação da estrutura da clorofila (A) onde R= -CH ₃ na clorofila a e R= - HC=O na clorofila b, da porfina (B) e da metaloporfina (C)	7
Figura 4 - Alterações das clorofilas em função do pH.....	8
Figura 5 - Representação da oxidação do ácido ascórbico.....	11
Figura 6 - Parâmetros de cor das matérias-primas: L* (A), a* (B), b* (C) e tonalidade (D).....	23
Figura 7 – Teor de compostos fenólicos totais (mg EAC.100 g ⁻¹) presentes nas matérias-primas.....	24
Figura 8 – Capacidade antioxidante (μ mol Trolox.100 g ⁻¹) nas matérias-primas	25
Figura 9- Representação das formas utilizadas para a aplicação dos pré-tratamentos térmicos: (A) couve, (B) abóbora e (C) maçã.....	26
Figura 10 - Resultados do teste da peroxidase em maçã <i>Fuji</i> submetida a diferentes pré-tratamentos térmicos.	27
Figura 11 - Resultados do teste da peroxidase em maçã <i>Granny Smith</i> submetida a diferentes pré-tratamentos térmicos.	27
Figura 12 - Resultados do teste da peroxidase em couve portuguesa submetida a diferentes pré-tratamentos térmicos.....	28
Figura 13 - Resultados do teste da peroxidase em abóbora submetida a diferentes pré-tratamentos térmicos.	29
Figura 14 - Compostos fenólicos totais (mg EAC.100 g ⁻¹) nas matérias-primas frescas e após os pré-tratamentos...29	
Figura 15 - Capacidade antioxidante (μ mol Trolox.100 g ⁻¹) nas matérias-primas frescas e após os pré-tratamentos30	
Figura 16- Processo de desenvolvimento da polpa	31
Figura 17 - Diagrama de processamento da polpa.....	32
Figura 18 - Polpa após trituração.	32
Figura 19 - Representação gráfica dos resultados da análise sensorial de polpas com maçã da variedade Fuji: <i>Fuji 1</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₂₀), <i>Fuji 2</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀) e <i>Fuji 3</i> (M ₃₆ A ₂₆ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀ Kiwi ₁₀).....	33
Figura 20 - Representação gráfica dos resultados da análise sensorial de polpas com maçã da variedade Granny Smith: <i>Granny Smith 1</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₂₀), <i>Granny Smith 2</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀) e <i>Granny Smith 3</i> (M ₃₆ A ₂₆ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀ Kiwi ₁₀).....	33
Figura 21 - Parâmetro de cor das polpas (A) L*, (B) a* e (C) b*: <i>Fuji 1</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₂₀), <i>Fuji 2</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀), <i>Fuji 3</i> (M ₃₆ A ₂₆ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀ Kiwi ₁₀), <i>Granny Smith 1</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₂₀), <i>Granny Smith 2</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀) e <i>Granny Smith 3</i> (M ₃₆ A ₂₆ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀ Kiwi ₁₀).....	34
Figura 22 - Representação fotográfica das polpas nos dias 0 e 1: <i>Fuji 1</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₂₀), <i>Fuji 2</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀), <i>Fuji 3</i> (M ₃₆ A ₂₆ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀ Kiwi ₁₀), <i>Granny Smith 1</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₂₀), <i>Granny Smith 2</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀) e <i>Granny Smith 3</i> (M ₃₆ A ₂₆ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀ Kiwi ₁₀).....	35
Figura 23 - Compostos fenólicos (mg EAC.100 g ⁻¹) totais presentes nas polpas: <i>Fuji 1</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₂₀), <i>Fuji 2</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀), <i>Fuji 3</i> (M ₃₆ A ₂₆ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀ Kiwi ₁₀), <i>Granny Smith 1</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₂₀), <i>Granny Smith 2</i> (M ₄₁ A ₃₁ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀) e <i>Granny Smith 3</i> (M ₃₆ A ₂₆ Couv ₈ Ab ₁₀ Ban ₁₀ Kiwi ₁₀).....	36

Figura 24 - Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.100 g}^{-1}$) nas polpas: <i>Fuji 1</i> ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}A_{b20}$), <i>Fuji 2</i> ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}A_{b10}B_{an10}$), <i>Fuji 3</i> ($M_{36}A_{26}C_{ouV_8}A_{b10}B_{an10}K_{iwi10}$), <i>Granny Smith 1</i> ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}A_{b20}$), <i>Granny Smith 2</i> ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}A_{b10}B_{an10}$) e <i>Granny Smith 3</i> ($M_{36}A_{26}C_{ouV_8}A_{b10}B_{an10}K_{iwi10}$).....	37
Figura 25 - Parâmetros de cor das polpas <i>Fuji 2</i> ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}A_{b10}B_{an10}$) sujeitas a diferentes binômios tempo/ temperatura: L^* (A), a^* (B), b^* (C) e tonalidade (D).	39
Figura 26 - Representações fotográficas das polpas após os diferentes tratamentos de pasteurização.....	40
Figura 27 - Teor de ácido ascórbico ($\text{mg ác. ascórbico.100g}^{-1}$) nas amostras frescas e sujeitas aos diferentes tratamentos térmicos	41
Figura 28 - Contagem de mesófilos totais nas polpas sujeitas a diferentes binômios tempo/ temperatura.....	41
Figura 29 - Projeção dos atributos no plano.....	43
Figura 30 - Projeção das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.....	43
Figura 31 - Diagrama de cluster.	44
Figura 32 - Embalagens de polpas: (A) sem proteção à luz (transparente, T), (B) com proteção à luz (opaca, O)....	45
Figura 33 - Parâmetros de cor das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O): L^* (A), a^* (B).....	46
Figura 34 - Compostos fenólicos totais (mg EAC.100 g^{-1}) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).	48
Figura 35 - Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.100 g}^{-1}$) das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	48
Figura 36 - Resultado da análise sensorial das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O): (A) dia 0, (B) dia 3, (C) dia 7 e (D) dia 14.	49
Figura 37 - Valores de pH (A) e teor de sólidos solúveis (TSS, ° Brix, B) nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	50
Figura 38 - Representações fotográficas das alterações das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O) ao longo do armazenamento em refrigeração ($\approx 3^\circ\text{C}$).	51
Figura 39 - Contagem dos mesófilos totais (Log UFC.mL^{-1}) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	52
Figura 40 - Contagem de bolores e leveduras (Log UFC.mL^{-1}) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT): (A) embaladas sem proteção à luz (T) e (B) com proteção à luz (O).....	52
Figura 41 - Teor de ácido ascórbico ($\text{mg ác. ascórbico.100g}^{-1}$) presente nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	53
Figura 42 - Valores de atividade enzimática (PPO, U.g^{-1}) presente nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).	54
Figura 43 - Projeção dos atributos no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.	55
Figura 44 - Projeção das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.....	56
Figura 45 - Diagrama de cluster.	56
Figura 46 - Parâmetros de cor das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O): L^* (A) e a^* (B).....	57
Figura 47 - Compostos fenólicos totais (mg EAC.100 g^{-1}) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	59

Figura 48 - Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.100 g}^{-1}$) das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	59
Figura 49 – Resultados da análise sensorial das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O): (A) dia 0, (B) dia 30 e (C) dia 60.	60
Figura 50 - Valores de pH (A) e teor de sólidos solúveis (TSS, ° Brix, B) nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	61
Figura 51 - Representações fotográficas das alterações das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O) ao longo do armazenamento em congelamento ($\approx -18^{\circ}\text{C}$).....	61
Figura 52 – Contagem dos mesófilos totais (Log UFC.mL^{-1}) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	62
Figura 53 - Contagem de bolores e leveduras (Log UFC.mL^{-1}) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	63
Figura 54 - Teor de ácido ascórbico ($\text{mg ác. ascórbico.100g}^{-1}$) presente nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).....	63
Figura 55 - Valores de atividade enzimática (PPO, U.g^{-1}) presente nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).	64
Figura 56 - Projeção dos atributos no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.	66
Figura 57 - Projeção das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.....	66
Figura 58 - Diagrama de cluster.	67

Lista de Abreviaturas

- AE – Aroma: estranho
- AF – Aroma: frutado
- AG – Apreciação global
- AO – Antioxidantes ($\mu\text{mol Trolox.100g}^{-1}$)
- Cons – Consistência (Pa.s^n)
- DCV – Doenças cardiovasculares
- DMA – Degeneração ocular relacionada com a idade
- Fen tot – [Fenólicos totais] (mg EAC.100g^{-1})
- GA – Gosto: acidez
- GD – Gosto: doce
- GE – Gosto: estranho
- IC – Intenção de compra
- O – Embalagem opaca
- ST – Sem tratamento térmico
- T – Embalagem transparente
- TF – Textura: fibrosidade
- TH – Textura: homogeneidade
- TSS – Teor de sólidos solúveis
- TT – Tratamento térmico
- VIH – Vírus de imunodeficiência humana
- Vit C – Vitamina C

Introdução

O aumento da consciencialização por parte do consumidor relativamente à importância do consumo de alimentos saudáveis na prevenção de doenças e melhoria da qualidade de vida, tem promovido o aumento do consumo de frutos, hortícolas e produtos derivados (Müller *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2011). Os consumidores preferem adquirir alimentos de elevada qualidade com características próximas dos frutos e hortícolas frescos, seguros e sem adição de conservantes (Allende *et al.*, 2006; Cortés *et al.*, 2008). De forma a satisfazer os apelos dos consumidores, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma polpa à base de hortofrutícolas, com boa aceitabilidade por parte dos consumidores, rica em compostos bioativos e estável físico-química e microbiologicamente sem adição de químicos. Este produto poderá ser importante para a indústria pois é um produto de valor acrescentado preparado a partir de matérias-primas subvalorizadas para o consumo em fresco, em especial a maçã. Os frutos utilizados para a preparação desta polpa poderão não apresentar as características (calibre, aspeto, cor) requeridas para o consumo em fresco.

Para ir de encontro às expectativas dos consumidores, a polpa foi preparada a partir de matérias-primas fresca, sem adição de conservantes, tendo sofrido um tratamento térmico por forma a garantir a estabilidade microbiológica no produto final, sem comprometer outros parâmetros de qualidade, nomeadamente as características sensoriais.

As matérias-primas utilizadas em maior proporção para a obtenção da polpa foram a maçã (*Malus domestica*) e o ananás (*Ananas cosmosus* L.). Posteriormente, no sentido de aumentar o valor bioativo ao produto final optou-se pela adição de couve portuguesa (*Brassica oleracea* L.), naturalmente rica em glucosinolatos, a abóbora (*Cucurbita maxima*), a banana (*Musa cavendish*) e o kiwi (*Actinidea deliciosa*), que contêm compostos benéficos para a saúde. A polpa a desenvolver ao longo deste trabalho apresenta características singulares e benéficas, comparativamente às polpas vulgarmente encontradas no mercado, provenientes sobretudo de frutos. A adição de hortícolas à polpa pronta a consumir pode ser uma mais-valia para o produto vingar no mercado, dado ser uma forma conveniente de veicular este tipo de produtos, para além de a tornar apetecível a uma gama mais alargada de consumidores. O consumidor poderá encontrar no produto uma forma simples de consumir estes hortícolas associados a fruta numa polpa agradável, saborosa e aromática. Este trabalho desenvolveu-se no âmbito do Projeto QREN CONVIT09 - Polpas de frutos e hortícolas de elevada bioatividade e conveniência.

ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1 Produtos hortofrutícolas e derivados na alimentação humana

Ao longo dos anos tem surgido uma crescente preocupação com a saúde, sendo os alimentos funcionais cada vez mais procurados por um consumidor exigente que tem cada vez menos tempo, que procura produtos convenientes, prontos a consumir, inovadores e com elevada qualidade. O aspeto, a cor, a textura e o sabor são critérios decisivos que devem permanecer ao longo do tempo de prateleira pois são avaliados pelo consumidor no momento da compra (Landl *et al.*, 2010).

Ao longo do tempo tem surgido interesse em compostos que protejam a saúde, estes compostos são designados como compostos bioativos. Estes influenciam pouco o valor nutritivo, mas desempenham papéis importantes na saúde humana (Oszmianski *et al.*, 2011). Alguns estudos associam o elevado consumo de hortícolas a um menor risco de doenças crónicas degenerativas tais como o cancro, doenças cardiovasculares (Machlin, 1995), degeneração ocular relacionada com a idade (Bone *et al.*, 2000), diabetes e osteoporose (Rao *et al.*, 2007). No sentido de prevenir estas doenças, tem-se apelado ao aumento do consumo à base de produtos hortofrutícolas, uma vez que são fontes de compostos biologicamente ativos (Rao & Rao, 2007).

A introdução de diferentes frutos e hortícolas na polpa origina uma mistura interessante de compostos bioativos com benefícios para a saúde, como descrito no ponto 3 (matérias-primas utilizadas no presente estudo). As diferentes matérias-primas contribuem para o valor bioativo, pois cada fruto e hortícola colabora de uma forma notável e diversificada as propriedades da polpa.

2 Compostos bioativos

Como referido anteriormente, o consumidor dos dias de hoje tem consciência do impacto de uma alimentação saudável para a sua saúde. Por esta razão, o desenvolvimento de produtos ricos em compostos bioativos tem vindo a aumentar, pois para além dos benefícios para a saúde previnem ainda o aparecimento de certas doenças.

Segundo a European Food Information Resource Network, os compostos bioativos são constituintes não nutritivos intrínsecos aos produtos vegetais que promovem a saúde e apresentam efeitos benéficos quando são ingeridos (Gry *et al.*, 2007).

Os radicais livres têm assumido importância devido à contribuição para a disseminação de doenças crónicas degenerativas (Bray, 2000). O desenvolvimento de radicais livres no corpo deve-se aos processos metabólicos, às condições ambientais, aos processos inflamatórios, à irradiação com chumbo e à radiação (ultravioleta e infravermelhos) (Lachance *et al.*, 2001; Halliwell, 2006). Os níveis elevados de radicais livres podem causar stress oxidativo, envelhecimento da pele e cancro (Sander *et al.*, 2004).

Assim o corpo para se proteger desenvolveu uma proteção natural devido aos carotenóides, vitaminas, enzimas e outras substâncias ativas que interagem sinergicamente como corrente protetora para evitar a ação destrutiva dos radicais livres (Meinke *et al.*, 2010). O stress oxidativo é induzido por espécies reativas de oxigénio que são produzidas pela atividade metabólica normal e pelo estilo de vida, sendo estes efeitos nocivos minimizados pelo consumo de antioxidantes (Rao & Rao, 2007). Os carotenóides e as clorofilas desempenham um papel importante na prevenção de várias doenças associadas ao stress oxidativo, como o cancro, as doenças cardiovasculares e outras doenças crónicas (Sangeetha & Baskaran, 2010).

2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo de metabolitos secundários distribuídos pelo reino vegetal (Treutter, 2005; Hagen *et al.*, 2009). Dentro deste grupo encontram-se os compostos bioativos que possuem elevada capacidade antioxidante (Wolfe *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011) que apresentam efeitos benéficos para a saúde, e que estão presentes nas plantas medicinais, em legumes, em frutas, em grãos e outras sementes (Halliwell & Gutteridge, 1999). Estes compostos podem ser divididos em vários sub-grupos como ácidos, ácido benzóico, flavonóis, flavonas, flavonóides, dihidrochalconas, dihidroflavonóis e antocianinas (Treutter, 2005).

Estes protegem contra a ação nociva das espécies reativas de oxigénio, principalmente os radicais livres de oxigénio (Halliwell & Gutteridge, 1999). Os radicais livres são produzidos dependendo das condições patológicas e estão envolvidos no desenvolvimento das doenças crónicas degenerativas, como doenças cardiovasculares e cancro (Block *et al.*, 1992; Halliwell & Gutteridge, 1999). Os compostos fenólicos com efeitos favoráveis para a saúde são, por exemplo, a curcumina, o resveratrol, que são utilizados comercialmente, mas o consumo é relativamente raro (Huang *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos apresentam efeitos biológicos que impedem a oxidação das proteínas de baixa densidade, retardam o vírus de imunodeficiência humana e apresentam capacidades anti microbianas e anti carcinogénicas (Cadenas & Packer, 2002; Chun *et al.*, 2005). Estes compostos têm despertado interesse por desempenharem um papel importante na prevenção de doenças degenerativas, em especial o cancro e as doenças cardiovasculares (Kroon & Williamson, 2005). Os benefícios dos compostos fenólicos na saúde estão relacionados com o elevado poder antioxidante, com a participação na expressão genética e na sinalização celular através da ligação a transportadores e receptores celulares (Kroon & Williamson, 2005; Han *et al.*, 2007; Stevenson & Hurst, 2007; Reddy *et al.*, 2010; Sancho *et al.*, 2011).

A capacidade antioxidante tem adquirido importância devido às funções e ao interesse dos antioxidantes naturais em sistemas alimentares e biológicos. Os antioxidantes naturais podem agir contra as espécies reativas por diferentes mecanismos (Othman *et al.*, 2008). As reações de oxidação dos radicais livres, que são moléculas com eletrões não emparelhados, contribuem para o decréscimo de muitos problemas de saúde, como o cancro, doenças cardiovasculares, problemas inflamatórios e de envelhecimento (Kehrer, 1993). Os antioxidantes são agentes que podem limitar os efeitos prejudiciais das reações de oxidação ou dos radicais livres, prevenindo a formação destes ou eliminando-os sem causar danos induzidos pelos mesmos (DiSilvestro, 2001). Os antioxidantes também podem prevenir ou retardar a degradação oxidativa dos lípidos, das proteínas e dos ácidos nucleicos através das espécies reativas de oxigénio (Insel *et al.*, 2002).

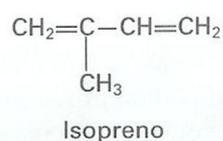
2.2 Carotenóides

O nome carotenóides é derivado do nome científico da cenoura *Daucus carota* L. (Ribeiro & Seravalli, 2007). Os carotenóides são pigmentos que apresentam o intervalo de cores: amarelo a vermelho encontrando-se em abundância na natureza, junto das clorofilas presentes nas plantas e nos microrganismos. Os animais não sintetizam carotenóides, mas podem ingerir os pigmentos a partir dos alimentos e absorvê-los (Quirós *et al.*, 2006; Ribeiro & Seravalli, 2007). O interesse de estudar estes compostos deve-se às suas funções fisiológicas e biológicas (Berg *et al.*, 2000), pois os frutos e hortícolas constituem a maior fonte de carotenóides na alimentação humana (Johnson, 2002).

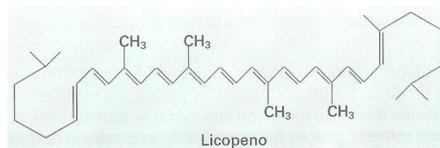
Os carotenóides assumem grande importância nos alimentos, pois estão associados a critérios de qualidade, nomeadamente a cor, podendo sofrer algumas modificações com o processamento (Chen *et al.*, 1995). O tipo e a concentração de carotenóides presentes nas frutas e hortícolas dependem de vários fatores como: a variedade genética, a maturidade, o manuseamento pós-colheita, o processamento e o armazenamento (Quirós *et al.*, 2006).

A estrutura básica dos carotenóides é constituída por oito unidades de isopreno (Figura 1-A) unidas de tal forma que ocorre uma reversão na parte central da molécula e os dois grupos metílicos centrais ficam separados por três carbonos (Ribeiro & Seravalli, 2007). A partir de fontes naturais já se identificaram e isolaram mais de 600 carotenóides (Pfander, 1987; Rao & Rao, 2007), os quais podem ser divididos em carotenos e xantofilas (Quirós *et al.*, 2006; Ribeiro & Seravalli, 2007). Os carotenos são compostos constituídos por carbono e hidrogénio e as xantofilas são derivados de hidrocarbonetos oxigenados obtidos por oxidação dos carotenos com formação dos grupos: hidroxilo, metoxilo, carboxilo e cetona (Quirós *et al.*, 2006; Ribeiro & Seravalli, 2007).

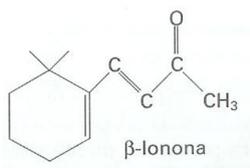
(A) isopreno



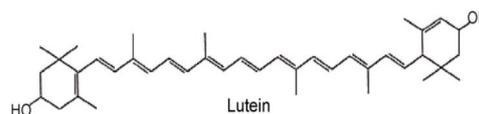
(B) Licopeno



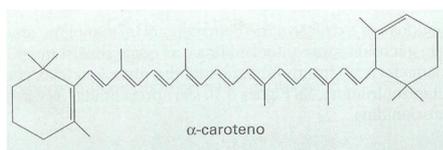
(C) β-ionona



(D) Luteína



(E) α-caroteno



(F) β-caroteno

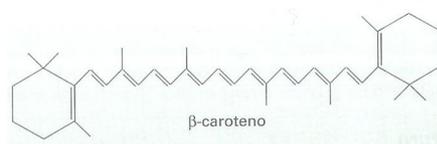


Figura 1 - Representação das estruturas isopreno (A), Licopeno (B), β-ionona (C), luteína (D), α-caroteno (E) e β-caroteno (F) (Rao & Rao, 2007; Ribeiro & Seravalli, 2007).

A estrutura característica do carotenóide é um sistema de duplas ligações conjugadas que tem influência ao nível das propriedades químicas, bioquímicas e físicas. Estas ligações influenciam a cor e para a cor amarela são necessárias no mínimo, sete ligações conjugadas. O aumento no número de ligações conjugadas origina bandas de absorção e comprimentos de onda maiores, havendo alteração da cor amarela para vermelha. A estrutura fundamental dos carotenóides pode ser representada pelo pigmento do tomate, o licopeno (Figura 1-B), a partir do qual se obtém outras estruturas devido à reação de hidrogenação, ciclização, oxidação ou combinação destas (Ribeiro & Seravalli, 2007).

Os principais carotenóides encontrados em folhas verdes são a luteína (Figura 1-D), violaxantina, zeaxantina e neoxantina (Landrum & Bone, 2001; Ribeiro & Seravalli, 2007). Durante a maturação dos frutos são produzidas elevadas quantidades de carotenóides em presença de luz, sendo o α e β-caroteno e as xantofilas os mais frequentes (Ribeiro & Seravalli, 2007). Alguns carotenóides são uma fonte importante de precursores da vitamina A,

denominados pró-vitamina A (Olson, 1994; Paiva & Russell, 1999). Apenas os carotenóides que contém a estrutura cíclica da β -ionona (Figura 1-C) apresentam atividade de pró-vitamina A, encontrando-se uma molécula de pró-vitamina A no α -caroteno e duas no β -caroteno (Figura 1-E e 1-F) (Ribeiro & Seravalli, 2007). Não existe um nível recomendado da ingestão dietética de carotenóides, mas é aconselhada a ingestão de vitamina A entre 700 e 1000 mg por dia de retinol equivalente (Murkovic *et al.*, 2002).

A atividade da pró-vitamina A de alguns carotenóides, tais como o β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno, a luteína e o licopeno diminuem o risco de doenças degenerativas e cardiovasculares, previnem catarata ocular degenerativa e a arteriosclerose, retardam o processo de envelhecimento, reduzem a incidência de cancro e de outras doenças como se pode observar na Figura 2 (Lee *et al.*, 2006; Wisniewska & Subczynski, 2006; Rao & Rao, 2007; Heinen *et al.*, 2007; Ribeiro & Seravalli, 2007). Os carotenóides são decompostos quando reagem com os radicais livres (Stahl & Sies, 2003), o que provoca a redução da proteção do organismo, que pode ser restituída com o consumo de alimentos ricos em compostos antioxidantes (Khachik *et al.*, 2002; Heinrich *et al.*, 2003).

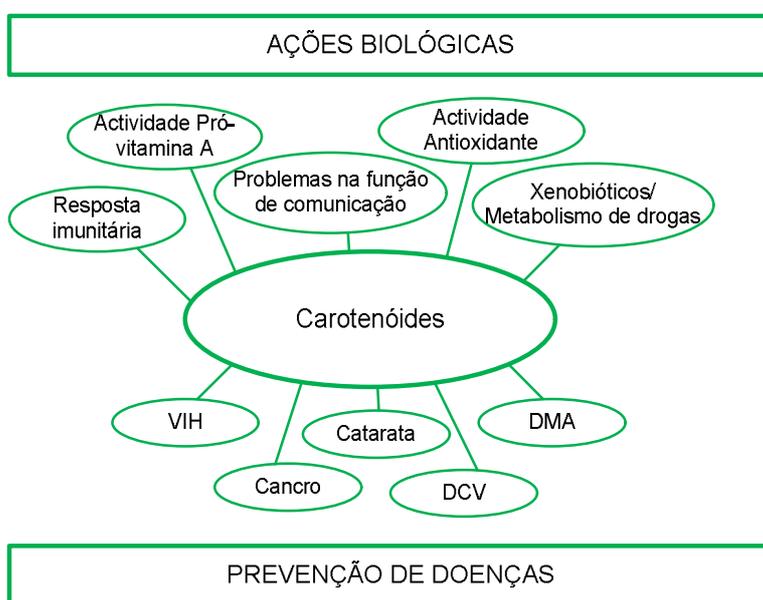


Figura 2 - Relação dos carotenóides com a prevenção de doenças crónicas adaptado de Rao *et al.*, (2007).

Os carotenóides apresentam funções antioxidantes (Figura 2) e promovem uma resposta imune por estes estarem envolvidos na comunicação celular e as xantofilas captarem os radicais livres (Krinsky, 1994). Os carotenóides são conhecidos por reagirem com o oxigénio e protegerem as células dos radicais livres (Nishino *et al.*, 2009), mas nem todos os carotenóides são antioxidantes (Ribeiro & Seravalli, 2007).

Os carotenóides são compostos solúveis em gordura, que se associam às frações lipídicas (Quirós *et al.*, 2006). Os carotenóides são solúveis em solventes orgânicos que possuem alguma estabilidade ao calor, perdem a cor por oxidação e são facilmente isomerizados pelo calor, pelo ácido ou pela luz (Ribeiro & Seravalli, 2007).

As duplas ligações podem ocorrer na forma *cis* ou *trans*, sendo a forma *trans* mais frequente na natureza. Os compostos com todas as ligações em *trans* apresentam uma cor mais escura, enquanto o aumento das ligações em *cis* resulta num enfraquecimento gradual da cor (Ribeiro & Seravalli, 2007).

Os carotenóides possuem duplas ligações na cadeia de carbono que provocam sensibilidade a algumas reações como a oxidação e a isomerização (*cis-trans*) durante o processamento e armazenamento de alimentos devido à

presença de luz, calor, ácidos e oxigênio que causam perda de cor e redução da atividade biológica (Rodríguez-Amaya, 1999; Rao & Rao, 2007; Ribeiro & Seravalli, 2007).

A estabilidade dos carotenóides também pode ser afetada por vários fatores, como a estrutura molecular do carotenóide, a concentração do oxigênio, a presença de metais, a exposição à luz, a severidade do tratamento térmico, a matriz do alimento, entre outros, que leva à rejeição dos produtos por parte do consumidor (Rodríguez-Amaya, 1999). O uso de carotenóides apresenta vantagens em relação a outros pigmentos porque não são afetados pela presença de ácido ascórbico ou por ciclos de aquecimento ou congelamento. Os carotenóides possuem extrema importância na alimentação devido às suas propriedades e à pressão dos consumidores mais exigentes contra os corantes artificiais (Gordon & Bouernfeind, 1982).

A oxidação é a principal causa da degradação dos carotenóides nos alimentos, estes são facilmente oxidados devido ao grande número de duplas ligações conjugadas que alteram a estabilidade dependendo do meio (Britton, 1995; Ribeiro & Seravalli, 2007). Em função da sua estrutura insaturada e conjugada, os produtos da degradação são muito complexos (Rodríguez-Amaya, 1999). A suscetibilidade à oxidação pode ser influenciada pela presença de luz, calor e pró-oxidantes quando os pigmentos são extraídos ou os tecidos sofrem danos físicos. Na maioria dos alimentos, os carotenóides são instáveis devido aos valores de pH entre 3 e 6. Estes também sofrem degradação oxidativa provocada por mecanismos indiretos como a enzima lipoxigenase que catalisa a oxidação de ácidos gordos insaturados para a produção de peróxidos, estes peróxidos reagem com os carotenos (Ribeiro & Seravalli, 2007).

2.3 Clorofilas

As clorofilas são a classe de pigmentos mais abundantes na natureza, essenciais ao processo de fotossíntese que se realiza nos tilacóides (Hooper *et al.*, 2007; Ribeiro & Seravalli, 2007; Schmid, 2008). Estes são responsáveis pela cor verde das frutas e hortícolas e são muito suscetíveis à degradação durante o processamento, resultando em alterações na cor dos alimentos (Schwartz *et al.*, 1983). Nos tecidos vegetais vivos, a clorofila está presente como suspensão coloidal nas células dos cloroplastos, associada com carotenóides, lípidos e proteínas (Ribeiro & Seravalli, 2007).

O processo de degradação das clorofilas inicia-se quando as clorofilas presentes nas membranas dos tilacóides contactam com a clorofilase (Matile *et al.*, 1997).

As clorofilas são suscetíveis à degradação por agentes químicos ou enzimáticos (Koca *et al.*, 2006), pois as ligações entre as moléculas são fracas e facilmente quebradas, tornando possível a extração de clorofilas dos tecidos vegetais através da maceração com solventes orgânicos (Ribeiro & Seravalli, 2007).

As diferenças de cor encontradas entre os vegetais são atribuídas à presença de outros pigmentos, particularmente os carotenóides que acompanham as clorofilas (Ferruzzi & Blakeslee, 2007; Ribeiro & Seravalli, 2007), como referido anteriormente. Ao longo da maturação dos frutos, a clorofila é degradada e a cor verde desaparece, enquanto a síntese de carotenóides aumenta (Ribeiro & Seravalli, 2007). A clorofila nos vegetais depende das condições edafo-climáticas, dos tratamentos pré e pós-colheita e do grau de processamento dos alimentos (Gross, 1991). Os vegetais que contêm clorofila são uma fonte de compostos bioativos, pois este pigmento apresenta 5 vezes mais pigmentos bioativos do que os carotenóides (Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

As clorofilas são porfirinas formadas pela adição de um quinto anel isocíclico ao núcleo porfina (Figura 3-B). A estrutura das clorofilas (Figura 3-A) difere em relação aos substituintes em torno do núcleo de porfina (Ribeiro &

Seravalli, 2007). As clorofilas mais importantes, denominadas *a* e *b*, são encontradas sempre na proporção de 3 clorofilas *a* para cada clorofila *b* nos tecidos dos vegetais verdes (von Elbe & Schwartz, 1996; Ferruzzi & Blakeslee, 2007; Ribeiro & Seravalli, 2007). A clorofila *a* difere da *b*, em função do radical presente C₃, sendo a clorofila *a* representada pela fórmula C₅₅H₇₂O₅N₄Mg, com radical metilo e a clorofila *b* representada pela fórmula C₅₅H₇₀O₆N₄Mg com radical formilo (Schwartz & Lorenzo, 1991; Ribeiro & Seravalli, 2007). A clorofila *a* é menos estável termicamente que a clorofila *b* (Schwartz & Lorenzo, 1991).

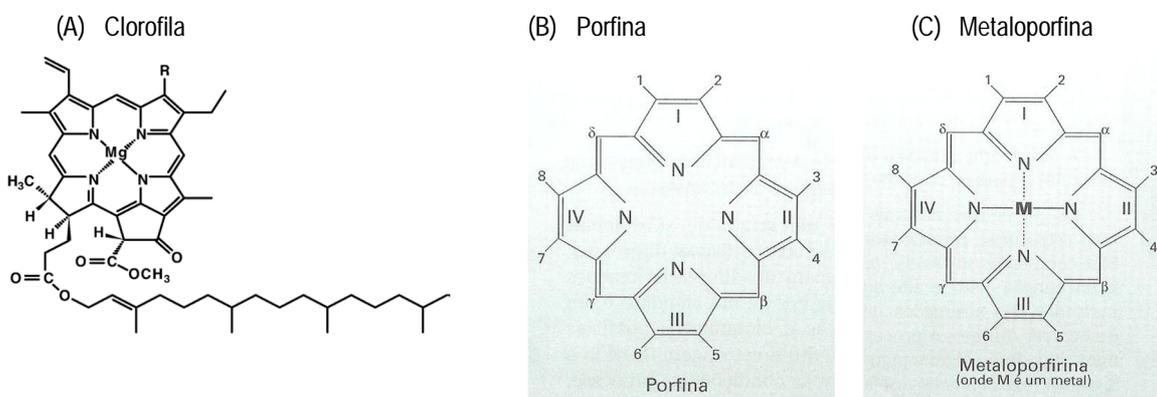


Figura 3 - Representação da estrutura da clorofila (A) onde R= -CH₃ na clorofila *a* e R= - HC=O na clorofila *b*, da porfina (B) e da metaloporfina (C) (Ferruzzi & Blakeslee, 2007; Ribeiro & Seravalli, 2007).

As clorofilas são alteradas quimicamente por vários fatores, tais como o pH, presença de metais bivalentes (Figura 3-C), aquecimento e enzimas (Schwartz & Lorenzo, 1990; Ribeiro & Seravalli, 2007). A principal causa de descoloração do verde durante o processamento é a conversão das clorofilas em feofitinas e pirofeofitinas por influência do pH, o verde dos legumes transforma-se em verde-azeitona quando sujeito a aquecimento ou colocado em soluções ácidas (Heaton & Marangoni, 1996; Gunawan & Barringer, 2000; Koca *et al.*, 2006). As alterações das clorofilas em função do pH estão representadas na Figura 4. As clorofilas em meio alcalino perdem o fitol, formando as clorofilidas, as quais são mais solúveis em água e apresentam a cor verde mais brilhante. Quando o meio alcalino é forte (pH >8), ocorre degradação da estrutura do vegetal devido à desmetoxilação da pectina alterando o sabor. Em meio ácido fraco as clorofilas perdem o íon magnésio, sendo este facilmente substituído por íons H⁺, formando as feofitinas e a coloração muda para verde-castanho. Em meio ácido forte, além da remoção do íon magnésio e sua substituição por prótons, a clorofila perde o fitol, formando feoforbídeos e ocorre posteriormente a degradação do vegetal devido à hidrólise da pectina (Ribeiro & Seravalli, 2007).

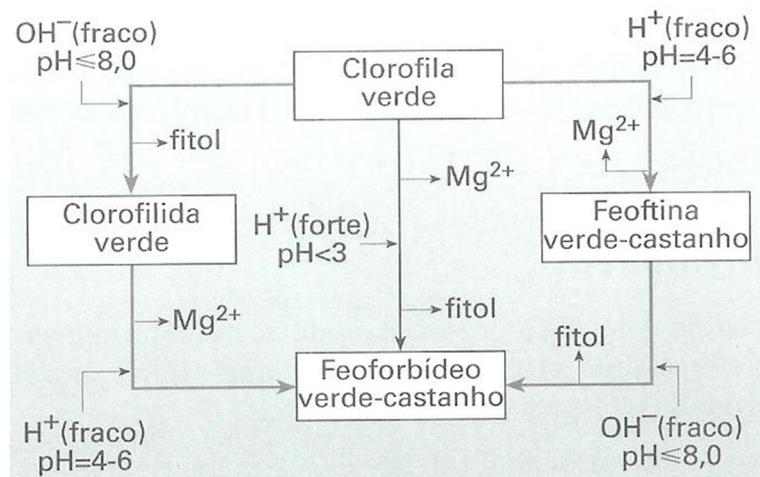


Figura 4 - Alterações das clorofilas em função do pH (Ribeiro & Seravalli, 2007).

O aquecimento provoca a desnaturação das proteínas que protegem a clorofila, os ácidos formados ou presentes no interior das células reagem com as clorofilas, pois perderam a proteção natural das proteínas (Ribeiro & Seravalli, 2007). Durante a reação os íons de hidrogénio transformam as clorofilas em feofitinas por substituição do íon magnésio no anel de porfirina com consequente alteração da cor original das clorofilas (Minguez-Mosquera *et al.*, 1989; Ribeiro & Seravalli, 2007). A manutenção da integridade dos pigmentos da polpa assume grande importância dado que a conversão da clorofila para feofitinas e feoforbídeo resulta na mudança de verde-claro a marcante verde-azeitona ou verde-azeitona-amarelo que é percebido pelo consumidor como perda de qualidade (Gupte *et al.*, 1963). A clorofila nos tecidos vegetais vivos está protegida da degradação pela luz durante a fotossíntese pelos lípidos e carotenóides associados. Uma vez que essa proteção é perdida na senescência, por extração do pigmento do tecido ou danos celulares durante o processamento, as clorofilas tornam-se susceptíveis à fotodegradação. Na presença de luz e oxigénio, as clorofilas são irreversivelmente perdidas e tornam-se incolores. Os produtos são poucos conhecidos, pensa-se que a fotodegradação resulte na abertura dos anéis pirrólicos e fragmentação em componentes menores (Ribeiro & Seravalli, 2007).

O íon magnésio é facilmente substituído por metais bivalentes como cobre e zinco, formando o complexo de cor verde brilhante, mais atraente que a cor original da clorofila (Ribeiro & Seravalli, 2007). Os sais bivalentes são adicionados antes do processamento térmico para promover a formação de complexos como a feofitina, a metalclorofila e a pirofeofitina e assim melhorar a cor do produto (Fischbach, 1943; Canjura *et al.*, 1999). Esses complexos são utilizados em conservas devido à maior estabilidade em soluções ácidas do que alcalinas (Ribeiro & Seravalli, 2007; Fischbach, 1943). O cobre forma complexos mais rápido que o zinco, não é absorvido, nessa forma, pelo organismo e a legislação permite um teor de cobre ionizável de 200 mg/L (Ribeiro & Seravalli, 2007).

As mudanças de cor no amadurecimento de frutos ou envelhecimento de vegetais são resultantes da degradação das clorofilas que mascaram a cor dos outros pigmentos. A clorofilase, uma esterase, é a enzima que catalisa a degradação da clorofila por remoção do fitol das clorofilas e das feofitinas, formando clorofilidas e feoforbidos, respetivamente. O feoforbídeo sofre uma clivagem do anel fluorescente que, posteriormente é convertido num composto não fluorescente (Ribeiro & Seravalli, 2007). Os derivados de clorofilidas também se formam em tratamentos térmicos suaves devido à atividade endógena da clorofilase a partir do aquecimento dos tecidos das plantas (Canjura *et al.*, 1991). O branqueamento inativa a clorofilase e as enzimas responsáveis pela senescência e

pela perda rápida da cor verde (Koca *et al.*, 2006). A atividade da enzima é reduzida, quando o tecido vegetal é aquecido a temperaturas acima de 80 °C e é perdida acima de 100 °C (Ribeiro & Seravalli, 2007).

No processamento de alimentos ricos em clorofilas, a substituição do magnésio por íons hidrogênio na presença de ácidos diluídos é a principal reação responsável pela alteração da cor desses alimentos (Ribeiro & Seravalli, 2007; LaBorde & von Elbe, 1994). Os principais métodos para evitar a formação de cor verde-castanho em frutas e hortícolas consistem na adição de substâncias alcalinas, como bicarbonato de sódio, hidróxido de magnésio, glutamato di-sódico e hidróxido de sódio ou na adição de tampões como o fosfato ou citrato de forma a neutralizar os ácidos (Blair & Ayres, 1943; Gilpin *et al.*, 1959; Ribeiro & Seravalli, 2007).

A utilização de atmosferas ricas em CO₂ e temperaturas baixas retardam a degradação enzimática da clorofila em frutos e vegetais frescos. O efeito do CO₂ está provavelmente relacionado com a inibição da produção e ação de etileno, uma vez que em atmosferas ricas em etileno ocorre rápida degradação da clorofila (Ribeiro & Seravalli, 2007).

As clorofilas têm sido ignoradas relativamente aos benefícios fisiológicos e ao impacto na prevenção de doenças crónicas (Ferruzzi & Blakeslee, 2007) embora sejam utilizadas para fins terapêuticos na medicina tradicional (Kephart, 1955). A clorofilina é um derivado estável e solúvel da clorofila que possui um efeito inibidor em mutações (Sarkar *et al.*, 1994) e que protege os animais do aparecimento de tumores (Breinhold *et al.*, 1995).

A clorofila apresenta um conjunto de propriedades anti-inflamatórias (Larato & Pfau, 1970) que promovem a cicatrização (Edwards, 1954) e funciona como agente eficaz na terapia do cancro (Sternberg *et al.*, 1998). Estes pigmentos também apresentam propriedades importantes na prevenção do cancro, atividade antioxidante, atividade anti mutagénica. A investigação científica tem desenvolvido fundamentos que apoiam a biodisponibilidade da clorofila em seres humanos no sentido de clarificar os benefícios dos derivados de clorofila na prevenção do cancro (Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

As ações simultâneas de enzimas, ácidos gordos, oxigénio, luz e calor podem levar à formação de muitos produtos de degradação (Koca *et al.*, 2006). As principais vias de degradação química estão associadas à epimerização, feofitinação e também à hidroxilação, à oxidação ou à foto-oxidação, em presença de luz (Mangos & Berger, 1997; Schmidt *et al.*, 2003). A retenção de clorofila foi utilizada como uma medida de qualidade em vegetais verdes, pois o aquecimento excessivo dos produtos alimentares causa perdas consideráveis na qualidade organolética dos alimentos (Hayakawa & Timbers, 1977). Para manter a estabilidade das clorofilas nos vegetais, o ideal é utilizar vegetais de boa qualidade, processando-os rapidamente e armazenando sob baixas temperaturas (Ribeiro & Seravalli, 2007).

2.4 Glucosinolatos

Os glucosinolatos são um grupo específico de compostos naturais encontrados na família das *Brassicaceae* (sin. *Cruciferae*) (Fahey *et al.*, 2001). Estes são constituídos por compostos que contêm enxofre e azoto cujo esqueleto básico consiste num resíduo de β-tioglucoose, um radical N-hidroximinosulfato e uma cadeia lateral variável (Halkier, 1999), vulgarmente associados à divisão das angiospérmicas dicotiledóneas (Hansen *et al.*, 1995; Hagen *et al.*, 2009). Nas plantas já foram identificados pelo menos 120 glucosinolatos diferentes, com variações estruturais na cadeia lateral ou no grupo R- (Wallsgrave *et al.*, 1999; Fahey *et al.*, 2001).

Os glucosinolatos de couve são os compostos mais interessantes (Tanongkankit *et al.*, 2012). Estes são um grupo sulfurado contendo metabolitos secundários da planta e podem ser hidrolisados por mirosinas para formar

diferentes produtos (Wennberg *et al.*, 2006). Nos tecidos das plantas os glucosinolatos são quimicamente estáveis porque encontram-se separados da enzima mirosinase (Kelly *et al.*, 1998). Quando os tecidos das células das plantas são danificados, como ocorre durante o corte, a enzima mirosinase (tioglucosido glucohidrolase EC 3.2.3.1) inicia a hidrólise rápida dos glucosinolatos para produzir sulfato de glucose e/ou isotiocianatos, tiocianatos e nitrilos (Wallsgrave *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2002; Halkier & Gershonzen, 2006). A formação dos produtos de hidrólise específicos depende de vários factores, incluindo a cadeia lateral, o pH, os iões metálicos e a presença de proteínas como co-factores (Wallsgrave *et al.*, 1999). Dependendo das condições podem-se formar glucorafanino, isotiocianato de sulforafano (1-isotiocianato-4-metilsulfonilbutano) ou nitrilo sulforafano após a hidrólise (Zhang *et al.*, 1992).

Os glucosinolatos têm despertado atenção devido aos aspetos positivos ou negativos, por exemplo, fatores anti nutricionais, efeitos tóxicos ou sabores desagradáveis (Kim *et al.*, 1997; Griffiths *et al.*, 1998), atividade antibacteriana, atividade antifúngica e proteção natural das plantas contra o ataque por insetos herbívoros (Rosa *et al.*, 1997), fungos, nemátodes e ervas daninhas (Charron & Sams, 1999; Smolinska & Horbowicz, 1999).

Os isotiocianatos são um produto dos glucosinolatos que apresentam baixa atividade biológica de uma maneira geral, mas os produtos de degradação têm propriedades anti carcinogénica (Zhang & Talalay, 1994; Talalay, 1999; Hecht, 2000; Talalay & Fahey, 2001; Sun *et al.*, 2012). Alguns estudos epidemiológicos têm demonstrado que estes compostos possuem efeito protetor em alguns tipos de cancro, em especial, cancro do cólon, da bexiga e do pulmão (Pereira *et al.*, 2002; Cartea & Velasco, 2008). A investigação tem demonstrado que os isotiocianatos, em particular, sulforafano, inibem enzimas como a glutatona-redutase e quinona redutase (Conaway *et al.*, 2002), responsáveis pela ativação carcinogénica na fase I e II e induzem a desintoxicação dos sistemas enzimáticos, aumentando os mecanismos de defesa do corpo contra o cancro (Zhang *et al.*, 1992; Talalay *et al.*, 1995; Munday & Munday, 2004). O sulforafano pode inibir o cancro de diferentes modos, pois interfere na proliferação celular, na indução da apoptose e retém a progressão do ciclo celular, via angiogénese ou infamatória (Juge *et al.*, 2007). O sulforafano é responsável por inibir a bactéria *Helicobacter pylori*, responsável pelas úlceras estomacais (Fahey *et al.*, 2002) e também por prevenir doenças cardiovasculares (Wu *et al.*, 2004).

Os processos pós-colheita, nomeadamente a cozedura, influenciam os glucosinolatos e outros compostos bioativos. Estes compostos sofrem algumas perdas durante o branqueamento, nomeadamente quando este se realiza com recurso a água, devido à degradação enzimática, à degradação térmica e à lixiviação (Verkerk *et al.*, 2001). A velocidade e extensão das perdas dependem da quantidade de água, do tipo e do tempo de cozedura utilizado (Jones *et al.*, 2006). Alguns estudos têm demonstrado que o uso de microwaves e a fervura são os métodos de cozedura que causam maiores perdas de glucosinolatos (Conaway *et al.*, 2000; Vallejo *et al.*, 2002). A vaporização parece ser o método com menos perdas, embora ocorra grandes variações (Conaway *et al.*, 2000). O material vegetal se for cozinhado a altas temperaturas, a enzimas mirosinase desnatura e ocorre menor conversão dos glucosinolatos em isotiocianatos. Os glucosinolatos são degradados em isotiocianatos através das mirosinases da flora bacteriana do intestino (Shapiro *et al.*, 2001).

2.5 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico é um antioxidante natural presente na fruta e hortícolas que pode ser utilizado como aditivo alimentar uma vez que se encontra autorizado pela Comissão Europeia (Quirós *et al.*, 2009). O ácido ascórbico é uma das vitaminas solúveis em água mais importantes (Pénicaud *et al.*, 2010).

O ácido ascórbico é mais estável quimicamente nos frutos do que nos hortícolas devido à acidez. O ácido ascórbico é importante nos processos bioquímicos como a formação de colagénio, absorção de ferro encontrando-se envolvida ainda na neuro transmissão e em respostas imunes (Martínez, 1998; Davey *et al.*, 2000). As frutas e os hortícolas são as principais fontes que fornecem ácido ascórbico ao ser humano, através da sua ingestão, uma vez que são incapazes de sintetizar esta substância (Ming-Jun *et al.*, 2008). O ácido ascórbico é um hidrocarboneto que pode ser sintetizado a partir da D-glicose ou da D-galactose por muitas espécies animais com a exceção dos primatas e de certas aves (Nishikimi & Yagi, 1991; Ribeiro & Seravalli, 2007).

O ácido ascórbico é um antioxidante necessário como co-fator para várias enzimas, que se encontra sob a forma de ácido ascórbico (forma reduzida) e ácido dehidroascórbico (forma oxidada) (Rizzolo & Polesello, 1992). A forma reduzida do ácido ascórbico, ácido L-ascórbico, é a forma principal da vitamina biologicamente ativa e é um antioxidante eficaz devido ao elevado poder de fornecer eletrões e de se voltar a converter na forma ativa reduzida (Davey *et al.*, 2000; Jacob & Sotoudeh, 2002). No estado sólido, o ácido ascórbico é relativamente estável, no entanto, quando se encontra em solução, é facilmente oxidado a ácido L-dehidroascórbico. Essa facilidade de oxidação do ácido ascórbico deve-se à presença de um grupo, fortemente redutor, a redutona. Como este é um forte agente redutor, atua como antioxidante em vários sistemas biológicos (Ribeiro & Seravalli, 2007). O ácido ascórbico além de atuar como um antioxidante também pode atuar como pró-oxidante (Buettner, 1986).

O ácido ascórbico pode ser oxidado para de forma reversível para ácido dehidroascórbico, na presença de iões metálicos, calor, luz ou condições levemente alcalinas (acima de pH 6) com perda parcial da atividade do ácido ascórbico. O ácido dehidroascórbico pode ser oxidado irreversivelmente ao 2,3 ácido dicetogulónico com perda da atividade. Este ácido pode ser convertido em ácido oxálico e ácidos L-treónicos e posteriormente em pigmentos escuros. A reação é acelerada por iões metálicos (Cu^{2+} e Fe^{2+}), em meio de teor de humidade reduzido, a destruição é função da atividade da água. A contaminação com iões metálicos, durante o processamento, resulta num aumento da oxidação do ácido ascórbico para ácido dehidroascórbico, que por sua vez, é convertido em ácido dicetogulónico, que sofre desidratação e descarboxilação com formação de furfural. A reação de polimerização subsequente forma pigmentos escuros. Na ausência de catalisadores, o ácido ascórbico reage lentamente com o oxigénio (Ribeiro & Seravalli, 2007). A reação de oxidação do ácido ascórbico encontra-se representada na Figura 5.

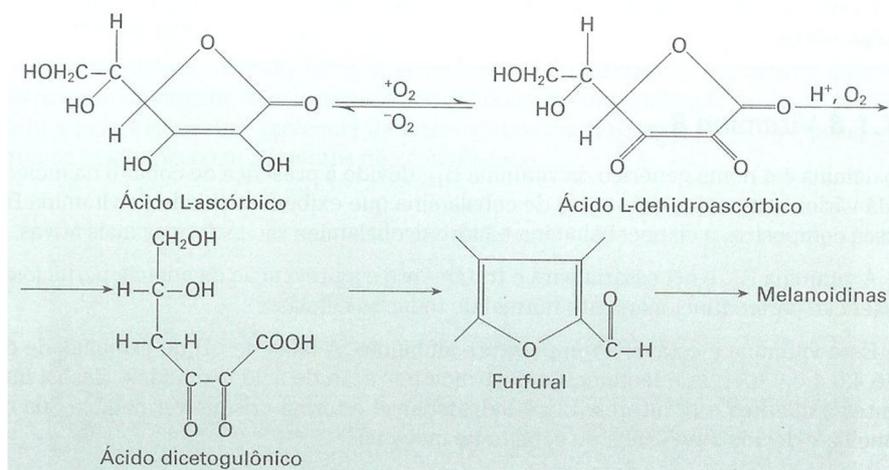


Figura 5 - Representação da oxidação do ácido ascórbico (Ribeiro & Seravalli, 2007).

A peroxidase e o ácido ascórbico oxidase presentes nos alimentos aceleram a oxidação do ácido ascórbico, sendo necessário a sua inativação para evitar perdas de ácido ascórbico. Para além disso, o ácido ascórbico pode ainda ser oxidado pela ação das quinonas oriundas da oxidação de compostos fenólicos pela polifenoloxidase (Ribeiro & Seravalli, 2007). O branqueamento é o tratamento vulgarmente utilizado para inativar enzimas, provocando perdas nutricionais e das propriedades antioxidantes, nomeadamente a perda de ácido ascórbico e ácidos gordos (Gonçalves *et al.*, 2007).

A velocidade da oxidação aeróbia depende do pH, é mais rápida e a degradação é maior em meio alcalino (pH > 8). Em pH muito ácido (pH < 1,5), o ião hidrogénio catalisa a decomposição do ácido ascórbico pela hidrólise do anel da lactona e, com a descarboxilação, ocorre a formação do furfural e de ácidos (Ribeiro & Seravalli, 2007).

As perdas mais significativas no processamento de alimentos são o resultado da degradação química. As perdas estão associadas a reações de escurecimento não enzimático que podem ser minimizadas por congelação. A utilização de SO₂ o ácido dehidroascórbico forma produtos de adição que previnem as reações de escurecimento não enzimático e a interrupção da reação de formação de compostos carbonílicos (Ribeiro & Seravalli, 2007).

A destruição anaeróbica do ácido ascórbico deve ser também considerada, pois a velocidade da reação é independente do pH, exceto na faixa entre 3 e 4, em que há um ligeiro aumento na velocidade de oxidação. A reação pode ser acelerada em presença de frutose, frutose 6-fosfato, frutose 1,6 difosfato e frutose caramelizada, sendo o produto final da reação o furfural e o CO₂ (Ribeiro & Seravalli, 2007).

A concentração de ácido ascórbico em frutas e hortícolas depende da variedade, das condições de crescimento, das condições de maturação, das condições pós-colheita, das condições de armazenagem (Franck *et al.*, 2003; Ribeiro & Seravalli, 2007), dos fatores ambientais e das técnicas agrícolas utilizadas (Dumas *et al.*, 2003). O teor de ácido ascórbico pode diminuir ao longo do amadurecimento (Lee & Kader, 2000).

A determinação exata deste antioxidante é importante, pois o ácido ascórbico em níveis elevados pode causar efeitos adversos corpo humano (Quirós *et al.*, 2009).

Alguns estudos demonstram que os indivíduos que ingerem maior quantidade de ácido ascórbico têm menor risco de sofrerem de doenças crónicas como doenças cardiovasculares, diabetes, cancro, doenças neuro degenerativas ou envelhecimento (Davey *et al.*, 2000; Jacob *et al.*, 2002).

O ácido ascórbico desempenha funções fisiológicas importantes no corpo humano como a absorção de ferro, o metabolismo dos esteróides e aminoácidos aromáticos, a síntese de polissacáridos e colagénio e o desenvolvimento neonatal (Hasegawa *et al.*, 1993). O ácido ascórbico é necessário para a função normal dos leucócitos, embora não se conheça exatamente a função biológica (Washko *et al.*, 1991).

O ácido ascórbico é conhecido como a vitamina que previne e cura o escorbuto, pois esta mantém a integridade da estrutura celular, preserva a integridade capilar, promove a cicatrização dos ferimentos, fracturas, contusões, hemorragias e sangramentos das gengivas. O ácido ascórbico também influencia a formação da hemoglobina, a absorção e armazenamento do ferro e participa na síntese hormonal (Ribeiro & Seravalli, 2007).

3 Matérias-primas utilizadas no presente estudo

Os hortofrutícolas são uma componente importante para uma alimentação equilibrada, pois possuem um teor de gordura baixo, elevado conteúdo em glúcidos e fibras e são pouco calóricos (Labuza, 1982), para além de possuírem elevada bioatividade.

As matérias-primas foram selecionadas de acordo com a sua composição nutricional, componente bioativa e propriedades físico-químicas, de forma a obter uma polpa com propriedades benéficas para a saúde e estável em termos físico-químicos.

3.1 Maçã

As maçãs (*Malus domestica*) que pertencem à família *Rosaceae* que são umas das frutas mais consumidas na Europa e apresentam benefícios em termos de saúde por serem ricas em compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides, e fibra alimentar (Scalbert *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2002). De entre os compostos fenólicos da maçã destacam-se a quercetina, a catequina, a epicatequina, a floridizina, e o ácido clorogénico (Boyer & Liu, 2004).

Em termos nutricionais, o ferro, o zinco e o cálcio são nutrientes essenciais, que por vezes são ingeridos em quantidades insuficientes ou sofrem uma absorção deficiente no organismo podendo provocar a osteoporose ou massa óssea reduzida. É ainda de salientar que a preparação das maçãs antes da ingestão pode influenciar o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, uma vez que a remoção da casca elimina um teor significativo dos compostos fenólicos presentes (Briones-Labarca *et al.*, 2011).

De uma forma geral, o consumo de maçãs revela efeitos positivos na saúde humana, uma vez que este consumo está associado à redução do risco de cancro (especialmente da próstata, do cólon, pulmonar e hepático), à prevenção de doenças coronárias cardíacas, à diminuição do risco de diabetes tipo II e também pode facilitar a perda de peso (Arts *et al.*, 2001; De Oliveira *et al.*, 2003).

Neste estudo foram utilizadas duas variedades de maçã, *Fuji* e *Granny Smith*, com características diferentes. As maçãs da variedade *Fuji* apresentam uma polpa com uma coloração mais amarelada e mais doce, a casca com uma coloração avermelhada e riscada enquanto as maçãs da variedade *Granny Smith* apresentam uma polpa mais clara e mais ácida e a casca tem cor verde.

3.2 Ananás

O ananás (*Ananas cosmosus* L.), pertencente à família das *Bromeliaceae*, é um fruto com grande importância comercial devido ao seu aroma e sabor agradável (Rattanathanalerk *et al.*, 2005).

O ananás é um fruto benéfico para a saúde humana uma vez que tem um valor bioativo elevado associado ao ácido ascórbico, aos compostos fenólicos e aos carotenóides. Estes compostos além de reduzirem o risco de oxidação relacionado com a presença de radicais livres, também diminuem o risco de contrair diferentes tipos de cancro, doenças cardiovasculares e neurológicas (Collins & Harrington, 2002).

Em termos nutricionais o ananás é rico em vitaminas A, B e C e também uma fonte de vários minerais como o cálcio, fósforo e ferro com propriedades importantes para a saúde (Holden *et al.*, 2011).

3.3 Couve

A couve portuguesa (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) pertencente à família *Brassicaceae* é uma excelente fonte de carotenóides dietéticos (Kurilich *et al.*, 1999), sendo esta a que possui maior capacidade antioxidante dentro da família das Brássicas (Halvorsen *et al.*, 2002), devido à luteína, ao β -caroteno e a outros compostos

fenólicos como os glucosinolatos, os tocoferóis, os polifenóis e os flavonóides (Olsen *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2010). A ingestão de alimentos ricos em luteína e β -caroteno encontra-se relacionada com a redução do risco de cancro de pulmão e de doenças oculares crónicas, como cataratas e degeneração ocular relacionada com a idade (Landrum & Bone, 2001). Para além dos carotenóides é ainda possível encontrar uma elevada quantidade de fibras e outros compostos bioativos que originam produtos benéficos para a saúde prevenindo doenças como o cancro, a aterosclerose, a nefrite e a diabetes *mellitus* (Nilnakara *et al.*, 2009; Taveira *et al.*, 2009).

3.4 Abóbora

A abóbora (*Cucurbita maxima*) é um hortícola da família *Cucurbitaceae* que apresenta propriedades benéficas ao nível da nutrição humana na polpa e nas sementes, quer em consumo direto quer na preparação de produtos como xaropes, geleias, compotas e purés (Provesi *et al.*, 2011). É ainda muito utilizada na preparação de alimentos para bebés principalmente por apresentar um baixo risco de acumulação de metais pesados (Krzysik & Bogucka, 1981).

A polpa possui elevadas quantidades de carotenóides, que são pigmentos que derivam do isopreno e variam entre a cor amarelo e vermelho (Oliver & Palou, 2000). A cor laranja brilhante da polpa indica que esta é rica em α - e β -caroteno, podendo apresentar valores na ordem de 0-75 mg g⁻¹ e 6-84 mg g⁻¹, respetivamente, dependendo da cultivar (Murkovic *et al.*, 2002). O teor de carotenóides aumenta com a maturação da abóbora, mas a composição apresenta instabilidade a altas temperaturas de processamento e a condições severas de armazenamento (Provesi *et al.*, 2011). A abóbora possui valores elevados de atividade antioxidante e de compostos fenólicos quando se encontra no estado de maturação avançado, reduzindo o risco de desenvolvimento de determinados tipos de cancro, oferecendo proteção contra problemas cardíacos (Oloyede *et al.*, 2012).

Para além disso, os tecidos das polpas contêm ácido ascórbico, mono, di e polissacáridos (glucose, frutose, sacarose e amido), sais minerais (K, Ca, Mg e Fe) e pectinas (Gajc-Wolska *et al.*, 2005; Bognar, 2006).

3.5 Banana

A banana (*Musa cavendish*) da família da *Musaceae* é um fruto com uma energia elevada e elevados níveis de vitaminas A, B₁, B₂ e C (ácido ascórbico), minerais, pré-bióticos e compostos fenólicos (Agopian *et al.*, 2008; Thaipanit & Anprung, 2010). Na banana os compostos que conferem elevada capacidade antioxidante são a dopamina, o ácido ascórbico e os carotenóides, cerca de 5000 mg/100 g caroteno equivalente (Kanazawa & Sakakibara, 2000; Englberger, 2003). Estes compostos apresentam efeito protetor em doenças como o cancro, a artrite reumatoide e doenças cardiovasculares (Chong & NoorAziah, 2010).

As bananas contribuem em média para 2,7 % do total de potássio (K) e fibras consumidas por adulto (USDA/HHS, 2004).

3.6 Kiwi

O kiwi (*Actinidea deliciosa*) é o fruto produzido pela planta *Actinidia chinensis* da família *Actinidiaceae*, composto por ácidos orgânicos importantes como o ácido cítrico, quínico e málico (Soufleros *et al.*, 2001). A concentração de ácido quínico e a elevada capacidade antioxidante são as principais características destes frutos ricos em clorofila (Heatherbell, 1975; Cassano *et al.*, 2006). Comparando a concentração de ácido ascórbico do kiwi e dos citrinos, conclui-se que o primeiro é 3 a 5 vezes mais rico que os citrinos (Soufleros *et al.*, 2001). Estes frutos possuem na sua composição carotenóides, compostos fenólicos, sais minerais (P, K, Ca, Mg) e compostos aromáticos (ésteres, álcoois e cetonas) (Patterson *et al.*, 1983).

4 Processos degradativos dos compostos bioativos dos hortofrutícolas. Implicações e processos de conservação

Os produtos minimamente processados, prontos-a-usar, são uma alternativa cómoda, que necessitam de manter o aspeto agradável e atraente, próximo dos produtos frescos. Estes produtos têm uma vida útil limitada devido ao aumento da taxa dos processos metabólicos que causam deterioração (Agüero *et al.*, 2008). Os danos causados pela preparação aumentam a produção de etileno, a respiração e a taxa das reações bioquímicas responsáveis pelas alterações de cor, textura, sabor e qualidade nutricional (Kramer & Wang, 1989).

A aplicação de pré-tratamentos como os tratamentos térmicos moderados e branqueamento nos frutos e hortícolas têm como objetivo a estabilização físico-química e microbiológica dos produtos ao longo do tempo de armazenamento, uma vez que inativam as enzimas responsáveis pelas alterações, destroem as formas vegetativas e conseqüente redução da carga microbiana (Cruz *et al.*, 2006).

O tratamento térmico é o mais utilizado para estabilizar alimentos, com recurso a calor, devido à capacidade de eliminar microrganismos e inativar enzimas (He *et al.*, 2007). O aquecimento excessivo produz perdas consideráveis na qualidade dos alimentos, particularmente nas propriedades organolépticas (Hayakawa & Timbers, 1977). Segundo um estudo realizado em diferentes Brássicas, estes tratamentos aplicam temperaturas entre os 50 °C e os 100 °C e tempos que variam entre os 10 e os 30 minutos (Roy *et al.*, 2007).

O branqueamento consiste numa técnica de processamento suave que pretende inativar as enzimas responsáveis pelo escurecimento dos frutos, sem no entanto conferir sabor a cozido (Martins, 1992). Este tratamento térmico estabiliza os alimentos devido à capacidade de destruir microrganismos, além de inativar as enzimas, como referido anteriormente (Cruz *et al.*, 2006). Este método é importante no processamento de alimentos devido às alterações que provoca ao nível dos componentes funcionais. O branqueamento é frequentemente realizado por choque térmico, sendo utilizada como índice de um branqueamento adequado, a enzima oxidativa mais termorresistente, a peroxidase (POD) (Jongen, 2002). O branqueamento aplicado em polpas de maçã por Balbi (2009) utilizou diferentes binómios tempo/temperatura com gamas de temperatura a variar entre 70 °C e 75 °C e o tempo a variar de 30 segundos a 10 minutos.

O objetivo deste tratamento é a eficácia na conservação dos alimentos maximizando a integridade nutricional (Roy *et al.*, 2007). O branqueamento proporciona também a remoção de sabores desagradáveis devido à ação da lavagem e a remoção de alguns pesticidas residuais (Canet, 1989).

Os tratamentos térmicos prolongam a vida útil dos frutos no período pós-colheita e promovem o aumento dos compostos bioativos (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2010), melhoram a cor e o brilho e evitam a descoloração tornando os produtos mais atraentes para o consumidor (Ihl *et al.*, 1998).

No entanto existem desvantagens após tratamento térmico, como a redução de vitaminas, alterações na textura e cor do alimento, com a possibilidade de desenvolver cheiros desagradáveis (Norton & Sun, 2008). Este tratamento também provoca alteração dos pigmentos, amolecimento de tecidos e perdas nutricionais devido à degradação térmica por lixiviação e difusão (Günes & Bayindirh, 1993; Gonçalves *et al.*, 2007). Durante o processamento podem desenvolver-se pigmentos de cor escura que torna o produto inaceitável (Chutintrasri & Noomhorm, 2007), sendo a cor um atributo utilizado como indicador de qualidade para avaliar o grau de deterioração provocado pelo processamento térmico (Avila & Silva, 1999).

4.1 Degradação enzimática

O tratamento térmico é considerado um método eficaz para inativar as enzimas, que normalmente recorre a vapor ou água quente (Rudra *et al.*, 2008).

Quando a enzima peroxidase (POD) é inativada, as outras enzimas responsáveis pela degradação dos tecidos também são inativadas. O aquecimento necessário para inativar completamente a POD é mais do que suficiente para destruir as enzimas responsáveis pela perda de qualidade, no entanto é necessário ter em consideração a intensidade do tratamento, de forma a não causar alterações indesejáveis (Günes & Bayindirh, 1993; Agüero *et al.*, 2008). A presença de enzimas residuais pode causar alterações de qualidade, como a textura, a cor, o sabor e perdas nutricionais durante o armazenamento (Gonçalves *et al.*, 2007).

A POD oxida os compostos fenólicos através do peróxido de hidrogénio com os radicais que oxidam as clorofilas de baixo peso molecular levando à perda de cor (Rudra *et al.*, 2008). O prazo de validade e a qualidade dos alimentos relacionam-se com a qualidade microbiana e com as reações bioquímicas e enzimáticas (Landl *et al.*, 2010). As enzimas podem promover grande número de reações oxidativas, responsáveis pela alteração da cor, degradação da clorofila ou auxinas, oxidação de compostos fenólicos, oxidação do ácido índole acético e biossíntese de lenhina (Valderrama & Clemente, 2004). Estes fatores também estão associados ao sabor, cor, textura e qualidade nutricional dos alimentos (Clemente & Pastore, 1998).

A enzima polifenoloxidase (PPO) é responsável pelo acastanhamento enzimático que torna as polpas de frutos e hortícolas desagradáveis ao consumidor. O controlo da atividade da POD é importante na prevenção e no processamento de alimentos, caso esta enzima não seja controlada, pode promover o escurecimento durante a comercialização dos hortofrutícolas (Valderrama & Clemente, 2004). Os frutos quando são cortados, a superfície de corte fica castanha, o que reduz a qualidade visual e também provoca alterações indesejáveis no sabor e perda de nutrientes devido ao escurecimento enzimático (Luo & Barbosa, 1997).

O escurecimento enzimático pode causar alterações e aparecimento de propriedades organoléticas indesejáveis que podem afetar o produto no mercado ou mesmo levar a exclusão completa por parte do consumidor (McEvily *et al.*, 1992). Este escurecimento de frutas e hortícolas crus ocorre principalmente devido à oxidação dos compostos fenólicos naturais, compostos por quinonas, que por sua vez são polimerizadas para castanho, vermelho ou pigmentos negros (Duangmal & Apenten, 1999; Valderrama & Clemente, 2004). As quinonas sofrem reações secundárias com aminoácidos, proteínas ou outros compostos fenólicos para formar pigmentos como melanoidina (Whitaker & Lee, 1995; Friedman, 1996). A capacidade da PPO em oxidar compostos fenólicos pode ser utilizada para aumentar a biodisponibilidade do ferro contido nos compostos fenólicos (Matuschek & Svanberg, 2005).

A POD é a enzima convencionalmente utilizada para monitorizar e avaliar a extensão e a eficácia do tratamento térmico, uma vez que é uma das enzimas mais estáveis devido à elevada resistência térmica (Arthey & Dennis, 1992; Icier *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010). Os tratamentos em que se utilizam o azoto e vácuo têm sido os mais eficazes para a inibição da PPO, enquanto que a presença de oxigénio conduz a valores mais elevados de atividade bioquímica e enzimática e maiores alterações de cor (Soliva-Fortuny *et al.*, 2002).

4.2 Degradação microbiológica

Os atributos de conveniência, frescura e qualidade característicos dos produtos prontos-a-consumir podem ser limitados pela deterioração microbiana. A carga inicial destes produtos depende das matérias-primas, das práticas agrícolas e das condições de colheita e processamento (Gras *et al.*, 1994). O processamento mínimo provoca a rápida deterioração microbiana do produto, por exemplo no momento do descasque ocorre a transferência da microflora da casca para o interior do produto facilitando o seu crescimento uma vez que os nutrientes se encontram disponíveis (Guerzoni *et al.*, 1997).

As bactérias patogénicas como a *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* e *Aeromonas hydrophila* podem contaminar os frutos e hortícolas, o que representa um perigo para a saúde do consumidor (Beaufort *et al.*, 1992; Nguyen-the & Carlin, 1994; Breidt & Fleming, 1997).

O armazenamento de alimentos, nomeadamente de frutos e hortícolas, provoca elevados desperdícios antes do consumo que origina perdas económicas consideráveis e perigos para a saúde pública, pois os microrganismos podem multiplicar-se e segregar substâncias tóxicas (Lacasse, 1995; Francis *et al.*, 1999). As alterações de origem microbiana provocam amolecimento dos tecidos, sabores e odores desagradáveis e perda de nutrientes que tornam os alimentos impróprios para consumo humano num curto espaço de tempo (Lacasse, 1995; Galli & Franzetti, 1997).

Os microrganismos, e em particular os fungos presentes na superfície dos produtos hortofrutícolas podem desenvolver-se com a maturação avançada do fruto ou do hortícola reduzindo o seu tempo de conservação. As condições ambientais (temperatura, humidade e etileno) desempenham um papel importante na conservação, pois a temperatura elevada acelera a maturação e as alterações microbianas enquanto que as temperaturas baixas retarda estes efeitos (Lacasse, 1995).

As polpas e os sumos de fruta apresentam normalmente um pH inferior a 4 que dificulta a alteração por microrganismos, nomeadamente por patogénicos (Neto & Faria, 1999). O pH é o fator intrínseco que distingue os frutos dos hortícolas, pois o pH dos frutos é muito ácido ($\text{pH} < 4,5$), enquanto o pH dos hortícolas de uma maneira geral, apresentam valores entre os 5,5 e os 6,5 (Lacasse, 1995). Deste modo, os frutos são deteriorados quase exclusivamente por fungos (bolores e leveduras) e algumas bactérias lácticas pois são microrganismos tolerantes a meios ácidos, (Neto & Faria, 1999) e os hortícolas podem ser degradados tanto por bactérias como por fungos (Lacasse, 1995). O potencial redox destes alimentos favorece o desenvolvimento de espécies aeróbias ou anaeróbias facultativas em detrimento das anaeróbias estritas (Lacasse, 1995).

Os derivados de frutos sofrem um tratamento térmico antes de serem embalados e refrigerados, o que permite eliminar a maior parte dos microrganismos. As temperaturas em torno dos 90 °C, normalmente utilizadas para a preservação desse tipo de produtos podem não ser suficientes para inativar os fungos termorresistentes. As temperaturas mais elevadas afetam as características físico-químicas e organolépticas e, portanto, o controlo da deterioração por fungos termorresistentes baseia-se fundamentalmente na adoção de práticas adequadas, que visam diminuir a possibilidade de contaminação das matérias-primas (Kabir, 1994; Neto & Faria, 1999; O'Beirne & Francis, 2003).

O aumento do período de vida útil é possível recorrendo a matérias-primas de boa qualidade, cuidados especiais durante o processamento e ao longo da cadeia de comercialização, manutenção das condições de higiene adequadas, controlando a humidade relativa e a temperatura e recorrendo a atmosferas modificadas, tal como referido anteriormente (Nguyen-the & Carlin, 1994; Corbo *et al.*, 2004).

DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

No presente estudo desenvolveu-se uma polpa de base maçã e ananás com adição de outros frutos e hortícolas, com elevada bioatividade, estabilizada sem recurso a aditivos químicos.

O estudo, após caracterização das diferentes matérias-primas, desenvolveu-se em 4 fases principais:

- Estabelecimento de pré-tratamentos térmicos de inativação enzimática;
- Formulação da polpa;
- Estabelecimento do binómio tempo-temperatura de pasteurização;
- Determinação do tempo de vida útil de polpa embalada em dois tipos de material, sob condições de refrigeração e de congelação

5 Materiais e Métodos analíticos

5.1 Matérias-primas

As matérias-primas foram fornecidas pela empresa CAMPOTEC IN, localizada em Torres Vedras e recepcionadas no Laboratório “Ferreira Lapa” do Pavilhão de Agro-Indústrias e Agronomia Tropical do Instituto Superior de Agronomia. Os frutos provenientes de climas tropicais (ananás e banana) foram transportados à temperatura ambiente e armazenados nas mesmas condições até serem processados. Os restantes hortofrutícolas (maçã, couve, abóbora e kiwi) foram transportados e armazenados sob condições de refrigeração ($\approx 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

5.2 Métodos analíticos

5.2.1 Determinações Físico-químicas

5.2.1.1 Cor

A cor foi determinada através do colorímetro Minolta CR 300 pelo sistema CIELab, previamente calibrado com um padrão branco ($L^* = 97,46$; $a^* = -0,02$; $b^* = 1,72$). Os parâmetros analisados foram L^* , a^* e b^* . O eixo L^* representa a luminosidade podendo variar de preto (0) a branco (100), o eixo a^* varia de vermelho (+60) a verde (-60) e o eixo b^* varia de amarelo (+60) a azul (-60). Para cada amostra foram efetuadas 12 determinações.

Para uniformizar as condições de teste as polpas foram colocadas em caixas de Petri com 8 cm de diâmetro e aproximadamente 5 mm de espessura. A partir dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* foi possível calcular a tonalidade da cor ($^{\circ}h$), a cromaticidade (C^*) e a diferença total de cor (DTC) através das seguintes expressões matemáticas:

$$^{\circ}h = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$^{\circ}h = [\arctg (b^*/a^*)] / 6,2832 \times 360 \quad \text{se } a^* > 0; b^* > 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$^{\circ}h = 180 + [\arctg (b^*/a^*)] / 6,2832 \times 360, \quad \text{se } a^* < 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$^{\circ}h = 360 + [\arctg (b^*/a^*)] / 6,2832 \times 360, \quad \text{se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{DTC} = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo que:

$$\Delta L^* = L^* - L^*_0 \quad \Delta a^* = a^* - a^*_0 \quad \Delta b^* = b^* - b^*_0$$

L^*_0 = amostra fresca (sem tratamento)

A diferença total de cor é classificada de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios de classificação da diferença total de cor (DTC), adaptado de Drlange (1994).

DTC	Critérios de classificação de cor
0,0 – 0,2	Diferença impercetível
0,2 – 0,5	Diferença muito pequena
0,5 – 1,5	Diferença pequena
1,5 – 3,0	Diferença distinta
3,0 – 6,0	Diferença muito distinta
6,0 – 12,0	Diferença grande
> 12,0	Diferença muito grande

5.2.1.2 Teor de sólidos solúveis (TSS)

O procedimento foi realizado de acordo com a norma portuguesa NP EN 12 143 (1999). O teor de sólidos solúveis (TSS) foi determinado em triplicado através do refratómetro (Pocket Refractometer PAL-1 Atago), após as amostras serem filtradas com o auxílio de um filtro de pano, rejeitando as primeiras gotas. O resultado foi expresso em °Brix, correspondendo à percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto.

5.2.1.3 pH

A determinação do pH foi realizada de acordo com a norma portuguesa NP EN 1132 (1996) utilizando o potenciómetro (PHM82 STANDARD pH METER), previamente calibrado a 20 °C, com soluções tampão de pH=4 e pH=7. Realizaram-se 3 determinações para cada amostra.

5.2.1.4 Preparação do extrato para a determinação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante

A preparação do extrato para determinação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante foi efetuada na proporção de 1:4 (m:v) de amostra e metanol (100%) seguida de homogeneização (IKA LABORTECHNIK T25 basic) a 8000 rpm x 1 min. A extração compreendeu um período de espera do homogeneizado de 24h a 4 °C. Para obtenção do extrato seguiu-se uma centrifugação em HERMLE LABORTECHNIK Z 383K a 8000 rpm x g durante 20 min (4 °C) e armazenou-se o sobrenadante a 4 °C, ao abrigo da luz, até ao momento da análise.

5.2.1.4.1 Compostos fenólicos

A determinação de compostos fenólicos totais foi baseada na reação colorimétrica promovida pelo reagente Folin-Ciocalteu de acordo com (Swain & Hillis, 1959). Para o doseamento efetuou-se a mistura, em tubos de 5 ml, de 2400 µL de água nanopura com 150 µL de extrato fenólico e 150 µL de reagente Folin (0.25 N). Agitou-se a mistura e ao final de 3 minutos adicionou-se 300 µL de 1 N carbonato de sódio, agitou-se novamente e esperou-se 2 horas no escuro e à temperatura ambiente. Efetuaram-se as leituras espectrofotométricas a $\lambda = 725$ nm. Os cálculos basearam-se na interpolação dos valores de absorvância na curva de calibração de ácido clorogénico expressando os resultados em mg Equivalentes de ácido clorogénico por 100 g de produto fresco ($\text{mg EAC} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

$$\text{Ácido clorogénico: } [\text{Ácido clorogénico}] = 0,275 \times \text{Abs} - 0,006 \quad (R^2=0,9968) \quad (\text{Eq. 7})$$

5.2.1.4.2 Capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante baseou-se no método DPPH (Brand-Williams, et al., 1995). Este baseia-se na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 517 nm. Uma alíquota de 150 µL de extrato (obtido no ponto 5.2.1.4) foi adicionada a 2850 µL da solução diária de DPPH ($6,76 \times 10^{-3}$ M). A mistura permaneceu no escuro à temperatura ambiente durante 40 minutos. Findo este tempo, efetuaram-se as leituras no espectrofotómetro UNICAM UV/VIS Spectrometer a $\lambda = 517$ nm. Foi realizada uma curva de calibração como padrão o Trolox nas concentrações de 75-1000 µM. Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente. 100 g^{-1} de produto. No total foram realizadas 3 extrações por amostra.

5.2.1.5 Humidade

A determinação da humidade foi realizada de acordo com a NP-784 (1970). A humidade é a perda de massa sofrida pela amostra, seca a 100-105 °C até massa constante. Os resultados devem ser expressos em percentagem. Foram realizadas 2 repetições por amostra.

5.2.1.6 Ácido ascórbico

A determinação do teor de ácido ascórbico foi realizada por titulação segundo a NP 3030 (1985). Efetuaram-se 3 determinações para a cada amostra.

5.2.1.7 Separação de fases

A separação de fases foi realizada com base numa análise visual em termos qualitativos após a amostra ($\pm 50\text{g}$) repousar num copo de precipitação durante um período de aproximadamente 3 horas.

5.2.2 Determinações bioquímicas

5.2.2.1 Análise qualitativa da atividade enzimática da peroxidase (POD)

A determinação qualitativa da peroxidase (POD) baseou-se no facto desta enzima decompor o peróxido de hidrogénio em presença de substrato orgânico na forma reduzida, tendo como produto a H_2O e substrato oxidado, adaptado de Doerge, et al. (1997). O guaiacol é um dos substratos incolor na forma reduzida que por oxidação forma um composto corado. A pesquisa da peroxidase realizou-se colocando pequenos pedaços do vegetal branqueado num copo onde se adicionou 5 mL de água, 1 mL de guaiacol a 1% e 1 mL de peróxido de hidrogénio. Agitou-se a mistura e deixou-se repousar durante 2 minutos. De seguida agita-se novamente e observa-se a cor

desenvolvida. Os resultados foram expressos de acordo com a denominação apresentada na Tabela 2, tendo em conta o aparecimento ou não da coloração castanho avermelhada nas amostras.

Tabela 2 - Resultado/Interpretação da coloração ou não das amostras.

Observação	Resultado/Interpretação
Coloração castanho-avermelhada	Reação positiva/Peroxidase ativa
Manchas espalhadas de castanho claro	Reação levemente positiva/Branqueamento satisfatório
Ausência da coloração castanho-avermelhada	Reação negativa/ Peroxidase inativa

5.2.2.2 Análise quantitativa da enzima polifenoloxidase (PPO)

A extração da enzima consistiu na mistura de 1:3 (m:v) utilizando 5 g de amostra e 15 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5), 5% PVPP (polivinilpirrolidona) e uma gota de Triton-X, homogeneizando por 3 vezes em separado após a adição de tampão, PVPP e Triton-X. A homogeneização desta mistura foi realizada no IKA LABORTECHNIK T25 basic à velocidade de 8000 rpm durante aproximadamente 30 segundos. Após centrifugação em HERMLE LABORTECHNIK Z 383K do homogeneizado à velocidade de 8000 rpm a 4 °C durante 20 minutos, obteve-se o sobrenadante (extrato enzimático) guardando-se de seguida à temperatura de 4 °C até ao momento do doseamento da atividade enzimática.

O doseamento da atividade enzimática da PPO foi efetuada após a mistura de substrato catecol (pH 6,5, 110 mM): tampão fosfato de sódio (pH 6,5, 0,1 M): extrato nas proporções de 2,5: 0,425: 0,075 e 2,5: 0,4: 0,1 no espectrofotómetro UNICAM UV/VIS Spectrometer a $\lambda = 420$ nm durante 30 segundos.

A atividade da enzima foi calculada a partir da porção linear da curva (DO420 nm/min) devido à oxidação do substrato. Definiu-se 1 unidade (U) como a variação de 0,001 unidades de absorvância a 420 nm por um minuto por mililitro, nas condições de ensaio, exprimindo os resultados em U.100g⁻¹. Efetuaram-se 3 determinações para cada amostra (Galvis-Sánchez, et al., 2003).

5.2.3 Determinações microbiológicas

5.2.3.1 Mesófilos totais

A contagem de microrganismos aeróbios a 30 °C foi realizada segundo a Norma EN ISO 4833 (2003). Esta determinação baseia-se no princípio de que cada célula bacteriana presente numa amostra a analisar origina uma colónia individualizada e visível, após inoculação por incorporação e incubação a uma temperatura de 30 °C durante 72 horas em meio de cultura Plate Count Agar (PCA). Utilizou-se solução de ringer para realizar as diluições. Efetuaram-se 2 inoculações para cada amostra.

5.2.3.2 Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras foram determinados de acordo com a NP 3277-1 (1987) de forma qualitativa e quantitativa. Em ambos os casos utilizou-se o meio GYP (Glucose, Yeast e Peptone) no qual se inoculou 100 µL de amostra por espalhamento. As placas sofrem incubação numa estufa a 25 °C durante 48 horas, tempo ao fim do qual se efetuou a contagem do número de colónias desenvolvidas para a determinação quantitativa, enquanto na determinação qualitativa apenas se observou o eventual crescimento (positivo). Utilizou-se solução de ringer para realizar as diluições. Efetuaram-se 2 determinações para cada amostra.

5.2.4 Determinações reológicas

A viscosidade aparente das diferentes polpas (3 - 5 °C) foi determinada no viscosímetro MODEL LDVDI+ VISCOSIMETRO utilizando o "spindle" 3. Foram realizadas 1 determinações por amostra, utilizando 10 velocidades por amostra, iniciando-se com velocidades menores de 0,3 rpm e foi-se aumentando até à velocidade máxima de 100 rpm, adaptado de Oliveira *et al.* (2005). A consistência e o índice de escoamento foram calculados através da lei de potência:

$$\log \eta_a = \log K + (n - 1) \log \dot{\gamma} \quad \text{Eq. 8}$$

5.2.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada no Departamento de Agro-indústrias e Agronomia Tropical do Instituto Superior de Agronomia (ISA) numa sala de provas com 6 cabines individuais. Nas diversas sessões participaram aproximadamente 10 consumidores com idades compreendidas entre os 19 e os 70 anos, aos quais foi pedido para classificarem os diferentes atributos das polpas com base na ficha de prova apresentada no ANEXO I. As provas foram realizadas num ambiente calmo, silencioso e isento de odores estranhos e com iluminação adequada de acordo com a NP 4258 (1993).

5.2.6 Tratamento estatístico dos resultados

O tratamento estatístico e gráficos foram elaborados nos programas Microsoft Excel 2010 e Statistica versão 8.0. Para avaliar os resultados laboratoriais obtidos para cada um dos parâmetros foi usada estatística descritiva, através da determinação da média, desvio padrão, erro e intervalo de confiança da média a 95%, por amostra. Para monitorizar os parâmetros analisados e a evolução das propriedades das amostras ao longo do tempo de armazenamento, foram efetuadas análises de variância a um fator (Teste de Tukey HSD para comparação de médias) e análise multivariada de componentes principais e de Cluster. A representação gráfica das variáveis que contribuem para a explicação das componentes principais e as coordenadas das amostras no plano formado pelas componentes principais (projeção das amostras no plano principal), permite reconhecer as correlações existentes entre variáveis originais e estabelecer grupos de amostras com comportamento semelhante, através de uma simples observação.

6 Caracterização das matérias-primas

A parte experimental do presente trabalho iniciou-se pela caracterização das matérias-primas com o objetivo de prever a sua influência no produto final, em termos de características sensoriais, funcionais e de estabilidade.

6.1 Resultados e discussão

6.1.1 Cor

Os parâmetros de cor relativos às matérias-primas utilizadas na formulação das polpas encontram-se representados na Figura 6.

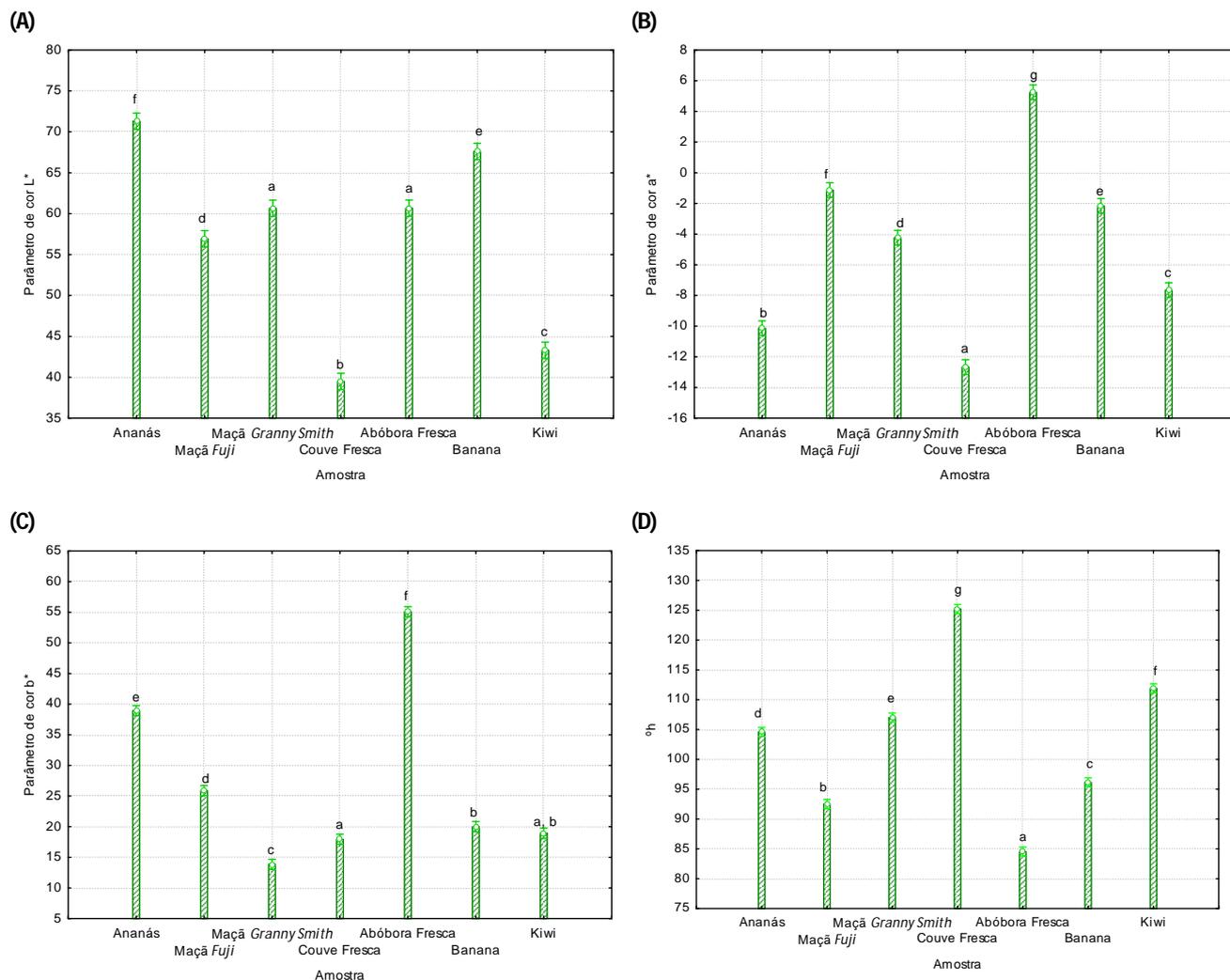


Figura 6 - Parâmetros de cor das matérias-primas: L^* (A), a^* (B), b^* (C) e tonalidade (D). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

As matérias-primas, de uma maneira geral, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$) para todos os parâmetros de cor, não sendo essa comparação decisiva para o desenvolvimento do trabalho.

6.1.2 Teor de sólidos solúveis (TSS) e pH

Os resultados do teor de sólidos solúveis (TSS, ° Brix) e do pH encontram-se na Tabela 3. Relativamente aos valores de pH verifica-se que todas as matérias-primas apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$), sendo o kiwi e a abóbora fresca as matérias-primas mais ácida e mais básica, respetivamente. O ananás e o kiwi não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$) no teor de sólidos solúveis, sendo de constatar que a banana e a abóbora fresca apresentam a maior e menor quantidade, respetivamente.

Tabela 3 - Tabela de valores de pH e teor de sólidos solúveis (° Brix) das matérias-primas.

Amostra	pH	TSS (° Brix)
Abóbora fresca	6,35 ^g ± 0,01	7,03 ^b ± 0,25
Couve fresca	5,86 ^f ± 0,01	9,60 ^c ± 0,10
Ananás	3,49 ^c ± 0,01	13,40 ^a ± 0,26
Maçã Fuji	4,28 ^d ± 0,02	14,23 ^e ± 0,15
Maçã <i>Granny Smith</i>	3,35 ^b ± 0,01	11,50 ^d ± 0,10
Kiwi	3,20 ^a ± 0,02	13,43 ^a ± 0,06
Banana	4,82 ^e ± 0,01	22,03 ^f ± 0,15

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0.05$).

6.1.3 Compostos fenólicos

Na Figura 7 pode observar-se o teor de compostos fenólicos totais das matérias-primas com diferenças significativas em todas ($p < 0.05$) exceto o ananás e a maçã *Granny Smith*. As matérias-primas que apresentam o maior e o menor teor de compostos fenólicos são a couve e a abóbora, respetivamente.

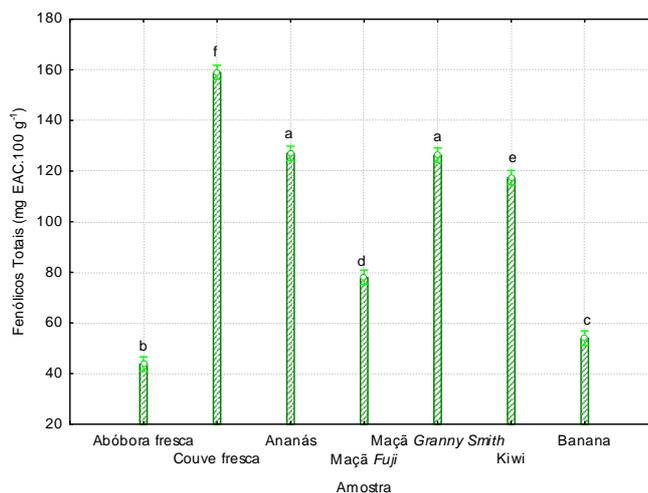


Figura 7 – Teor de compostos fenólicos totais (mg EAC.100 g⁻¹) presentes nas matérias-primas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

6.1.4 Capacidade Antioxidante

Na Figura 8 encontra-se representada a capacidade antioxidante das matérias-primas, na qual se observa que a banana possui menor e a couve fresca maior poder antioxidante. Comparando as diferentes amostras verifica-se que as matérias-primas que apresentam valores mais elevados de capacidade antioxidante são a couve fresca, o ananás e o kiwi, não apresentando diferenças entre si ($p > 0.05$).

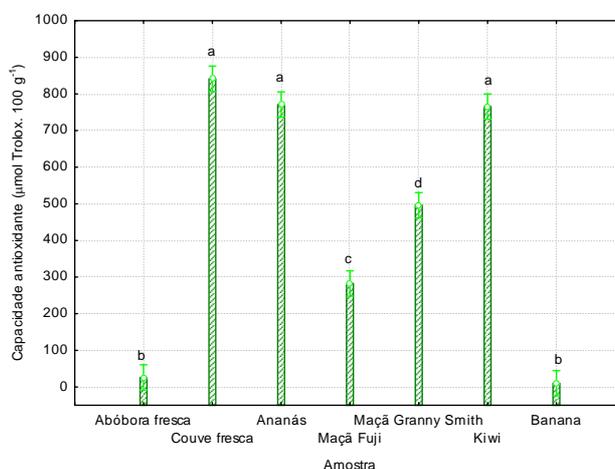


Figura 8 – Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) nas matérias-primas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

6.1.5 Humidade

Como previsível, as matérias-primas apresentam teores de humidade elevados com diferenças significativas entre si ($p < 0.05$), com exceção da maçã *Fuji* e do ananás ($p > 0.05$), como se observa na Tabela 4. O fruto com maior e menor teor de humidade são a abóbora e a banana, respetivamente.

Tabela 4 - Teor de humidade (%) das matérias-primas.

Amostra	Teor de Humidade (%)
Maçã <i>Fuji</i>	86,42 ^a ± 0,04
Maçã <i>Granny Smith</i>	84,30 ^d ± 0,02
Ananás	86,17 ^a ± 0,11
Couve	87,20 ^e ± 0,20
Abóbora	92,84 ^f ± 0,00
Banana	77,61 ^b ± 0,02
Kiwi	81,98 ^c ± 0,39

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

6.1.6 Balanço intercalar

Através da caracterização das matérias-primas foi possível verificar as particularidades de cada uma e assim poder prever as alterações no produto final tendo em conta a proporção de cada hortofrutícola. Durante a preparação das matérias-primas observou-se a rápida oxidação, em especial na maçã, conduzindo à alteração em termos de cor nestes produtos.

Hipótese: Realizar pré-tratamentos térmicos nos hortícolas e na maçã com o objetivo de reduzir a atividade enzimática, contribuindo para a preservação da cor da polpa e ainda a redução da carga microbiana.

7 Estabelecimento de pré-tratamentos térmicos de inativação enzimática

A aplicação de pré-tratamentos térmicos nos produtos hortofrutícolas tem como principais objetivos a redução da carga microbiana inicial, o controlo da atividade enzimática e ainda melhorar a aceitação por parte do consumidor nalguns casos. No que respeita ao último ponto do presente trabalho pretende-se eliminar o cheiro característico da couve crua e reduzir a fibrosidade da couve e da abóbora de forma a evitar a rejeição por parte do consumidor.

Os binómios tempo / temperatura dos pré-tratamentos realizados no presente estudo foram ajustados para cada caso. Para tal procedeu-se à preparação dos produtos hortofrutícolas, variando a forma e dimensão conforme se observa na Figura 9: couve, tiras de largura 0,5 cm; abóbora, paralelepípedos com ca de 3 x 3 x 1 cm (Gonçalves *et al.*, 2007) e no caso da maçã fatias com ca de 0,8 cm. Foram testados tratamentos por imersão em água e por vapor. Os binómios testados foram: no caso da maçã *Fuji* T= 100 °C, t= 0, 0,5 e 1,5 minutos, no caso da maçã *Granny Smith* T= 100 °C, t= 0; 0,5; 1; 1,5 e 2 minutos, no caso da couve T= 100 °C, t= 0; 0,5; 3 e 5 minutos e no caso da abóbora T= 90 °C, t= 0; 6 e 8 minutos.

Após os tratamentos térmicos, procedeu-se ao arrefecimento rápido num banho de água e gelo durante 5 minutos e o excesso de água foi removido com papel absorvente.

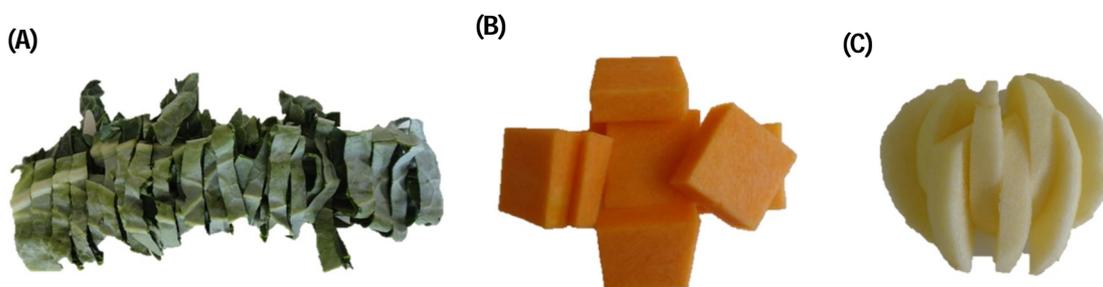


Figura 9- Representação das formas utilizadas para a aplicação dos pré-tratamentos térmicos: (A) couve, (B) abóbora e (C) maçã.

A eficiência do tratamento consistiu na avaliação qualitativa da inativação da peroxidase (5.2.2.1) e na avaliação da componente bioativa através do teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante visto que o objetivo principal deste trabalho é a obtenção de uma polpa de hortofrutícola com elevada componente bioativa.

7.1 Resultados e discussão

7.1.1 Teste da peroxidase

Com a avaliação do teste da peroxidase pretendeu-se selecionar os binómios de temperatura/tempo dos pré-tratamentos aplicados às matérias-primas que resultaram na inativação enzimática dos hortofrutícolas.

7.1.1.1 Maçã

Os pré-tratamentos térmicos aplicados à maçã (*Fuji* e *Granny Smith*) foram realizados em água a 100 °C e em vapor de água por diferentes períodos de tratamento. Findo o tempo de tratamento térmico procedeu-se ao teste da peroxidase e registaram-se as alterações como se observam nas Figuras 10 e 11.

Tratamento	Tempo de tratamento (min)			
	0	0,5	1	1,5
Água	 Reação positiva	 Reação positiva	 Reação negativa	 Reação levemente positiva
Vapor	 Reação positiva	 Reação positiva	 Reação levemente positiva	 Reação positiva

Figura 10 - Resultados do teste da peroxidase em maçã *Fuji* submetida a diferentes pré-tratamentos térmicos.

Relativamente à variedade *Fuji* verificou-se que o tempo de tratamento necessário para inativar a enzima peroxidase é de 1 minuto, independentemente do tipo de tratamento realizado (em água ou vapor).

Tratamento	Tempo de tratamento (min)				
	0	0,5	1	1,5	2
Água	 Reação positiva	 Reação positiva	 Reação positiva	 Reação levemente positiva	 Reação negativa
Vapor	 Reação positiva	 Reação positiva	 Reação positiva	 Reação levemente positiva	 Reação negativa

Figura 11 - Resultados do teste da peroxidase em maçã *Granny Smith* submetida a diferentes pré-tratamentos térmicos.

Em relação à variedade de maçã *Granny Smith*, e independentemente do tipo de tratamento (em água ou vapor) após 1,5 minutos foi possível constatar a inativação da enzima peroxidase.

7.1.1.2 Couve

No caso da couve os tratamentos térmicos foram mais intensos com o objetivo de eliminar o cheiro a couve fresca e consequente inativação enzimática, para tal aplicaram-se tratamentos com água e vapor durante diferentes tempos, como se observa na Figura 12.

Tratamento	Folha couve	Tempo de tratamento (min)			
		0	0,5	3	5
Água	Inteira	 Reação positiva	 Reação negativa	 Reação negativa	 Reação negativa
	Cortada	 Reação positiva	 Reação positiva	 Reação negativa	 Reação negativa
Vapor	Inteira	 Reação positiva	 Reação positiva	 Reação negativa	 Reação negativa
	Cortada	 Reação positiva	 Reação levemente positiva	 Reação negativa	 Reação negativa

Figura 12 - Resultados do teste da peroxidase em couve portuguesa submetida a diferentes pré-tratamentos térmicos.

Neste caso, a resposta que determinou a seleção do binómio tempo/temperatura de tratamento foi o cheiro. Verificou-se que apenas os tratamentos com duração de 5 minutos conduziram à redução do cheiro desagradável e característico da couve fresca, independentemente da forma como a folha de couve foi sujeita ao mesmo. A folha de couve cortada facilita a atuação das mirosinases e consequente hidrólise dos glucosinolatos ao contrário da folha inteira (Pereira *et al.*, 2002; Halkier & Gershonzen, 2006).

7.1.1.3 Abóbora

A abóbora é um hortícola que apresenta elevada fibrosidade e alguma atividade enzimática. Para minimizar a influência no produto final, aplicaram-se pré-tratamentos térmicos utilizando água à temperatura de 90 °C durante 6 e 8 minutos (Gonçalves *et al.*, 2007).

Pela análise da Figura 13 é possível verificar que a inativação enzimática foi conseguida apenas com os 6 minutos de tratamento. Este tempo conduziu igualmente a uma diminuição da fibrosidade.

Tratamentos	Tempo de tratamento (min)		
	0	6	8
Água	 Reação positiva	 Reação levemente positiva	 Reação levemente positiva

Figura 13 - Resultados do teste da peroxidase em abóbora submetida a diferentes pré-tratamentos térmicos.

7.1.2 Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais das matérias-primas em fresco e tratadas observa-se na Figura 14. Após o pré-tratamento térmico verifica-se um aumento significativo ($p < 0.05$) nas variedades de maçã estudadas nomeadamente após imersão em água da maçã *Fuji*. O teor de compostos fenólicos totais da variedade *Granny Smith* não apresentou diferenças significativas ($p > 0.05$) independentemente dos pré-tratamentos aplicados. Na abóbora tratada observou-se uma redução não significativa ($p > 0.05$) do teor de compostos fenólicos totais em cerca de 7,64% em relação à matéria-prima em fresco. No caso da couve houve uma redução significativa ($p < 0.05$) após o tratamento de aproximadamente 73,37%, independentemente do tratamento aplicado.

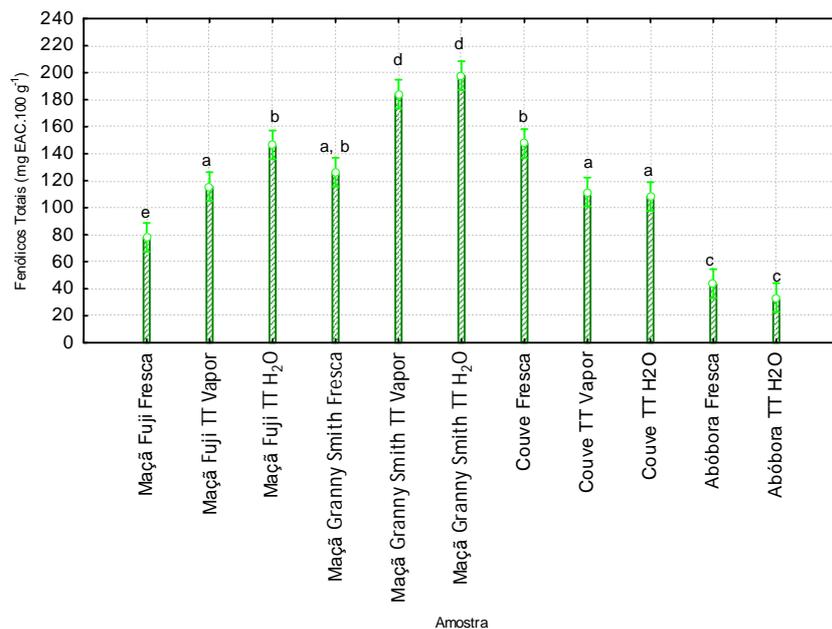


Figura 14 - Compostos fenólicos totais (mg EAC.100 g⁻¹) nas matérias-primas frescas e após os pré-tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

7.1.3 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante dos produtos hortofrutícolas quando são sujeitos ao tratamento em água não é alterada significativamente ($p > 0.05$) embora se verifique um ligeiro aumento (Figura 15). A couve sujeita a tratamento com vapor apresenta um aumento da capacidade antioxidante de forma significativa ($p < 0.05$). A capacidade antioxidante da maçã *Fuji* quando tratada em água aumenta de forma significativa ($p < 0.05$) comparativamente à maçã *Fuji* em fresco ou tratada com vapor.

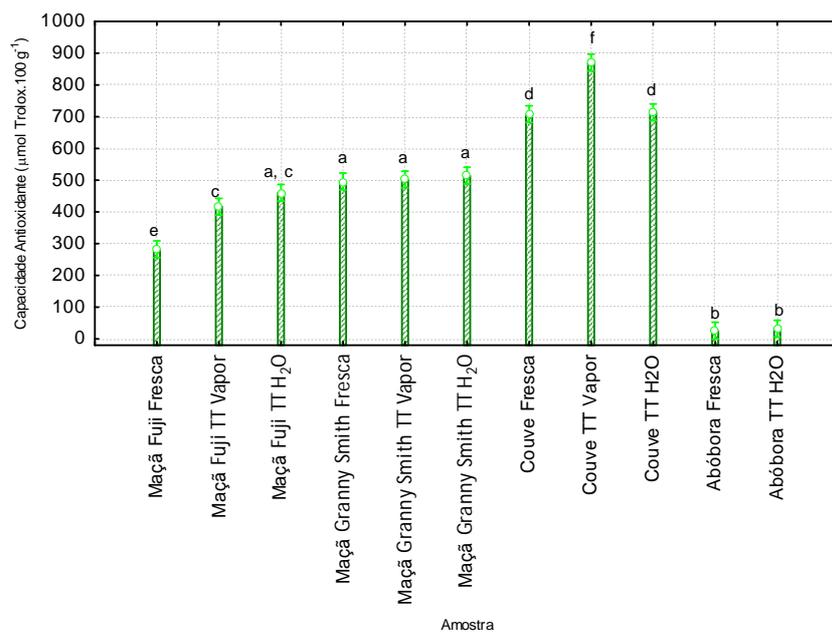


Figura 15 - Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.}100\text{ g}^{-1}$) nas matérias-primas frescas e após os pré-tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

7.1.4 Balanço intercalar

Com a aplicação de pré-tratamentos no caso das matérias-primas que apresentavam algumas limitações para a utilização em natureza, verificou-se tal como pretendido, inativação enzimática e algumas alterações na componente bioativa. A capacidade antioxidante de todos os produtos hortofrutícolas avaliados aumentou ou manteve-se com os pré-tratamentos térmicos aplicados, enquanto que o teor de compostos fenólicos totais na couve sofreu uma redução de cerca de 73,37% em ambos os pré-tratamentos térmicos. No caso da maçã verificou-se que com a aplicação do pré-tratamento térmico em água registou-se um aumento do teor de compostos fenólicos bem como a manutenção da capacidade antioxidante.

8 Desenvolvimento de formulações

A seleção da formulação da polpa de hortofrutícola com elevada bioatividade compreendeu diversas fases como se ilustra na Figura 16.

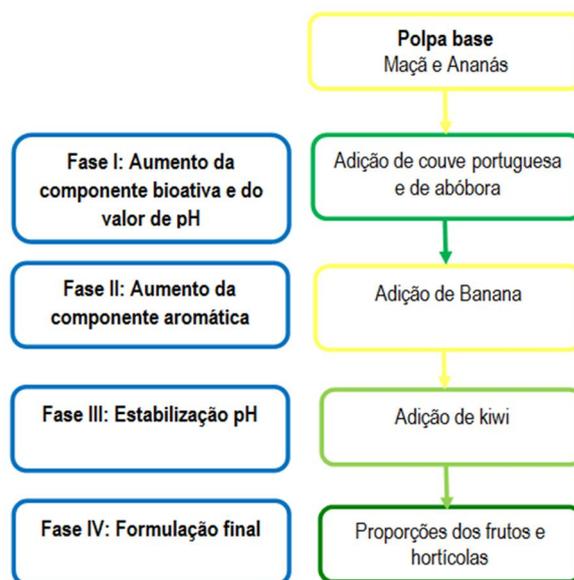


Figura 16- Processo de desenvolvimento da polpa.

O desenvolvimento da polpa iniciou-se com a adição de couve portuguesa numa base de fruta constituída por maçã e ananás. Esta polpa apresentou um valor de pH relativamente baixo conduzindo a dificuldades na manutenção da cor verde. Com o objetivo de solucionar este problema, isto é, estabilizar o pigmento de cor verde, clorofilas, optou-se por introduzir um hortícola com valor de pH mais elevado como é o caso da abóbora. Com esta medida obteve-se uma polpa com um pH mais elevado em que as proporções de hortofrutícola são: 41 % de maçã, 31 % de ananás, 8 % de couve e 20 % de abóbora. Após acerto das proporções de frutos e hortícolas na mistura chegou-se à conclusão de que a polpa obtida era pouco aromática, apresentando ainda dificuldades na manutenção da cor. No sentido de melhorar as características sensoriais desta introduziu-se a banana obtendo-se a formulação final de 41% de maçã, 31% de ananás, 8% de couve, 10% de abóbora e 10% de banana. Esta polpa obteve um aroma agradável, bastante frutado, mas continuou a apresentar instabilidade de cor. A hipótese avaliada para a obtenção da estabilização da cor e do aumento do aroma frutado bem como da capacidade antioxidante foi a introdução do kiwi, fruto naturalmente ácido, com cor verde. Neste caso a polpa foi processada utilizando 36% de maçã, 26% de ananás, 8% de couve, 10% de abóbora, 10% de banana e 10% kiwi. Foi ainda avaliado o efeito de duas variedades de maçã, Fuji & *Granny Smith* na manutenção da cor e da componente bioativa da polpa final.

A preparação da polpa iniciou-se com os pré-tratamentos térmicos realizados à couve e abóbora conforme descrito anteriormente.

O processamento da polpa final foi realizado em ambiente refrigerado, em porções de 500 gramas, segundo o processo de fabrico apresentado na Figura 17. Inicialmente, os frutos foram descascados, cortados e triturados no equipamento Vorwerk durante 45 segundos a 9180 rpm obtendo a polpa apresentada na Figura 18. Posteriormente a polpa foi embalada, removendo o máximo de oxigénio possível, tratada termicamente (TT) ou não (ST), e posteriormente arrefecida até à temperatura de armazenamento.

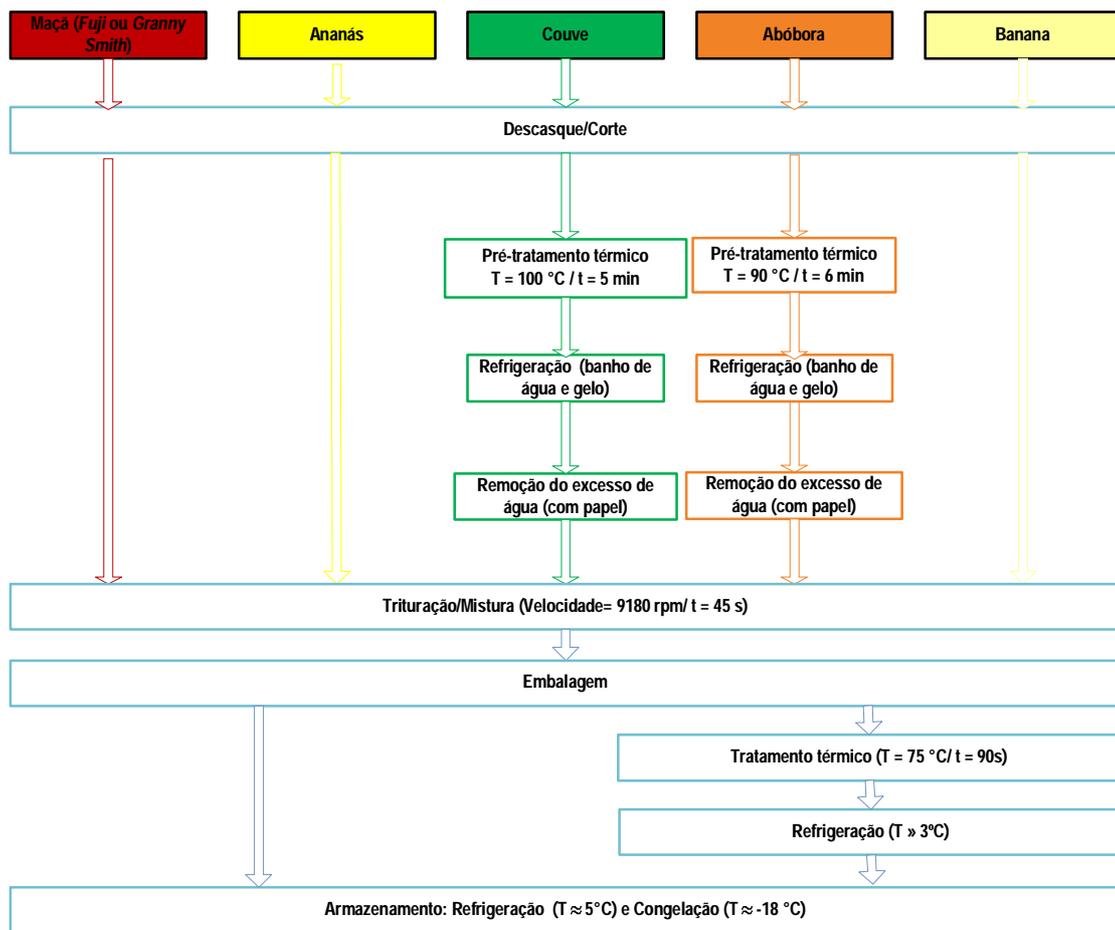


Figura 17 - Diagrama de processamento da polpa.



Figura 18 - Polpa após trituração.

As diferentes amostras foram analisadas sob o ponto de vista sensorial para os parâmetros de cor, pH, TSS, compostos fenólicos e atividade antioxidante.

8.1 Resultados e discussão

Na otimização da formulação foram combinadas diferentes matérias-primas em proporções tais que conduziram a diferentes polpas, como foi descrito anteriormente no ponto 8 (Desenvolvimento de formulações). De entre as diferentes formulações avaliadas definiram-se parâmetros como a análise sensorial, cor, pH, TSS, compostos fenólicos e atividade antioxidante com o objetivo de selecionar a formulação que melhor se enquadra nas preferências dos consumidores, mantendo-se estável e com propriedades benéficas para a saúde.

8.1.1 Análise Sensorial

Os resultados da análise sensorial para as polpas com maçã *Fuji* e *Granny Smith* e os hortícolas pré-tratados termicamente, observam-se nas Figuras 19 e 20.

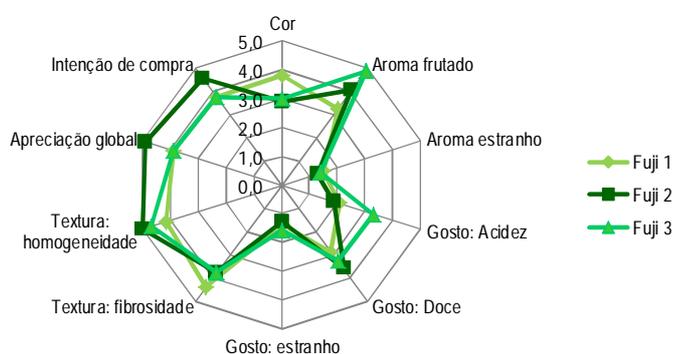


Figura 19 - Representação gráfica dos resultados da análise sensorial de polpas com maçã da variedade Fuji: *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{20}$), *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ba_{10}$) e *Fuji 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouV_8}Ab_{10}Ba_{10}Ki_{wi10}$).

Através da análise verifica-se que as três formulações de polpas testadas foram bem pontuadas por parte dos consumidores, visto não terem manifestado opiniões muito diferentes em relação às amostras analisadas. Pelo tratamento estatístico dos resultados, apenas foram encontradas diferenças significativas ($p < 0.05$) no atributo aroma: frutado entre as polpas *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{20}$) e *Fuji 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouV_8}Ab_{10}Ba_{10}Ki_{wi10}$). A polpa *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ba_{10}$) em termos de aroma frutado não apresenta diferenças significativas ($p > 0.05$) em relação às restantes embora seja a formulação com maior apreciação global e intenção de compra.

No sentido de observar a influência na preservação da cor e o efeito na atividade antioxidante das polpas foi testada a variedade de maçã *Granny Smith*.

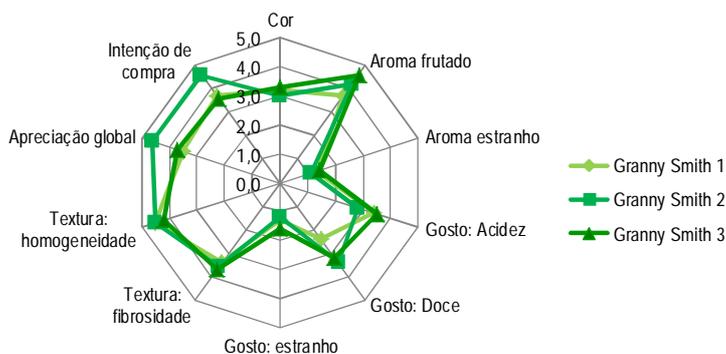


Figura 20 - Representação gráfica dos resultados da análise sensorial de polpas com maçã da variedade Granny Smith: *Granny Smith 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{20}$), *Granny Smith 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ba_{10}$) e *Granny Smith 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouV_8}Ab_{10}Ba_{10}Ki_{wi10}$).

Através da observação da Figura 20 verifica-se que o painel de provadores pontuou bem o produto, não se verificando diferenças significativas em nenhum dos atributos ($p > 0.05$). A formulação com maior aceitabilidade ao nível da apreciação global e intenção de compra foi a *Granny Smith 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ba_{10}$). O painel de provadores considerou a formulação *Granny Smith 1* e 3 as mais ácidas e a *Fuji 1* e 2 as menos ácidas, resultado que se encontra em conformidade com os valores de pH obtidos pelo método analítico. A polpa que o painel de

consumidores considerou mais doce foi a *Fuji 2*, seguida da *Granny Smith 2*. Esta diferença pode ser explicada pela acidez da variedade da maçã *Granny Smith* que mascarou o sabor doce da polpa.

8.1.2 Cor

A cor das formulações das diferentes polpas foi avaliada instrumentalmente nos dias 0 e 1, encontrando-se representada na Figura 21, em que a polpa *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ban_{10}$) e *Granny Smith 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ban_{10}$) possuem uma cor mais clara no dia 0, pois apresentam um parâmetro de cor L^* mais elevado e significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$). A polpa *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ban_{10}$) apresenta um valor relativamente inferior e significativamente diferente ($p < 0.05$) do parâmetro de cor a^* quando comparada com as restantes polpas, indicando uma coloração mais verde que as restantes polpas.

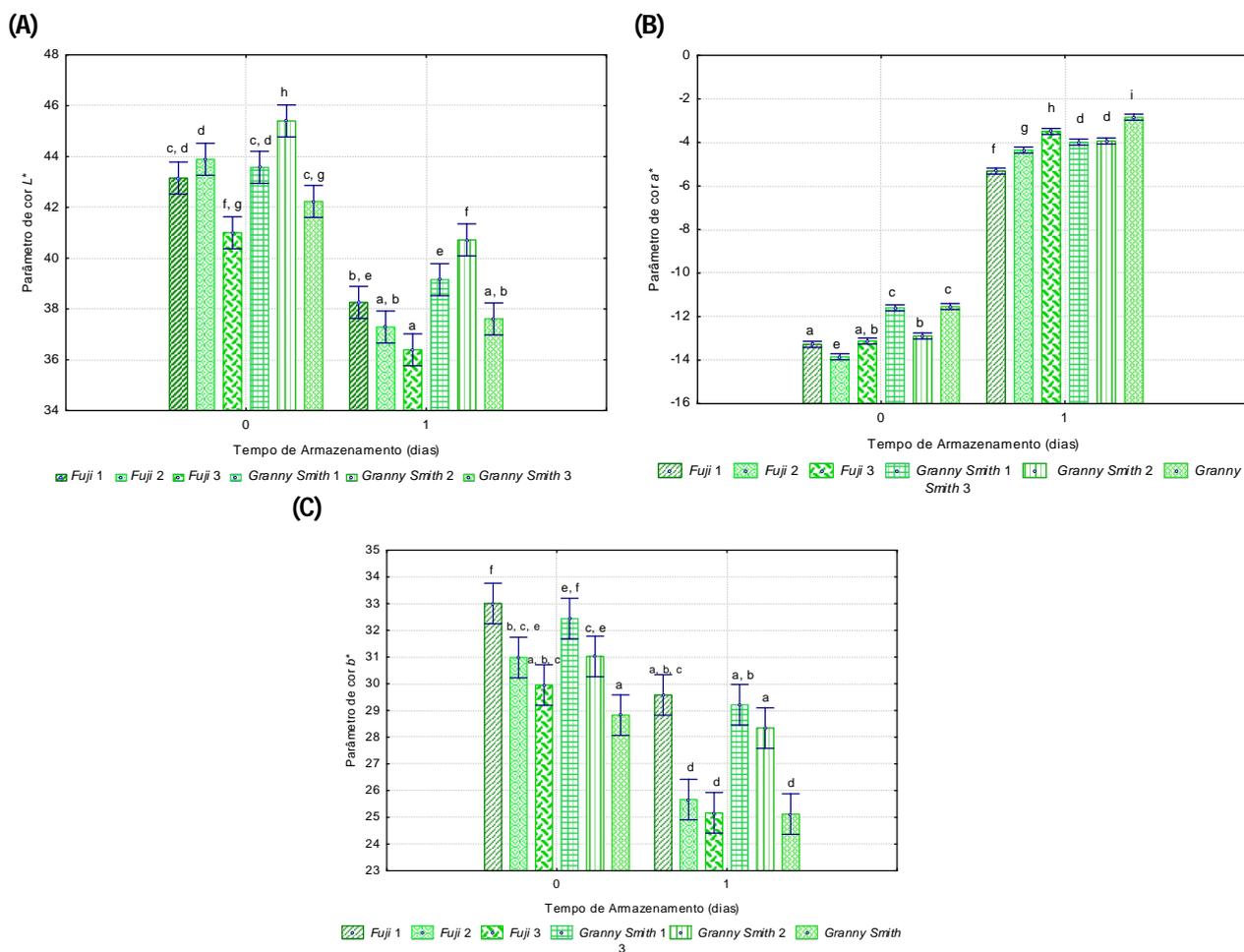


Figura 21 - Parâmetro de cor das polpas (A) L^* , (B) a^* e (C) b^* : *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{20}$), *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ban_{10}$), *Fuji 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouV_8}Ab_{10}Ban_{10}Kiwi_{10}$), *Granny Smith 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{20}$), *Granny Smith 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ban_{10}$) e *Granny Smith 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouV_8}Ab_{10}Ban_{10}Kiwi_{10}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

As formulações *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{20}$) e *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouV_8}Ab_{10}Ban_{10}$) caracterizam-se por possuírem uma pigmentação verde e significativamente diferente ($p < 0.05$) entre si e das restantes. Quanto ao parâmetro de cor b^* verifica-se que houve uma diminuição ao comparar os valores do dia 1 com os obtidos no dia 0, em todas as formulações. Relativamente à diferença total de cor todas as amostras sofrem uma alteração de cor designada de

“diferença grande” (9,97 e 11,77) ou “muito grande” (12,75) após um dia de armazenamento à temperatura de aproximadamente 5 °C.

O aspeto visual das diferentes formulações no dia 0 e no dia 1 encontra-se representado na Figura 22, na qual é evidente as alterações de cor sofridas pelas diferentes formulações.

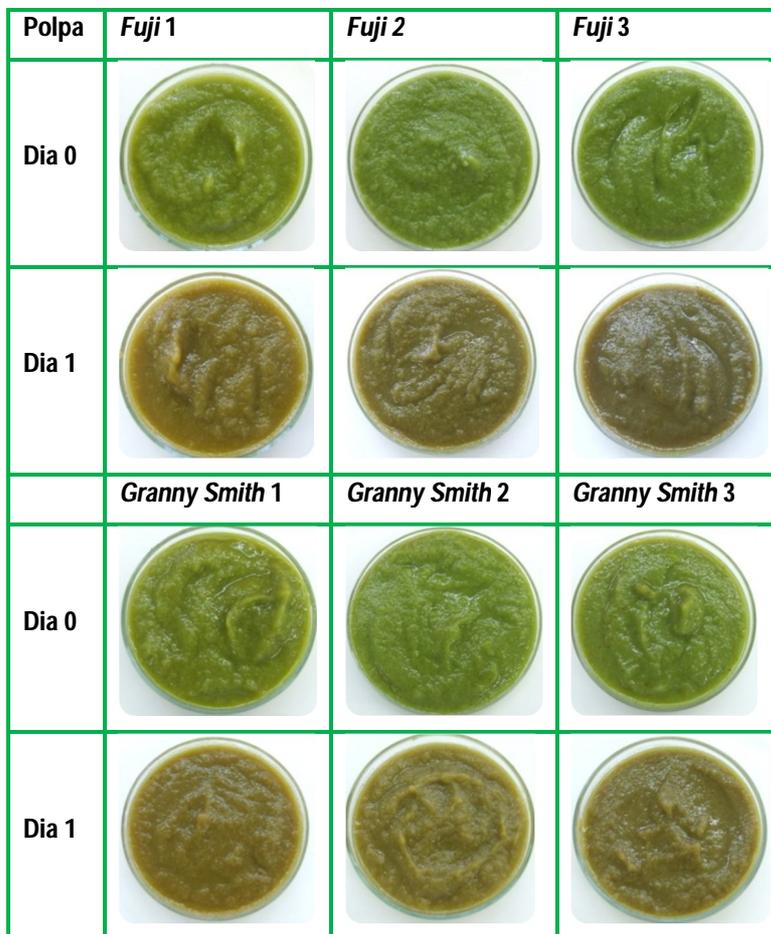


Figura 22 - Representação fotográfica das polpas nos dias 0 e 1: *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$), *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$), *Fuji 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}Kiwi_{10}$), *Granny Smith 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$), *Granny Smith 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$) e *Granny Smith 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}Kiwi_{10}$).

8.1.3 Teor de sólidos solúveis (TSS) e pH

Os valores de pH e TSS das formulações encontram-se na Tabela 5, na qual se observa que a amostra *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$) apresenta um valor de pH mais elevado e um TSS menor enquanto que a *Granny Smith 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$) apresenta um valor de pH inferior e a *Granny Smith 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$) um valor de TSS superior. Quanto aos valores de pH as amostras *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$) e *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$) não são significativamente diferentes ($p > 0.05$), mas relativamente aos valores de TSS verifica-se diferenças significativas em todas as formulações ($p < 0.05$).

Tabela 5 - Tabela de valores de pH e teor de sólidos solúveis (TSS, ° Brix) das polpas: *Fuji 1* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₂₀), *Fuji 2* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₁₀Ban₁₀), *Fuji 3* (M₃₆A₂₆Couv₈Ab₁₀Ban₁₀Kiwi₁₀), *Granny Smith 1* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₂₀), *Granny Smith 2* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₁₀Ban₁₀) e *Granny Smith 3* (M₃₆A₂₆Couv₈Ab₁₀Ban₁₀Kiwi₁₀).

Amostra	pH	TSS (° Brix)
<i>Fuji 1</i>	4,14 ^b ± 0,01	10,63 ^b ± 0,06
<i>Fuji 2</i>	4,13 ^b ± 0,01	12,77 ^e ± 0,06
<i>Fuji 3</i>	3,96 ^d ± 0,01	12,53 ^d ± 0,06
<i>Granny Smith 1</i>	3,75 ^a ± 0,01	11,37 ^c ± 0,06
<i>Granny Smith 2</i>	3,84 ^c ± 0,01	13,07 ^a ± 0,06
<i>Granny Smith 3</i>	3,77 ^a ± 0,01	12,97 ^a ± 0,06

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p < 0,05).

8.1.4 Compostos fenólicos

Na Figura 23 encontra-se representado o teor de compostos fenólicos totais das diferentes formulações, em que se observa que as formulações *Fuji 1* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₂₀) e *Granny Smith 1* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₂₀) apresentam menor e maior proporção de compostos fenólicos, respetivamente. As amostras *Fuji 1* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₂₀) e *Fuji 2* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₁₀Ban₁₀) não apresentam diferenças significativas entre si (p > 0,05), assim como as formulações *Granny Smith 2* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₁₀Ban₁₀) e *Granny Smith 3* (M₃₆A₂₆Couv₈Ab₁₀Ban₁₀Kiwi₁₀).

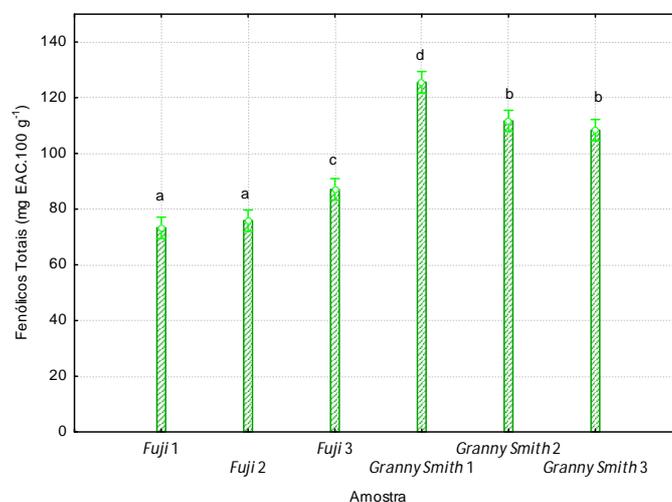


Figura 23 - Compostos fenólicos (mg EAC.100 g⁻¹) totais presentes nas polpas: *Fuji 1* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₂₀), *Fuji 2* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₁₀Ban₁₀), *Fuji 3* (M₃₆A₂₆Couv₈Ab₁₀Ban₁₀Kiwi₁₀), *Granny Smith 1* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₂₀), *Granny Smith 2* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₁₀Ban₁₀) e *Granny Smith 3* (M₃₆A₂₆Couv₈Ab₁₀Ban₁₀Kiwi₁₀). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).

8.1.5 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante das polpas encontra-se representada na Figura 24, na qual se observa que a amostra *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$) possui menor capacidade antioxidante enquanto a *Granny Smith 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$) é a amostra que apresenta o valor mais elevado. As 3 formulações à base da variedade de maçã *Fuji* não apresentam diferenças significativas ($p>0.05$) entre si. O mesmo resultado obteve-se relativamente às formulações à base da variedade *Granny Smith 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$) e 3 ($M_{36}A_{26}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}Kiwi_{10}$)

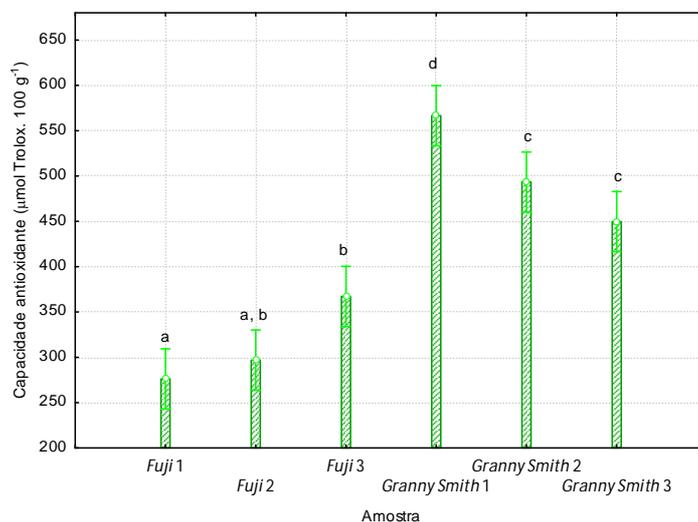


Figura 24 - Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.}100\text{ g}^{-1}$) nas polpas: *Fuji 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$), *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$), *Fuji 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}Kiwi_{10}$), *Granny Smith 1* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{20}$), *Granny Smith 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$) e *Granny Smith 3* ($M_{36}A_{26}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}Kiwi_{10}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0.05$)

8.1.6 Balanço intercalar

Através dos resultados obtidos concluiu-se que os provadores preferiram a formulação $M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$ independentemente da variedade de maçã utilizada. Um dos principais problemas observados aquando o armazenamento da polpa foi a alteração da cor verde agradável para uma cor verde-escuro menos apelativa. Esta mudança de cor está diretamente relacionada com os pigmentos responsáveis pela cor verde – as clorofilas. Uma vez que estas são instáveis a pH ácido e tendo em conta as preferências dos provadores selecionou-se a formulação *Fuji 2* ($M_{41}A_{31}C_{ouv8}Ab_{10}Ban_{10}$).

9 Estabelecimento do binómio tempo-temperatura de pasteurização da polpa

Após seleção da formulação estudou-se o efeito da pasteurização na estabilidade da cor, ácido ascórbico e carga microbológica das polpas após aplicação de diferentes binómios de tempo/temperatura de tratamento.

Os tratamentos de pasteurização foram executados pela imersão da polpa acondicionada em embalagens transparentes (ca 100 g, 15 x 10 x 1,5 cm) em banhos de água, termoestatizados e com agitação. Os tempos de tratamento foram contabilizados a partir do momento em que as amostras foram imersas nos banhos. Após cada condição de pasteurização as amostras foram refrigeradas, por imersão em banho de água e gelo e posteriormente em equipamento de circulação forçada de ar (Ilsa 5T 1/1 simply, Itália).

Foram realizados diferentes tratamentos térmicos, de acordo com as combinações dos binómios tempo/temperatura apresentados na Tabela 6. O tratamento térmico correspondeu à melhor preservação das características de produto fresco, nomeadamente a cor e o que provocou menores alterações na componente bioativa, bem como a redução da contagem de microrganismos a 30 °C e a determinação qualitativa de bolores e leveduras.

No desenvolvimento experimental realizou-se um controlo para cada temperatura, de modo a minimizar os erros dos resultados obtidos durante a execução dos métodos analíticos.

Tabela 6 – Binómios de temperatura/tempo testados no tratamento térmico de pasteurização.

Temperatura (°C)	Tempo (s)		
75	15	45	90
80	15	45	90
85	15	45	90
90	15	45	90

9.1 Resultados e discussão

9.1.1 Cor

Os parâmetros de cor das polpas após a aplicação dos diferentes binómios de tempo/temperatura encontram-se representados na Figura 25. Quanto ao parâmetro de cor L^* verifica-se que não existem diferenças significativas ($p > 0.05$) em relação às polpas frescas quando se aplicam os binómios de 80 °C/15 s, 85 °C/ 15 s e 90 °C/ 90 s. O parâmetro de cor a^* responsável pela coloração verde, não sofreu alterações significativas ($p > 0.05$) quando são aplicados os tratamentos de 85 °C/ 15 s, 75 °C/ 90 s, 85 °C/ 45 s. Relativamente ao parâmetro de cor b^* as amostras não sofreram alterações significativas ($p > 0.05$) quando são sujeitas a tratamentos de 75 °C/ 15 s, 75 °C/ 45 s, 75 °C/ 90 s, 80 °C/ 15 s e 80 °C/ 45 s. As amostras do dia 0 não apresentam tonalidade significativamente diferente ($p > 0.05$) entre si, independentemente do tratamento. Nos tratamentos com duração de 15 segundos verifica-se que a utilização de temperaturas de 75 °C e 80 °C não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$) entre si. Na aplicação do tratamento de 90 segundos, as temperaturas de 85 °C e 90 °C também não apresentam alterações significativas ($p > 0.05$) de tonalidade. A diferença total de cor apresenta valores inferiores para os tratamentos 75 °C/ 90 s, 85 °C/ 45 s, 90 °C/15 s e 90 °C/ 90s, embora esta diferença se classifique como uma diferença “muito distinta” (3,00-3,90) em relação às amostra frescas.

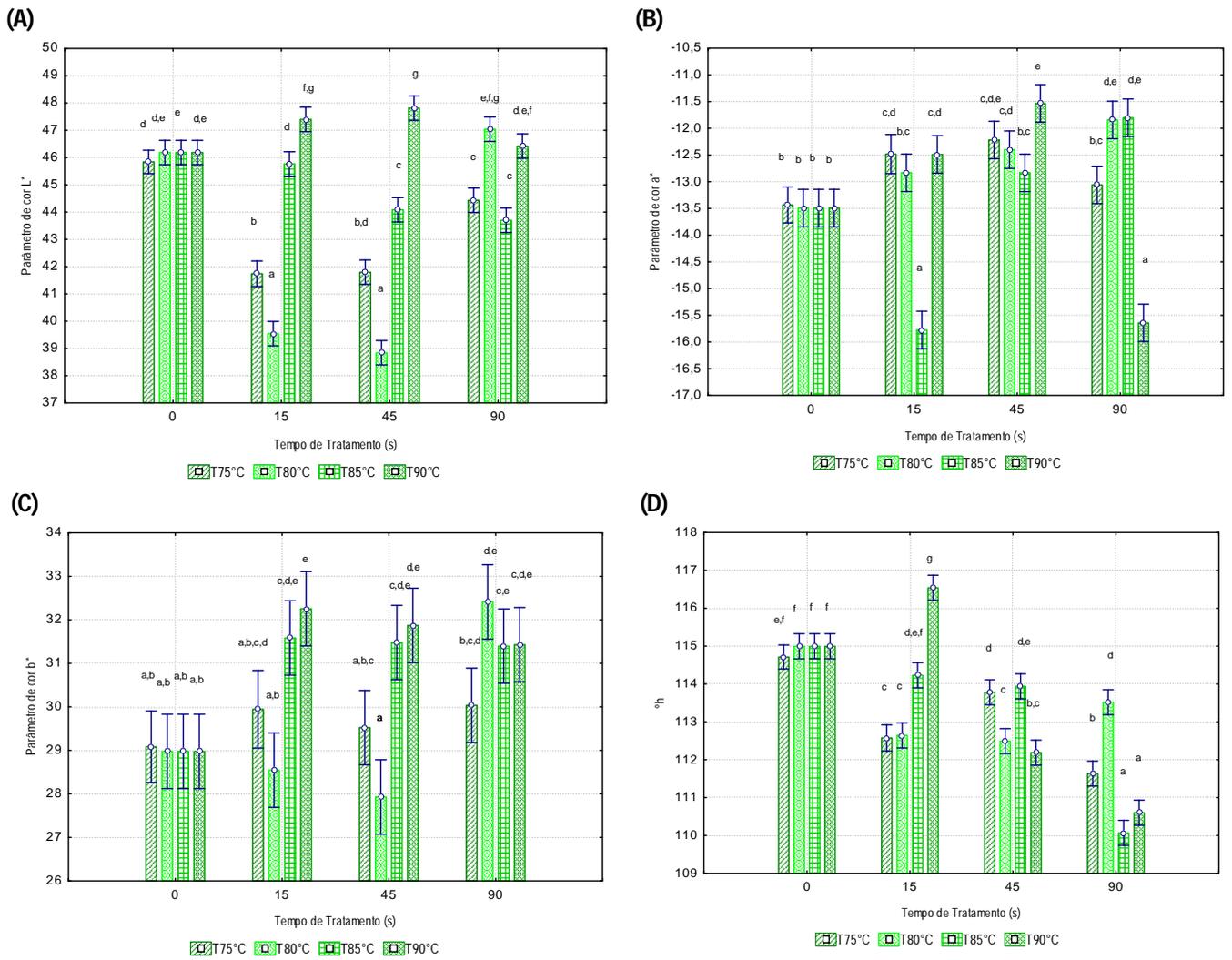


Figura 25 - Parâmetros de cor das polpas Fuji 2 (M₄₁A₃₁CouV₃Ab₁₀Ban₁₀) sujeitas a diferentes binômios tempo/ temperatura: L* (A), a* (B), b* (C) e tonalidade (D). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0.05). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

Na Figura 26 encontram-se as fotografias que permitem visualizar as alterações de cor provocadas pelos tratamentos.

Tempo Tratamento (s)	Temperatura (° C)			
	75	80	85	90
0				
15				
45				
90				

Figura 26 - Representações fotográficas das polpas após os diferentes tratamentos de pasteurização.

9.1.2 Ácido ascórbico

Com a aplicação dos diferentes binómios de tempo/temperatura de tratamento pretendia-se para além da manutenção da cor através da redução da atividade enzimática (polifenolxidade), também a preservação da componente nutricional e bioativa através da avaliação do teor de ácido ascórbico, parâmetro muito sensível à intensidade dos tratamentos térmicos, como se pode observar na Figura 27. O método analítico seguido não é muito rigoroso, pelo que os aumentos verificados de ácido ascórbico para tratamento a 90 °C durante 15 e 45 segundos e a 80 °C e 85 °C durante 45 segundos, podem não ser autênticos. Os resultados de ácido ascórbico obtidos por titulação podem não representar o valor real deste parâmetro na polpa (Raghu *et al.*, 2007).

A condição selecionada para prosseguir para o ensaio de armazenamento foi a temperatura de 75 °C durante 90 segundos, pois não apresentou diferenças significativas ($p > 0.05$) na alteração de cor e no teor de ácido ascórbico comparativamente à amostra em fresco, portanto manteve 95,43% do teor de ácido ascórbico. No estudo desenvolvido por Zulueta, *et al.* (2010) em sumo de laranja, observou-se uma diminuição de 14% do teor de ácido ascórbico após tratamento a 90° C/20 segundos, ao contrário do observado na polpa em estudo após tratamento a 90° C/ 15 segundos em que se registou um aumento de 68,77 %.

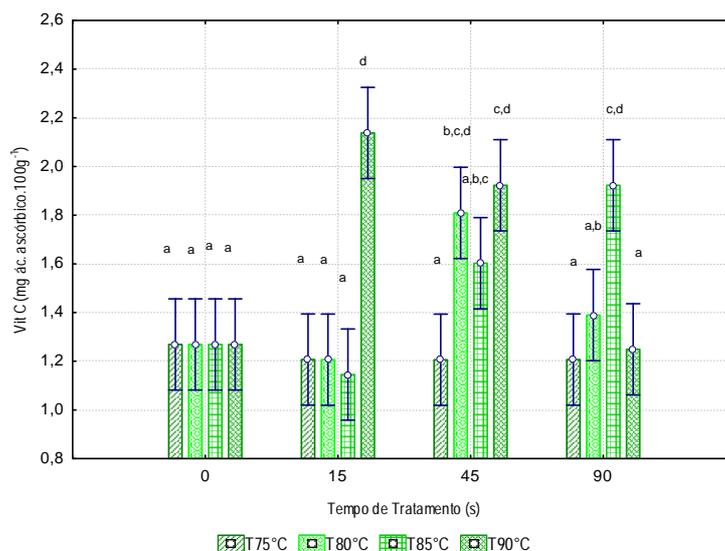


Figura 27 - Teor de ácido ascórbico (mg ác. ascórbico.100g⁻¹) nas amostras frescas e sujeitas aos diferentes tratamentos térmicos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

9.1.3 Mesófilos totais

Com a aplicação dos tratamentos térmicos pretendeu-se ainda estabilizar o produto sob o ponto de vista microbiológico mantendo as características do produto em fresco. Na Figura 28 encontra-se representada a contagem microbiana em que se verifica que as amostras sujeitas a 70 °C/ 90 s, 75 °C/ 90 s e 90 °C/ 15 s apresentam uma maior redução da carga microbiana inicial, cerca de 2 ciclos logarítmicos. Umme, et al. (1999) observou uma redução de 1,92 Log UFC.mL⁻¹ na polpa de anona tratada à temperatura de 79 °C durante 69 segundos. Esta diminuição é semelhante à obtida na polpa em estudo após tratamento a 75° C durante 90 segundos.

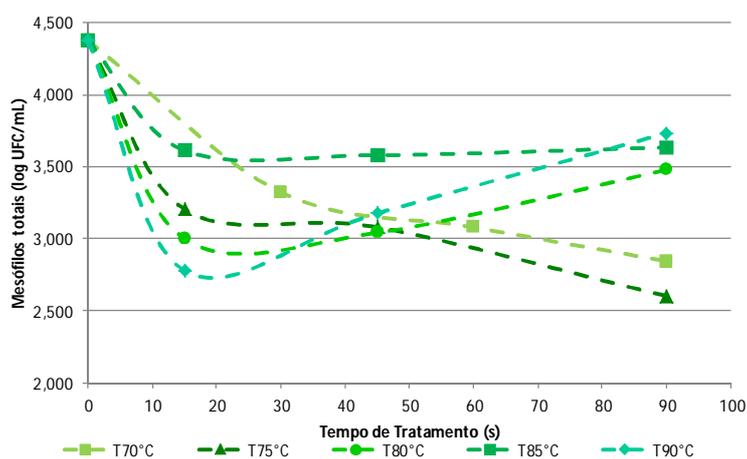


Figura 28 - Contagem de mesófilos totais nas polpas sujeitas a diferentes binómios tempo/ temperatura.

Ainda em termos de carga microbiana presente nas polpas também se realizou a determinação qualitativa dos bolores e leveduras, no qual todas as amostras apresentaram resultado positivo.

9.1.4 Análise multivariada

Na Tabela 7 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais, em que as duas primeiras componentes principais explicam 81,80 % da variância: primeira componente principal explica 45,83 % e a segunda componente explica 35,98 % da variância. As componentes principais que apresentam valor próprio superior a 1 consideram-se significativos ($p < 0.05$), sendo que as duas primeiras componentes principais apresentam valores próprios de 3,21 e 2,52.

Tabela 7 - Valores próprios e extração das componentes principais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância acumulada (%)
1	3,21	45,83	3,21	45,83
2	2,52	35,98	5,73	81,80
3	0,75	10,65	6,47	92,45
4	0,46	6,58	6,93	99,03
5	0,07	0,96	7,00	100,00
6	0,00	0,00	7,00	100,00
7	0,00	0,00	7,00	100,00

A relação das variáveis (parâmetros originais) com os componentes principais é determinada pelos coeficientes de correlação, apresentados na Tabela 8. Assim, verifica-se que a primeira componente principal é explicada pelas variáveis L^* , b^* , C^* e DTC (módulo > 0.7). A segunda componente principal é explicada por h e pelo ácido ascórbico.

Tabela 8 - Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e as duas primeiras componentes principais.

Variáveis	Componente principal 1	Componente principal 2
L^*	0,95	0,03
a^*	-0,22	-0,92
b^*	0,93	-0,21
C^*	0,93	0,13
$^{\circ}h$	-0,22	0,94
DTC	-0,65	-0,37
Vit C	0,24	-0,77
*MesTot	0,29	0,40

Nas Figuras 29 e 30 apresenta-se a projeção dos atributos no plano e das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais. Com base na projeção das amostras no plano principal e no diagrama de cluster (Figura 31) verifica-se a formação de 4 grupos. O grupo que contém as amostras tratadas 85°C/ 90s e 90°C/ 45s e o grupo 85°C/ 15s e 90°C/ 90s apresentam valores semelhantes de C^* , L^* , b^* e DTC a variar na primeira componente principal e o grupo 85°C/ 90s e 90°C/ 45s apresenta maiores valores de ácido ascórbico a variar na segunda componente principal. Os tratamentos térmicos com recurso a temperaturas de 75 °C aproximam-se do controlo, independentemente do tempo de tratamento, assim a amostra que apresentou uma maior semelhança com o controlo foi sujeita a um tratamento de 75°C/ 90s.

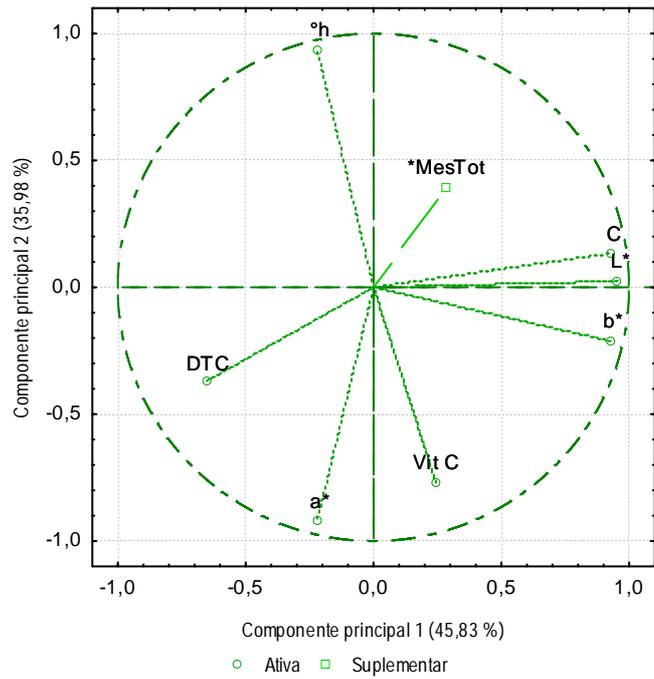


Figura 29 - Projeção dos atributos no plano.

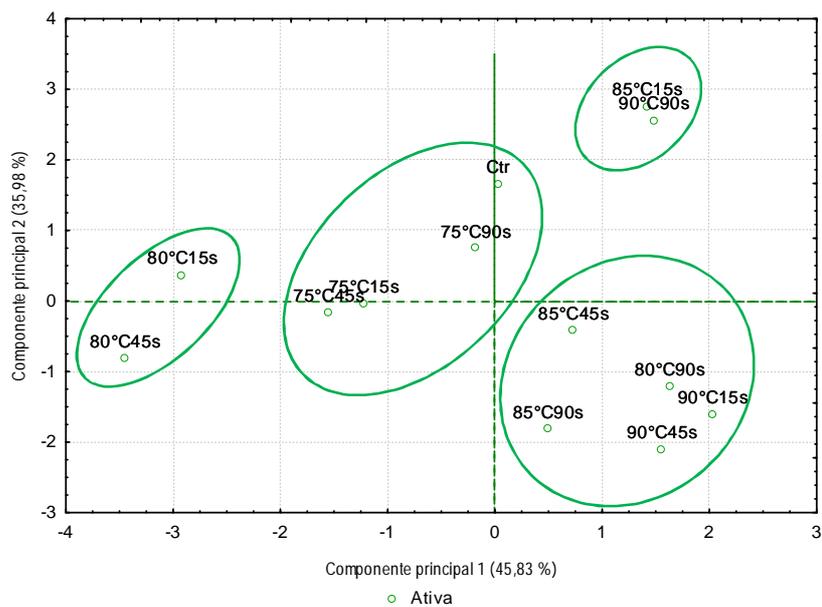


Figura 30 - Projeção das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

Na figura 31 apresenta-se a análise de cluster que permite observar à distância Euclidiana de 4 uma separação entre o controlo (Ctr) e as amostras sujeitas tratamentos térmicos de 75 °C e a amostra 85 °C/ 15 s. As amostras sujeitas a tratamento térmico mais intenso apresentam maiores diferenças relativamente ao controlo do que as amostras tratadas a 75 °C. Assim, pode-se concluir que o tratamento mais intenso prejudica as características quando se compara com o produto em fresco.

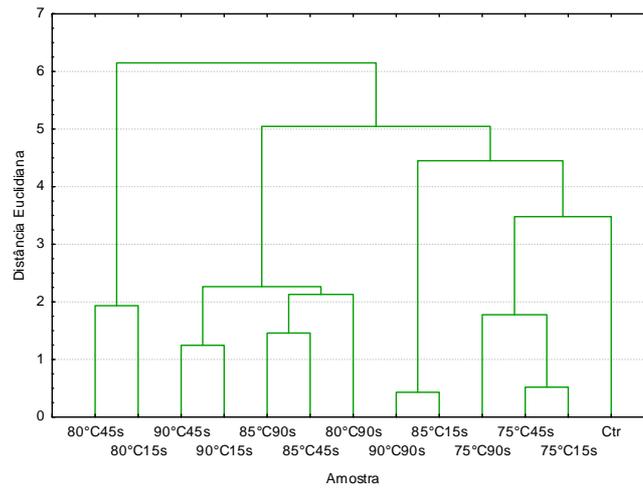


Figura 31 - Diagrama de cluster.

9.1.5 Balanço intercalar

Os tratamentos térmicos à temperatura de 75 °C independentemente do tempo, permitem obter produtos com características próximas do controlo, ao contrário dos tratamentos mais intensos em que se verifica a perda destas. O binómio tempo/temperatura de 75 °C durante 90 segundos é o tratamento térmico que provoca maior redução da carga microbiana de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos, que preserva as características das polpas, mantendo-as mais próximas do produto fresco ao nível da estabilidade de cor e da componente bioativa.

10 Determinação do tempo de vida útil de polpa embalada em dois tipos de material, sob condições de refrigeração e de congelação

A polpa foi preparada de acordo com o processamento apresentado na Figura 17 (pg. 31). Polpas sem tratamento (ST) e após o tratamento térmico (TT) (75 °C/ 90 segundos) foram arrefecidas até à temperatura de 3 °C ou -18 °C, dependendo da temperatura de armazenamento (refrigeração ou congelação) em equipamento de circulação forçada de ar (Ilsa 5T 1/1 simply, Itália) e devidamente acondicionadas às respetivas temperaturas de refrigeração (5 °C) e de congelação (-18 °C) até ao momento da realização do protocolo analítico.

O ensaio de refrigeração foi planeado inicialmente para decorrer ao longo de 30 dias, com análises a decorrer nos dias 0, 3, 7 e 14. No entanto, o ensaio foi interrompido no dia 14, visto as polpas não apresentarem condições aceitáveis para consumo.

O ensaio da congelação foi planeado inicialmente para decorrer ao longo de 6 meses, nos quais apenas se realizaram as análises dos dias 0, 30 e 60 visto que o ensaio ainda estava a decorrer no cessar deste trabalho.

Com o objetivo de estudar a influência do tipo de embalagem na qualidade final da polpa, foram testados dois tipos de embalagem: polietileno próprio para congelação sem proteção à luz (transparente, T) e um complexo laminado polietileno-alumínio-polietileno com proteção à luz (opaca, O). A polpa foi embalada em porções de 100 gramas em sacos de ca de 15 x 10 x 1,5 cm sendo os sacos de seguida selados com a ajuda de uma termoseladora (Figura 32).

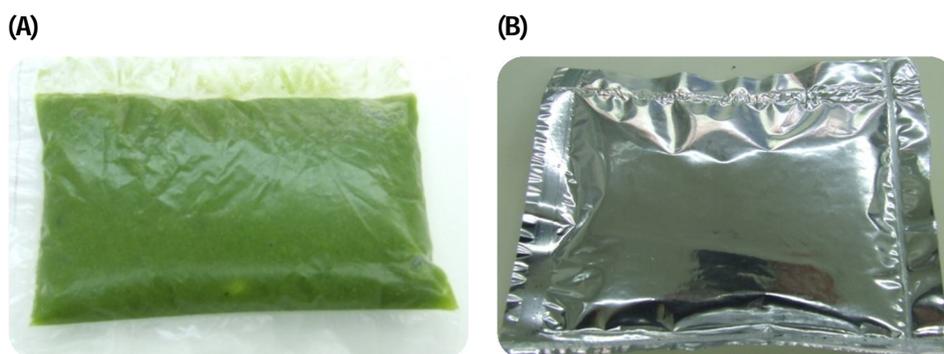


Figura 32 - Embalagens de polpas: (A) sem proteção à luz (transparente, T), (B) com proteção à luz (opaca, O).

10.1 Polpa conservada sob refrigeração

De forma a avaliar a polpa refrigerada procedeu-se à avaliação dos seguintes parâmetros: cor, determinações reológicas, compostos fenólicos, capacidade antioxidante, análise sensorial, teor de sólidos solúveis, separação de fases, mesófilos totais, bolores e leveduras, ácido ascórbico e atividade enzimática (PPO). As polpas da embalagem T não foram analisadas no dia 14 porque não apresentavam características sensoriais aceitáveis.

10.1.1 Resultados e discussão

O ensaio teve como objetivo avaliar o período de vida útil da polpa *Fuji 2* (M₄₁A₃₁Couv₈Ab₁₀Ban₁₀) sem tratamento (ST) e tratada termicamente (TT) em água à temperatura de 75 °C durante 90 segundos, acondicionada em embalagens sem proteção à luz (transparentes: T) e com proteção à luz (opacas: O).

10.1.1.1 Cor

Na Figura 33 encontram-se representados os parâmetros de cor das amostras armazenadas em embalagem transparente (T) e opaca (O), sem tratamento (ST) e tratadas termicamente (TT). Em relação ao parâmetro de cor L^* verifica-se que imediatamente após tratamento não se observaram diferenças significativas ($p>0.05$) entre as amostras. Após 3 dias à temperatura de refrigeração denotou-se uma diminuição de luminosidade em todas as amostras, revelando um escurecimento nestas. A partir deste dia registou-se um aumento, principalmente na amostra ST opaca verificando-se diferenças significativas ($p<0.05$) relativamente às restantes amostras do dia 7. Quanto ao parâmetro de cor a^* , após TT verificam-se diferenças significativas ($p<0.05$) no dia 0 dependendo do tipo de embalagem utilizada. As amostras TT apresentam um valor de a^* superior às amostras ST indicando uma menor proporção de cor verde nesta polpa. No 3º dia de armazenamento verifica-se um aumento significativo deste parâmetro ($p>0.05$) em todas as amostras analisadas, independentemente do tipo de tratamento e embalagem, quando comparado com os valores encontrados no dia 0. Ao longo da refrigeração, a diferença total de cor é "muito grande" em todas as amostras, apresentando um valor superior a 12, com a exceção das embalagens opacas TT e do dia 14 da embalagem opaca ST. Independentemente dos tratamentos, as embalagens com proteção à luz (O) apresentam um valor de diferença total de cor "grande" (8,62-9,03) no dia 14, o que indica uma alteração de cor nos primeiros dias de armazenamento. As alterações de cor ao nível do escurecimento e da perda a cor verde foram percebidas sensorialmente.

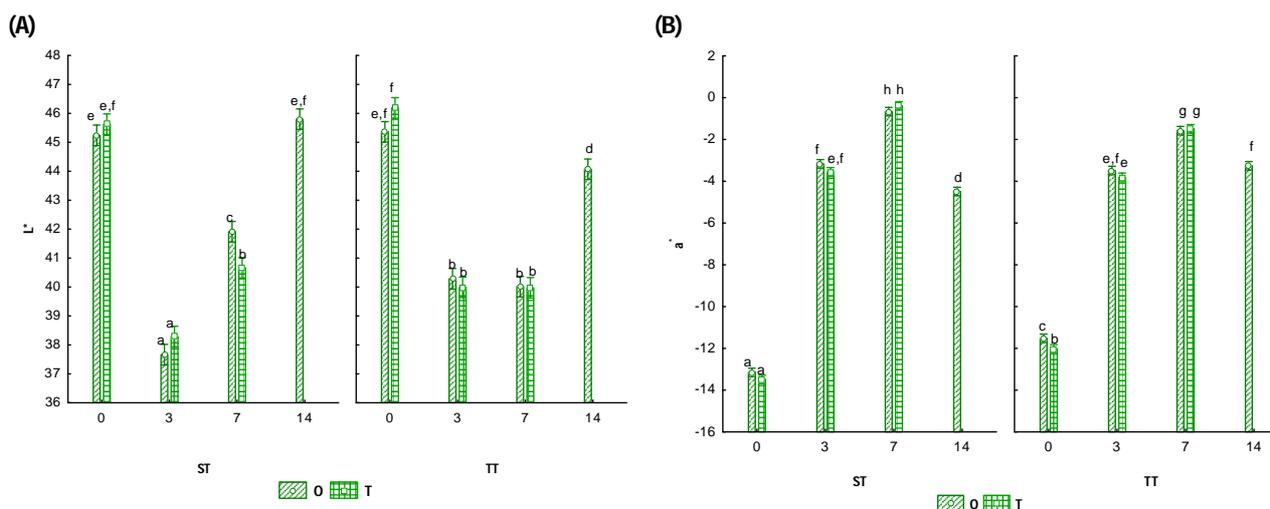


Figura 33 - Parâmetros de cor das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O): L^* (A), a^* (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.1.1.2 Determinações reológicas

Os resultados apresentados na tabela 9 evidenciam uma tendência de aumento da consistência e uma diminuição do índice de escoamento ao longo do tempo de armazenamento, independentemente do tipo de tratamento e embalagem.

Tabela 9 - Resultados da consistência (Pa.sⁿ) e índice de escoamento das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).

Amostra	TA (dias)	Consistência (Pa.s ⁿ)	Índice de escoamento
TST	0	1,36	0,21
TST	3	1,42	0,20
TST	7	1,88	0,09
OST	0	1,36	0,21
OST	3	1,11	0,18
OST	7	1,89	0,17
OST	14	2,21	0,19
TTT	0	1,80	0,24
TTT	3	1,15	0,20
TTT	7	2,55	0,13
OTT	0	1,49	0,22
OTT	3	1,05	0,19
OTT	7	2,20	0,16
OTT	14	1,90	0,15

10.1.1.3 Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos encontra-se representado na figura 34, na qual se verifica no 3.º dia de armazenamento, uma redução de aproximadamente 24,89 e 18,84; 23,17 e 18,98 mg EAC.100 g⁻¹ nas amostras ST: T e O e TT: T e O, respetivamente, quando comparado com o teor observado no dia 0. Após este dia registou-se um aumento gradual até ao final do armazenamento. No final de armazenamento o teor de compostos fenólicos totais encontrados nas amostras foi superior ao registado no dia 0. Nos dias 0 e 3 de armazenamento não se verificam diferenças significativas ($p > 0.05$) entre as amostras ST e TT independentemente do tipo de acondicionamento, podendo concluir-se que o tipo de embalagem não influenciou a componente fenólica das polpas.

Tal como referido anteriormente, durante o tempo de armazenamento observou-se um aumento significativo ($p < 0.05$) destes compostos independente do tratamento e do tipo de embalagem, não se observando diferenças significativas ($p > 0.05$) no dia 14 entre os tratamentos. O tratamento térmico não provocou uma alteração significativa ($p > 0.05$) no teor de compostos fenólicos, no entanto, ocorreu uma diminuição de 0,89% na embalagem T e 3,02% na embalagem O. A diminuição do teor destes compostos foi observada por Landl *et al.*, (2010) em polpa de maçã *Granny Smith* após tratamento térmico com intensidade semelhante (mesma temperatura e tempo superior (10 minutos)).

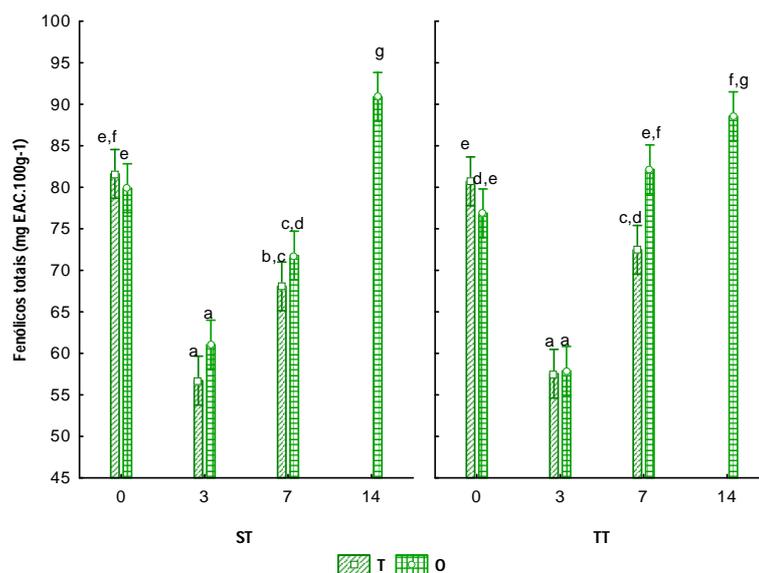


Figura 34 - Compostos fenólicos totais (mg EAC.100 g⁻¹) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.1.1.4 Capacidade antioxidante

Na Figura 35 apresenta-se a capacidade antioxidante das diferentes amostras, na qual se observa que após tratamento existe um aumento não significativo ($p > 0.05$) de 12,34 $\mu\text{mol Trolox.100 g}^{-1}$ na amostra acondicionada em embalagem T e uma diminuição não significativa ($p > 0.05$) de 0,61 $\mu\text{mol Trolox.100 g}^{-1}$ na amostra acondicionada em embalagem O. Relativamente ao dia 3, as amostras sujeitas TT apresentam um valor significativamente maior ($p < 0.05$) que as amostras ST enquanto no dia 7 apenas a amostra TT e com proteção à luz apresenta capacidade antioxidante significativamente maior ($p < 0.05$) em relação às ST.

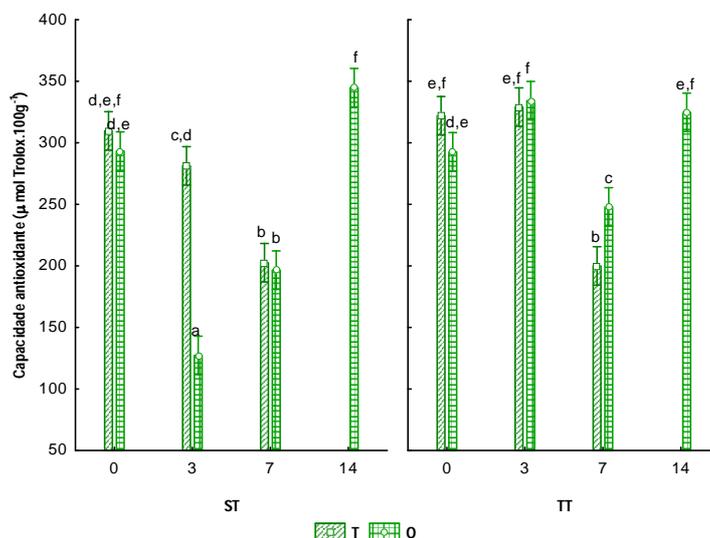


Figura 35 – Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.100 g}^{-1}$) das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

Ao longo da refrigeração independentemente do tipo de tratamento aplicado, a embalagem opaca apresenta um aumento significativo ($p < 0.05$) da capacidade antioxidante, sem diferenças significativas ($p > 0.05$) entre os

tratamentos. Assim, este tipo de embalagem é mais eficaz para a manutenção da capacidade antioxidante da polpa. A polpa hortícola apresenta valores de capacidade antioxidante entre 127,30 e 344,84 $\mu\text{mol Trolox}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de produto fresco, valores superiores aos encontrados por Alothman, *et al.* (2009) no ananás em fresco $12.7 \pm 1.28\ \mu\text{mol Trolox}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ e na banana em fresco $36.8 \pm 2.93\ \mu\text{mol Trolox}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ individualmente.

10.1.1.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada sempre que se procedeu ao controlo analítico das amostras, como se observa na Figura 36.

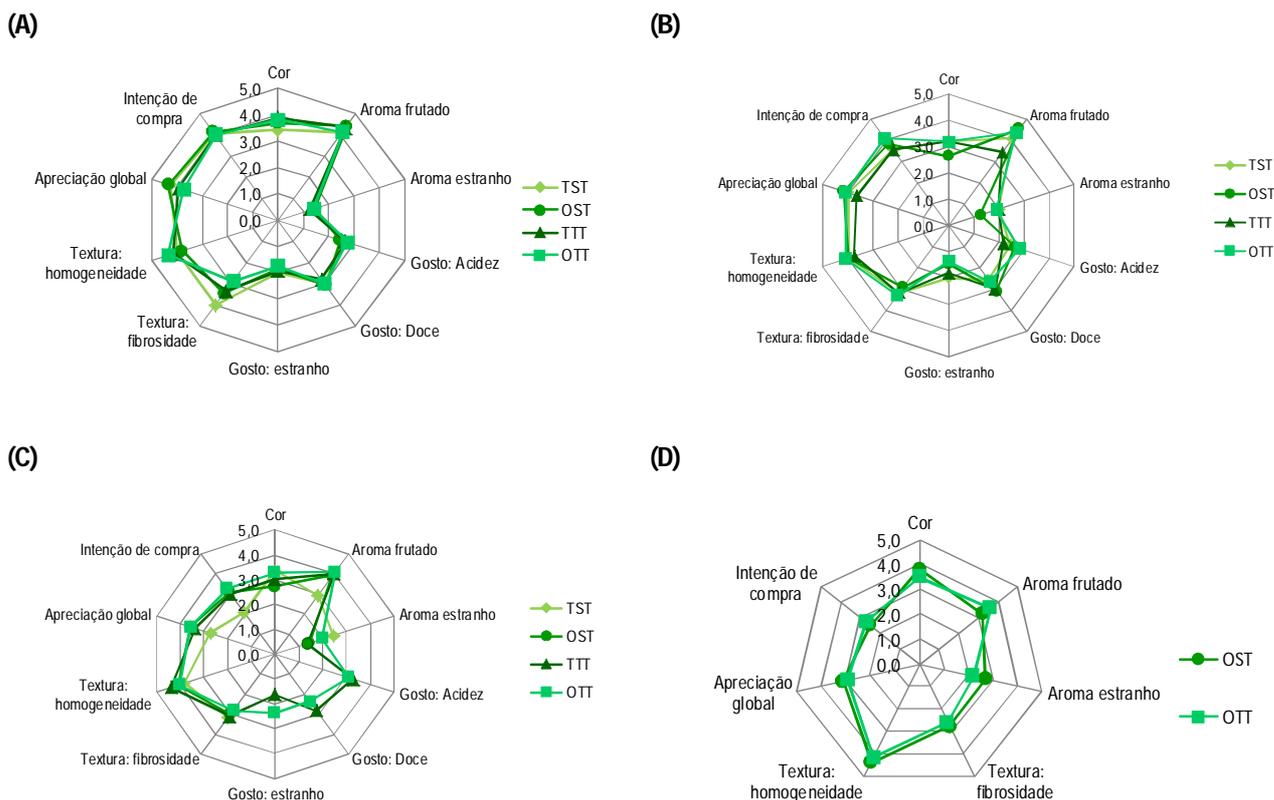


Figura 36 – Resultado da análise sensorial das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O): (A) dia 0, (B) dia 3, (C) dia 7 e (D) dia 14.

No momento em que se realizou a análise sensorial ainda não se conheciam os resultados microbiológicos das polpas, e por uma questão de segurança alimentar não se avaliou o parâmetro gosto a partir do dia 7 nas amostras ST. No dia 0, todas as amostras obtiveram uma apreciação global e uma intenção de compra positiva, embora as amostras ST apresentem uma apreciação global e um aroma frutado mais apreciados. De uma maneira geral o aroma estranho foi aumentando e o aroma frutado foi diminuindo, em especial no dia 7 da amostra transparente ST. No dia 14, nas amostras com embalagem opaca observa-se uma preferência pela amostra TT em detrimento da ST devido à classificação do aroma como mais frutado e menos estranho. As alterações de cor percebidas pelos provadores foram comprovadas pelo método analítico CIELab.

10.1.1.6 Teor de sólidos solúveis (TSS) e pH

Os valores de pH e teor de sólidos solúveis (TSS) encontram-se representados na Figura 37. Relativamente aos valores de pH (Figura 37 A) verifica-se que o tratamento térmico e o tipo de embalagem não conduziram a alterações significativas ($p > 0.05$) deste parâmetro no dia 0. De um modo geral verifica-se uma diminuição do valor de pH em todas as amostras ao longo do armazenamento, embora as amostras com proteção à luz nos dias 7 e 14 apresentem um valor superior de pH comparativamente às amostras em que se utilizou embalagem transparente, independentemente do tratamento. No caso das embalagens TT com proteção à luz, o valor de pH sofreu um aumento de 0,01 e 0,09 nos dias 7 e 14, respetivamente, em relação à embalagem transparente.

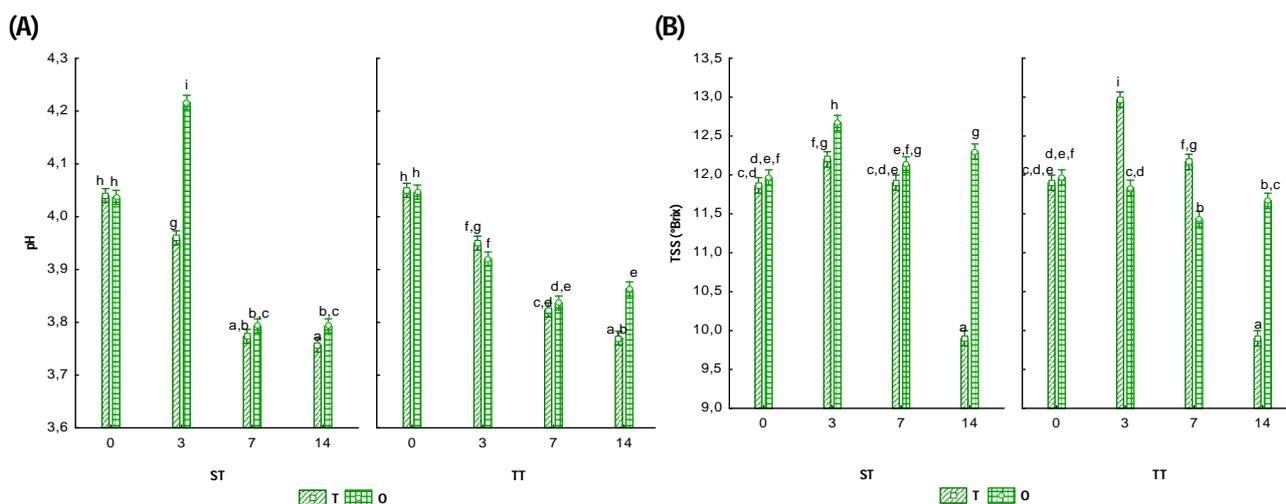


Figura 37 – Valores de pH (A) e teor de sólidos solúveis (TSS, ° Brix, B) nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

O TSS (Figura 37 B), não obstante a ligeiras variações manteve-se constante ao longo do período estudado. Apenas as amostras de embalagem transparente do dia 14 apresentam descida muito acentuada deste parâmetro, independentemente do tratamento, o que pode demonstrar a ocorrência de fermentações. Estes valores estão em concordância com a descida de pH observada nestas amostras e com a análise sensorial (aroma estranho) apenas nas amostras O.

10.1.1.7 Separação de fases

A separação de fases foi realizada com base numa apreciação visual na qual se verificou que esta é mínima independentemente do tipo de embalagem e do tratamento aplicado até ao 7º dia de armazenamento. No 14º dia de armazenamento verificou-se a formação de uma espécie de fungos filamentosos “filmes” nas polpas embaladas sem proteção à luz e uma separação de fases notória como se verifica nas fotografias presentes na Figura 38. Esta observação vem corroborar a explicação dada no ponto anterior.

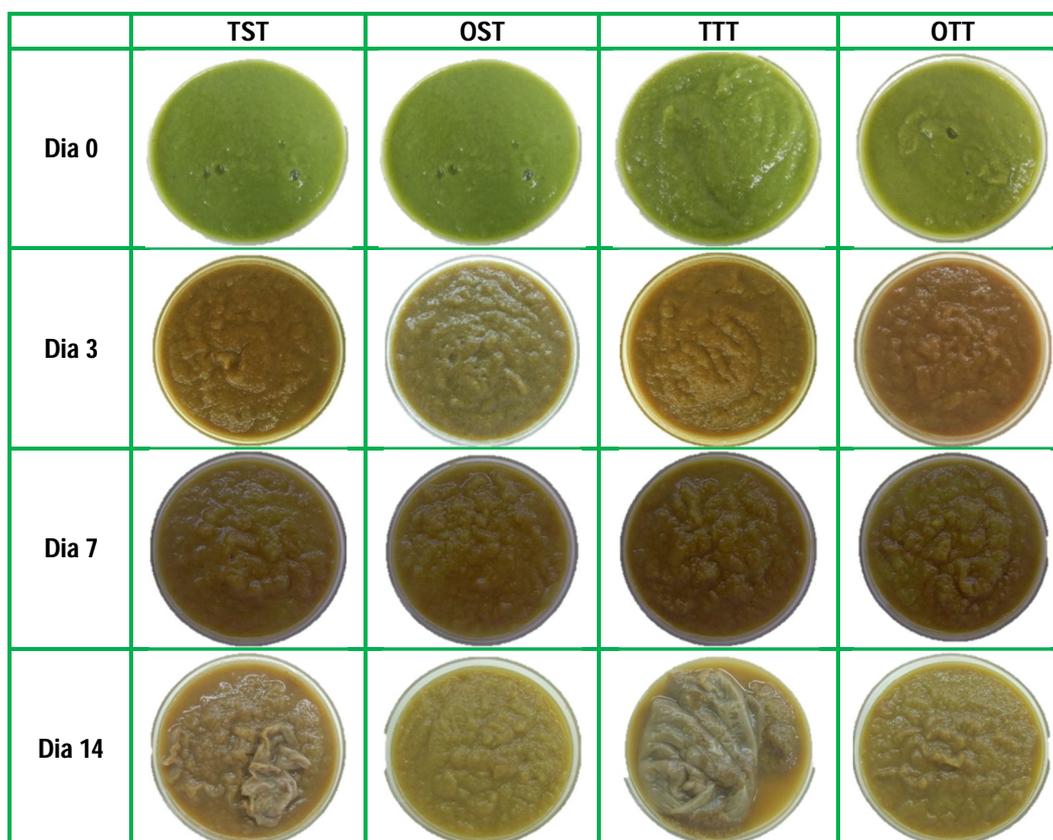


Figura 38 - Representações fotográficas das alterações das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O) ao longo do armazenamento em refrigeração ($\approx 3^{\circ}\text{C}$).

10.1.1.8 Mesófilos totais

A contagem dos mesófilos totais encontra-se representada na Figura 39, na qual se observa que o tratamento de uma maneira geral não influenciou significativamente ($p > 0.05$) a redução microbiana, ao contrário do esperado. No decorrer dos 14 dias de armazenamento houve uma tendência de diminuição da contagem de mesófilos totais em todas as amostras. No final do armazenamento, não se verificam diferenças significativas ($p > 0.05$) entre as amostras podendo concluir-se que o acondicionamento e o tratamento não contribuíram para a carga microbiana das polpas estudadas. Esta contagem pode ser proveniente da variabilidade das matérias-primas e pelo estado de maturação destas. Num estudo semelhante em polpa de maracujá pasteurizada Monteiro *et al.*, (2005) à temperatura $69-72^{\circ}\text{C}$ e $73-76^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, observou-se uma variação de 1 ciclo logarítmico a partir dos 60 dias de armazenamento. As amostras TT apresentam uma variação de $0,27 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ e $0,15 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ao fim dos 14 dias, comparando com o dia 0, para as embalagens transparentes e opacas respetivamente, o que pode sugerir que o produto em termos microbiológicos possui um tempo de prateleira muito superior aos 14 dias.

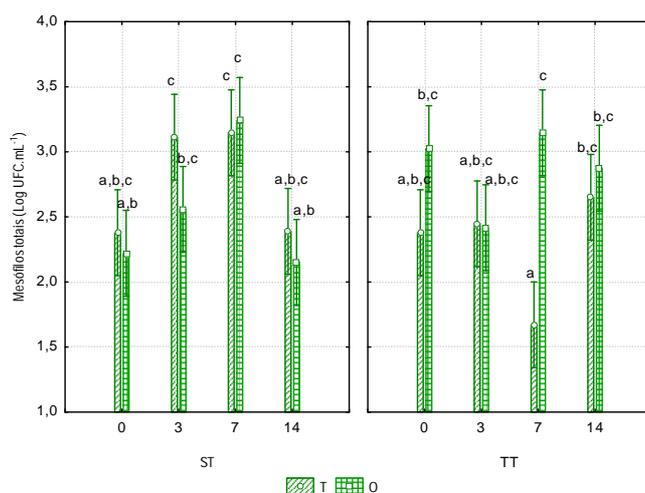


Figura 39 - Contagem dos mesófilos totais (Log UFC.mL⁻¹) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.1.1.9 Bolores e leveduras

Os resultados dos bolores e leveduras encontram-se representados na Figura 40, na qual se observa que não existem diferenças significativas ($p > 0.05$) entre as amostras frescas (ST) e sujeitas a tratamento térmico (TT), apesar de haver uma diminuição de 1 Log UFC.mL⁻¹ na amostra embalada T. De uma maneira geral, ao longo do tempo de armazenamento houve um aumento da carga microbiana até 2 Log UFC.mL⁻¹, apesar de não apresentar diferenças significativa ($p > 0.05$). A polpa desenvolvida no presente trabalho apresenta um comportamento semelhante à polpa de maracujá pasteurizada (Monteiro *et al.*, 2005) nos intervalos de temperatura 69-72°C e 73-76 °C durante 30 segundos, pois apresentou uma pequena variação na contagem de bolores e leveduras ao longo dos 180 dias de armazenamento, sendo que até aos 90 dias não houve variação na contagem destes microrganismos.

As polpas em estudo apresentam valores dentro dos padrões microbiológicos exigidos para a qualidade microbiológica dos produtos prontos a consumir (10³-10⁵) (Santos *et al.*, s/d).

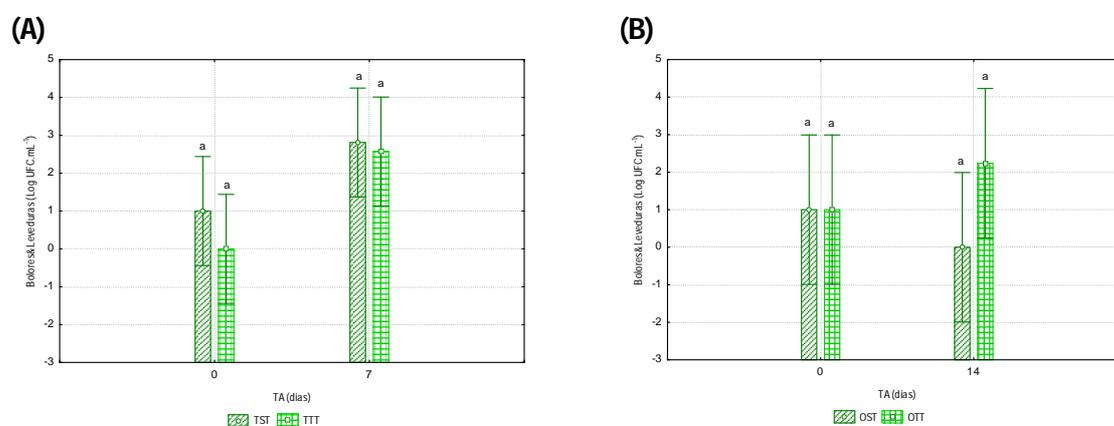


Figura 40 - Contagem de bolores e leveduras (Log UFC.mL⁻¹) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT): (A) embaladas sem proteção à luz (T) e (B) com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.1.1.10 Ácido ascórbico

Ao longo da refrigeração não se verificam diferenças significativas ($p>0.05$) no teor de ácido ascórbico, independentemente do tratamento e do tipo de embalagem, como se observa na Figura 41. No final do armazenamento verifica-se que as amostras ST acondicionadas em embalagens transparentes sofreram uma redução de $0,14 \text{ mg } \acute{\text{a}}\text{c. ascórbico.}100 \text{ g}^{-1}$ e as embalagens opaca sofreram uma diminuição de $0,08 \text{ mg } \acute{\text{a}}\text{c. ascórbico.}100 \text{ g}^{-1}$, comparando com o dia 7. Uma polpa preparada a partir de maçã, variedade *Granny Smith*, sujeita a um tratamento térmico de 75°C durante 10 minutos apresentou *ca* de $4 \text{ mg } \acute{\text{a}}\text{c. ascórbico.}100 \text{ g}^{-1}$ após 14 dias de armazenamento sob refrigeração, valores superiores aos obtidos no presente trabalho apesar do tratamento térmico ser mais prolongado (Landl *et al.*, 2010).

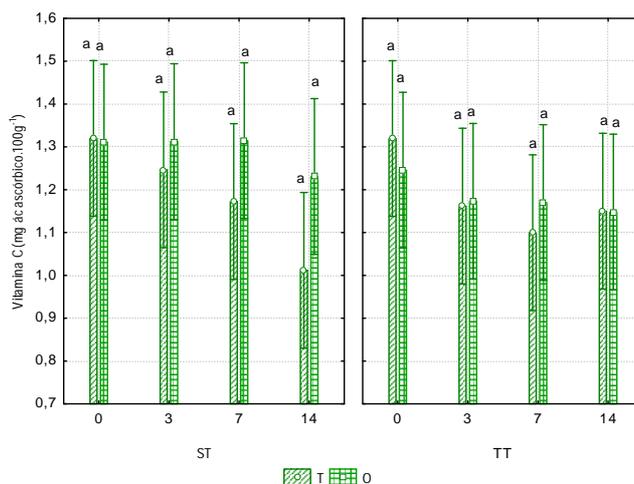


Figura 41 - Teor de ácido ascórbico ($\text{mg } \acute{\text{a}}\text{c. ascórbico.}100\text{g}^{-1}$) presente nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.1.1.11 Atividade enzimática: Polifenoloxidase (PPO)

A atividade enzimática encontra-se representada na Figura 42 na qual se observa que não existem diferenças significativas ($p>0.05$) entre as embalagens transparentes (T). Após tratamento foi visível um aumento de 37,74 % na atividade enzimática da PPO na amostra acondicionada em embalagem opaca. No final do armazenamento verifica-se que o tratamento térmico (TT) não influencia de forma significativa ($p>0.05$) a atividade enzimática da PPO, ao contrário da embalagem que apresenta diferenças significativas ($p<0.05$) entre a transparente (T) e a opaca (O), sendo a opaca a que apresenta um valor mais elevado. Observando os valores de atividade enzimática, independentemente da embalagem, verifica-se que as amostras TT e ST apresentam valores na ordem de $26,11 \text{ U.g}^{-1}$ e $20,92 \text{ U.g}^{-1}$, respetivamente. De uma forma geral, o tratamento térmico provocou um aumento de aproximadamente 20 % da atividade da PPO, ao contrário dos resultados obtidos por Chutintrasria & Noomhorm, (2006) numa polpa de ananás sujeita a um tratamento térmico de 75°C durante 5 minutos em que houve uma redução da atividade enzimática da PPO, permanecendo $59.07\pm 1.3\%$ ativa.

Estes resultados evidenciam que o tratamento térmico efetuado não foi efetivo nem para o controlo microbiano nem para a redução enzimática.

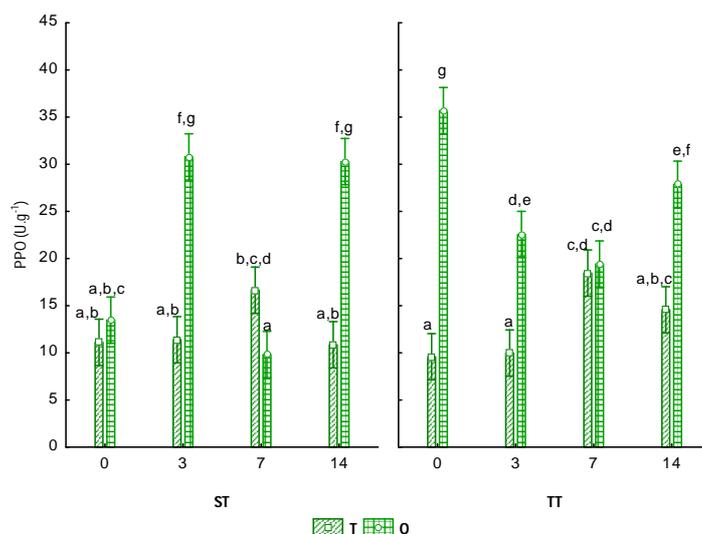


Figura 42 - Valores de atividade enzimática (PPO, U.g⁻¹) presente nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.1.1.12 Análise multivariada

Na tabela 10 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais, em que a primeira componente principal explica 51,22% da variância e a segunda componente principal explica 31,12%. No total, as primeiras duas componentes principais explicam 82,35% da variância.

As duas primeiras componentes principais apresentam valores próprios significativos, superiores a 1, com valores de 6,15 e 3,73 para a primeira e a segunda componentes principais, respetivamente.

Tabela 10 - Valores próprios e extração das componentes principais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância acumulada (%)
1	6,15	51,22	6,15	51,22
2	3,73	31,12	9,88	82,35
3	0,86	7,20	10,75	89,55
4	0,59	4,94	11,34	94,49
5	0,29	2,42	11,63	96,91
6	0,21	1,71	11,83	98,62
7	0,07	0,58	11,90	99,20
8	0,04	0,36	11,95	99,56
9	0,03	0,26	11,98	99,82
10	0,02	0,15	12,00	99,98
11	0,00	0,02	12,00	100,00
12	0,00	0,00	12,00	100,00

A relação das variáveis (parâmetros originais) com as componentes principais é determinada pelos coeficientes de correlação, apresentados na Tabela 11. A primeira componente é explicada pelas variáveis: Parâmetro de cor L*, a*, b*, C* e %h. A segunda componente principal é explicada pelas variáveis: Cons (consistência), Fen Tot (compostos fenólicos) e AG (apreciação global).

Tabela 11 - Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.

Variáveis	Componente principal 1	Componente principal 2
L*	-0,82	-0,50
a*	0,98	-0,14
b*	-0,96	-0,21
C*	-0,98	-0,11
°h	-0,86	0,08
DTC	0,33	0,54
Cons	0,29	-0,78
Fen tot	-0,47	-0,77
pH	-0,52	0,72
Cor	-0,74	-0,51
AG	-0,50	0,79
IC	-0,62	0,70
*AO	-0,58	-0,32
*AE	0,38	-0,56
*TH	-0,04	-0,47

Nas figuras 43 e 44 apresenta-se a projeção dos atributos no plano e a projeção das amostras no plano respetivamente. A cor está relacionada com o dia 0 a variar na primeira componente principal, embora a intenção de compra mais elevada se associe à polpa do dia 3 de armazenamento explicada pela segunda componente principal. A apreciação global é associada à segunda componente principal, na qual as amostras do dia 3 apresentam melhores classificações por parte dos provadores. As amostras do dia 14 apresentam menores diferenças de cor, L*, b* e C* do que as amostras do dia 3 e 7, explicada pela componente principal 1.

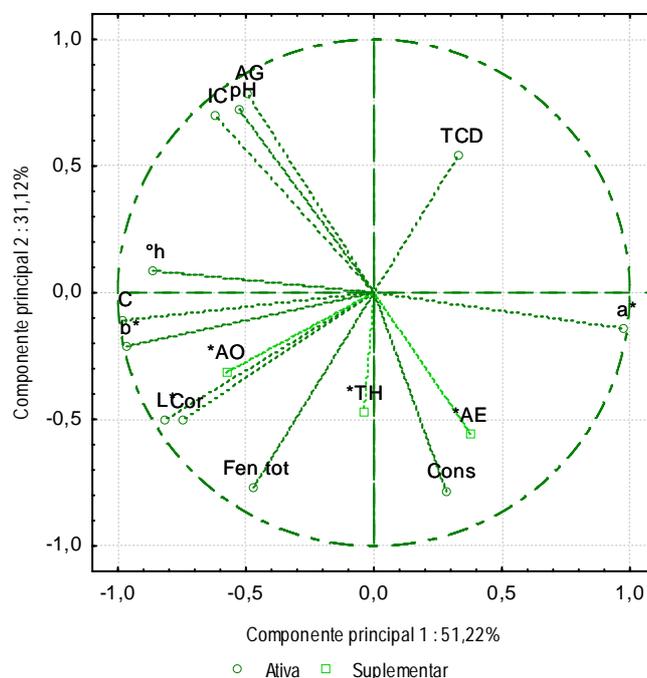


Figura 43 - Projeção dos atributos no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

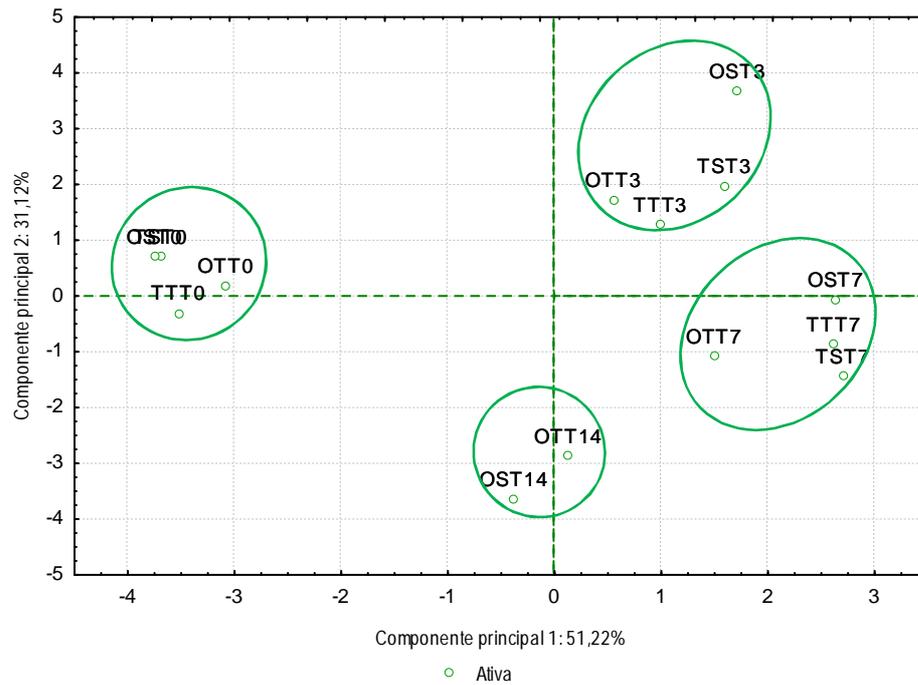


Figura 44 - Projeção das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

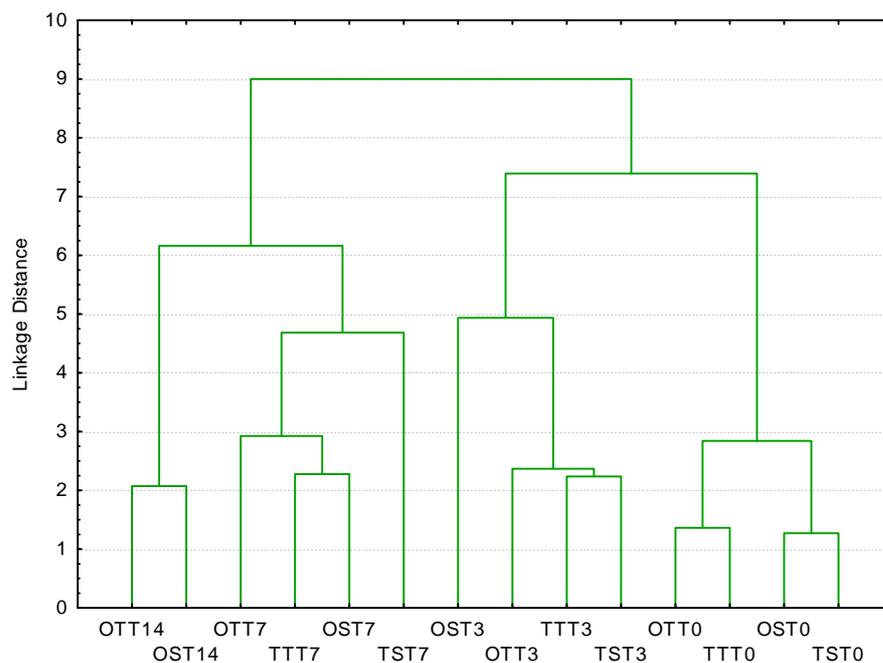


Figura 45 - Diagrama de cluster.

Com base no diagrama de cluster (Figura 45) é possível identificar 4 grupos de amostras. O fator que influencia o ensaio da refrigeração é o tempo de armazenamento, apresentando maior importância do que o tratamento e a embalagem. A distância Euclidiana 4,5 separa o tempo de armazenamento do dia 0 e dia 3, para um nível mais abaixo verifica-se que o tratamento térmico e a embalagem têm a mesma importância.

10.1.1.13 Balanço intercalar

Com o presente estudo foi possível verificar que o TT de pasteurização efetuado não se mostrou adequado para conservar. No que respeita à embalagem, a embalagem opaca apresentou vantagens em relação à transparente.

10.2 Polpa conservada sob congelação

As amostras foram controladas para os parâmetros: cor, determinações reológicas, compostos fenólicos, capacidade antioxidante, análise sensorial, teor de sólidos solúveis, separação de fases, mesófilos totais, bolores e leveduras, ácido ascórbico e atividade enzimática (PPO).

10.2.1 Resultados e discussão

O ensaio da congelação ($T \approx -18\text{ }^{\circ}\text{C}$), à semelhança do ensaio da refrigeração, teve como objectivo avaliar o tempo de vida útil da polpa *Fuji 2* ao longo do tempo de armazenamento, utilizando combinações entre as embalagens transparente (T) e opacas (O) e as amostras frescas (ST) e sujeitas a tratamento térmico (TT).

10.2.1.1 Cor

Na Figura 46 encontram-se representados os parâmetros de cor das amostras armazenadas em embalagem transparente (T) e opaca (O), sem tratamento (ST) e tratadas termicamente (TT). Relativamente ao parâmetro L^* , todas as amostras sofrem um aumento e posteriormente uma perda de luminosidade, revelando um maior escurecimento no final do armazenamento. No entanto, verifica-se que no final do armazenamento, as amostras com embalagem O, não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$) relativamente à luminosidade inicial, independentemente do tratamento. Em relação ao parâmetro de cor a^* , observa-se que nas amostras ST este parâmetro é preservado de forma não significativa ($p > 0.05$) relativamente às embalagens utilizadas. As amostras sujeitas a TT não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$) no dia 0, independentemente da embalagem, assim como a amostra ST sem protecção à luz. Após 60 dias de armazenamento, pode concluir-se que não existem diferenças significativas ($p > 0.05$) relativamente à utilização de diferentes embalagens ou tratamentos. As amostras apresentam uma diferença total de cor "muito distinta" (3,89-5,33) que não é minimizada pela aplicação do tratamento térmico nem pelo tipo de embalagem.

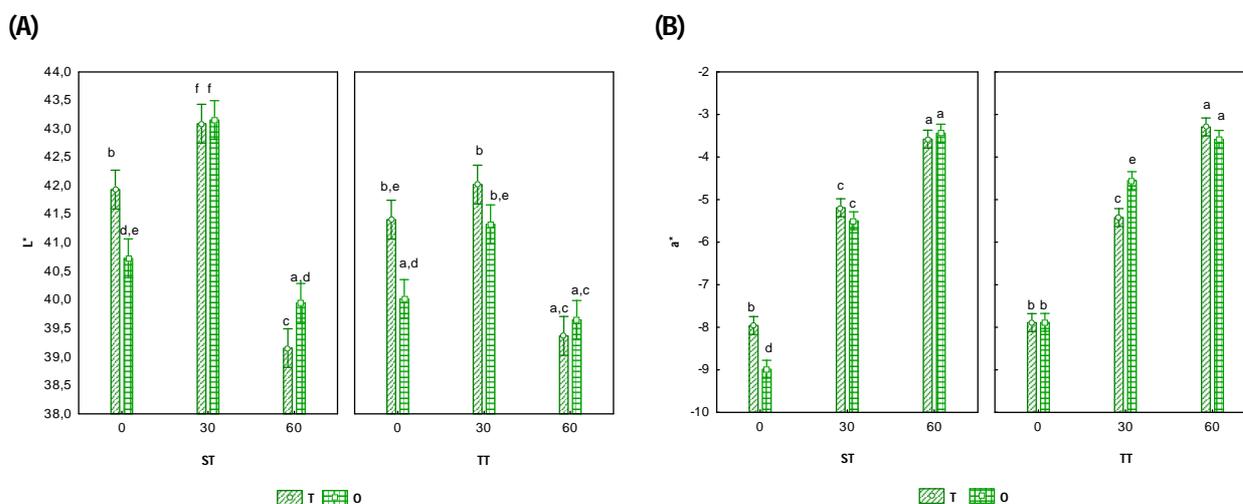


Figura 46 - Parâmetros de cor das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem protecção à luz (T) e com protecção à luz (O): L^* (A) e a^* (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.2.1.2 Determinações reológicas

Os resultados de consistência apresentados na tabela 12 evidenciam uma tendência de aumento da consistência ao longo do tempo de armazenamento para a embalagem transparente e uma diminuição para a embalagem opaca, independentemente do tratamento. O índice de escoamento apresenta uma tendência de aumento ao longo do tempo de armazenamento, independentemente do tipo de tratamento e da embalagem utilizada, com a exceção da embalagem transparente ST que apresenta valores semelhantes.

Tabela 12 - Resultados da consistência (Pa.s) e índice de escoamento das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O).

Amostra	TA (dias)	Consistência (Pa.s)	Índice de escoamento
TST	0	1,35	0,21
TST	30	1,04	0,24
TST	60	1,64	0,20
OST	0	1,16	0,12
OST	30	1,22	0,21
OST	60	1,02	0,22
TTT	0	1,34	0,13
TTT	30	1,34	0,20
TTT	60	1,84	0,20
OTT	0	1,18	0,17
OTT	30	1,02	0,17
OTT	60	1,13	0,25

10.2.1.3 Compostos fenólicos

A evolução do teor de compostos fenólicos totais das diferentes polpas encontra-se na Figura 47, na qual se observa um aumento até ao dia 30 e uma posterior diminuição independente dos tratamentos e do tipo de embalagem. No entanto, observa-se uma tendência de aumento e posterior diminuição deste parâmetro ao longo do armazenamento, uma vez que comparando com o dia 0 com o dia 30, as amostras ST: T e O e TT: T e O, registaram um acréscimo de 11,69; 27,5; 10,52; 0,34 mg EAC.100 g⁻¹ no teor de compostos fenólicos totais, respetivamente. As amostras não apresentam diferenças significativas ($p>0.05$) entre o tipo de embalagem, podendo assim concluir-se que a embalagem não influencia a componente fenólica das polpas. Os compostos fenólicos totais presentes na polpa hortofrutícola apresentam valores entre 65,94 e 114,13 mg EAC.100 g⁻¹, mais elevados do que os obtidos por Kuskoski *et al.* (2006) numa polpa de ananás após congelação (≈ -15), ca. de $50 \pm 0,01$ a $60 \pm 0,1$ mg EAC.100 g⁻¹.

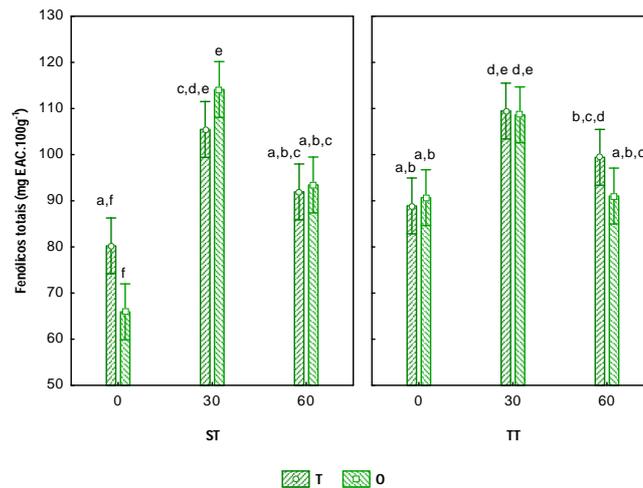


Figura 47 - Compostos fenólicos totais (mg EAC.100 g⁻¹) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0.05). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.2.1.4 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante encontra-se representada na Figura 48, na qual se observa um aumento até ao dia 30 e uma posterior diminuição, independente do tratamento e do tipo de embalagem. No dia 0, as amostras não apresentam diferenças significativas (p>0.05) entre si, assim como no final do armazenamento.

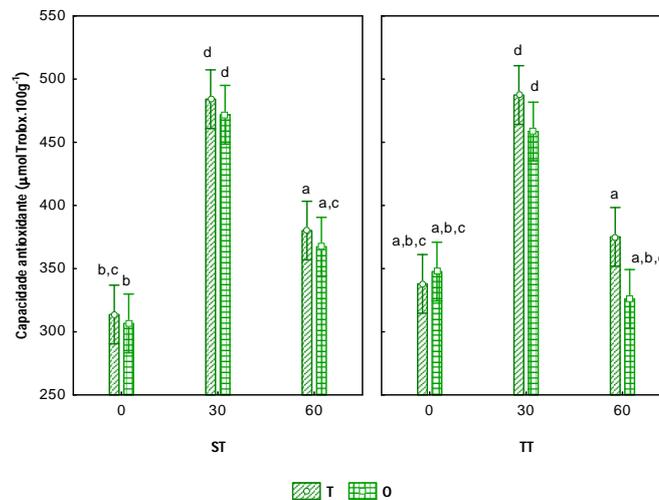


Figura 48 - Capacidade antioxidante (µmol Trolox.100 g⁻¹) das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0.05). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.2.1.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada nos dias de análise de forma a comparar as diferentes amostras com os resultados analíticos, apresentando-se os resultados na Figura 49. No dia 0, os provadores manifestaram maior intenção de compra e maior apreciação global relativamente à polpa ST com proteção à luz, embora tenham identificado esta polpa como a mais ácida. A polpa com embalagem transparente TT foi considerada pelos consumidores como a menos frutada e com a presença de um aroma estranho relativamente às restantes amostras, no dia 0. No final do armazenamento, os provadores notaram pequenas alterações de cor em todas as amostras, salientando-se o

aumento da fibrosidade na amostra ST armazenada em embalagem transparente e um aumento da acidez na amostra TT acondicionada no mesmo tipo de embalagem, relativamente às restantes amostras. A maior acidez identificada pelos provadores, não foi confirmada pelo valor de pH obtido nos métodos instrumentais.

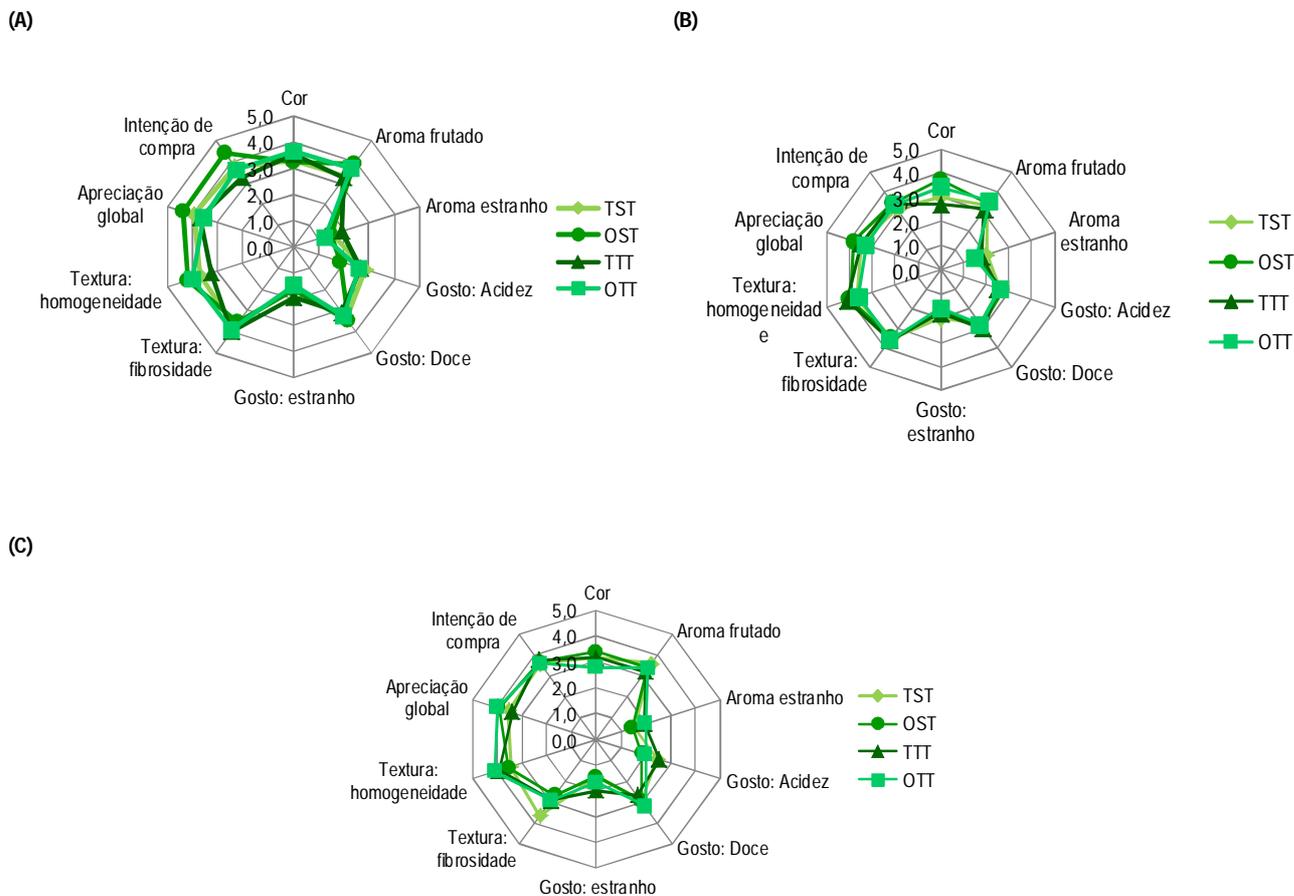


Figura 49 – Resultados da análise sensorial das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O): (A) dia 0, (B) dia 30 e (C) dia 60.

10.2.1.6 Teor de sólidos solúveis (TSS) e pH

Os valores de pH e de TSS encontram-se representados na Figura 50, na qual se observa que as amostras ST acondicionadas em embalagem transparente (T) no dia 0 e as TT dos dias 30 e 60 apresentaram valores similares ($p < 0.05$) na ordem de 4,07. Relativamente às amostras sujeitas a TT verifica-se que as embalagens transparentes não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$) entre o final do armazenamento e o dia 0, ao contrário das embalagens opacas em que ocorre um aumento significativo ($p < 0.05$) de 0,25 unidades de pH. De uma maneira geral, os valores de TSS não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$) entre as diferentes embalagens e tratamentos, apesar de se observar uma tendência de diminuição ao longo do armazenamento, sendo que a maior redução observa-se na amostra T-TT. Deste modo, pode concluir-se que o tratamento térmico no dia 0 aumenta o TSS independentemente do acondicionamento.

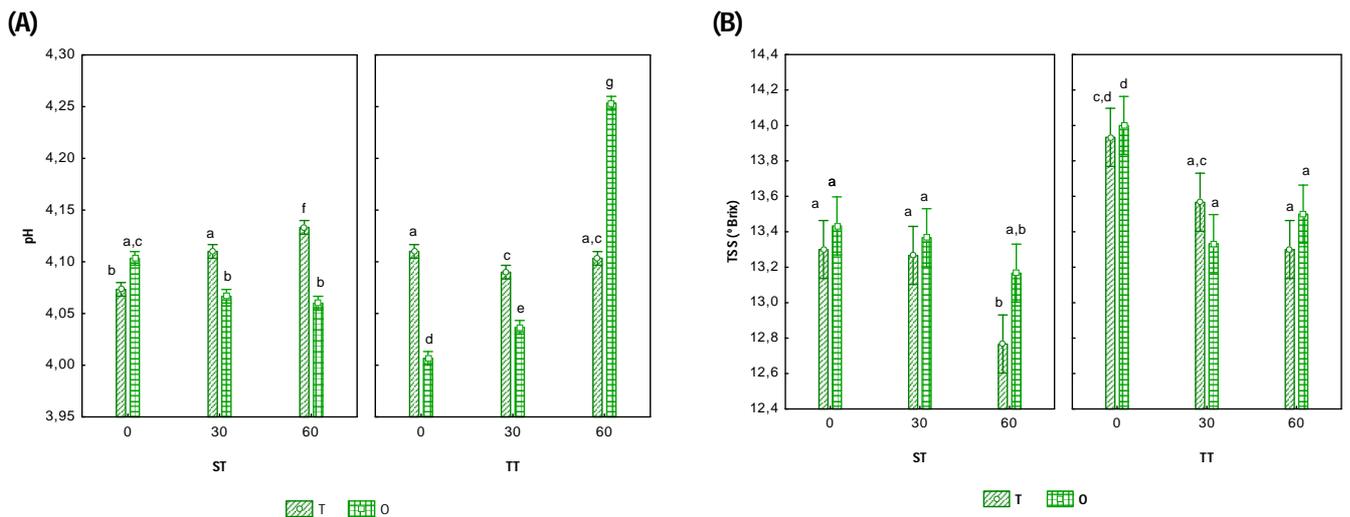


Figura 50 - Valores de pH (A) e teor de sólidos solúveis (TSS, ° Brix, B) nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.2.1.7 Separação de fases

A separação de fases foi realizada com recurso à análise visual das polpas representadas na Figura 51. A separação de fases foi mínima, embora mais evidente nas polpas armazenadas em embalagem opaca possivelmente devido à dificuldade em descongelar relativamente às embalagens transparentes. No momento de abertura da embalagem verificou-se uma maior separação de fases, característica que pode ser contrariada, tal como na refrigeração, através da recomendação ao cliente de mexer ou agitar antes de consumir.

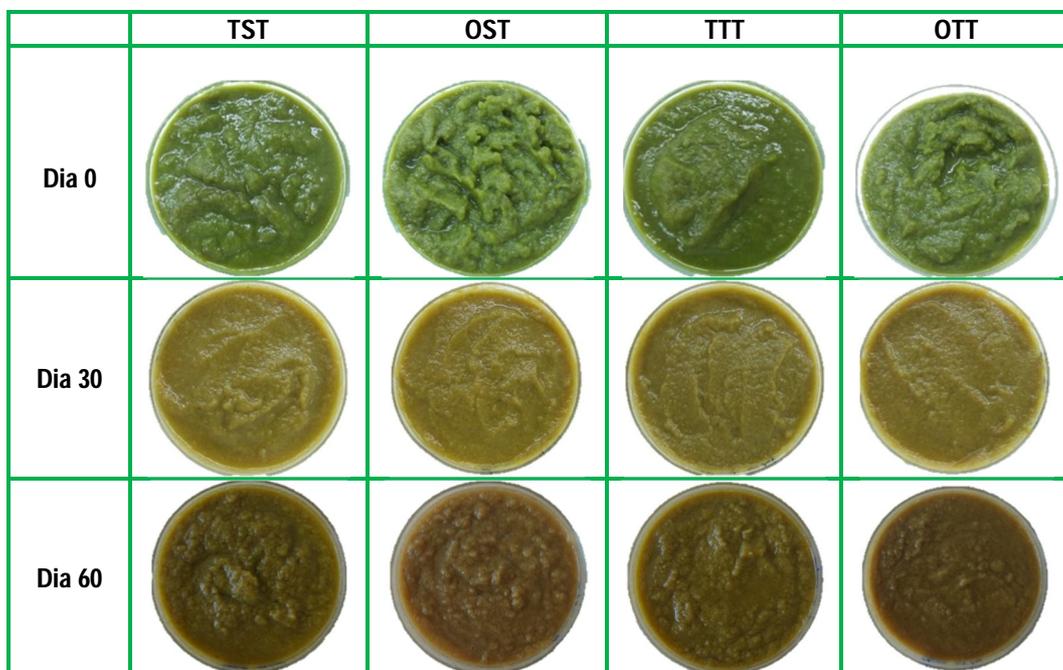


Figura 51 - Representações fotográficas das alterações das polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O) ao longo do armazenamento em congelação ($\approx -18^\circ\text{C}$).

10.2.1.8 Mesófilos totais

A contagem de mesófilos totais encontra-se representada na Figura 52, na qual se observa que não existem diferenças significativas ($p>0.05$) entre os diferentes tipos de acondicionamento, nas amostras sem tratamento (ST) e tratadas termicamente (TT) do dia 0. Após tratamento térmico foi possível constatar uma redução de 0,14 e 0,18 ciclos Log nas amostras T e O, respetivamente. Ao fim de 60 dias a carga microbiana das amostras frescas (ST) é similar à encontrada nas amostras opacas (O) sujeitas a TT (cerca de 2,6 Log). Todas as amostras apresentam valores de mesófilos totais dentro dos limites legais de segurança pública (limite aceitável: 10^4 - 10^6) (Santos *et al.*, s/d), no entanto seria de esperar uma maior redução da carga microbiana após o tratamento térmico. A diminuição da carga microbiana registada no 60º dia de armazenamento quando comparada com o dia 0 poderá dever-se à variabilidade da polpa e das matérias-primas utilizadas para o processamento destas, com produção descontínua de 500 grama. Por outro lado a congelação à temperatura de $-18\text{ }^\circ\text{C}$ permite um atrofiamento das células microbianas podendo ocorrer a lise destas contribuindo para a redução da carga microbiana.

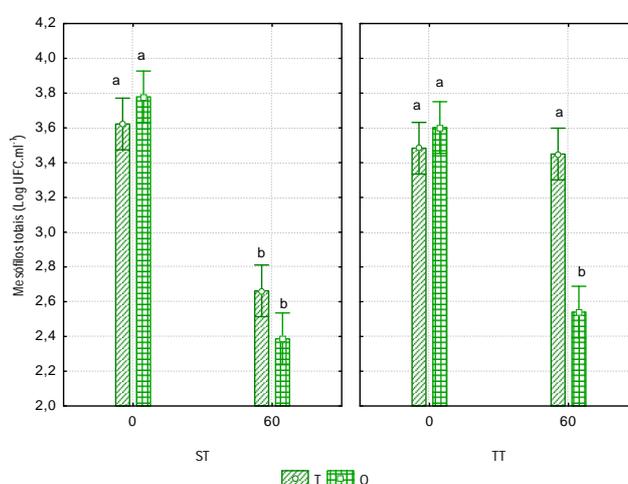


Figura 52 – Contagem dos mesófilos totais (Log UFC.ml⁻¹) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.2.1.9 Bolores e Leveduras

A contagem dos bolores e leveduras encontra-se na Figura 53. Relativamente aos valores de contagem obtidos (2,15-3,63 Log UFC.ml⁻¹), verifica-se que não existem diferenças significativas ($p>0.05$) entre os diferentes tratamentos e acondicionamentos. No final do armazenamento, observa-se que o tipo de embalagem contribui para a variação da contagem de bolores e leveduras, independentemente do tratamento aplicado. Todas as amostras se encontram dentro dos parâmetros legais (10^3 - 10^5) (Santos *et al.*, s/d). Tal como referido nos mesófilos totais, as polpas apresentavam alguma variabilidade de matérias-primas e estados de maturação que poderão influenciar os resultados obtidos.

Num estudo desenvolvido por Faraoni (2006) em polpas de manga congeladas, verificou-se ao final de 180 dias que os bolores e leveduras apresentaram uma contagem de 1,69 Log UFC.ml⁻¹ nas polpas sem tratamento prévio e $1,69\pm 0,69$ Log UFC.ml⁻¹ e $2,75\pm 0,69$ Log UFC.ml⁻¹ em polpas pasteurizadas a $75\text{ }^\circ\text{C}$ durante 8,7 minutos e $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 4,6 minutos, respetivamente. Os valores de bolores e leveduras encontrados em todas as amostras do dia 0 em estudo foram superiores à encontrada na polpa de manga.

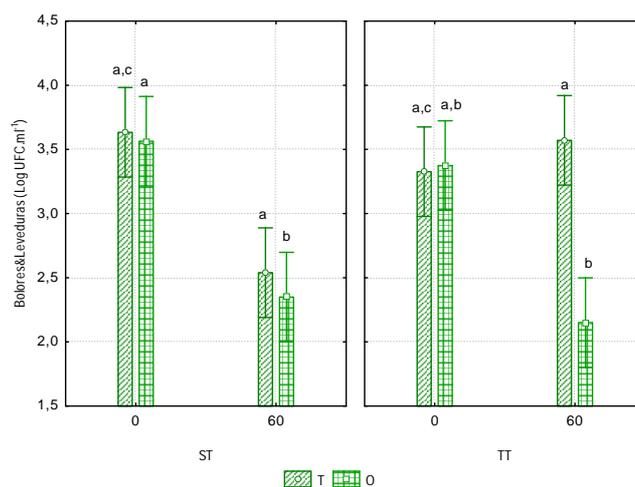


Figura 53 - Contagem de bolores e leveduras (Log UFC.ml⁻¹) presentes nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.2.1.10 Ácido ascórbico

O tratamento térmico aplicado conduz a uma diminuição de 37 % na polpa acondicionada em embalagem T, enquanto que na polpa acondicionada em embalagem O observou-se um aumento não significativo ($p > 0.05$) de 6%, como se observa na Figura 54. No decorrer do armazenamento observou-se uma diminuição deste parâmetro em cerca de 0,42; 0,11; 0,24; 0,31 mg ác. ascórbico.100g⁻¹, nas amostras TST, TTT, OST e OTT respetivamente. Lee & Coates (1998) observou uma redução de 19,2% no conteúdo de ácido ascórbico ao fim de 24 meses de armazenamento sob congelação a (- 23°C) de sumo de laranja não pasteurizado. Comparando a polpa hortofrutícola em estudo e o sumo de laranja notou-se uma redução não significativa ($p > 0.05$) de 36 % na embalagem transparente e de 20 % na embalagem opaca nas amostras ST, valores superiores aos encontrados no sumo de laranja.

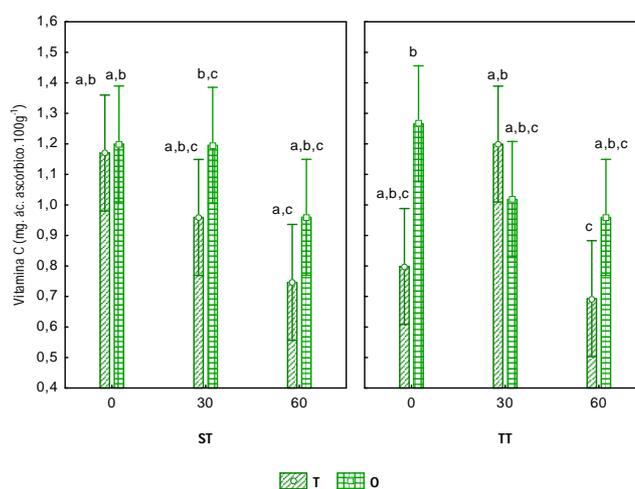


Figura 54 - Teor de ácido ascórbico (mg ác. ascórbico.100g⁻¹) presente nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.2.1.11 Atividade enzimática: Polifenoloxidase (PPO)

Como se observa pela Figura 55 o tratamento térmico e o tipo de embalagem não induziram a alterações significativas ($p>0.05$) na atividade enzimática da PPO das polpas congeladas. Na polpa hortofrutícola, após o tratamento, verificou-se um aumento da atividade enzimática de 8,4 % no caso da embalagem transparente e uma redução de 8,41 % no caso da embalagem opaca. O tratamento térmico não reduziu de forma significativa ($p>0.05$) a atividade enzimática, embora no final do armazenamento a amostra acondicionada em embalagem opaca ST tenha apresentado uma redução de 18,34 U.g⁻¹ em relação à TT. Apesar de não se terem registado alterações significativas ($p>0.05$) ao longo do armazenamento, foi possível observar um acréscimo na ordem dos 5,76 e 15,79 U.g⁻¹ (T e O) nas amostras ST. A aplicação do tratamento térmico de 75 °C durante um minuto em polpa de goiaba Zanatta *et al.* (2006) provocou uma diminuição da atividade enzimática até aos 20 %, superior à verificada nas embalagens opacas.

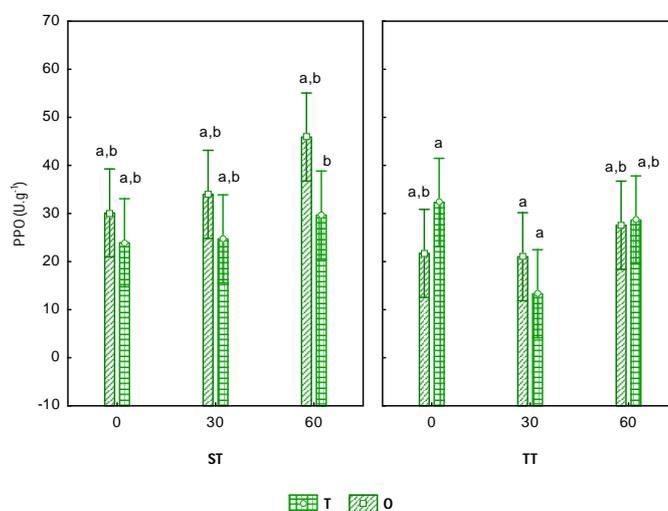


Figura 55 - Valores de atividade enzimática (PPO, U.g⁻¹) presente nas polpas sem tratamento térmico (ST) e com tratamento (TT) embaladas sem proteção à luz (T) e com proteção à luz (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0.05$). As barras mostram o intervalo de confiança a 0.95.

10.2.1.12 Análise multivariada

Na Tabela 13 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais, em que a primeira componente principal explica 45,71% da variância e a segunda componente principal explica 30,32%. No total, as primeiras duas componentes principais explicam 76,02% da variância.

As duas primeiras componentes principais apresentam valores próprios superiores a 1, significativos, com valores de 6,40 e 4,24 respetivamente, para a primeira e a segunda componente principal.

Tabela 13 - Valores próprios e extração das componentes principais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância acumulada (%)
1	6,40	45,71	6,40	45,71
2	4,24	30,32	10,64	76,02
3	1,67	11,96	12,32	87,98
4	0,84	6,03	13,16	94,01
5	0,28	2,04	13,45	96,05
6	0,22	1,54	13,66	97,59
7	0,17	1,20	13,83	98,79
8	0,12	0,82	13,95	99,61
9	0,05	0,32	13,99	99,94
10	0,01	0,06	14,00	100,00
11	0,00	0,00	14,00	100,00

A relação das variáveis (parâmetros originais) com as componentes principais é determinada pelos coeficientes de correlação, apresentados na Tabela 14. A primeira componente é explicada pelas variáveis: DTC (diferenças total de cor), Fen tot (Fenólicos totais), AO (Atividade antioxidante), GD (Gosto: doce), AP (apreciação global) e IC (intenção de compra). A segunda componente é explicada pelas variáveis: parâmetros L^* e a^* , C^* e h da cor e TF (textura: fibrosidade).

Tabela 14 - Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e as duas primeiras componentes principais.

Variáveis	Componente principal 1	Componente principal 2
L^*	0,40	-0,76
a^*	0,62	0,77
b^*	0,63	-0,58
C	0,40	-0,77
$^{\circ}h$	-0,69	-0,70
DTC	0,73	0,59
Fen tot	0,98	-0,06
AO	0,91	-0,25
AF	-0,61	-0,03
GA	0,40	-0,60
GD	-0,88	-0,26
TF	-0,16	-0,84
AG	-0,74	0,05
IC	-0,79	0,28
*pH	0,12	-0,48
*AE	-0,37	-0,19
*GE	-0,41	0,10
*Vit C	0,20	0,61

Nas figuras 56 e 57 apresenta-se a projeção dos atributos no plano e a projeção das amostras no plano respetivamente. A intenção de compra e o aroma frutado estão associados às amostras do dia 0, independentemente do tipo de tratamento a variar na primeira componente principal. A capacidade antioxidante e os compostos fenólicos relacionam-se com a primeira componente principal e apresentam valores maiores nas amostras com 30 dias de armazenamento. O parâmetro de cor a^* apresenta maiores valores para as amostras do dia 60, explicado pela componente principal 2, que indica perda da coloração verde.

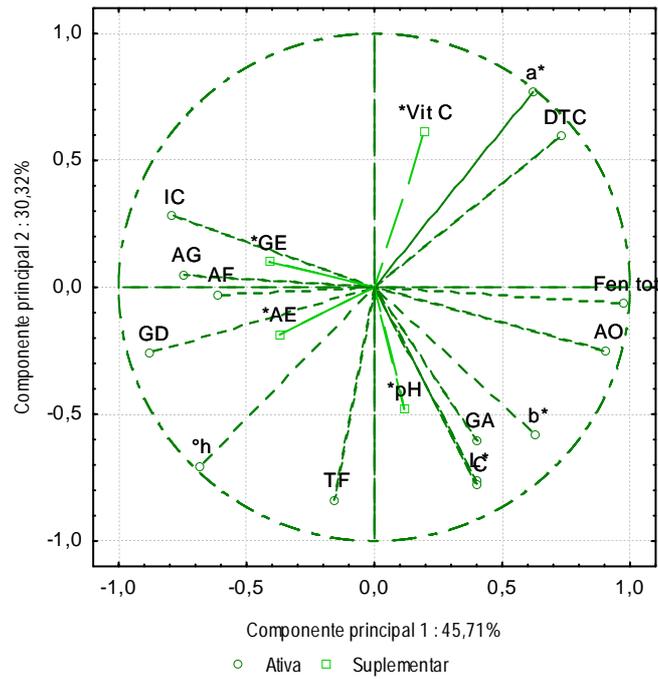


Figura 56 - Projeção dos atributos no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

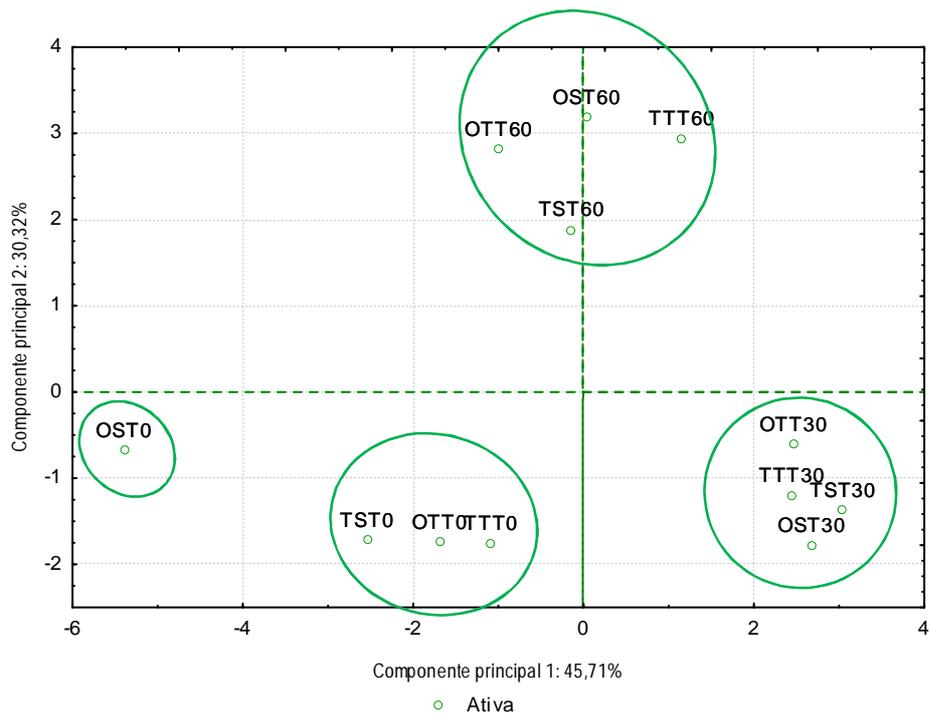


Figura 57 - Projeção das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

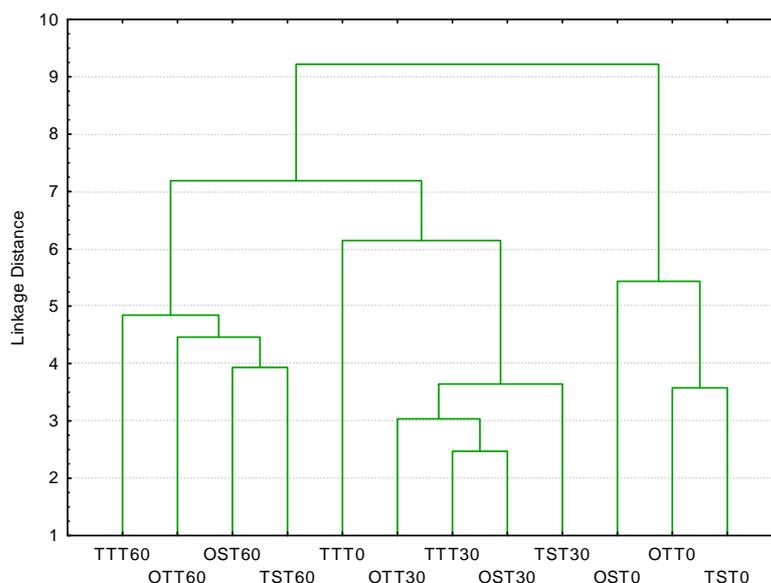


Figura 58 - Diagrama de cluster.

Na figura 58 encontra-se representado o diagrama de cluster que permite observar a distância Euclidiana de 8 a separação entre dois grupos, por um lado o dia 0 e por outro o dia 30 e o dia 60, bem como a amostra transparente TT do dia 0. À distância Euclidiana de 6 desunem-se os dias 30 e o dia 0 (TTT) do dia 60, independentemente do tipo de tratamento e acondicionamento. Assim, pode-se concluir que o tempo de armazenamento tem maior influência nas características das polpas do que a embalagem e o tratamento térmico, com a exceção da amostra transparente TT do dia 0.

10.2.1.13 Balanço intercalar

A congelação revelou ser um método de conservação eficiente ao nível da preservação das características originais do produto, nomeadamente a cor e a componente bioativa. Ao longo dos 60 dias de armazenamento verificou-se que o tratamento térmico (TT) aplicado não influencia de forma significativa ($p < 0.05$) as características da polpa em relação à polpa ST. A embalagem com proteção à luz (O) também não apresenta diferenças significativas ($p > 0.05$) em relação à embalagem transparente (T) ao nível da componente bioativa e da estabilidade da cor da polpa.

11 Conclusões Gerais

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma polpa de fruta com introdução de hortícolas, com elevada componente bioativa e estável físico-química e microbiologicamente sem recurso à adição de químicos.

O desenvolvimento do novo produto iniciou-se com a adição de diferentes produtos hortofrutícolas numa polpa base de maçã e ananás, fazendo variar as proporções até otimização da formulação. Através da análise dos resultados obtidos conclui-se que:

- Os binómios de temperatura e tempo dos pré-tratamentos térmicos necessários para inativar a peroxidase foram de: 100 °C durante 5 minutos para a couve, 90 °C durante 6 minutos para a abóbora e 100 °C durante 1 minutos para a maçã *Fuji* e 1,5 minutos para variedade *Granny Smith*.
- A formulação de maçã *Fuji 2* (41 %) adicionada de ananás (31 %), couve (8 %), abóbora (10 %) e banana (10 %) foi a melhor aceite por parte dos provadores e com maior estabilidade físico-química. Para além desta, a polpa de maçã *Fuji 3* (36 %) adicionada de ananás (26 %), couve (8 %), abóbora (10 %), banana (10 %) e kiwi (10 %) também obteve uma classificação bastante satisfatória por parte dos provadores, embora apresente maior instabilidade físico-química, resultando num escurecimento mais rápido.
- Ao testar diferentes binómios de temperatura/tempo de tratamento térmico com o objetivo da pasteurização verificou-se que as temperaturas mais intensas afetaram negativamente os atributos característicos de fresco, sendo a temperatura de 75 °C a que permitiu uma menor alteração das características iniciais da polpa. No tratamento de 75 °C durante 90 segundos obteve-se uma redução da carga microbiana, preservando as características próximas da polpa original.
- No que respeita ao binómio temperatura/tempo de pasteurização selecionado, foi concluída a grande dependência deste em relação à condição inicial. Dado que nem sempre se mostrou suficiente um tratamento de 75 °C/ 90 segundos, este valor deverá ser revisto e por questões de segurança deverá ser sempre mais intenso, apesar do detrimento das características sensoriais.
- O tipo de embalagem evidenciou ser importante no caso da conservação por refrigeração, não o sendo no caso da congelação. As polpas refrigeradas deverão ser embaladas ao abrigo da luz (opacas).
- A temperatura de conservação, tal como esperado, é igualmente um fator determinante no período de vida útil dos produtos. Assim, sob condições de refrigeração a polpa desenvolvida apresentou um período de vida útil de apenas 7 dias para embalagem transparente e 14 dias para embalagem opaca, no caso da congelação este foi superior a 60 dias para ambas as embalagens.

12 Sugestões para trabalhos futuros

Com o desenvolvimento deste trabalho surgiram algumas necessidades e propostas para eventuais linhas de investigação de trabalhos futuros.

1. Continuar com o desenvolvimento da polpa de forma a obter um produto mais estável ao nível da cor tornando-a mais apelativa para o consumidor, utilizando outras variedades de frutos;
2. Preparar as formulações com maçãs sujeitas a pré-tratamentos térmicos (água, vapor de água) e tratamentos não térmicos como radiação UV-C, em substituição das maçãs frescas. E ainda avaliar o comportamento das polpas ao longo do tempo de armazenamento em refrigeração e congelação;
3. Preparar as formulações com couve sujeita a outros pré-tratamentos que impliquem menores perdas de compostos bioativos (vapor, radiação UV-C, ultrassons).
4. Optimizar os tratamentos de pasteurização por forma a conseguir estabilização sem comprometer a componente bioativa;
5. Identificar e quantificar os compostos fenólicos e os pigmentos, clorofilas e carotenóides, das polpas por HPLC.

13 Bibliografia

- Agopian, R.G.D., et al. 2008.** Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, Vol. 56, pp. 3305–3310.
- Agüero, M.V., et al. 2008.** Thermal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. *LWT*. 2008, Vol. 41, pp. 401–407.
- Allende, A., Tomás-Barberán, F. e Gil, M. 2006.** Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science & Technology*. 2006, Vol. 17, pp. 513-519.
- Alothman,, M., Bhat, R. e Karim, A.A. 2009.** Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 2009, Vol. 115, pp. 785–788.
- Arthey, D. e Dennis, C. 1992.** *Procesado de hortalizas*. Zaragoza : Acribia, 1992.
- Arts, I. C. W., et al. 2001.** Dietary catechins and epithelial cancer incidence. The Zutphen elderly study. *International Journal of Cancer*. 2001, Vol. 92, pp. 298–302.
- Avila, I. M. L. B. e Silva, C. L. M. 1999.** Modeling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. *Journal of Food Engineering*. 1999, Vol. 39, pp. 161–166.
- Balbi, S. F. 2009.** *Estudo do impacto de stress abiótico controlado na componente bioactiva de polpas de maçã - Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar*. Lisboa : ISA/UTL, 2009.
- Beaufort, A., Poumeyrol, G. e Rudelle, S. 1992.** Fréquence de contamination par *Listeria* et de produits de 4eme gamme. *Rev. Gen. Du Froid*. 1992, Vol. 82, pp. 28–31.
- Berg, H.V. D., et al. 2000.** The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, Vol. 80, pp. 880–912.
- Blair, J. S. e Ayres, T. B. 1943.** Protection of natural green pigment in the canning of peas. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1943, Vol. 35, pp. 85–95.
- Block, G., Patterson, B. e Subar, A. 1992.** *Nutr. Cancer*. 1992, Vol. 1, p. 18.
- Bognar, A. 2006.** Nutritive value of some varieties of pumpkin and winter squash grown in Germany. *Ernahrungs Umschau*. 2006, Vol. 53, pp. 298–308.
- Bone, R.A., et al. 2000.** Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. *Experimental Eye Research*. 2000, Vol. 71, pp. 239–245.
- Boyer, J. e Liu, R. H. 2004.** Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* 3. 2004.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. e Berset, C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technologie/ Food Science and Technology*. 1995, Vol. 28, pp. 25-30.
- Bray, T. M. 2000.** Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition*. 2000, Vol. 16, pp. 578–581.
- Breidt, F. e Fleming, .H.P. 1997.** Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol*. 1997, Vol. 51, pp. 44-46, 48, 51.
- Breinhold, V., et al. 1995.** Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Cancer Res*. 1995, Vol. 55, pp. 57–62.
- Briones-Labarca, V., et al. 2011.** Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*. 2011, Vol. 128, pp. 520–529.
- Britton, G. 1995.** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 1995, Vol. 9, pp. 1551–8.

- Buettner, G. R. 1986.** Ascorbic acid antioxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free Rad Res Commun.* 1986, Vol. 1, pp. 349–353.
- Cadenas, E. e Packer, L. 2002.** *Handbook of Antioxidants.* New York, USA : Marcel Dekker, 2002.
- Canet, W. 1989.** Quality and stability of frozen vegetables. In: Thorne, S. (Eds.), *Developments in Food Preservation*, Vol 5, Elsevier Science Publishing Inc., NewYork.DrLange, 1994. 1989.
- Canjura, F. L., Schwartz, S. J. e Nunes, R. V. 1991.** Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllides. *J Food Sci.* 1991, Vol. 56, pp. 1639- 43.
- Canjura, F. L., Watkins, R. H. e Schwartz, S. J. 1999.** Color improvement and metallo-chlorophyll complexes in continuous flow aseptically processed peas. *J Food Sci.* 1999, Vol. 64, pp. 987- 90.
- Cartea, M. E. e Velasco, P. 2008.** Glucosinolates in Brassica foods: Bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews.* 2008, Vol. 7, pp. 213–229.
- Cassano, A., et al. 2006.** Integrated membrane process for the production of highly nutritional kiwifruit juice. *Desalination.* 2006, Vol. 189, pp. 21–30.
- Charron, C.S. e Sams, C.E. 1999.** Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of Brassica species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1999, Vol. 124, pp. 462–467.
- Chen, B.H., Peng, H.Y. e Chen, H.E. 1995.** Changes of carotenoids, color and vitamin A contents during processing of carrot juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1995, Vol. 43, pp. 1912–1918.
- Chong, L. C. e NoorAziah, A. A. 2010.** Effects of banana flour and b-glucan on the nutritional and sensory evaluation of noodles. *Food Chemistry.* 2010, Vol. 119, pp. 34-40.
- Chu, Y.-F., et al. 2002.** Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2002, Vol. 50, pp. 6910–6916.
- Chun, O. K., et al. 2005.** Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2005, Vol. 85, pp. 1715–1724.
- Chutintrasri, B. e Noomhorm, A. 2007.** Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. *LWT.* 2007, Vol. 40, pp. 300–306.
- Chutintrasria, B. e Noomhorm, A. 2006.** Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *LWT.* 2006, Vol. 39, pp. 492–495.
- Clemente, E. e Pastore, G. M. 1998.** Clemente, E., & Pastore, G. M. (1998). Peroxidase and polyphenoloxidase: The importance for food technology. *Boletim da SBCTA.* 1998, Vol. 32, pp. 167–171.
- Collins, A.R. e Harrington, V. 2002.** Antioxidants: not only reason to eat fruit and vegetables. *Phytochemistry Reviews.* 2002, Vol. 1, pp. 167–174.
- Conaway, C. C., et al. 2000.** Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutrition and Cancer.* 2000, Vol. 38 (2), pp. 168–178.
- Conaway, C. C., Yang, Y. M. e Chung, F. L. 2002.** Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr. Drug Metab.* 2002, Vol. 3, pp. 233–255.
- Corbo, M.R., et al. 2004.** Effect of temperature on shelf life and microbial population of lightly processed cactus pear fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 2004, Vol. 31, pp. 93–104.
- Cortés, C., Esteve, M. e Frigola, A. 2008.** Color of orange juice treated by High Intensity Pulsed Electric Fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. *Food Control.* 2008, Vol. 19, pp. 151-158.
- Cruz, R. M. S., Vieira, M. C. e Silva, C. L. M. 2006.** Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). *Journal of Food Engineering.* 2006, Vol. 72, pp. 8–15.

- Davey, M.W., et al. 2000.** Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 2000, Vol. 80, pp. 825–860.
- De Oliveira, M., Sicheri, R. e Moura, A. 2003.** Weight loss associated with a daily intake of three apples or three pears among overweight women. *Nutrition.* 2003, Vol. 19, pp. 253–256.
- DiSilvestro, R. A. 2001.** Antioxidant actions of soya. *Food Industry Journal.* 2001, Vol. 4, pp. 210–220.
- Doerge, D. R., Divi, R. L. e Churchwell, M. I. 1997.** Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY.* 14 de February de 1997, Vol. 250, pp. 10–17.
- Drlange. 1994.** *Colour review.* USA : DrLange Application Report No. 8e., 1994.
- Duangmal, K. e Apenten, R. K. O. 1999.** A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). *Food Chemistry.* 1999, Vol. 64, pp. 351–359.
- Dumas, Y., et al. 2003.** *J. Sci. Food Agric.* 2003, Vol. 83, pp. 369–382.
- Edwards, B.J. 1954.** Treatment of chronic leg ulcers with ointment containing soluble chlorophyll. *Physiotherapy.* 1954, Vol. 40, pp. 177- 9.
- Englberger, L. 2003.** Des bananes riches en caroténoïdes en Microne. *InfoMusa.* 2003, Vol. 12 (2), pp. 2-5.
- Fahey, J. W., et al. 2002.** Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Science USA.* 2002, Vol. 99 (11), pp. 7610–7615.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. e Talalay, P. 2001.** *Phytochemistry.* 2001, Vol. 5, p. 56.
- Faraoni, A. S. 2006.** *Efeito do tratamento térmico, do congelamento e da embalagem sobre o armazenamento da polpa de manga orgânica (Mangifera indica L.).* Brasil : MINAS GERAIS, 2006.
- Ferruzzi, M. G. e Blakeslee, J. 2007.** Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research.* 2007, Vol. 27, pp. 1– 12.
- Fischbach, H. 1943.** Microdeterminations for organically combined metal in pigment of okra. *J Assoc Off Agric Chem.* 1943, Vol. 26, pp. 139- 43.
- Francis, G. A., Thomas, C. e O'Beirne, D. 1999.** The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science & Technology.* 1999, Vol. 34, pp. 1-22.
- Franck, C., et al. 2003.** *J. Agric. Food Chem.* 2003, Vol. 51, pp. 4757–4763.
- Friedman, M. 1996.** Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1996, Vol. 44, pp. 631–653.
- Gajc-Wolska, J., et al. 2005.** The fruit quality assessment of the chosen hybrids and cultivars of pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.). *Vegetable Crops Research Bulletin.* 2005, Vol. 63, pp. 33–43.
- Galli, A. e Franzetti, L. 1997.** Aspetti microbiologici e sicurezza degli ortaggi della IV gamma. *Tecnol. Alim.* 1997, Vol. 2, pp. 96–105.
- Galvis-Sánchez, A., Gil-Izquierdo, A. e Gil, M. I. 2003.** Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *Sci. Food Agric.* 2003, Vol. 83 (10), pp. 995-1003.
- Gilpin, G. L., et al. 1959.** Effect of cooking methods on broccoli. II. Palatability. *Journal of the American Dietetic Association.* 1959, Vol. 35, p. 359.
- Gonçalves, E.M., et al. 2007.** Modelling the kinetics of peroxidase inactivation, colour and texture changes of pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) during blanching. *Journal of Food Engineering.* 2007, Vol. 81, pp. 693–701.
- Gonzalez-Aguilar, G.A., et al. 2010.** Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. *Trend. Food Sci. Technol.* 2010, Vol. 21, pp. 475–482.

- Gordon, H. T. e Bouernfeind, J. C. 1982.** Carotenoids as food colorants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1982, pp. 18–59.
- Gras, M.H., Druet-Michaud, C. e Cerf, O. 1994.** La flore bactérienne des feuilles de salade fraîche. *Sci. Alim.* 1994, Vol. 14, pp. 173–188.
- Griffiths, D.W., Birch, A.N.E. e Hillman, J.R. 1998.** *J. Hort. Sci. Technol.* 1998, Vol. 1, p. 73.
- Gross, J. 1991.** *Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids.* New York (NY) : Van Nostrand Reinhold, 1991.
- Gry, J., et al. 2007.** A Combined Composition and Biological Activity Database for Bioactive Compounds in Plant-Based Food. *Trends in Food Science and Technology.* 2007, Vol. 18, pp. 434-444.
- Günes, B. e Bayindirh, A. 1993.** Peroxidase and lipoxigenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.* 1993, Vol. 26, pp. 406–410.
- Guerzoni, M.E., et al. 1997.** *Modelling of growth of microorganisms on minimally processed fruits and vegetables in relation to technological and environmental conditions.* Italy : Bologna, 1997. pp. 15-20.
- Guerzoni, M.E., et al. 1996.** Shelf life modelling for fresh-cut vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 1996, Vol. 9, pp. 195–207.
- Gunawan, M. I. e Barringer, S. A. 2000.** Green colour degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. *Journal of Food Processing and Preservation.* 2000, Vol. 24, pp. 253–263.
- Gupte, S. M., El-Bisi, H. M. e Francis, F. J. 1963.** Kinetics of thermaldegradation of chlorophyll in spinach puree. *Journal of Food Science.* 1963, Vol. 29, pp. 379–382.
- Hagen, S. F., et al. 2009.** Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Postharvest Biology and Technology.* 2009, Vol. 51, pp. 36–42.
- Halkier, B. A. e Gershonzen, J. 2006.** Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology.* 2006, Vol. 57, pp. 303–333.
- Halkier, B. A. 1999.** *Glucosinolates. Naturally Occurring Glycosides: Chemistry Distribution and Biological Properties.* Ikan, R. (Ed.) : John Wiley & Sons, 1999. pp. 193–223.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C. 1999.** *Free Radical in Biology and Medicine.* UK : Oxford University Press, 1999. p. 617.
- Halliwell, B. 2006.** Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006, Vol. 97, pp. 1634–1658.
- Halvorsen, B.L., et al. 2002.** A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.* 2002, Vol. 132, pp. 461–471.
- Han, X., Shen, T. e Lou, H. 2007.** Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* 2007, Vol. 8, pp. 950–988.
- Hansen, M., et al. 1995.** Glucosinolates in broccoli stored under controlled atmosphere. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 1995, Vol. 120 (6), pp. 1069–1074.
- Hasegawa, K. e Bunseki, S. 1993.** *Food Analysis, in Japanese.* Tokyo : Baifukan, 1993. p. 72. Vol. 5.
- Hayakawa, K. e Timbers, G. E. 1977.** Influence of heat treatment on the quality of vegetables: changes in visual green colour. *Journal of Food Science.* 1977, Vol. 42 (3), pp. 778-781.
- He, Q. e Luo, Y. 2007.** Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce. *Stewart Postharvest Review.* 2007, pp. 6-3.
- Heatherbell, D. A. 1975.** Identification and quantitative analysis of sugars and non-volatile organic acids in Chinese gooseberry fruit (*Actinidia chinensis* Planch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1975, Vol. 26, pp. 815–820.

- Heaton, J. W. e Marangoni, A. G. 1996.** Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends Food Sci Technol.* 1996, Vol. 7 (1), pp. 8 - 15.
- Hecht, S.S. 2000.** Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metabolism Reviews.* 2000, Vol. 32, pp. 395–411.
- Heinen, M.M., et al. 2007.** Intake of antioxidant nutrients and the risk of skin cancer. *Eur. J. Cancer.* 2007, Vol. 43, pp. 2707–2716.
- Heinrich, U., et al. 2003.** Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J. Nutr.* 2003, Vol. 133, pp. 98–101.
- Holden, J.M., et al. 2011.** Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International.* 2011, Vol. 44, pp. 672–676.
- Hooper, J. K., Eggink, L. L. e Chen, M. 2007.** Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts. *Photosynth Res.* 2007, Vol. 94, pp. 387–400.
- Huang, D., Ou, B. e Prior, R. L. 2005.** *J. Agric. Food Chem.* 2005, Vol. 53, p. 1841.
- Icier, F., Yildiz, H. e Baysal, T. 2006.** Peroxidase inactivation and colour changes during ohmic blanching of pea puree. *Journal of Food Engineering.* 2006, Vol. 74 (3), pp. 424–429.
- Ihl, M., Monsalves, M. e Bifani, V. 1998.** Chlorophyllase inactivation as a measure of blanching efficacy and colour retention of artichokes (*Cynara scolymus* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.* 1998, Vol. 31, pp. 50–56.
- Insel, P., Turner, R. E. e Ross, D. 2002.** *Nutrition. An Update of 2001 edition.* American Dietetic Association. Sudbury MA : Jones and Bartlett Publishers, 2002.
- Jacob, R. A. e Sotoudeh, G. 2002.** Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in Clinical Care.* 2002, Vol. 5, p. 66–74.
- Johnson, E.J. 2002.** The role of carotenoids in human health. *Nutr Clin Care.* 2002, Vol. 5 (2), pp. 47–9.
- Jones, R. B., Faragher, J. D. e Winkler, S. 2006.** A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology.* 2006, Vol. 41 (1), pp. 1–8.
- Jongen, W. 2002.** Fruit and Vegetable Processing - Improving Quality. [autor do livro] H.S. Ramaswamy e C.R. Chen. *Maximising the Quality of Thermally Processed Fruits and Vegetables.* s.l. : Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, 2002.
- Juge, N., Mithen, R. F. e Traka, M. 2007.** Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: A comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2007, Vol. 64, pp. 1105–1127.
- Kabir, H. 1994.** Fresh-cut vegetables. [autor do livro] A. L. Brods e V. A. Herndon. *Modified atmosphere food packaging.* Naperville, Illinois : Institute of Packaging Professionals, 1994, pp. 155-160.
- Kanazawa, K. e Sakakibara, H. 2000.** High content of dopamine, a strong antioxydant, in Cavendish banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2000, Vol. 48 (3), pp. 844-848.
- Kehrer, J. P. 1993.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology.* 1993, Vol. 23, pp. 21–48.
- Kelly, P. J., Bones, A. e Rossiter, J. T. 1998.** Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta.* 1998, Vol. 206, pp. 370–377.
- Kephart, J.C. 1955.** Chlorophyll derivatives—their chemistry, commercial preparations and uses. *Econ Bot.* 1955, Vol. 9, pp. 3 - 38.

- Khachik, F., et al. 2002.** Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2002, Vol. 227, pp. 845–851.
- Kim, D.J., et al. 1997.** Carcinogenesis. 1997, Vol. 18, p. 377.
- Koca, N., Karadeniz, F. e Burdurlu, H. S. 2006.** Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chemistry*. 2006, Vol. 100, pp. 609–615.
- Kramer, G. F. e Wang, C. Y. 1989.** Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash. *Physiology Plant*. 1989, Vol. 76, pp. 479–484.
- Krinsky, N.I. 1994.** The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*. 1994, Vol. 66, pp. 1003–1010.
- Kroon, P. e Williamson, G. 2005.** Polyphenols: dietary components with established benefits to health? *J. Sci. Food Agric*. 2005, Vol. 85, pp. 1239–1240.
- Krzysik, K. e Bogucka, W. 1981.** Pumpkin – valuable raw material for baby food. *Przemysl Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*. 1981, Vol. 4, pp. 23–25.
- Kurilich, A.C., et al. 1999.** Carotene, tocopherol, and ascorbate in subspecies of *Brassica oleracea*. *J. Agric. Food Chem*. 1999, Vol. 47, pp. 1576–1581.
- Kuskoski, E. M., et al. 2006.** Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Cienc. Rural*. 2006, Vol. 36.
- LaBorde, L. F. e von Elbe, J. H. 1994.** Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables. *J Agric Food Chem*. 1994, Vol. 42, pp. 1100- 3.
- Labuza, T. P. 1982.** Shelf-life of frozen fruits and vegetables. T. P. Labuza. *Shelf-life of foods*. Westport. Connecticut: USA : Food & Nutrition Press, Inc., 1982, pp. 289-340.
- Lacasse, D. 1995.** Contaminantes e Deterioração dos Alimentos. *Introdução à Microbiologia Alimentar*. Lisboa : INSTITUTO PIAGET, 1995, pp. 251-279.
- Lachance, P. A., Nakat, Z. e Jeong, W. 2001.** Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition*. 2001, Vol. 17, pp. 835–838.
- Landl, A., et al. 2010.** Effect of high pressure processing on the quality of acidified *Granny Smith* apple purée product. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010, Vol. 11, pp. 557–564.
- Landrum, J.T. e Bone, R.A. 2001.** Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives Biochem. Biophys*. 2001, Vol. 385, pp. 28–40.
- Larato, D. C. e Pfau, F. R. 1970.** Effects of water soluble chlorophyllin ointment on gingival inflammation. *NY Dent J*. 1970, Vol. 36, pp. 291- 3.
- Lee, H. S. e Coates, G. A. 1998.** Vitamina C in frozen, fresh squeeze, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food Chem*. 1998, Vol. 65, pp. 165-168.
- Lee, J.E., et al. 2006.** Intakes of fruits, vegetables, vitamins A, C, and E, and carotenoids and risk of renal cell cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2006, Vol. 15, pp. 2445–2452.
- Lee, S.K. e Kader, A.A. 2000.** Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*. 2000, Vol. 20, pp. 207–220.
- Li, P. M., Du, G. R. e Ma, F. W. 2011.** Phenolics concentration and antioxidant capacity of different fruit tissues of astringent versus non-astringent persimmons. *Sci. Hortic*. 2011, Vol. 129, pp. 710–714.

- Luo, Y. e Barbosa, G. 1997.** Enzymatic browning and its inhibition in new apple cultivars slices using 4-hexylresorcinol in combination with ascorbic acid. *Food Science and Technology International*. 1997, Vol. 3 (3), pp. 195–201.
- Machlin, L.J. 1995.** Critical assessment of epidemiological data concerning the impact of antioxidant nutrients on cancer and cardiovascular disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1995, Vol. 35, pp. 41–50.
- Mangos, T. J. e Berger, R. G. 1997.** Mangos, T. J., & Berger, R. G. Determination of major chlorophyll degradation products. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und-Forschung A*. 1997, Vol. 204, pp. 345–350.
- Martínez, J. A. 1998.** Fundamentos teórico-prácticos de Nutrición y dietética. España : McGraw-Hill, Interamericana, 1998.
- Martins, M.L. L. 1992.** *Inativação Térmica e Regeneração da Peroxidase de Feijão Verde - Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Lisboa : UTL / ISA, 1992.
- Matile, P., Schellenberg, M. e Vicentini, F. 1997.** Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope. *Planta*. 1997, Vol. 201, pp. 96–9.
- Matuschek, E. e Svanberg, U. 2005.** The effect of fruit extracts with polyphenol oxidase (PPO) activity on the in vitro accessibility of iron in high-tannin sorghum. *Food Chemistry*. 2005, Vol. 90, pp. 765–771.
- McEvily, A. J., Iyengar, R. e Otwell, W. S. 1992.** Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1992, Vol. 32(3), pp. 253–273.
- Meinke, M. C., et al. 2010.** Bioavailability of natural carotenoids in human skin compared to blood. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010, Vol. 76, pp. 269–274.
- Ming-Jun, L., et al. 2008.** Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). *Plant Science*. 2008, Vol. 174, pp. 606–612.
- Minguez-Mosquera, M. I., Garrido-Fernandez, J. e Gandul-Rojas, B. 1989.** Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1989, Vol. 37, pp. 8–11.
- Monteiro, M., Amaro, A. P. e Bonilha, P. R. M. 2005.** Avaliação físico-química e microbiológica da polpa de maracujá processada e armazenada sob refrigeração. *Alim. Nutr.* 2005, Vol. 16, pp. 71-76.
- Müller, L., et al. 2010.** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT – Food Science and Technology*. 2010, Vol. 43, pp. 992-999.
- Munday, R. e Munday, C. M. 2004.** Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: Comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004, Vol. 52, pp. 1867–1871.
- Murkovic, M., Muelleder, U. e Neunteufl, H. 2002.** Carotenoid content in different varieties of pumpkins. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2002, Vol. 15, pp. 633–638.
- Neto, R.C. e Faria, J. 1999.** Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1999, Vol. 19 (1).
- Nguyen-the, C. e Carlin, F. 1994.** The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1994, Vol. 34, pp. 371–401.
- Nilnakara, S., Chiewchan, N. e Devahastin, S. 2009.** Production of antioxidant dietary fiber powder from cabbage outer leaves. *Food Bioprod. Process.* 2009, Vol. 87, pp. 301–307.
- Nishikimi, M. e Yagi, K. 1991.** Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am J Clin Nutr.* 1991, Vol. 54, pp. 1203S–1208S.

- Nishino, H., et al. 2009.** Cancer prevention by carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2009, Vol. 483, pp. 165–168.
- Norma EN ISO 4833. 2003.** "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30°C". 2003.
- Norton, T. e Sun, D. W. 2008.** Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*. 2008, Vol. 1(1), p. 2–34.
- NP 3030-1985.** *Frutos, produtos hortícolas e seus derivados: determinação do teor de ácido ascórbico: processos correntes*. s.l. : Direção Geral de Qualidade, 1985.
- NP 3277:1-1987.** *Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25 °C*. 1987.
- NP 4258-1993.** *Análise sensorial. Directivas gerais para a concepção dos locais apropriados para análise*. 1993.
- NP EN 1132-1996.** *Sumos de frutos e produtos hortofrutícolas. Determinação do valor de pH*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa : s.n., 1996.
- NP EN 12 143-1999.** *Sumos de frutos e produtos hortícolas. Determinação do teor de sólidos solúveis. Método refractométrico*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa, Portugal : s.n., 1999.
- NP 784-1970.** Determinação do resíduo seco total, solúvel e insolúvel. Processo de referência. 1970.
- O'Beirne, D. e Francis, G. A. 2003.** Novel food packaging techniques. [autor do livro] R. Ahvenainen. *Reducing the pathogen risk in MAP-prepared produce*. Cambridge, UK : Woodhead Publishing Limited/CRC Press LLC, 2003, pp. 231-286.
- Oliveira, A.L., et al. 2005.** Propriedades físicas de misturas para sherbet de mangaba. *Pesq. agropec. bras*. 2005, Vol. 40, pp. 581-586.
- Oliver, J. e Palou, A. 2000.** Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*. 2000, Vol. 881, pp. 543–555.
- Oloyede, F.M., et al. 2012.** Nutritional and antioxidant profiles of pumpkin (*Cucurbita pepo Linn.*) immature and mature fruits as influenced by NPK fertilizer. *Food Chemistry*. 2012, Vol. 135, pp. 460–463.
- Olsen, H., Aaby, K. e Borge, G.I. 2009.** Characterization and quantification of flavonoids (*Var. sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Agric. Food Chem.* 2009, Vol. 57, pp. 2816–2825.
- Olson, J. A. 1994.** Carotenoids: Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure and Applied Chemistry*. 1994, Vol. 66, pp. 1011–1016.
- Oszmianski, J., Wojdyło, A. e Kolniak, J. 2011.** Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chemistry*. 2011, Vol. 127, pp. 623–631.
- Othman, N. B., et al. 2008.** Tunisian table olive phenolic compounds and their antioxidant capacity. *Journal of Food Science*. 2008, Vol. 73, pp. C235–C240.
- Paiva, S. e Russell, R. 1999.** Beta carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll. Nutr.* 1999, Vol. 18, pp. 426–33.
- Patterson, H. Y. V. I. e Burns, D. J. N. 1983.** Volatile aroma constituents of kiwifruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1983, Vol. 34, pp. 81–84.
- Pénicaud, C., et al. 2010.** Ascorbic acid in food: Development of a rapid analysis technique and application to diffusivity determination. *Food Research International*. 2010, Vol. 43, p. 838–847.

- Pereira, F.M., et al. 2002.** Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* Var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 2002, Vol. 50, pp. 6239–6244.
- Pfander, H. 1987.** *Key to Carotenoids*. Basel : Birkhäuser Verlag, 1987.
- Provesi, J. G., Dias, C. O. e Amante, E. R. 2011.** Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*. 2011, Vol. 128, pp. 195–202.
- Quirós, Rodríguez-Bernaldo A., Fernández-Arias, M. e López-Hernández, J. 2009.** A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chemistry*. 2009, Vol. 116, pp. 509–512.
- Quirós, Rodríguez-Bernaldo A. e Costa, H. 2006.** Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, Vol. 19, pp. 97–111.
- Raghu, V., Kalpana Platel e Srinivasan, K. 2007.** Comparison of ascorbic acid content of *Embllica officinalis* fruits determined by different analytical methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, Vol. 20, pp. 529–533.
- Rao, A. V. e Rao, L. G. 2007.** Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. 2007, Vol. 55, pp. 207–216.
- Rattanathanalerk, M., Chiewchan, N. e Srichumpoung, W. 2005.** Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. *Journal of Food Engineering*. 2005, Vol. 66, pp. 259–265.
- Reddy, C.V. K., Sreeramulu, D. e Raghunath, M. 2010.** Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*. 2010, Vol. 43, pp. 285–288.
- Ribeiro, E. P. e Seravalli, E. A. G. 2007.** *Química de Alimentos*. 2ª. São Paulo - Brasil : Editora Edgard Blücher Ltda, 2007.
- Rizzolo, A. e Polesello, S. 1992.** *J. Chromatogr.* 1992, Vol. 103, p. 624.
- Rodriguez-Amaya, D. B. 1999.** A guide to carotenoid analysis in foods. *Washington: International Life Sciences Institute (ILSI) Press*. 1999.
- Rosa, E. A. S., et al. 1997.** Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews*. 1997, Vol. 19, pp. 99–215.
- Roy, M. K., et al. 2007.** Antioxidant potential, anti-proliferative activities, and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry*. 2007, Vol. 103, pp. 106–114.
- Rudra, S. G., et al. 2008.** Thermal inactivation kinetics of peroxidase in coriander leaves. *Food and Bioprocess Technology*. 2008, Vol. 1, pp. 187–195.
- Sancho, L. E.G. G., Yahia, E. M. e González-Aguilar, G. A. 2011.** Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. *Maradol*) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International*. 2011, Vol. 44, pp. 1284–1291.
- Sander, H.C.S., et al. 2004.** Thiele, Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int. J. Dermatol.* 2004, Vol. 43, pp. 326–335.
- Sangeetha, R. K. e Baskaran, V. 2010.** Carotenoid composition and retinol equivalent in plants of nutritional and medicinal importance. Efficacy of b-carotene from *Chenopodium album* in retinol-deficient rats. *Food Chemistry*. 2010, Vol. 119, pp. 1584–1590.
- Santos, I., et al. s/d.** Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo jorge. *Centro de Segurança Alimentar e Nutrição*. s/d.
- Sarkar, D., Sharma, A. e Talukder, G. 1994.** Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutation Res.* 1994, Vol. 318, pp. 239–247.

- Scalbert, A. e Williamson, G. 2000.** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. 2000, Vol. 130, pp. 2073S–2085S.
- Schmid, V. H. 2008.** Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell Mol Life Sci*. 2008, Vol. 65, pp. 3619–39.
- Schmidt, K., et al. 2003.** Recombinant water soluble chlorophyll protein from *Brassica oleracea* var. *botrys* binds various chlorophyll derivatives. *Biochemistry*. 2003, Vol. 42, pp. 7427–33.
- Schmidt, S., et al. 2010.** Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem*. 2010, Vol. 119, pp. 1293–1299.
- Schwartz, S. J. e Lorenzo, T. V. 1990.** *Chlorophyll in foods*. In: *Clydesdale FM*. Boca Raton (Fla) : CRC Press, 1990.
- Schwartz, S.J e Lorenzo, T. V. 1991.** Chlorophyll stability during continuous aseptic processing and storage. *Journal of Food Science*. 1991, Vol. 56, pp. 1059–1062.
- Schwartz, S. J. e Von Elbe, J. H. 1983.** Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables. *Journal of Food Science*. 1983, Vol. 48, pp. 1303–1306.
- Shapiro, T. A., et al. 2001.** Chemopreventive glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prevent*. 2001, Vol. 10, pp. 501–508.
- Smolinska, U. e Horbowicz, M. 1999.** Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *J. Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*. 1999, Vol. 147, pp. 119–124.
- Soliva-Fortuny, R. C., et al. 2002.** Kinetics of polyphenol oxidase activity inhibition and browning of avocado purée preserved by combined methods. *Journal of Food Engineering*. 2002, Vol. 55, pp. 131–137.
- Soufleros, E. H., et al. 2001.** Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine; sensory evaluation and optimisation of its composition. *Food Chemistry*. 2001, Vol. 75, pp. 487–500.
- Stahl, W. e Sies, H. 2003.** Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med*. 2003, Vol. 24, pp. 345–351.
- Sternberg, E.D., Dolphin, D. e Brqckner, C. 1998.** Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 1998, Vol. 54, pp. 4151- 202.
- Stevenson, D.E. e Hurst, R.D. 2007.** Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci*. 2007, Vol. 64, pp. 2900–2916.
- Sun, B., et al. 2012.** Effects of plant hormones on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese kale. *Food Research International*. 2012, Vol. 48, pp. 359–366.
- Swain, T. e Hillis, W. E. 1959.** The phenolic constituents of *Prunus domestica* 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1959, Vol. 10, pp. 63-68.
- Talalay, P. e Fahey, J.W. 2001.** Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J. Nutr*. 2001, Vol. 131, pp. 3027S–3033S.
- Talalay, P. 1999.** Proc. Am. Philos. Soc. 1999, Vol. 52, p. 143.
- Talalay, P., et al. 1995.** Chemoprotection against cancer by phase II enzyme induction. *Toxicology Letters*. 1995, Vol. 82, pp. 173–179.
- Tanongkankit, Y., Chiewchan, N. e Devahastin, S. 2012.** Physicochemical property changes of cabbage outer leaves upon preparation into functional dietary fiber poder. *Food and Bioproducts Processing*. 2012, Vol. 90, pp. 541–548.
- Taveira, M., et al. 2009.** In vitro cultures of *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC: Potential plant bioreactor for antioxidant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, Vol. 57(4), pp. 1247–1252.

- Thaipanit, S. e Anprung, P. 2010.** Physicochemical and flavor changes of fragrant banana (*Musa acuminata* AAA group 'Gross michel') during ripening. *J. Food Process. Preserv.* 2010, Vol. 34, pp. 366–382.
- Tiwari, B., et al. 2011.** Stability of antocyanins and ascorbic acid of high pressure processed blood orange juice during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2011.
- Treutter, D. 2005.** Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 2005, Vol. 7, pp. 581–591.
- Umme, A., et al. 1999.** Microbial and enzymatic changes in natural soursop puree during storage. *Food Chemistry.* 1999, Vol. 65, p. 315-322.
- USDA/HHS. 2004.** *US Department of Agriculture, US Department of Health and Human. s.l. : Dietary Guidelines Advisory Committee Report, 2004.*
- Valderrama, P. e Clemente, E. 2004.** Isolation and thermostability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars *Gala* and *Fuji*. *Food Chemistry.* 2004, Vol. 87, pp. 601–606.
- Vallejo, F., Tomas-Barberan, F. A. e Garcia-Viguera, C. 2002.** Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *European Food Research and Technology.* 2002, Vol. 215 (4), pp. 310–316.
- Verkerk, R., Dekker, M. e Jongen, W.M.F. 2001.** Postharvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of Brassica vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 2001, Vol. 81, pp. 953–958.
- von Elbe, J. H. e Schwartz, S. J. 1996.** *Colorants.* In O. R. Fennema (Ed.). New York : Marcel, 1996. pp. 651–722.
- Wallsgrave, R.M., Doughty, K.J. e Bennett, R.N. 1999.** *Glucosinolates, in: Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology.* New York : Marcel Dekker, 1999.
- Washko, P., Rotrosen, D. e Levine, M. 1991.** Ascorbic acid in human neutrophils. *Am J Clin Nutr.* 1991, Vol. 54, pp. 1221S–1227S.
- Wennberg, M., et al. 2006.** Change in carbohydrate and glucosinolate composition in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) during blanching and treatment with acetic acid. *Food Chem.* 2006, Vol. 95 (2), pp. 226–236.
- Whitaker, J. R. e Lee, C. Y. 1995.** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. An overview. *ACS Symposium Series.* 1995, Vol. 600, pp. 2–7.
- Wisniewska, A. e Subczynski, W. K. 2006.** Accumulation of macular xanthophylls in unsaturated membrane domains. *Free Radical Biology & Medicine.* 2006, Vol. 40, pp. 1820–1826.
- Wolfe, K., Wu, X. e Liu, R. H. 2003.** Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* 2003, Vol. 51, pp. 609–614.
- Wu, L., et al. 2004.** Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Science USA.* 2004, Vol. 101 (18), pp. 7094–7099.
- Zanatta, C. L., Zotarelli, M. F. e Eclemente, E. 2006.** Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006, Vol. 26 (3), pp. 705-708.
- Zhang, Y. e Talalay, P. 1994.** Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and metabolisms. *Cancer Res.* 1994, Vol. 54, pp. 1976S–1981S.
- Zhang, Y., et al. 1992.** A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Science USA.* 1992, Vol. 89, pp. 2399–2403.
- Zhu, Y., et al. 2010.** Processing and quality characteristics of apple slices processed under simultaneous infrared dryblanching and dehydration with intermittent heating. *Journal of Food Engineering.* 2010, Vol. 97, pp. 8–16.

Zulueta, A., Esteve, M.J. e Frigola, A. 2010. Ascorbic acid in orange juice–milk beverage treated by high intensity pulsed electric fields and its stability during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010, Vol. 11, pp. 84–90.

ANEXOS



Anexo I - Folha de análise sensorial das polpas hortofrutícolas.

FOLHA DE ANÁLISE SENSORIAL DE POLPAS HORTOFRUTÍCOLAS

Nome: _____

Data: _____

Idade: _____

Amostra: _____

Faça uma apreciação das amostras de polpas que lhe são apresentadas, classificando-as de acordo com a cor, o gosto, o aroma, a textura, a apreciação global e a intenção de compra, assinalando o código da amostra no quadrado que mais se aproxima à sua avaliação.

1. Cor

1 – Muito escura

6 – Muito clara

1

2

3

4

5

6

2. Aroma

Frutado

1 – Pouco frutado

6 – Muito frutado

1

2

3

4

5

6

Estranho

1 – Nada estranho

6 – Muito estranho

1

2

3

4

5

6

3. Gosto

Acidez

1 – Nada ácido

6 – Muito ácido

1

2

3

4

5

6

Doce

1 – Pouco doce

6 – Muito doce

1

2

3

4

5

6

Estranho

1 – Nada estranho

1

2

3

4

5

6

6 – Muito estranho

4. Textura

Granulosidade

1 – Nada granulosidade

1

2

3

4

5

6

6 – Muito granulosidade

Homogeneidade

1 – Nada homogéneo

1

2

3

4

5

6

6 – Muito homogéneo

5. Apreciação global

1 – Muito desagradável

1

2

3

4

5

6

6 – Muito agradável

6. Intenção de compra

1 – Não compraria de certeza

1

2

3

4

5

6

6 – Compraria de certeza

COMENTÁRIOS:

OBRIGADA PELA COLABORAÇÃO!