

ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS NA CONSERVAÇÃO DE SUMO DE MAÇÃ 100%

Maria Margarida Gomes Roldão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Coorientador: Engenheira Maria Joaquina da Cunha Pinheiro

Júri:

Presidente: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais:

- Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

- Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Lisboa, 2014

A concretização desta dissertação de Mestrado só foi possível graças à ajuda daqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a sua realização.

Agradeço à minha orientadora, Professora Margarida Moldão, por todos os ensinamentos, ajuda, orientação, paciência, compreensão, palavras de motivação e por todo o carinho desde o primeiro dia em que descobriu que tinha uma “homónima” como sua aluna;

À Engenheira Joaquina Pinheiro pela sua preciosa ajuda e contribuição durante todo o trabalho, sendo o seu apoio imprescindível e fundamental para a concretização do mesmo;

À Frubaça pela disponibilidade de todos os recursos necessários à realização do trabalho;

Ao Eng^o. Eduardo Leitão pela sua ajuda no método de HPLC;

Aos bolsheiros Carolina, Bernardo e Florina, pelas constantes palavras de incentivo e boa disposição;

À D. Júlia, pela ajuda que só ela conseguia dar;

Aos meus colegas de curso que, sem exceção, fizeram parte da minha vida enquanto estudante e em muito contribuíram para a pessoa que sou hoje;

Aos meus amigos, que me apoiaram durante os momentos mais difíceis deste percurso;

À minha família por todo o apoio nas várias etapas do curso, por terem sempre acreditado em mim;

Ao André Mão-de-Ferro pela grande ajuda e apoio;

Ao Pedro, por tudo;

Aos meus pais, por todo o apoio incondicional, pois sem eles este meu percurso não teria sido possível.

O objetivo deste estudo consistiu na avaliação das causas da instabilidade e procura de soluções para a manutenção da qualidade de sumo de maçã 100% tratado a altas pressões hidrostáticas (500 MPa, 120 s, 18°C, 0,1% de ácido ascórbico). O escurecimento enzimático do sumo e o depósito formado deve-se ao facto de, face ao sumo fresco, o tratamento conseguir apenas inativar 66% e 84,9% das enzimas polifenoloxidase e pectinametilsterase, respetivamente, sendo a adição de ácido ascórbico indispensável para garantir a estabilidade da cor do sumo a 4 °C durante 35 dias. Por este motivo estudou-se a aplicação de diferentes níveis de pressão (450 a 600 MPa) e conclui-se que a inativação da polifenoloxidase foi diretamente proporcional à pressão, apesar de não se ter atingido uma inativação efetiva mesmo às pressões mais elevadas. A pressões superiores a 578 MPa atingiu-se a inativação efetiva (100%) da pectinametilsterase. O tratamento alternativo por microondas (T = 87 a 105°C, tempo de rampa = 76 a 300 s, tempo de *holding* = 0 a 180 s) mostrou-se eficaz na inativação total da pectinametilsterase em toda a gama estudada. Este tratamento foi apenas eficaz na inativação da polifenoloxidase para temperaturas superiores a 87 °C e tempo de rampa superior a 280 segundos e/ou a 101°C e tempo de rampa superior a 80 segundos, porém promoveu a formação de 5-hidroximetilfurfural em concentrações superiores a 150 µg.L⁻¹.

Palavras-chave: sumo de maçã 100%; altas pressões hidrostáticas; polifenoloxidase; pectinametilsterase; microondas; 5-hidroximetilfurfural.

The aim of this study was to assess the causes of instability in 100% apple juice treated by high hydrostatic pressure (500 MPa, 120 s, 18 °C, 0.1% ascorbic acid) and seek solutions to maintain the its original quality. Enzymatic browning of the juice and the appearance of a precipitate in the bottom of containers is due to the fact that the treatment is able to only inactivate 66% of polyphenoloxidase and 84.9% of pectinmethylesterase enzymes. The addition of ascorbic acid was essential to maintenance the colour of juice, at 4 °C during 35 days. By varying the applied pressure (450 to 600 MPa) it was concluded that the inactivation of polyphenoloxidase was directly proportional to pressure, however an effective inactivation was not reached even at higher pressures. Futhermore, for pressures higher than 578 MPa a complete (100%) inactivation of pectinmethylesterase was achieved. Microwave treatment (T = 87 at 105 °C, ramp time = 76 to 300 s, holding time = 0 to 180 s) was completely effective (100%) in the inactivation of the pectinmethylesterase across the studied range of radiation. The microwave treatment was equally effective in the inactivation of polyphenoloxidase only for temperatures above 87 °C and ramp time above 280 seconds and/or temperature above 101°C and ramp time above 80 seconds. However, it was found that this treatment promotes the formation of 5-hydroxymethylfurfural with concentration values above 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Keywords: apple juice 100%; high hydrostatic pressure; polyphenoloxidase; pectinmethylesterase; microwaves; 5-hidroxyethylfurfural.

Nowadays, consumers reveal a higher interest in aspects related to health, composition and functionality of food, which has triggered a growing demand for high quality products. Due to these new patterns of consumption, the food industry has invested in diversification of technologies that provide minimal degradation of processed products.

100% apple juice produced by Frubaça is currently preserved through a high hydrostatic pressure treatment (500 MPa, 120 s, 18 °C, 0.1% ascorbic acid), however it has sensory changes that occur during storage. The aim of this study was to assess the causes of this instability, seek solutions to maintain its original properties and extend its shelf life.

It was found that 66% of polyphenoloxidase and 84.9% of pectinmethylesterase enzymes, remained active after the preservation process currently applied by Frubaça. The presence of polyphenoloxidase is the most responsible factor for the deterioration of the juice since it triggers the oxidation of phenolic compounds that leads to browning of the juice during storage. Additionally, pectinmethylesterase produces calcium pectates that, after agglomeration, result in the formation of a deposit in the juice. However, through this treatment a reduced degradation of total phenolic compounds and antioxidant activity was possible, when compared to heat-treated juice.

In order to overcome the inefficacy of the treatment currently applied by industry, other pressure levels were studied, with the objective of inactivating polyphenoloxidase and pectinmethylesterase without sensory degradation.

Based on the central composite rotatable experimental design (DCCR) the applied pressure levels were 450 to 600 MPa, remaining the other variables of the process (120 s, 18 °C, 0.1% ascorbic acid) constant.

It was found that the polyphenoloxidase activity tends to decrease with increasing pressure applied, however full inactivation (100%) was not achieved. On the other hand, the inactivation of pectinmethylesterase was 100% for pressure levels above 578 MPa. Despite this successful result, deposit of juice starts to form prior the pressure treatment, more precisely after the crushing operation. Thus, the formation of deposit by pectinmethylesterase should be significantly reduced by applying a pressure above 578 MPa during the treatment but also by decreasing the period after the crushing operation.

As a proposal for an alternative process, thermal treatment applied by microwaves in the range $T = 87$ to $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, ramp time = 76 to 300 seconds and holding time = 0 to 180 seconds. An effective inactivation (100%) of pectinmethylesterase was obtained in all points studied, as well as polyphenoloxidase only when temperature above $87\text{ }^{\circ}\text{C}$ and ramp time above 280 seconds and/or temperature above 101°C and ramp time above 80 seconds. The disadvantage of microwave treatment is the formation of 5-hydroxymethylfurfural – an undesirable sensorial agent, with concentration above $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (flavour threshold detection = $35,784\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

This work showed that neither high-pressure nor thermal treatments alone can inactivate the enzymes polyphenoloxidase and pectinmethylesterase - which are the most important agents for the shortened shelf life of apple juice 100% produced by Frubaça, without promoting the undesirable formation of sensory compounds above the sensorial threshold. However, for future works it is strongly advised to implement both treatments in series or in parallel since it could bring the best of both worlds: similar sensory characteristics to fresh juice with an extended shelf life.

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Extended Abstract	IV
Índice Geral	VI
Índice de Tabelas	IX
Índice de Figuras	X
Lista de Abreviaturas	XIII
1. Introdução e Objetivos	1
2. Enquadramento teórico	3
2.1 Sumo de fruta – maçã	3
2.2 Processos de conservação alimentar	6
2.3 Altas pressões hidrostáticas no processamento e conservação alimentar	7
2.3.1 Descrição do processo	8
2.3.2 Altas pressões hidrostáticas em processamento de alimentos	10
2.3.3 Efeito das altas pressões hidrostáticas nos parâmetros globais de qualidade dos sumos de fruta	11
2.4 As microondas no processamento e conservação de sumo de maçã	19
3. Desenvolvimento experimental	23
3.1 Preparação e caracterização das amostras	23
3.2 Métodos analíticos	24
3.2.1 Determinação do conteúdo fenólico total	24
3.2.2 Determinação da capacidade antioxidante total	24
3.2.2.1 Capacidade antioxidante através do método de captura do radical livre DPPH	24
	VI

3.2.2.2 Capacidade antioxidante através da redução do ferro – FRAP	25
3.2.2.3 Capacidade antioxidante através da captura do radical livre ABTS	25
3.2.3 Determinação da cor (CIElab)	26
3.2.4 Determinação da atividade da enzima polifenoloxidase	26
3.2.5 Determinação da atividade da enzima pectinametilesterase	27
3.2.6 Análise dos compostos do aroma	27
3.2.7 Determinação do 5-hidroximetilfurfural	28
3.2.8 Registo fotográfico	28
3.3 Métodos estatísticos	29
3.3.1 Análise de variância (ANOVA)	29
3.3.2 Metodologia de superfície de resposta (RSM)	29
4. Avaliação da estabilidade de sumo de maçã por altas pressões hidrostáticas nas condições aplicadas na indústria vs tratamento térmico	31
4.1 Delineamento experimental	31
4.2 Resultados e discussão	33
4.2.1 Atividade da polifenoloxidase	33
4.2.2 Atividade da pectinametilesterase	34
4.2.3 Conteúdo fenólico total	35
4.2.4 Capacidade antioxidante total	37
4.2.5 Cor (CIElab) e Índice de escurecimento	41
4.3 Balanço Intercalar	44
5. Otimização das condições de processamento de sumo de maçã por altas pressões hidrostáticas	46
5.1 Delineamento experimental	46
5.2 Resultados e discussão	47
5.2.1 Inibição da atividade da polifenoloxidase	48

5.2.2 Inibição da atividade da pectinametilesterase	49
5.2.3 Cor (CIElab)	50
5.2.4 Registos fotográficos	52
5.2.5 Composição aromática	53
5.2.5.1 Compostos voláteis totais	53
5.2.5.2 Compostos voláteis mais representativos do perfil do aroma	55
5.3 Balanço intercalar	63
6. Otimização das condições de inativação enzimática de sumo de maçã por microondas	64
6.1 Delineamento experimental	64
6.2 Resultados e discussão	66
6.2.1 Inibição da atividade da polifenoloxidase	66
6.2.2 Inibição da atividade da pectinametilesterase	68
6.2.3 5-Hidroximetilfurfural	69
6.3 Balanço Intercalar	71
7. Conclusões gerais	72
8. Sugestões de melhoria à unidade industrial	74
9. Propostas de trabalhos futuros	75
10. Bibliografia	76
Anexos	86

Tabela 2.1. Compostos voláteis de impacto na composição aromática da maçã e seus derivados.	5
Tabela 2.2. Produtos alimentares processado por HHP comercializados em várias indústrias.	10
Tabela 2.3. Efeito do processamento por HHP nas propriedades físicas e químicas de sumos de fruta.	12
Tabela 2.4. Efeito de diferentes condições de tratamento por HHP na cor de sumos de fruta.	13
Tabela 2.5. Efeito de diferentes condições de tratamento por HHP no conteúdo fenólico total e na capacidade antioxidante total de sumos de fruta.	16
Tabela 2.6. Efeito de diferentes condições de tratamento por HHP na atividade enzimática da pectinametilsterase e polifenoloxidase de sumo de maçã.	19
Tabela 4.1. Caracterização das amostras estudadas para validação de H ₁ .	31
Tabela 4.2. Quantificação das amostras e respetivos tempos de análise.	32
Tabela 5.1 Matriz das variáveis independentes (P e t _A) na forma codificada e decodificada.	46
Tabela 5.2. Caracterização e quantificação das amostras estudadas para validação de H ₂ .	47
Tabela 5.3. Compostos voláteis que apresentaram maior representatividade nos cromatogramas ao longo do estudo.	55
Tabela 6.1. Matriz das variáveis independentes (T, t _R e t _H) na forma codificada e decodificada.	65

Figura 2.1. Componentes que compõem um sistema de altas pressões hidrostáticas.	9
Figura 2.2. Utilização do método de conservação por HHP em diferentes segmentos da indústria alimentar.	11
Figura 2.3. Esquema de reação de escurecimento enzimático promovido pela polifenoloxidase.	17
Figura 2.4. Esquema da reação promovida pela pectinametilsterase.	18
Figura 3.1. Gama de sumos de fruta produzidos pela Frubaça.	23
Figura 3.2. Diagrama de produção do sumo de maçã.	23
Figura 3.3. Processo de extração dos compostos do aroma do sumo de maçã por SPME.	28
Figura 4.1. Esquema do equipamento do tratamento de altas pressões hidrostáticas.	32
Figura 4.2. Efeito dos processos de conservação aplicados <i>vs</i> sumo fresco na atividade da polifenoloxidase, no tempo zero.	33
Figura 4.3. Efeito dos processos de conservação aplicados <i>vs</i> sumo fresco na atividade da pectinametilsterase, no tempo zero.	34
Figura 4.4. Efeito dos processos de conservação aplicados <i>vs</i> sumo fresco no conteúdo fenólico total ao longo do tempo de armazenamento.	35
Figura 4.5 Efeito dos processos de conservação aplicados <i>vs</i> sumo fresco na capacidade antioxidante total, segundo metodologia DPPH, ao longo do tempo de armazenamento.	37
Figura 4.6. . Efeito dos processos de conservação aplicados <i>vs</i> sumo fresco na capacidade antioxidante total, segundo metodologia FRAP, ao longo do tempo de armazenamento.	38
Figura 4.7. Efeito dos processos de conservação aplicados <i>vs</i> sumo fresco na capacidade antioxidante total, segundo metodologia ABTS, ao longo do tempo de armazenamento.	39
Figura 4.8. Efeito dos processos de conservação aplicados <i>vs</i> sumo fresco na luminosidade (L) da cor, ao longo do tempo de armazenamento.	41
Figura 4.9. Efeito dos processos de conservação aplicados <i>vs</i> sumo fresco na cromaticidade (c) da cor, ao longo do tempo de armazenamento.	42

Figura 4.10. Efeito dos processos de conservação no índice de escurecimento, ao longo do tempo de armazenamento.	43
Figura 5.1. Superfície de resposta da variação da % de inativação da PPO em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).	48
Figura 5.2. Superfície de resposta da variação da % de inativação da PME em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).	49
Figura 5.3. Superfície de resposta da variação de luminosidade (L) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).	50
Figura 5.4. Superfície de resposta da variação de cromaticidade (c) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).	51
Figura 5.5. Registos fotográficos das amostras tratadas a 450, 472, 525, 578 e 600 MPa ao longo do tempo em estudo.	52
Figura 5.6. Área correspondente aos compostos voláteis totais dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo zero.	54
Figura 5.7. Cromatograma obtido com a definição dos picos mais representativos observados em todas as amostras estudadas.	55
Figura 5.8. Superfície de resposta da variação da % de acetato de hexilo em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).	56
Figura 5.9. Área correspondente ao acetato de hexilo dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo zero.	56
Figura 5.10. Superfície de resposta da variação da % de X_A ($t_R = 14,60$ s) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).	57
Figura 5.11. Área correspondente ao X_A ($t_R = 14,60$ s) dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo zero.	58
Figura 5.12. Superfície de resposta da variação da % de X_B ($t_R = 19,19$ s) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).	59
Figura 5.13. Área correspondente ao X_B ($t_R = 19,19$ s) dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo zero.	60

Figura 5.14. Superfície de resposta da variação da % de X_C ($t_R = 24,40$ s) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).	61
Figura 5.15. Área correspondente ao X_C ($t_R = 19,19$ s) dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo zero.	61
Figura 6.1. Esquema do forno de microondas.	66
Figura 6.2. Superfície de resposta da variação da % de inativação da PPO em função da temperatura (T) e tempo de rampa (t_R).	67
Figura 6.3. Superfície de resposta da variação da % de inativação da PPO em função da temperatura (T) e tempo de <i>holding</i> (t_H).	67
Figura 6.4. Superfície de resposta da variação da % de inativação da PPO em função do tempo de rampa (t_R) e tempo de <i>holding</i> (t_H).	68
Figura 6.5. Superfície de resposta da variação da concentração de 5-hidroxiacetilfurfural (mg.L^{-1}) em função da temperatura (T) e tempo de rampa (t_R).	69
Figura 6.6. Superfície de resposta da variação da concentração de 5-hidroxiacetilfurfural (mg.L^{-1}) em função da temperatura (T) e tempo de <i>holding</i> (t_H).	70
Figura 6.7. Superfície de resposta da variação da concentração de 5-hidroxiacetilfurfural (mg.L^{-1}) em função do tempo de rampa (t_R) e tempo de <i>holding</i> (t_H).	70

AA – Ácido ascórbico

ABTS - *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*

a_w – Atividade da água

DPPH - *2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil*

FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*

HHP – *High hydrostatic pressure* (altas pressões hidrostáticas)

LD – Limiar de deteção ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

MW – *Microwave* (microondas)

PET - Politereftalato de etieno

PME – Pectinametilesterase

PPO – Polifenoloxidase

SF – Sumo fresco

SHHP – Sumo tratado por altas pressões hidrostáticas (500 MPa, 18 °C, 120 segundos)

SP – Sumo pasteurizado

t_A – Tempo de armazenamento (dias)

TAC – *Total antioxidant content* (capacidade antioxidante total)

t_H – Tempo de *holding* (segundos)

TPC – *Total phenolic content* (conteúdo fenólico total)

t_R – Tempo de rampa (segundos)

tR – Tempo de retenção (minutos)

TSS – Teor de sólidos solúveis

TT – Tratamento térmico

WI – índice de escurecimento.

O consumidor atual, revelando um maior interesse com aspetos relacionados com a saúde e com a composição e funcionalidade dos alimentos tem manifestado uma crescente procura por produtos de elevada qualidade. Assim, atendendo às suas necessidades específicas, tem-se assistido a um crescente desenvolvimento de novas tecnologias de conservação alimentar, em detrimento dos processos convencionais que maioritariamente utilizam a energia térmica para a diminuição e/ou inativação da microbiota e enzimas, retardando o processo de deterioração (Considine *et al.*, 2008).

As tecnologias emergentes de conservação alimentar objetivam propiciar a segurança microbiológica dos géneros alimentícios, aumentando o seu tempo de vida útil, bem como proporcionar mínimas alterações químicas e bioquímicas, promovendo a manutenção da qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (Rendueles *et al.*, 2011). Estes processos alternativos têm suscitado elevado interesse por parte da comunidade científica como tecnologias promissoras a serem empregues em larga escala industrial, uma vez que além de promoverem a manutenção de constituintes fundamentais dos alimentos, são tecnologias ecológicas e sustentáveis, com baixos requisitos de energia e utilização de água, superando diversas limitações intrínsecas aos métodos convencionais (Toepfl *et al.*, 2006).

As altas pressões hidrostáticas, como método de conservação alimentar, tem sido alvo de particular atenção como uma alternativa viável aos processos térmicos, visando a substituição ou complementaridade de processos convencionais. Vários estudos indicam que num futuro próximo este método poderá ser uma alternativa que substitua por completo o tratamento térmico (Rastogi *et al.*, 2007). No entanto, será necessário um maior desenvolvimento no que diz respeito à compreensão da cinética da atividade enzimática, já que esta tecnologia não se revela totalmente eficaz na estabilização desta componente (Hogan *et al.*, 2005).

As microondas, como um processo térmico de conservação alimentar, é entendido como um processo alternativo por ter a capacidade de gerar calor diretamente no interior do alimento, conduzindo a uma maior eficiência na aplicação da energia e, conseqüentemente, reduzir o tempo de tratamento, quando comparado às tecnologias convencionais. Esta vantagem poderá ser uma mais-valia relativamente à qualidade do produto após o tratamento, nomeadamente na manutenção de alguns constituintes termolábeis. No entanto, para ser utilizada como processo de conservação, mais estudos terão que ser efetuados com o objetivo de conhecer as cinéticas de inativação microbiana e enzimática (Chandrasekaran *et al.*, 2013).

Os sumos de fruta 100% são géneros alimentícios cada vez mais procurados devido à conveniência que oferecem e por poderem constituir excelentes fontes de fruta. O sumo de maçã 100%, sendo um dos mais apreciados e consumidos inclui normalmente processos térmicos

(pasteurização) no diagrama de processamento. Por forma a evitar as implicações negativas decorrentes do tratamento térmico, a Frubaça CRL produz sumo de maçã 100% utilizando as altas pressões hidrostáticas como método de conservação. As características do sumo pressurizado são facilmente distinguíveis relativamente aos sumos pasteurizados pois apresentam uma cor, sabor e aroma mais próximo do(s) hortofrutícola(s) que lhe deram origem. No entanto, o seu tempo de vida útil é mais reduzido quando comparado aos tratados termicamente pois, apesar de se encontrar estável microbiologicamente, ainda existe atividade química/bioquímica por parte das enzimas que o constituem, levando a um escurecimento precoce e a uma separação de fases indesejável (Bárbosa-Cánovas *et al.*, 2002).

Neste sentido, a presente dissertação de Mestrado teve como objetivo principal determinar e avaliar as principais causas da instabilidade do sumo de maçã 100% conservado por altas pressões hidrostáticas, tentando encontrar respostas e soluções com vista à aplicação segura e eficiente do tratamento e manutenção da qualidade, conduzindo a um aumento do tempo de vida útil. Como objetivos específicos, o estudo pretendeu (1) avaliar as alterações químicas e bioquímicas resultantes do processo de conservação aplicado na Frubaça em sumo de maçã 100%, por meio de altas pressões durante o tempo de prateleira atualmente praticado; (2) estudar o efeito da variação dos parâmetros intrínsecos do processo de altas pressões hidrostáticas (pressão e tempo de armazenamento) nas características bioquímicas dos sumos; (3) propor melhorias e/ou alternativas ao processo por forma a manter as características do produto tratado semelhantes ao produto fresco, equacionando-se um tratamento/pré-tratamento térmico alternativo do sumo, as microondas.

2.1 SUMO DE FRUTA – MAÇÃ

A crescente consciência da população acerca da importância do consumo de alimentos saudáveis na prevenção de doenças e na melhoria da qualidade de vida tem resultado num aumento do consumo de frutas, hortícolas e seus derivados a nível mundial (Tiwari *et al.*, 2011). Desta forma, os sumos de fruta 100% têm merecido real destaque por apresentarem elevados índices de consumo. Segundo o anuário Nielsen (2010) existiu um incremento no consumo de 5% em volume deste tipo de sumos em Portugal, apontando três tendências que parecem ter impulsionado o crescimento desta gama de produtos: (1) maior preocupação com a saúde; (2) conveniência; (3) crescente impacto das marcas próprias, encontrando nestas uma boa relação qualidade/preço.

Os consumidores têm demonstrado preferência por sumos que apresentam parâmetros de qualidade elevados, que se assemelham o mais possível aos seus congéneres em fresco, com o mínimo ou ausência de conservantes ou outros aditivos alimentares (Cortés *et al.*, 2008).

A maçã, sendo um dos frutos com maior produção em Portugal, detentor de elevado valor nutricional, apresenta um elevado potencial comercial e industrial. A Maçã de Alcobaça, um produto de Indicação Geográfica Protegida, é proveniente de uma reconhecida área do Oeste responsável pela maior produção deste fruto. O consumo de sumo de maçã natural, não pasteurizado e estabilizado por altas pressões hidrostáticas, está em franca expansão, sendo muito apreciado pelo consumidor. No entanto, o seu tempo de prateleira é consideravelmente curto quando comparado aos sumos tratados termicamente (Kadam *et al.*, 2012).

Os principais parâmetros apontados como fatores de qualidade dos sumos de fruta são a cor, o grau de turbidez e o valor nutricional (Valdramidis *et al.*, 2009). Os parâmetros nutricionais presentes no sumo de maçã com maior destaque são os fitonutrientes, tais como, flavonóides, polifenóis e ácidos fenólicos, que fornecem benefícios atuando na redução do risco de doenças cardiovasculares. O sumo de maçã apresenta um teor de vitamina C inferior, comparativamente aos restantes compostos nutricionais e a outras frutas (Tsao *et al.*, 2005).

A maior problemática subjacente à produção de sumo de maçã prende-se com o escurecimento enzimático que ocorre após o corte dos tecidos do fruto, causado pela ação da enzima polifenoloxidase (PPO) característica da polpa de maçã (Gui *et al.*, 2007). Por este motivo, industrialmente é prática comum a adição de ácido ascórbico por forma a inibir o escurecimento, proporcionando ao mesmo tempo uma fonte adicional de vitamina C (Tortoe *et al.*, 2007). Outra enzima igualmente responsável pelas características que conferem qualidade ao sumo de maçã é a

pectinametilesterase (PME). A sua atividade leva à precipitação de compostos presentes no sumo, configurando perda de turbidez desejável, levando à formação de depósito no fundo da embalagem (Valdrimidis *et al.*, 2009). Estes tipos de alterações desenvolvem-se rapidamente e têm um grande impacto visual, interferindo na aceitação sensorial dos sumos de maçã (Deliza *et al.*, 2005b).

Um dos parâmetros essenciais na qualidade do sumo de maçã é a componente aromática (Guo *et al.*, 2012). A determinação e caracterização da composição volátil de sumos de maçã têm sido alvo de vários estudos. Dixon *et al.* (2000) reportou a existência de 276 compostos voláteis identificados na maçã, dos quais 110 correspondem a ésteres, 48 álcoois, 26 aldeídos, 15 cetonas, 41 ácidos, 7 éteres, 18 hidrocarbonetos, 9 compostos terpénicos, 1 norisoprenóide e 1 lactona. Alguns destes compostos são formados por reações enzimáticas que podem ocorrer (Guo *et al.*, 2012). Da totalidade de compostos identificados apenas algumas dezenas são responsáveis pelo aroma característico do sumo de maçã (Komthong *et al.*, 2007).

A identificação dos compostos voláteis depende da metodologia aplicada e da apresentação da amostra a analisar (maçã inteira ou fragmentada em maior ou menor grau), sendo que no caso de se utilizar a maçã fragmentada em maior ou menor grau (cortada em fatias, esmagada, sumo, entre outros) é importante ter-se em linha de conta que os compostos que estão presentes são provenientes do próprio fruto, bem como os compostos formados durante os tratamentos sofridos pela amostra, tais como os resultantes de reações de oxidações e/ou hidrólise (Reis *et al.*, 2009).

Além da preparação da amostra existem ainda outros fatores que influenciam o tipo e a quantidade de compostos voláteis presentes nas maçãs, tais como, a cultivar, as práticas de cultivo, as condições climáticas, a data de colheita do fruto e o seu estado de maturação (Dixon *et al.*, 2000). No entanto, a maioria das cultivares de maçã já estudadas apresentam os mesmos compostos voláteis, embora em proporção variável (Oey *et al.*, 2008). As variedades de casca amarela foram associadas e catalogadas como aquelas que produzem na sua maioria ésteres de acetato; e as de casca vermelha produzem maioritariamente ésteres de butanoato (Dixon *et al.*, 2000).

Na Tabela 2.1 encontram-se descritos alguns dos compostos voláteis identificados em diferentes cultivares de maçã que estão diretamente relacionados com o seu aroma. Estes compostos encontram-se presentes em concentrações superiores ao seu limiar de deteção (LD) designando-se, por isso, compostos de potencial impacto no aroma da maçã e seus derivados (Reis *et al.*, 2009).

Tabela 2.1. Compostos voláteis de impacto na composição aromática da maçã e seus derivados.Adaptado de Reis *et al.* (2009)

	DESIGNAÇÃO	DESCRITOR DE AROMA	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Ésteres	Acetato de etilo	ananás, frutado, solvente	0,005
	Acetato de butilo	pêra, picante	0,066
	Butanoato de etilo	ananás, frutado, banana	0,001
	Acetato 2-metil-butilo	maçã, banana, solvente	0,005
	Acetato de pentilo	maçã, banana, ananás, terra	0,005
	Butanoato de propilo	ananás, damasco	0,018
	Hexanoato de metilo	ananás, frutado	0,087
	2-metilbutanoato de etilo	maçã, ameixa, frutado, verde	0,0001
	Propanoato de butilo	ananás, frutado	0,025
	Acetato de hexilo	maçã, pêra, doce, floral	0,002
	Butanoato de butilo	maçã, pêra, ananás	-
	Hexanoato de etilo	maçã, ananás, frutado, fresco, doce	0,001
	Pentanoato de butilo	maçã, framboesa	-
	Butanoato de hexilo	ananás, doce	-
	Hexanoato de butilo	ananás, frutado	-
Hexanoato de hexilo	verde, herbáceo	-	
Álcoois	Etanol	alcoólico	100
	Butanol	doce	0,5
	2-metilbutanol	manteiga, palha	0,25
	Hexanol	verde, herbáceo	0,5
Aldeídos	Acetaldeído	verde	0,015
	Hexanal	verde, herbáceo, gordura	0,005
	2-hexenal	maçã verde, ameixa, frutado, doce, verde amêndoa	0,017
Norisoprenóides	B-damascenona	frutado, doce, mel, maçã cozida	0,00002

Mattheis *et al.* (1999) verificaram que o estado de maturação no dia da colheita é crucial e determinante para a definição do aroma nas maçãs. Dado que este é um fruto climatérico, após a colheita o seu amadurecimento prossegue. Este amadurecimento é um processo que envolve alterações em vários parâmetros, incluindo o aroma, e está dependente da maturação do fruto no ato da colheita bem como das condições e da duração do armazenamento. Estudos realizados verificaram que frutos colhidos num estado de maturação precoce e conservados durante um longo período de tempo (18-20 °C, 40 dias) desenvolveram um aroma pouco intenso durante o seu amadurecimento; ao passo que frutos colhidos num estado de maturação avançado, e apresentando metade do tempo de armazenamento e amadurecimento, desenvolveram um aroma mais intenso. Uma colheita intermédia

entre estes estados de maturação permitirá obter um desenvolvimento equilibrado do aroma ao longo do amadurecimento, com um tempo de prateleira bastante aceitável (Reis *et al.*, 2009).

Os compostos voláteis presentes naturalmente na maçã podem sofrer alterações após processamento (Su *et al.*, 1998). Diversos estudos reportam que sumos de maçã tratados termicamente perdem cerca de metade dos componentes voláteis do fruto original (Perédi *et al.*, 1981). Su *et al.* (2002), após aplicação de diferentes tratamentos térmicos (57,2 °C durante 1 hora e 85 °C durante 10 minutos), observaram uma redução dos teores de todas as frações voláteis características da fruta em fresco.

2.2 PROCESSOS DE CONSERVAÇÃO ALIMENTAR

A avaliação da qualidade dos alimentos efetuada pelos consumidores tem por base as características intrínsecas (sensoriais, nutricionais e funcionais) e extrínsecas do produto que, juntamente com o seu período de vida útil, determinam a preferência individual por determinados géneros alimentícios. Adicionalmente, dada a crescente procura por produtos de alta qualidade que satisfaçam as expectativas dos consumidores, tem-se verificado um maior consumo de produtos com características semelhantes aos alimentos *in natura* (Hogan *et al.*, 2005).

Os processos de conservação de alimentos mais utilizados pelas indústrias envolvem a utilização de calor, como a pasteurização, esterilização e branqueamento; a remoção de água por forma a reduzir a atividade da água (a_w), como a desidratação e a secagem; e utilização de frio, como a refrigeração e a congelação (Fryer *et al.*, 2008).

Os processos térmicos geralmente conduzem a alterações na qualidade dos alimentos, tais como, da componente vitamínica, modificação da textura e da cor, e ainda podem conduzir ao desenvolvimento de “*off-flavours*” (Norton *et al.* 2008). Assim, as novas exigências têm criado enormes desafios à indústria alimentar, que tem a urgente necessidade de criar/implementar novas tecnologias que satisfaçam os requisitos dos consumidores, nomeadamente na manutenção das características exigidas bem como no tempo de vida útil, funcionalidade, conveniência e segurança dos alimentos (Rawson *et al.*, 2011). Devido a esta mudança, a indústria alimentar tem apostado no desenvolvimento de tecnologias que substituam ou complementem as convencionais, tendo como objetivo dispensar ou minimizar a utilização de energia térmica no processamento e conservação alimentar, onde se destacam as altas pressões hidrostáticas (HHP) e tecnologias que utilizam energia térmica de forma mais eficiente, como as microondas (MW), demonstrando serem tecnologias de elevado potencial à escala industrial para diversas aplicações (Welti-Chanes *et al.*, 2005; Knorr *et al.*, 2011; Chandrasekaran *et al.*, 2013).

O papel dos consumidores sobre o processo de validação da tecnologia é de extrema importância e deve ser considerada, dado que os avanços tecnológicos têm que ser traduzidos em produtos atraentes para os consumidores. Além disso, a alteração de valores e hábitos de consumo estimula a inovação tecnológica alimentar, visando a produção de novos produtos (Deliza *et al.*, 2005b). A inter-relação entre tecnologia e comportamento do consumidor deve receber mais atenção na modulação de inovação alimentar, pois a percepção e as preferências dos consumidores são os pontos de partida para o sucesso de um processo tecnológico (Linnemann *et al.*, 1999).

2.3 ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS NO PROCESSAMENTO E CONSERVAÇÃO ALIMENTAR

O processo de alta pressão hidrostática, também designado pelas nomenclaturas internacionais como *high pressure processing* (HPP), *high hydrostatic pressure* (HHP) ou *ultra high pressure* (UHP) consiste em submeter o alimento sólido ou líquido, pré-embalado ou não, a pressões que podem variar de 100 a 1000 MPa (equivalente a 1000 a 10000 atmosferas). Nos sistemas industriais, as pressões utilizadas e economicamente viáveis encontram-se na faixa de 300 a 700 MPa (Farkas *et al.*, 2000; San-Martín *et al.*, 2002). A literatura aponta que esta técnica preserva o valor nutricional dos alimentos e, quando aplicada à temperatura ambiente, é relatado um efeito mínimo sob o conteúdo bioativo de vários frutos e vegetais, comparativamente às tecnologias convencionais (Rastogi *et al.*, 2007; Oey *et al.*, 2008). As altas pressões produzem diversos efeitos sobre a microbiota e componentes dos alimentos, tais como, inativação microbiana, modificação de biopolímeros onde se incluem a ativação/inativação enzimática, a desnaturação proteica e a formação de géis; retenção das características de qualidade, nomeadamente a cor, o sabor e o valor nutricional (Indrawati *et al.*, 2004).

O primeiro registo da utilização de HHP como um método de conservação alimentar data de 1899, quando Bert Hite (químico do *Agricultural Experiment Station*, West Virginia, EUA) observou que o período de vida útil comercial do leite e outros produtos poderia ser prolongado depois de pressurizados (San-Martín *et al.*, 2002). Este investigador demonstrou que os microrganismos poderiam ser inativados no leite se este fosse submetido a pressões de 650 MPa durante 10 minutos à temperatura ambiente (Hendrickx *et al.*, 1998). Mais tarde, Hite *et al.* (1914) relataram que as HHP poderiam ser utilizadas a fim de aumentar o tempo de vida útil de frutas e sumos de fruta, dado que as leveduras e outros microrganismos responsáveis pelo processo degradativo eram muito suscetíveis a pressões elevadas. Posteriormente, Cruess (1924) também propôs que a alta pressão poderia ser utilizada com sucesso para preservar sumos de fruta, em que o baixo pH seria um inibidor de microrganismos esporulados.

Esta tecnologia não cativou muito interesse por parte da indústria alimentar até 1980, quando Farkas, da Universidade de Delaware (EUA) demonstrou que as altas pressões podiam reduzir

substancialmente a carga microbiana patogénica e deteriorante, incluindo os microrganismos esporulados, além de inativar determinadas enzimas e, ao mesmo tempo, preservar as características naturais dos alimentos (Garriga *et al.*, 2002).

O grande interesse pelo processamento de HHP tem-se desenvolvido desde 1985, quando estudos e desenvolvimentos ao nível da engenharia mecânica permitiram a construção de equipamento de altas pressões a custos razoáveis e com uma durabilidade suficiente para resistir a milhares de ciclos. Assim o seu potencial foi reintroduzido na indústria alimentar, inicialmente no mercado japonês, onde uma grande variedade de produtos foi tratada por HHP (Balasubramaniam *et al.* 2008a). Em 2012 existiam cerca de 160 indústrias alimentares, espalhadas por quatro continentes, a utilizar as HHP para o processamento e conservação de diversos produtos (Barba *et al.*, 2012).

2.3.1 DESCRIÇÃO DO PROCESSO

No processamento de HHP os alimentos são submetidos a pressões superiores a 100 MPa, afetando as ligações não covalentes (pontes de hidrogénio, ligações iónicas e hidrofóbicas), uma vez que são muito sensíveis à pressão. Os compostos de baixa massa molecular, tais como os responsáveis pelas características sensoriais e nutricionais dos alimentos, não são afetados pela pressão (Welti-Chanes *et al.*, 2005).

O processo tem por base dois princípios fundamentais da física: o princípio de *Le Chatelier* e a teoria de Pascal (princípio da pressão isostática). O princípio de *Le Chatelier* descreve que qualquer fenómeno, transição de fase, mudança de conformação molecular ou reação química acompanhado por uma variação de pressão está associado a uma mudança de volume, positiva ou negativa. O aumento de pressão favorece os fenómenos que provocam a diminuição do volume, deslocando o equilíbrio na direção do sistema de menor volume (Rastogi *et al.*, 2007). A teoria de Pascal ou princípio isostático define que a pressão é transmitida de forma uniforme e quase instantânea, independentemente do tamanho, geometria e composição da amostra (Norton *et al.*, 2008).

A pressão, o tempo e a temperatura são as variáveis mais importantes a controlar no processo, por se correlacionarem, deve ter-se em conta o efeito termodinâmico do calor adiabático de compressão que ocorre durante a compressão e a descompressão dos alimentos tratados e o meio de transmissão de pressão. O aquecimento que ocorre durante a compressão e o arrefecimento durante a descompressão podem ser descritos em função das propriedades termofísicas do produto compressível (Knorr *et al.*, 2011). Este aquecimento/arrefecimento adiabático ocorre de forma instantânea, uma vez que as alterações de temperatura induzidas pela pressão são previsíveis e homogéneas em todo o produto. Este processo adiabático ideal não ocorre na prática, mas a extensão

do aumento de temperatura pode ser estimado entre 3-9 °C por 100 MPa, dependendo da matriz alimentar tratada (Ting *et al.*, 2002).

No que concerne aos modos de operação, este processo pode ser efetuado em *batch*, semicontínuo ou contínuo, sendo que em todos o equipamento básico é composto por uma câmara de pressão (recipiente ou vaso), um sistema de geração de pressão, um dispositivo para controlo da temperatura e um sistema operacional (Mertens *et al.*, 1993), tal como se encontra ilustrado na Figura 2.1.

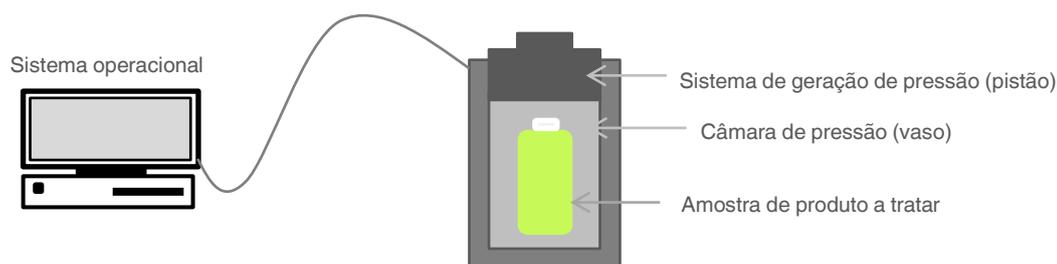


Figura 2.1. Componentes que compõem um sistema de altas pressões hidrostáticas.

Fonte: Adaptado de Mathys (2008).

A eficiência da tecnologia de HHP é função de vários fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos, tais como o tempo de tratamento, a taxa de compressão/descompressão, a temperatura, o número de ciclos, a composição e o estado fisiológico dos microrganismos a serem inativados. Assim, é essencial um profundo conhecimento do processo bem como das características da matriz alimentar para que o objetivo do tratamento seja atingido com a máxima rentabilidade (Hendrickx *et al.*, 2002).

As principais vantagens, comparativamente aos processos térmicos, centram-se (1) na possibilidade deste tratamento ser efetuado a temperaturas iguais ou inferiores à temperatura ambiente; (2) na minimização de operações prévias, dado que a transferência de pressão ocorre de forma uniforme, não havendo dependência da forma e do tamanho do alimento; (3) na capacidade de proporcionar segurança microbiológica sem a adição de aditivos químicos e (4) na possibilidade de desenvolvimento de produtos com propriedades funcionais (Rastogi *et al.*, 2007). Apesar desta tecnologia encontrar-se em expansão e desenvolvimento em diversas unidades fabris, os elevados custos que acarretam a aquisição do equipamento bem como o processo em si têm condicionado a disseminação desta tecnologia (Meyer *et al.*, 2000).

2.3.2 ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS EM PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

Recentemente, resultado da investigação e desenvolvimento deste processamento, constatou-se um aumento considerável no número de vendas de alimentos tratados por HHP. O Japão, em 1990, foi o primeiro país a comercializar os primeiros produtos (concentrados de fruta, geleias e gelatinas) processados por HHP (Indrawati *et al.*, 2004). Posteriormente, em 1996, a Europa e os EUA fazem as suas primeiras comercializações. Desde então, inúmeras unidades industriais apostam nesta nova abordagem e, em 2012, existiam 160 instalações industriais, com volumes de produção que variavam entre 55 a 420 litros/dia e uma produção total anual de mais de 250 000 toneladas (Barba *et al.*, 2012). Na Tabela 2.2 encontram-se alguns produtos alimentares processados por HHP, comercializados por diversas indústrias.

Tabela 2.2. Produtos alimentares processados por HHP comercializados em várias indústrias.

Fonte: Norton *et al.* (2008)

EMPRESA	PAÍS	ANO	PRODUTO TRATADO	CONDIÇÕES DE TRATAMENTO	TEMPO DE VIDA ÚTIL
Pampryl	França	1994	Sumo de laranja e limão	400 MPa	18 dias a 4 °C
Espuña	Espanha	1998	Presunto fatiado	400 MPa / 15 °C / 10-20 min	25 dias
Jumex	México	2001	Sumos de citrinos	500 MPa	32 dias
-	Líbano	2001	Sumos de fruta (54 variedades diferentes)	500 MPa	30 dias
Frubaça	Portugal	2001	Sumo de maçã	500 MPa / 120 s	28 dias a 4 °C
-	Itália	2001	Sumo de maçã, pêra, morango e cenoura	600 MPa / 1 min	1 a 2 meses
-	EUA	2002	Sumo de laranja e limonada	500 MPa	21 dias
Campo Frio	Espanha	2002	Presunto de frango fatiado	600 MPa / 20 °C / 3 min	35 dias
Vismara	Itália	2004	Presunto "Prosciutto", salame e mortadela	600 MPa / 20 °C	-
-	República Checa	2004	Sumo de brócolos com maçã	550 MPa / 22 °C	21 dias

A tecnologia de HHP pode ser utilizada numa ampla gama de produtos alimentares, sendo a sua maior aplicação em produtos vegetais, seguindo-se os produtos cárneos, sumos e bebidas, peixe e marisco e outros produtos (Heinz *et al.*, 2009b), tal como se encontra representado na Figura 2.2.

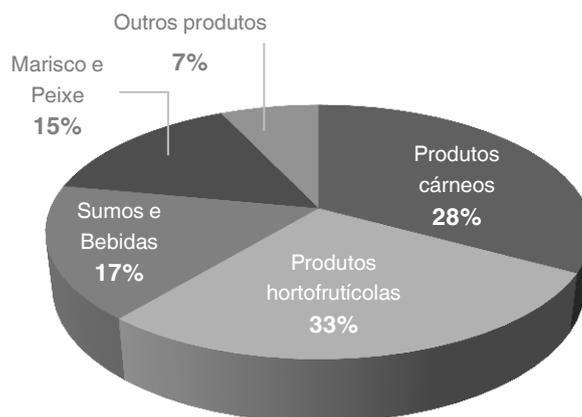


Figura 2.2. Utilização do método de conservação por HHP em diferentes segmentos da indústria alimentar.

Adaptado de Heinz *et al.* (2009b)

Os tratamentos efetuados aos alimentos utilizando HHP dependem do objetivo e do produto final que se pretende obter (Barba *et al.*, 2012). O processamento por HHP em combinação com o tratamento térmico suave (10 a 40 °C) é utilizado quando se pretende a pasteurização de sumos de fruta (Deliza *et al.*, 2005a; Barbosa-Cánovas *et al.*, 2008). Este tipo de tratamento necessita de baixas temperaturas de armazenamento e distribuição, a fim de preservar a qualidade sensorial e nutricional dos produtos (Mújica-Paz *et al.*, 2011). Esta tecnologia também apresenta potencial quando utilizada com o objetivo de esterilizar produtos alimentares, aplicando temperaturas elevadas (60 a 90 °C) (Black *et al.*, 2007). Além dos mencionados, as HHP têm sido alvo de diversos estudos para um vasto campo de aplicações, como exemplo, um pré-tratamento que promova a extração de diversos compostos bioativos (Corrales *et al.*, 2008).

2.3.3 EFEITO DAS ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS NOS PARÂMETROS GLOBAIS DE QUALIDADE DOS SUMOS DE FRUTA

A fruta, desde a colheita ao seu consumo, é exposta a vários fatores adversos que alteram as suas propriedades. O processamento é a etapa da cadeia alimentar que mais afeta as características físicas e bioquímicas e que determina a segurança e o período de vida útil do produto (Valdramidis *et al.*, 2009). A tecnologia de HHP em sumos de fruta, como processo alternativo de conservação, é normalmente realizado a pressões iguais ou superiores a 400 MPa, durante alguns minutos, a uma temperatura inferior ou igual a 20 °C (Patterson, 2005). As HHP têm como principais objetivos a inativação microbiana e enzimática, com o conseqüente aumento do período de vida útil do produto, mantendo simultaneamente as características sensoriais e nutricionais (Norton *et al.*, 2008).

A Tabela 2.3 descreve os resultados obtidos em vários estudos que incidiram sobre os efeitos de HHP nas características físicas e bioquímicas em diferentes sumos de fruta.

Tabela 2.3. Efeito do processamento por HHP nas propriedades físicas e bioquímicas de sumos de fruta.

PRODUTO	CONDIÇÕES DE TRATAMENTO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
Sumo de laranja	500 a 900 MPa / 60 °C / 1 s a 10 min	Manutenção da turbidez antes e após o tratamento.	Parish (1998)
	600 MPa / 5 °C / 1 min	Manutenção das propriedades sensoriais após tratamento.	Takahashi <i>et al.</i> (1998)
	500 a 800 MPa / temperatura ambiente / 5 min 21 dias de armazenamento a 4 °C	Manutenção do pH, °Brix, acidez total e viscosidade após o tratamento e ao longo do armazenamento.	Férrandez-García <i>et al.</i> (2001)
	600 MPa / 20 °C / 1 min 12 semanas de armazenamento a 4 e 10 °C	Manutenção do pH, °Brix, acidez total e viscosidade após o tratamento e ao longo do armazenamento. O índice de escurecimento aumentou significativamente ao longo do tempo.	Bull <i>et al.</i> (2004)
Sumo de laranja-limão-cenoura	500 a 800 MPa / temperatura ambiente / 5 min 21 dias de armazenamento a 4 °C	Manutenção do pH, °Brix, acidez total e viscosidade após o tratamento e ao longo do armazenamento.	Férrandez-García <i>et al.</i> (2001)
Sumo de melancia	300 a 900 MPa / 60 °C / 5 a 60 min	Manutenção da viscosidade. Diminuição do grau de escurecimento do sumo com o tratamento.	Zhang <i>et al.</i> (2011)
Sumo de uva	300 a 900 MPa / 20 °C / 2 a 10 min 3 semanas a 5 °C	Manutenção do índice de escurecimento ao longo do tempo de armazenamento.	Castellari <i>et al.</i> (2000)
Sumo de mirtilo	200 a 600 MPa / 20 a 42 °C / 5 a 15 min	Manutenção do pH e °Brix após tratamento.	Barba <i>et al.</i> (2012)
Sumo de tomate	500 a 900 MPa / 3 a 9 min	Aumento da pectina total com o aumento da pressão, não tendo apresentado uma relação linear com aumento do tempo de tratamento. A viscosidade foi fortemente afetada pela pressão aplicada, mas independente do tempo de tratamento.	Porreta <i>et al.</i> (1995)
	400 a 500 MPa / 2 a 40 °C / 10 min 60 dias de armazenamento a 4 °C	As características sensoriais do sumo tratado permaneceram mais estáveis vs sumo não tratado.	Daoudi <i>et al.</i> (2002)
Sumo de maçã	100 a 300 MPa / 4 e 20 °C armazenamento a 4 °C	Manutenção do pH, °Brix e acidez total após o tratamento. A viscosidade aumentou cerca de 5% no tratamento a pressão e temperatura mais elevadas.	Suárez-Jacobo <i>et al.</i> , (2011)

A cor dos sumos de fruta é um dos atributos mais importantes na preferência e no “ato da escolha” do consumidor. Tem sido utilizada em diversos estudos como um indicador da qualidade nutricional e organoléptica durante os tratamentos de processamento/conservação e subsequente armazenamento, pois está ligada com a percepção de algumas características que parecem ter grande

representatividade na qualidade dos sumos processados (Barba *et al.*, 2012). Existem vários fatores que causam o escurecimento da fruta nomeadamente (1) o escurecimento enzimático dos compostos fenólicos, (2) a oxidação do ácido ascórbico, (3) as caramelizações e (4) as reações de *Maillard* (Vaikousi *et al.*, 2008).

O processo de HHP pode influenciar a cor dos sumos de fruta, estando fortemente associado à temperatura de processamento e ao produto (Barba *et al.*, 2012). Segundo Oey *et al.* (2008) a utilização de HHP como método de conservação, a temperaturas baixas, tem um efeito limitado sobre os pigmentos (clorofilas, carotenoides, antocianinas, entre outros) responsáveis pela coloração dos sumos. No entanto durante o armazenamento, a cor vai apresentando alterações devido a uma incompleta inativação enzimática, que poderá resultar em reações indesejáveis na matriz alimentar (Daoudi *et al.*, 2002). Na Tabela 2.4 estão descritos alguns estudos em sumo de laranja, tomate e uva branca, cujo objetivo foi verificar a evolução da cor do sumo após tratamento térmico e por HHP a diferentes condições de pressão e temperatura, ao longo do tempo de armazenamento (Daoudi *et al.*, 2002; Polydera *et al.*, 2003; Bull *et al.*, 2004; Polydera *et al.*, 2005; Dede *et al.*, 2007).

Tabela 2.4. Efeito de diferentes condições de tratamento por HHP na cor de sumos de fruta.

PRODUTO	CONDIÇÕES DE TRATAMENTO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
Sumo de laranja	500 a 600 MPa / 35 a 40 °C / 4 a 5 min 2 meses de armazenamento a 0 e 15 °C	Alterações na cor com o tempo de armazenamento sem correlação com o tratamento a HHP, com a pasteurização (80 °C / 1 min) nem com a temperatura de armazenamento.	Polydera <i>et al.</i> , (2003)
	600 MPa / 35 °C / 5 min armazenamento de 0 a 30 °C	Taxas inferiores de alteração de cor do sumo tratado a HHP <i>vs</i> ao pasteurizado (80 °C / 1 min) em todas as temperaturas de armazenamento, exceto a 30 °C (valores superiores de escurecimento).	Polydera <i>et al.</i> , (2005)
	600 MPa / 20 °C / 1 min 12 semanas de armazenamento a 4 e 10 °C	Manutenção da cor após tratamento a HHP <i>vs</i> sumo não tratado. Alterações na cor com o tempo de armazenamento.	Bull <i>et al.</i> (2004)
Sumo de tomate	250 MPa / 35 °C / 15 min 30 dias de armazenamento a 4 e 25 °C	Menores alterações na cor do sumo tratado a HHP <i>vs</i> pasteurizado (80 °C / 1 min), ao longo do armazenamento.	Dede <i>et al.</i> (2007)
Sumo de uva branca	400 a 500 MPa / 2 a 20 °C / 10 min	Manutenção dos parâmetros da cor (valor de L*, a* e b*) imediatamente após o tratamento.	Daoudi <i>et al.</i> (2002)

O interesse pelo estudo da composição fenólica dos alimentos deve-se ao reconhecimento das suas propriedades antioxidantes, pela sua abundância numa vasta gama de alimentos e pelo seu papel preventivo em doenças associadas ao *stress* oxidativo (Middleton *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas e, quimicamente, pertencem à classe de compostos que possuem um ou mais grupos hidroxilo ligados a um anel aromático, encontrando-se geralmente associados a ésteres e glicosídeos (Vermerris *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos estão localizados nos vacúolos (97%), sendo que nas células da epiderme e sub-epiderme as suas concentrações são superiores às encontradas nos tecidos internos dos frutos. No caso da maçã, a relação de concentração de fenóis casca/polpa pode ser de 3 a 10 vezes superior, dependendo da cultivar (Nicolas *et al.*, 1994).

A composição fenólica em sumos de maçã tem merecido considerável interesse devido à sua influência nas características sensoriais como a cor, os sabores amargo e adstringente, na formação de certos aromas e na turbidez (Tomas-Barberan *et al.*, 2001). A composição em compostos fenólicos é dependente da cultivar de maçã, do grau de maturação, das condições culturais bem como do tipo de extração durante o processamento. Durante o processamento, a concentração de fenóis pode ser alterada devido à oxidação enzimática catalisada pela polifenoloxidase (PPO) (Nogueira *et al.*, 2003). A oxidação enzimática que ocorre por ação da PPO pode ser bloqueada pela utilização de compostos antioxidantes, como o ácido ascórbico, que podem atuar na inibição da enzima, interagir como intermediários da oxidação enzimática ou como agentes redutores, reconvertendo as quinonas aos compostos fenólicos originais. Desta forma, a maior perda de conteúdo fenólico durante o processamento ocorre pela oxidação durante e após a operação de trituração e por uma incompleta extração dos tecidos da fruta. Por forma a melhorar o rendimento de sumo extraído, ao triturado podem ser adicionadas enzimas, como pectinases e celulasas, que proporcionam um aumento de extração de compostos fenólicos, uma vez que os polifenóis como as catequinas, epicatequinas, procianidina B2 e quercetinas podem estar associados à parede celular (Will *et al.*, 2000).

O efeito dos tratamentos por HHP no conteúdo fenólico total de sumos de fruta varia com a intensidade do tratamento e com o tipo de fruta (Barba *et al.*, 2012).

Alguns autores evidenciam nos seus estudos diferentes resultados no conteúdo fenólico total dos sumos após tratamento por HHP (Esteve *et al.*, 2008; Barba *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2011; Suárez-Jacobo *et al.*, 2011) tal como mostra a Tabela 2.5. Em sumo de maçã, Suárez-Jacobo *et al.* (2011), após o tratamento aplicado (100 a 300 MPa / 4 e 20 °C) não observaram alterações significativas na TPC, comparativamente ao sumo fresco.

A capacidade antioxidante total (TAC) constitui um dos parâmetros importantes na avaliação da qualidade dos sumos. Os sumos de maçã apresentam uma elevada capacidade antioxidante devido à sua composição em compostos fenólicos como flavonóides, polifenóis, ácidos fenólicos. A vitamina C também se encontra presente, em níveis baixos, na ordem de $0,05 \text{ mg.g}^{-1}$ (Valdramidis *et al.*, 2009).

O tratamento por HHP influencia a estabilidade de vitaminas e o rendimento da extração de compostos bioativos, sendo espectável obterem-se alterações na capacidade antioxidante total após a sua aplicação (Oey *et al.*, 2008). Porém, alguns estudos demonstram que o efeito da pressão nem sempre influencia este parâmetro (Férrnandez-García *et al.*, 2000; Férrnandez-García *et al.*, 2001; Sánchez-Moreno *et al.*, 2005; Baron *et al.*, 2006).

Vários estudos têm sido realizados a fim de avaliar a capacidade antioxidante total em sumos de fruta, onde foram aplicadas uma ou várias metodologias, entre as quais *ferric reducing antioxidant power* (FRAP), *oxygen radical antioxidant capacity* (ORAC), *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DDPH), *trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC ou ABTS). É pertinente utilizar várias metodologias na avaliação da capacidade antioxidante em produtos de fruta, dada a variabilidade de composição dos mesmos (Barba *et al.*, 2012). Porém, segundo Rufino *et al.* (2007) a metodologia mais utilizada e apropriada para frutas e derivados é a da captura do radical livre DDPH. Vários estudos realizados por diversos autores, descritos na Tabela 2.5, demonstram a evolução da capacidade antioxidante total em sumos de laranja, laranja-limão-cenoura, tomate, uva e maçã, após os tratamentos de conservação e tempos de armazenamento (Férrnandez-García *et al.*, 2000; Férrnandez-García *et al.*, 2001; Polydera *et al.*, 2003; Indrawati *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2005; Baron *et al.*, 2006; Dede *et al.*, 2007; Del Pozo-Insfran *et al.*, 2007; Esteve *et al.*, 2008; Suárez-Jacobo *et al.*, 2011).

Diversos autores estudaram o efeito da aplicação de HHP, em diversas condições, na TAC de sumo de maçã. Fernández-García *et al.* (2000), após aplicar um tratamento de 600 MPa, a 60 °C, durante 30 minutos, observaram uma redução de 25% da TAC mantendo-se constante durante 1 mês de armazenamento. Outro estudo em que foi aplicado um tratamento no intervalo de pressão entre 200 a 600 MPa, a uma gama de temperatura entre 15 a 65 °C realizado por Baron *et al.* (2006), concluiu que não existiram alterações significativas nos valores da TAC após o tratamento. Suárez-Jacobo *et al.* (2011), aplicando um tratamento a pressões mais baixas (100, 200 e 300 MPa) em combinação com duas temperaturas (4 e 20 °C), mediram a TAC através de 4 metodologias: ORAC, DDPH, ABTS e FRAP. Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores obtidos nos métodos FRAP e DPPH, no entanto diferenças significativas foram detetadas comparativamente ao sumo fresco. No método ABTS foram observados valores menores de TAC quando o tratamento foi realizado a 20 °C. Os ensaios realizados pelo método ORAC apresentaram valores mais baixos de TAC em sumos tratados a 100 MPa. Em todos os ensaios realizados neste estudo, os valores de TAC do sumo fresco apresentaram valores mais elevados (5 – 19%) comparativamente aos sumos tratados a HHP.

Tabela 2.5. Efeito de diferentes condições de tratamento por HHP no conteúdo fenólico total e na capacidade antioxidante total de sumos de fruta.

PRODUTO	CONDIÇÕES DE TRATAMENTO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
Sumo de laranja	500 a 800 MPa / temperatura ambiente / 5 min 21 dias de armazenamento a 4 °C	Manutenção da TAC durante o armazenamento.	Férrandez-García <i>et al.</i> (2001)
	400 MPa / 40 °C / 1 min 20 dias de armazenamento a 4 °C	Manutenção da TAC (DPPH) após tratamento comparativamente ao sumo pasteurizado (70 °C / 30 s).	Sánchez-Moreno <i>et al.</i> , (2005)
	400 MPa / 42 °C / 5 min 7 semanas de armazenamento a 4 e 10 °C	Manutenção de TPC após o tratamento. Aumento de 5% do TPC durante o armazenamento a 4 °C. Diminuição menor (4,2%) da TAC (TEAC) após HHP <i>vs</i> sumo pasteurizado (90 °C / 20 s - 38,2%).	Esteve <i>et al.</i> , (2008)
	500 a 600 MPa / 35 a 40 °C / 4 a 5 min 2 meses de armazenamento a 0 e 15 °C.	Aumento da capacidade de retenção da TAC após HHP durante o armazenamento <i>vs</i> sumo pasteurizado (80 °C / 1 min).	Polydera <i>et al.</i> , (2003)
	100 a 800 MPa / 30 a 100 °C / 0 a 90 min	TAC (TEAC) diminuiu em função da temperatura e do tempo de tratamento.	Indrawati <i>et al.</i> , (2004)
Sumo de laranja-limão-cenoura	500 a 800 MPa / temperatura ambiente / 5 min 21 dias de armazenamento a 4 °C	Manutenção da TAC (DPPH) durante o tempo de armazenamento.	Férrandez-García <i>et al.</i> (2001)
Sumo de tomate	250 MPa / 35 °C / 15 min 30 dias de armazenamento a 4 e 25 °C	TAC (DPPH) diminuiu 10% quando a amostra foi armazenada a 4 °C.	Dede <i>et al.</i> (2007)
Sumo de mirtilo	200 a 600 MPa / 20 a 42 °C / 5 a 15 min	Aumento do TPC após o tratamento a 200 MPa durante 5 a 15 min e 400 MPa durante 15 min.	Barba <i>et al.</i> (2012)
Sumo de romã	400 MPa / 25 °C / 5 min 56 dias de armazenamento a 4 °C	Manutenção do TPC após tratamento.	Ferrari <i>et al.</i> (2011)
Sumo de uva	400 a 550 MPa / 15 min	TAC (ORAC) diminuiu com o aumento de P do tratamento, 21 e 45% respetivamente.	Del Pozo-Insfran <i>et al.</i> , (2007)
Sumo de maçã	600 MPa / 60 °C / 30 min 1 mês de armazenamento a 4 °C	Manutenção da TAC (ABTS) após tratamento e durante o armazenamento.	Férrandez-García <i>et al.</i> , (2000)
	200 a 600 MPa / 15 a 65 °C	Manutenção da TAC após o tratamento.	Baron <i>et al.</i> , (2006)
	100 a 300 MPa / 4 e 20 °C armazenamento a 4 °C	Manutenção de TPC após o tratamento. Manutenção da TAC (FRAP e DPPH) após tratamento. Verificaram-se perdas de TAC (ORAC e TEAC) <i>vs</i> sumo fresco. Todas as metodologias apresentaram valores superiores quando comparadas com o sumo pasteurizado (90 °C / 4 min).	Suárez-Jacobo <i>et al.</i> , (2011)

A componente enzimática dos sumos de fruta tem sido alvo de inúmeros estudos pois está diretamente relacionada com importantes parâmetros sensoriais, como a cor, o sabor e a turbidez, que constituem o primeiro impacto para a sua aceitação por parte do consumidor (Yaldagard *et al.*, 2008). A aplicação de HHP promove, em diversos casos, a inativação das enzimas, reduzindo a degradação nutricional e sensorial dos alimentos tratados (Mújica-Paz *et al.*, 2011). No entanto, a resposta de determinada enzima ao processo de HHP depende fortemente da pressão, temperatura e tempo de tratamento, da origem da enzima, da natureza do substrato, do pH, do teor de humidade e de outros parâmetros da matriz em causa (San-Martín *et al.*, 2002). As enzimas apresentam diferentes níveis de resistência à pressão porém, de um modo geral, pressões relativamente baixas ($\approx 100\text{-}200$ MPa) podem estimular a ativação de algumas enzimas e, por outro lado, pressões mais elevadas ($\approx 400\text{-}1000$ MPa) geralmente conduzem à sua inativação (Mújica-Paz *et al.*, 2011). No que concerne à inativação das enzimas, Miyagawa *et al.* (1964) distinguiram 4 grupos, com base na perda e recuperação da atividade da enzima, podendo esta estar (1) completa e irreversivelmente inativada, (2) completa e reversivelmente inativada, (3) incompleta e irreversivelmente inativada e (4) incompleta e reversivelmente inativada. Assim, o estudo e avaliação do tipo de inativação torna-se essencial para a previsão do comportamento dos sumos, característica fundamental para avaliar as transformações que o sumo poderá sofrer ao longo do tempo de armazenamento e definição do tempo de vida útil (Hendrickx *et al.*, 1998).

A maior problemática inerente ao processamento de sumo de maçã prende-se com a alteração da cor, desencadeada pela ação da polifenoloxidase (PPO) e com a separação de fases desencadeando a formação de depósito no fundo da embalagem, originado pela pectinametilsterase (PME) (Niu *et al.*, 2010). O escurecimento enzimático promovido pela PPO, de nome sistemático monofenol, di-hidroxifenilalina: oxigénio redutase (EC 1.14.18.1), consiste na oxidação do substrato fenólico a σ -quinonas, moléculas que se condensam combinando-se com os grupos amina ou sulfidrílo de proteínas, obtendo-se polímeros corados - melanoidinas (Valdramidis *et al.*, 2009).

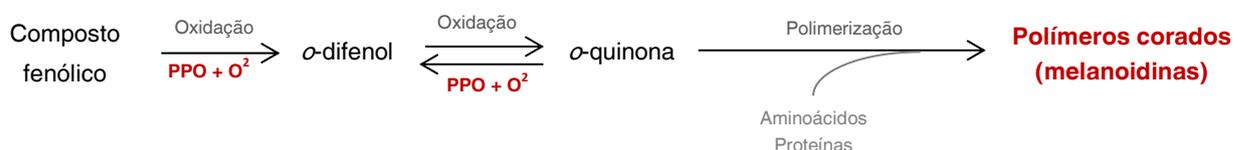


Figura 2.3. Esquema de reação de escurecimento enzimático promovido pela polifenoloxidase.

Fonte: Adams *et al.* (2010)

Por forma a evitar a formação destes pigmentos escuros (Figura 2.3) são usualmente adicionados agentes redutores, como o ácido ascórbico, que atuam na zona reversível da reação (formação de *o*-quinonas), dando lugar a *o*-difenois incolores (Hendrickx *et al.*, 1998).

A atividade da enzima PME, de nome sistemático pectina-pectil-hidrolase (EC 3.1.1.11.), é responsável por grande perda de qualidade nos sumos, causando a redução da viscosidade, separação de fases devido à precipitação de pectatos de cálcio e, conseqüente perda de turbidez desejável (Niu *et al.*, 2010). Tal como demonstra a Figura 2.4, esta promove a desesterificação dos grupos metóxilo das cadeias de pectina, a partir dos resíduos de ácido galacturónico metilado das moléculas de pectina, promovendo a libertação de metanol e produzindo polímeros de menor grau de esterificação (Wilinska *et al.*, 2008).

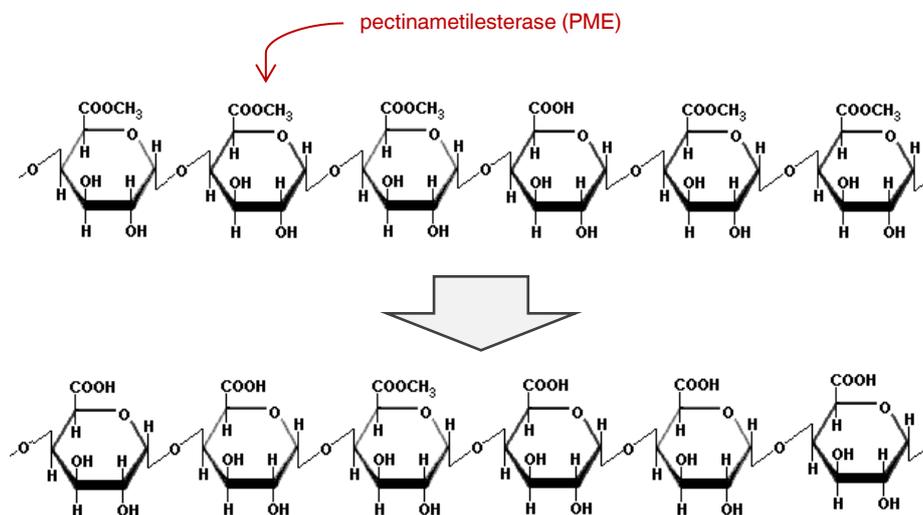


Figura 2.4. Esquema da reação promovida pela pectinametilesterase.

Fonte: Adams *et al.* (2010)

Vários sumos de fruta têm sido alvo de diversos estudos por forma a compreender o efeito de HHP na redução da atividade enzimática da PPO e da PME (Anese *et al.*, 1995; Riahi *et al.*, 2003; Valdramidis *et al.*, 2009), tal como se descreve na Tabela 2.6. Anese *et al.* (1995) avaliaram um tratamento de 900 MPa, a 25 °C, durante 1 minuto em sumo de maçã o qual resultou numa redução de atividade da PPO de 90%. Segundo Valdramidis *et al.* (2009), após a aplicação de um tratamento de 750 MPa, a uma gama de temperaturas entre 10 e 50 °C, durante um intervalo de 10 a 90 minutos, observaram uma redução mais efetiva da atividade da PPO (51,4%) após aplicação do binómio 50 °C/50 min. Em ambos os estudos observou-se uma diminuição na atividade da enzima com o aumento da temperatura. No que concerne à atividade da PME, o mesmos autores observaram uma redução de 81,4% após aplicação das condições mais extremas de tratamento (750 MPa / 50 °C / 90 minutos).

Numa publicação anterior, os mesmos autores afirmaram que, utilizando o método de conservação por HHP, foi atingida uma inativação de 95% da atividade de PME face ao sumo sem tratamento (Valdramidis *et al.*, 2007).

Tabela 2.6. Efeito de diferentes condições de tratamento por HHP na atividade enzimática da pectinametilesterase e polifenoloxidase de sumo de maçã.

CONDIÇÕES DE TRATAMENTO	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	REFERÊNCIA
900 MPa / 25 °C / 1 min	Redução de 90% da atividade da PPO.	Anese <i>et al.</i> (1995)
200 a 400 MPa / 0 a 180 min	Tratamentos acima de 400 MPa, durante 25 minutos resultaram numa inativação da enzima de 100%.	Riahi <i>et al.</i> (2003)
750 MPa / 10 a 50 °C / 10 a 90 min	<p>Maior redução da atividade da PPO (51,4%) no tratamento a 750 MPa / 50 °C / 50 min. Para todos os binómios estudados a redução da atividade estava diretamente relacionada com o aumento da temperatura.</p> <p>Redução mais efetiva da atividade da PME (81,44%) no tratamento a 750 MPa / 50 °C / 90 min. Para todos os binómios estudados a redução da atividade estava diretamente relacionada com o aumento da temperatura.</p>	Valdramidis <i>et al.</i> (2009)

2.4 AS MICROONDAS NO PROCESSAMENTO E CONSERVAÇÃO DE SUMO DE MAÇÃ

Atendendo à ineficácia das altas pressões hidrostáticas na inativação efetiva da componente enzimática, a tecnologia de microondas (MW) pode constituir um tratamento de interesse no processamento de sumos de fruta (Salazar-González *et al.*, 2012).

A tecnologia de microondas como processo de conservação de alimentos tem por base a redução da carga microbiana por intermédio de energia térmica (Chandrasekaran *et al.*, 2013). O aquecimento (aquecimento volumétrico) ocorre devido à interação da radiação eletromagnética aplicada, em determinadas frequências, com os materiais dielétricos que constituem a matriz alimentar. Em contraste com os sistemas de aquecimento por condução e convecção, esta tecnologia tem inúmeras aplicações na indústria alimentar uma vez que a radiação de MW tem a capacidade de penetrar diretamente no material, resultando numa maior eficiência energética, conduzindo a uma redução dos tempos de aquecimento. Como consequência, é espetável uma maior manutenção das propriedades sensoriais e nutricionais dos produtos tratados (Zhu *et al.*, 2007).

Do ponto de vista físico, o aquecimento por MW é um processo complexo pois depende da capacidade de propagação das MW na matriz alimentar. Essa propagação é regida pelas equações de *Maxwell* (Chandrasekaran *et al.*, 2013). A principal característica do aquecimento por MW é a capacidade de geração de calor no interior do alimento que não é alcançável por outro método convencional (Salazar-González *et al.*, 2012).

Esta tecnologia foi idealizada pela primeira vez pelo Dr. Percy Spencer, tendo patenteado a sua ideia em 1945. O primeiro processo de MW à escala industrial foi introduzido na década de 60, na secagem de batatas fritas (Tewari *et al.*, 2007). A partir de 1991 começaram a ser comercializados os primeiros microondas domésticos. Industrialmente esta tecnologia é utilizada principalmente em operações de desidratação de sólidos, pré-cozedura de produtos cárneos e descongelação. Como método de conservação alimentar o número de indústrias que utilizam é menos significativo, existindo a necessidade de estudos que permitam a melhoria neste campo de aplicação (Tewari *et al.*, 2007).

A aquisição do equipamento de MW, a nível industrial, é dispendioso porém os custos de utilização são inferiores quando comparados à tecnologia térmica convencional. Atualmente, os custos de aquisição estão a diminuir devido aos avanços recentes no que toca ao *design* e aos materiais utilizados no equipamento (Salazar-González *et al.*, 2012).

No processo térmico gerado por MW os produtos alimentares são submetidos a frequências de 915 ou 2,450 MHz (Fryer *et al.*, 2008). Existem dois mecanismos principais pelos quais as MW geram calor nos materiais dielétricos: polarização iónica e rotação dipolar. A polarização iónica ocorre quando os iões se movimentam em resposta a um campo elétrico. Durante essa deslocação, os iões colidem com outros iões, havendo a conversão da energia cinética em calor. Uma solução com elevada concentração de iões terá colisões iónicas mais frequentes e, conseqüentemente, apresentará um aumento de temperatura mais rápido quando comparado a soluções de concentrações iónicas inferiores (Suárez *et al.*, 2000). O mecanismo de rotação dipolar é o mais importante, porém está dependente da presença de moléculas polares (como a água). Em condições normais, as moléculas de água e outras polares estão orientadas aleatoriamente, contudo na presença de um campo elétrico, estas tendem a alinhar-se com esse mesmo campo. Enquanto existe esta movimentação é causado atrito intermolecular que é dissipado por toda a matriz, gerando instantaneamente calor (Salazar-González *et al.*, 2012). O calor gerado propaga-se em todas as direções e, em alimentos líquidos geram-se correntes de convecção que beneficiam a transferência de calor em todo o alimento (Tajchakavit *et al.*, 1997).

Os modos de operação das MW consistem na aplicação de microondas a uma dada potência de forma contínua ou em *batch* (descontínuo). No caso de sistema contínuo, este é utilizado quando se pretende atingir um determinado valor de temperatura sem interesse no tempo de tratamento. O forno emite radiação ao produto sempre com a mesma potência e, após atingido o valor de temperatura

pretendido, a emissão termina. Por outro lado, quando o objetivo é atingir uma dada temperatura, num determinado intervalo de tempo, utiliza-se o sistema *batch* em que, o equipamento faz a gestão da potência a que deve trabalhar por forma a cumprir o binómio tempo/temperatura que se pré-monitorizou (Suárez *et al.*, 2000). Em ambos os casos, o equipamento básico é constituído por um forno, fonte de alimentação, tubo de alimentação, secção de transmissão, placa oscilante, sistema de monitorização e sistema de controlo de temperatura (Tewari *et al.*, 2007).

A eficiência do tratamento por MW depende de fatores relacionados com o equipamento utilizado e com o produto a tratar. A frequência a que o tratamento é efetuado bem como a potência utilizada são os fatores que mais se relacionam com a *performance* do equipamento (Tajchakavit *et al.*, 1997). No que concerne aos fatores relacionados com o produto a tratar, Salazar-González *et al.* (2012) referiram (1) a temperatura inicial, pois a absorção de energia resulta num aumento de temperatura; logo, o tempo de aquecimento e temperatura final do produto irão depender da temperatura inicial do produto; (2) o volume e forma, dado que o aquecimento será mais rápido quanto menor for o volume e mais regular for a forma (esfera); (3) propriedades térmicas, sendo que quanto maior for a condutividade térmica maior será a dissipação de calor após receção das MW; (4) a densidade e consistência, pois a eficiência do tratamento é inversamente proporcional ao aumento destes parâmetros nos alimentos.

As vantagens apontadas para esta tecnologia prendem-se com: (1) a capacidade de aquecimento do produto em tempos inferiores quando comparados com o processamento convencional, levando a uma substancial retenção dos constituintes termolábeis presentes no alimento que representam importantes fatores de qualidade (Suárez *et al.*, 2000); (2) a eficiência energética, pois o calor é gerado no interior do alimento (Datta, 2003); (3) a possibilidade de manuseamento sem que haja perigo para o manuseador, dado que o equipamento não aquece, apenas o alimento (Datta, 2003); (4) ser uma tecnologia ecológica, pois não existe produção de gases nem geração de resíduos tóxicos (Salazar-González *et al.*, 2012).

A principal desvantagem reconhecida nesta tecnologia é a distribuição da temperatura não uniforme, resultando em pontos quentes e frios nos produtos tratados. Esta ineficiência está associada, principalmente, a alimentos sólidos (Vadivambal *et al.*, 2010). No entanto, esta tecnologia tem sido alvo de progressos no seu desenvolvimento e tal desvantagem já não é perceptível nos alimentos líquidos pois recentemente foram desenvolvidos sistemas que têm a capacidade de concentrar e energia emitida no interior de tubos cilíndricos, melhorando a sua *performance* (Salazar-González *et al.*, 2012).

Atualmente, e dadas as vantagens que apresenta, a inativação enzimática bem como a capacidade de retenção dos compostos bioativos e dos atributos sensoriais de maior importância têm suscitado algum interesse pela comunidade científica (Salazar-González *et al.*, 2012). Desta forma, alguns autores começam a direcionar os seus estudos neste sentido, porém ainda não existem

publicações referentes a sumos de maçã. O estudo realizado por Igual *et al.* (2010) demonstraram o efeito da pasteurização convencional comparada com MW no que respeita aos principais compostos bioativos e à atividade enzimática do sumo de uva. Foi aplicado um tratamento de pasteurização por meio de MW, em sistema contínuo, durante 30 segundos, a uma potência de 900 W. Os resultados demonstraram que o tratamento por MW causou uma maior preservação do ácido cítrico e ascórbico, da composição fenólica e na capacidade antioxidante total. A atividade enzimática residual da PME após os tratamentos de pasteurização convencional e por MW foi de 12,04% e 10,07%, respetivamente.

3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho compreendeu três estudos: (1) avaliação da estabilidade de sumo de maçã por altas pressões hidrostáticas nas condições aplicadas na Frubaça vs tratamento térmico (pasteurização); (2) otimização das condições de processamento de sumo de maçã por altas pressões hidrostáticas; (3) otimização das condições de inativação enzimática de sumo de maçã por microondas.

3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O sumo de maçã utilizado no presente estudo foi produzido pela Frubaça CRL - Cooperativa de Produtores de Fruta e de Produtos Hortícolas, sediada em Acipreste, Leiria. O sumo foi processado a partir das variedades *Granny Smith*, *Golden Delicious* e *Jonagold* e acondicionado em embalagens PET (politereftalato de etieno) com capacidade de 250 mL.



Figura 3.1. Gama de sumos de fruta produzidos pela Frubaça.

Fonte: www.frubaça.pt

O diagrama de produção do sumo contemplou as operações representadas na Figura 3.2, sendo o tratamento de estabilização efetuado por meio de altas pressões hidrostáticas ou tratamento térmico (pasteurização).

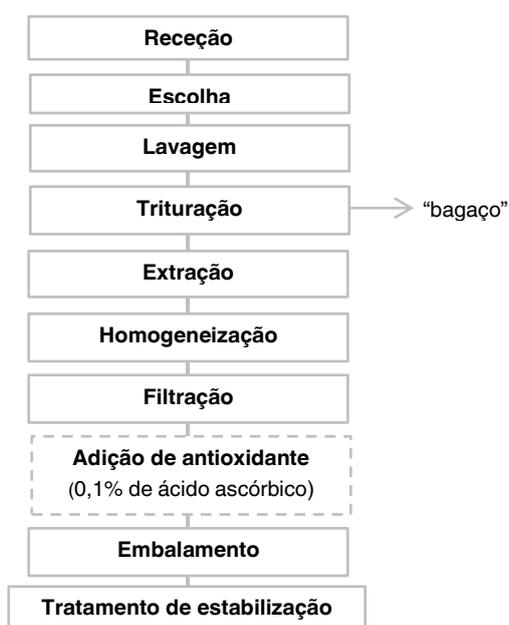


Figura 3.2. Diagrama de produção do sumo de maçã.

Os sumos foram armazenados em câmara de refrigeração (4 °C) e mantidos nestas condições até serem utilizados nos diferentes dias de controlo analítico.

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

A determinação do teor fenólico total (TPC) foi realizada segundo a metodologia descrita por Swain *et al.* (1959), tendo por base a reação colorimétrica promovida pelo reagente de *Folin-Ciocalteu*. O extrato fenólico foi obtido por extração com metanol (100%), 5 mL de sumo em 20 mL de metanol (100%), seguida de centrifugação (8000 rpm, 20 min, 14 °C – HERMLE LABORTECHNIK Z 383K), assumindo como extrato a analisar o sobrenadante obtido. Para cada amostra foram efetuadas 3 extrações.

O doseamento do conteúdo fenólico total, realizado em triplicado para cada extração, foi efetuado através da reação entre 50 µL de extrato fenólico, 2,40 mL de água nanopura, 100 µL de metanol (100%) e 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu (0,25 M) e, posteriormente, 300 µL de carbonato de sódio (1 M). A mistura preparada foi incubada, ao abrigo da luz, durante 2 horas. Por fim, procedeu-se à leitura espectrofotométrica a $\lambda = 720$ nm (UNICAM UV/VIS Spectrometer). Os valores de teor fenólico total foram obtidos através da interpolação dos resultados obtidos na curva de calibração realizada com soluções padrão de ácido gálico, em concentrações a variar de 0 a 400 mg.L⁻¹ (50, 100, 150, 200, 300 e 400 mg.L⁻¹). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes a ácido gálico por L de sumo (mg GAE.L⁻¹).

3.2.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

3.2.2.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH

A capacidade antioxidante baseada na captura do radical livre DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil*) foi efetuada por espectrofotometria segundo Brand-Williams *et al.* (1995). A preparação do extrato antioxidante foi idêntica à descrita no ponto 3.2.1. Foram realizadas 3 extrações para cada amostra.

A preparação da solução reacional diária de DPPH foi realizada a partir da mistura 1/4 (v/v) de metanol e solução mãe de DPPH (1/4 (m/v) de metanol/DPPH) e posterior acerto com metanol a uma absorvância inferior a 1,1 a comprimento de onda (λ) = 517 nm (UNICAM UV/VIS Spectrometer).

O doseamento, realizado em triplicado para cada extração, foi executado após a mistura de 2850 μL de solução diária de DPPH e 150 μL de extrato, tendo esta permanecido no escuro, à temperatura ambiente, durante 40 minutos. As leituras foram monitorizadas no espectrofotômetro (UNICAM UV/VIS Spectrometer) a $\lambda = 517 \text{ nm}$ (software Vision v3.20), sendo a taxa de inibição do radical expressa em μmol de equivalentes de Trolox por mL de sumo ($\mu\text{molTEAC}\cdot\text{mL}^{-1}$), por interpolação, a partir da curva de calibração realizada com padrão Trolox, com concentrações finais variáveis de 0 a 800 μM (50, 75, 150, 250, 400, 600 e 800 μM).

3.2.2.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO FERRO - FRAP

A determinação da capacidade antioxidante mediante a redução do ferro (FRAP) foi efetuada segundo Rufino *et al.* (2006). O extrato antioxidante foi preparado conforme descrito em 3.2.1. Para cada amostra foram efetuadas 3 extrações.

Em triplicado para cada extração, o doseamento foi realizado com a mistura de 2,7 mL da solução reacional FRAP, 270 μL de água nanopura e 90 μL de extrato sendo colocada em banho termostático (37 °C) durante 30 minutos. A leitura da atividade antioxidante foi efetuada no espectrofotômetro (UNICAM UV/VIS Spectrometer) a $\lambda = 595 \text{ nm}$ (software Vision v3.20). Os resultados obtidos foram convertidos em $\mu\text{molTEAC}\cdot\text{L}^{-1}$ por interpolação da curva de calibração realizada com padrão Trolox, com concentrações a variar de 0 a 700 μM (50, 75, 150, 250, 400, 500, 600 e 700 μM).

3.2.2.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA CAPTURA DO RADICAL LIVRE ABTS

A capacidade antioxidante tendo como princípio a reatividade do radical livre ABTS^{•+} (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) foi realizada por espectrofotometria segundo o método descrito por Re *et al.* (1999). A preparação do extrato antioxidante foi análoga à descrita em 3.2.1. Foram efetuadas 3 extrações para cada amostra.

A preparação da solução reacional ABTS^{•+} foi efetuada a partir da solução de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (5 mM) e, posteriormente, procedeu-se ao seu acerto com etanol (HPLC), a uma absorvância $0,7 \pm 0,02$, a $\lambda = 734 \text{ nm}$ (UNICAM UV/VIS Spectrometer).

O doseamento, efetuado em triplicado para cada extração, consistiu na mistura de 3 mL da solução reacional ABTS^{•+} e 30 μL do extrato antioxidante (1/100, extrato/ABTS^{•+}), sendo, seguidamente, colocada em banho termostático (30 °C) durante 7 minutos. A leitura da inibição do radical ABTS^{•+} promovida pelo extrato foi monitorizada no espectrofotômetro (UNICAM UV/VIS Spectrometer) a $\lambda = 734 \text{ nm}$ (software Vision v3.20), sendo a taxa de inibição do radical convertida em $\mu\text{molTEAC}\cdot\text{L}^{-1}$ por interpolação dos resultados obtidos na curva de calibração realizada com padrão Trolox, com concentrações a variar de 0 a 2000 μM (150, 250, 400, 500, 1000 e 2000 μM).

3.2.3 DETERMINAÇÃO DA COR (CIELAB)

Os parâmetros da cor, segundo o sistema CIElab, foram determinados por espectrofotometria. O extrato a analisar correspondeu ao sobrenadante obtido da amostra de sumo centrifugada (3800 rpm, 10 min, temperatura ambiente – MLW T54). Para a obtenção dos valores dos parâmetros da cor ($L^*a^*b^*$, c^* e h°) procedeu-se à leitura espectrofotométrica (UNICAM UV/VIS Spectrometer) do sobrenadante, com um varrimento do λ entre 380 e 770 nm (software CHROMA).

Posteriormente procedeu-se ao cálculo do índice de escurecimento (WI) segundo Bolin & Huxsoll (1991), tal como se apresenta na Eq. 1.

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

3.2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE

A extração da enzima polifenoloxidase (PPO) foi realizada segundo a metodologia descrita por Rocha & Morais (2001). Após otimização das condições de atividade máxima procedeu-se à mistura de 1 mL de sumo e 20 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 6,5) e 1% de PVPP (polivinilpolipirrolidona). A homogeneização da mistura (IKA LABORTECHNIK STAUFEN) foi realizada em 2 ciclos (8000 rpm, 30 s), com a adição de 10 μ L de Trinton-X100 no intervalo dos mesmos. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada (10000 rpm, 20 min, 4 °C - HERMLE LABORTECHNIK Z 383K) e o sobrenadante filtrado, tendo sido esse o extrato enzimático analisado.

O doseamento realizou-se com duas diluições diferentes, em triplicado, de modo a garantir a estequiometria da reação. Assim, foram preparados os volumes de 75 e 100 μ L de extrato para 2,925 e 2,90 mL de substrato (catecol 90 mM em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5), respetivamente. A atividade enzimática foi obtida por espectrofotometria, a $\lambda = 420$ nm (UNICAM UV/VIS Spectrometer) pelo aumento da absorvância durante 1 minuto (software Vision v3.20). A atividade da enzima foi calculada a partir da porção linear da curva Abs_{420} nm/min devido à oxidação do substrato. Os resultados foram expressos em percentagem de inativação da PPO (% Inat._{PPO}) relativamente ao valor obtido no sumo fresco (SF) ou em valores absolutos de $Abs \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

3.2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PECTINAMETILESTERASE

A determinação da atividade da enzima pectinametilsterase (PME) foi realizada por titulação, pela adaptação do método descrito por Kimball (1991). Utilizou-se um elétrodo de medição de pH

(BASIC-20 CRISON pH-meter) para quantificação dos íões H⁺ produzidos pelos grupos carboxílicos libertados pela hidrólise de ésteres metílicos da pectina.

Inicialmente procedeu-se à mistura de 5 mL de sumo e 50 mL da solução de pectina cítrica (SIGMA-ALDRICH) (1% (m/v) em NaCl 0,15 M) e, em seguida, o pH da solução foi ajustado a 7,0 com soluções de NaOH (1 e 0,1 M). Após atingido o pH de 7,0 foi adicionado 0,05 mL de NaOH (0,02 M) e registado o tempo necessário para a solução retomar o valor de pH 7,0 (30 °C). Os ensaios foram efetuados em triplicado para cada amostra. A atividade da PME foi calculada de acordo com a Eq. 2 (Basak, 2001), em que se define a atividade da PME como a quantidade de enzima que causa a libertação de 1 μmoleq de COO⁻ por mL de sumo por minuto (μmol.mL⁻¹.min⁻¹).

$$\text{Atividade da PME} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot 10^3}{V_{\text{substrato}} \cdot t} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que V NaOH = volume de NaOH gasto (mL); N NaOH = normalidade da solução de NaOH; V substrato = volume de substrato analisado (mL); t = tempo da reação (minutos).

Os resultados foram expressos em percentagem de inativação da PME (% Inat._{PME}) relativamente ao valor obtido no sumo fresco (SF) ou em valores absolutos de μmol COO⁻.mL⁻¹.min⁻¹.

3.2.6 ANÁLISE DOS COMPOSTOS DO AROMA

A análise dos compostos do aroma foi efetuada por cromatografia gasosa (GC) auxiliada por microextração em fase sólida (SPME), adaptada dos métodos descritos por Riu-Aumatell *et al.* (2004) e Guo *et al.* (2012). Após otimização das condições de análise efetivou-se uma preparação da amostra que promovesse a libertação dos compostos voláteis da matriz para o espaço de cabeça do recipiente (*vial*) utilizado. A preparação consistiu na introdução de 15 mL de sumo no *vial* e inclusão em estufa (MEMMERT) a 50 °C durante 20 minutos. Em seguida, a amostra foi colocada na placa de agitação com controlo termostaticado (3500 rpm, 50 °C - AREX-VELP SCIENTIFICA) durante 15 minutos. Ao fim deste período, foi introduzida a seringa SPME e colocado o revestimento em contacto com o espaço de cabeça do *vial* e, ao fim de 20 minutos, procedendo-se à separação e identificação dos compostos adsorvidos pelo revestimento da fibra de SPME, por cromatografia em fase gasosa, tal como se encontra representado na Figura 3.3.

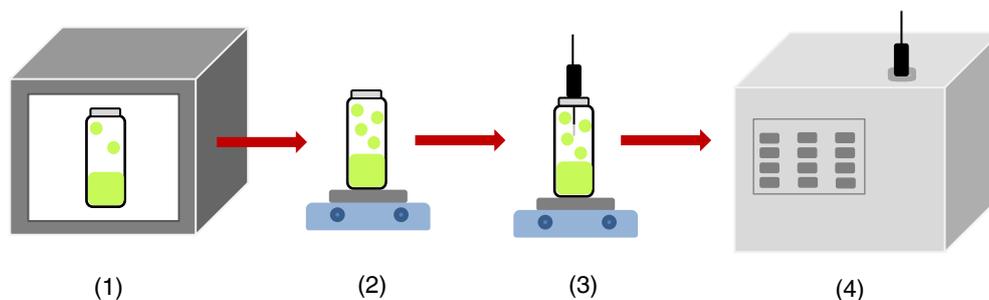


Figura 3.3 – Processo de extração dos compostos do aroma do sumo por SPME: (1) incubação da amostra na estufa (50 °C/20 min); (2) agitação da amostra (50 °C/20 min); (3) contacto do revestimento da seringa SPME com o espaço de cabeça do frasco (condições análogas); (4) inserção da seringa SPME no GC.

O revestimento da fibra de SPME foi introduzido durante 5 minutos no sistema de injeção do cromatógrafo de fase gasosa (VARIAN 450-GC). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-1 AGILANT (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme). O método utilizado foi em modo *splitless* e o forno programado para uma temperatura inicial de 40 °C durante 2,5 minutos, seguido de um aquecimento até à temperatura de 200 °C a uma velocidade de 5 °C/min, onde se manteve durante 5 minutos, em seguida voltou a subir a temperatura até 240 °C, a uma taxa de 10 °C/min, onde se manteve a essa temperatura durante 6,5 minutos. O injetor e o detetor encontravam-se à temperatura de 250 °C. O hélio foi o gás de arraste utilizado, a um fluxo de 29 mL/min.

3.2.7 DETERMINAÇÃO DO 5-HIDROXIMETILFURUFRAL

A determinação do 5-hidroximetilfurfural foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), conforme o descrito por Gokmen *et al.* (1999). Após otimização, a amostra foi introduzida no cromatógrafo (BECKMAN COULTER) equipado com bomba 125 NM e software KARAT 32 versão 8.0 para aquisição e tratamento de dados. A coluna utilizada foi SugarPak I (Waters). O forno foi programado para uma temperatura de 90 °C e o solvente utilizado uma solução aquosa de EDTA de cálcio a 50 ppm, fluxo de 0,5 mL/min, injetor de *loop* de 20 µL.

3.2.8 REGISTO FOTOGRÁFICO

Após o tratamento de estabilização, pequenas quantidades das amostras de sumo foram colocadas em tubos de ensaio, cobertos com parafilme, e armazenadas em câmara de refrigeração (4 °C). Nos momentos de controlo analítico estas amostras foram fotografadas sempre nas mesmas condições de luz e fundo, a fim de verificar as alterações de cor e evolução da formação de depósito.

3.3 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O tratamento estatístico dos resultados bem como o delineamento experimental dos estudos de otimização foi realizado com recurso ao Software informático Statistica™ v8.0 (StatSoft, Inc., 2007).

3.3.1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)

A separação de médias foi efetuada segundo o teste *Scheffé*, para um nível de significância de 95%.

3.3.2 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (RSM)

A metodologia de superfícies de resposta (RSM) envolve um delineamento experimental que compreende quatro etapas: a seleção das variáveis independentes e definição dos respetivos níveis; a formulação do delineamento; a construção do modelo - descodificação da matriz inicial (codificada) das variáveis independentes em causa, calculando as distâncias entre os pontos centrais e os pontos estrela (n_e); e identificação das soluções ótimas na situação em que o modelo apresenta validade estatística (Arteaga *et al.*, 1994). Nos ensaios de otimização recorreu-se ao delineamento central composto rotacional (DCCR), tendo-se utilizado o modelo empírico de regressão polinomial quadrático por forma a estimar as variáveis independentes – Y (Montgomery, 1991).

O delineamento experimental incluiu, em estudos diferentes, duas ou três variáveis independentes ($n = 2$ e 3). O delineamento que contemplou duas variáveis independentes ($n = 2$) contém $2n$ pontos centrais ($n_0 =$ pontos centrais), $2n$ pontos para um modelo fatorial completo ($n_q =$ pontos quadráticos), níveis $+1,000$ e $-1,000$ e $2n$ pontos axiais ($n_e =$ pontos estrela), codificados com $+\alpha$ e $-\alpha$. O valor de α depende do número de pontos do modelo fatorial (F) e do número de variáveis (n), sendo obtido através da equação $\alpha = \sqrt{n_q}$, obtendo $+\alpha = 1,41421$ e $-\alpha = -1,41421$. Para cada variável resposta (Y) em estudo os resultados foram avaliados utilizando o modelo empírico de regressão polinomial quadrático (Eq. 3):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_{11}X_1^2 + b_2X_2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que Y corresponde à variável dependente; X_1 e X_2 às variáveis independentes 1 e 2; b_n – aos coeficientes de regressão.

O delineamento experimental realizado para três variáveis independentes ($n = 3$) incluiu $2n + 2$ pontos centrais, $2n$ pontos para um modelo fatorial e $3n$ pontos axiais. O valor dos pontos axiais ($+\alpha$ e $-\alpha$), dependente dos fatores anteriormente descritos, foi calculado pela equação $\alpha = \sqrt[4]{n_c}$, onde $n_c =$ número de pontos cúbicos, tendo-se obtido $+\alpha = 1,6818$ e $-\alpha = -1,6818$. Para cada resposta em estudo

(variável dependente Y) os respetivos resultados experimentais foram ajustados segundo o modelo empírico de regressão polinomial quadrático (Eq. 4).

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que Y corresponde à variável dependente; X_1 , X_2 e X_3 às variáveis independentes 1, 2 e 3; b_n – aos coeficientes de regressão.

Para ambos os delineamentos, o ponto central fornece uma média para estimar o erro experimental e a falta de ajuste, assim como os pontos axiais são adicionados por forma a estimar a curvatura dos modelos.

Na avaliação da significância e validade dos modelos foram tidos em conta os coeficientes de regressão múltipla (r^2 e $r^2_{\text{ajust.}}$), a falta de ajuste do modelo (*lack of fit*) e o erro puro. Foi ponderado um nível de ajuste adequado para os modelos quando a respetiva falta de ajuste foi não significativa ($p > 0,05$), o erro puro era significativo ($p < 0,05$), tanto quanto possível a proximidade ao valor da unidade para r^2 e uma diferença menor que 0,1 entre r^2 e $r^2_{\text{ajust.}}$. Quando não se cumpriu os critérios mencionados procedeu-se à remoção de efeitos entre as variáveis independentes em causa (linear e/ou quadrático e/ou combinado).

4. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SUMO DE MAÇÃ POR ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS NAS CONDIÇÕES APLICADAS NA INDÚSTRIA VS TRATAMENTO TÉRMICO

A avaliação das condições do tratamento de estabilização aplicado ao sumo de maçã na Frubça CRL, teve como base uma análise comparativa da sua eficácia face aos métodos convencionais de estabilização térmica (pasteurização), usualmente utilizados pelas indústrias como método de conservação.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Por forma a validar o impacto do tratamento industrial estudado, formulou-se a seguinte hipótese:

Hipótese 1 (H₁): Sumo de maçã aditivado com 0,1% de ácido ascórbico e conservado por altas pressões hidrostáticas (500 MPa, 120 segundos, 18 °C) apresenta um período de vida útil de 35 dias (4° C) e uma atividade antioxidante superior a sumo tratado termicamente.

De modo a verificar H₁, considerou-se a formulação de sumos com tratamentos de estabilização utilizados na indústria, com/sem a adição de ácido ascórbico. Assim, o delineamento experimental contemplou sumo fresco como referência, sumo tratado a altas pressões hidrostáticas com adição de ácido ascórbico (processo implementado na indústria), sumo tratado a altas pressões sem adição do antioxidante e sumo estabilizado termicamente. A caracterização das amostras para o presente estudo encontra-se descrita na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Caracterização das amostras estudadas para validação de H₁.

AMOSTRAS		TRATAMENTO DE CONSERVAÇÃO	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO (°C)
Sumo Fresco SF		Sem tratamento de conservação e sem adição de conservantes	-18
Sumo tratado por HHP	adição de 0,1% de ácido ascórbico SHHP + AA	Tratamento a 500 MPa durante 120 segundos a 18 °C, com adição de 0,1% de ácido ascórbico	4
	sem adição de ácido ascórbico SHHP	Tratamento a 500 MPa durante 120 segundos a 18° C	4
Sumo Pasteurizado SP		Tratamento térmico a 95 °C durante 32 minutos	4

As amostras tratadas foram mantidas numa câmara de refrigeração (4 °C) e analisadas ao longo de 35 dias, tempo de vida útil definido pela indústria. O sumo fresco, que não sofreu nenhum tratamento de estabilização, foi mantido a -18 °C e posteriormente analisado. As determinações efetuadas para a verificação de H₁ foram: capacidade antioxidante total (DPPH, FRAP e ABTS), conteúdo fenólico total, cor (sistema CIElab), índice de escurecimento e atividade das enzimas PPO e PME. Procedeu-se ao controlo analítico nos dias 0, 2, 7, 15, 26 e 35 às amostras tratadas por altas pressões hidrostáticas, nos dias 0 e 35 para as amostras pasteurizadas e apenas após o tratamento de estabilização da amostra de sumo fresco , tal como se encontra descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Quantificação das amostras e respetivos tempos de análise.

AMOSTRA	TEMPO DE ANÁLISE (DIAS DE ARMAZENAMENTO)	QUANTIDADE DE AMOSTRAS
SF	0	6
SHHP + AA	0, 2, 7, 15, 26 e 35	36
SHHP	0, 2, 7, 15, 26 e 35	36
SP	0 e 35	12
TOTAL		90

As amostras foram introduzidas na câmara de pressão, após monitorização do tratamento que se pretendia, tal como se encontra ilustrado na Figura 4.1.

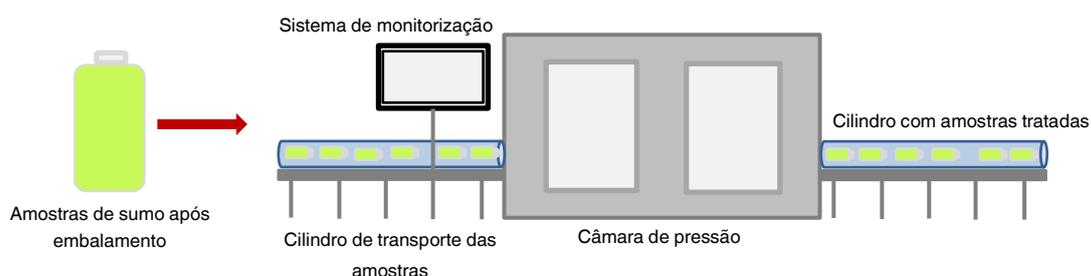


Figura 4.1. Esquema do equipamento de tratamento a altas pressões hidrostáticas.

Os resultados foram submetidos a uma análise de variância - ANOVA (teste *Scheffé*, intervalo de confiança a 95%).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas se apresentam os resultados que demonstraram significado estatístico ($p > 0,05$).

4.2.1 ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE

A atividade da polifenoloxidase (PPO) foi determinada imediatamente após o processamento dos diferentes sumos tal como se apresenta na Figura 4.2. O resultado é reportado em valor absoluto de $\text{Abs. min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$.

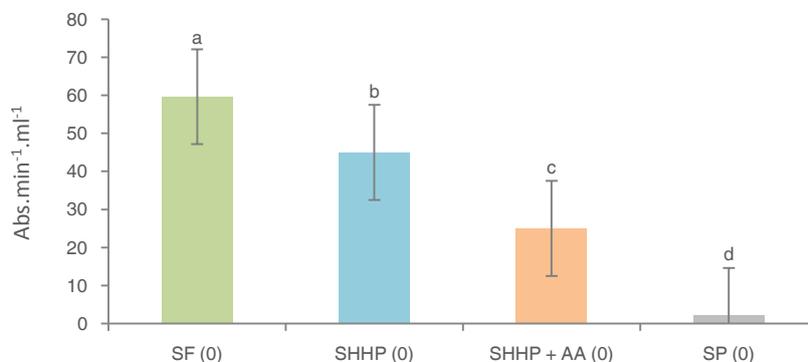


Figura 4.2. Efeito dos processos de conservação aplicados vs sumo fresco na atividade da polifenoloxidase, no tempo zero.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogéneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

O sumo fresco (SF) apresenta uma atividade da PPO muito superior quando comparado com as restantes amostras, como seria esperado. Face ao sumo fresco, a atividade da PPO nas amostras tratadas foi cerca de 65% para o sumo tratado a altas pressões sem adição do antioxidante (SHHP), 33% para o sumo tratado a altas pressões com adição de ácido ascórbico (SHHP+AA) e 3,5% para o sumo tratado termicamente (SP), existindo diferenças estatisticamente diferentes entre os sumos ($p < 0,05$).

4.2.2 ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE

A atividade da pectinametilesterase (PME) foi determinada imediatamente após a formulação dos diferentes sumos, como se apresenta na Figura 4.3.

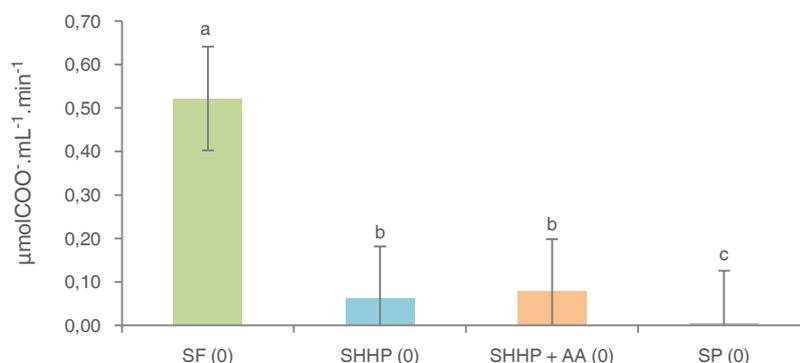


Figura 4.3. Efeito dos processos de conservação aplicados vs sumo fresco na atividade da pectinametilesterase, no tempo zero.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogêneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

O sumo fresco (SF) apresenta uma atividade da PME de cerca de $0,51 \mu\text{mol COO}^- \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, valor muito superior quando comparado com as restantes amostras. Face ao sumo fresco, a atividade da PME nas amostras tratadas foi cerca de 11,9% para o sumo tratado a altas pressões sem adição do antioxidante (SHHP), 15,1% para o sumo tratado a altas pressões com adição de ácido ascórbico (SHHP+AA), não apresentando diferenças estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$), e 1,2% para o sumo tratado termicamente (SP).

A avaliação da atividade da componente enzimática nos sumos de maçã é um indicador fundamental de previsão da estabilidade e da durabilidade, pois a esta estão associados importantes parâmetros sensoriais, como a cor, sabor e turbidez que, segundo Yaldagard *et al.* (2008) constituem o primeiro impacto de aceitação por parte do consumidor.

4.2.3 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

Na Figura 4.4 apresentam-se os resultados do conteúdo fenólico das amostras avaliadas.

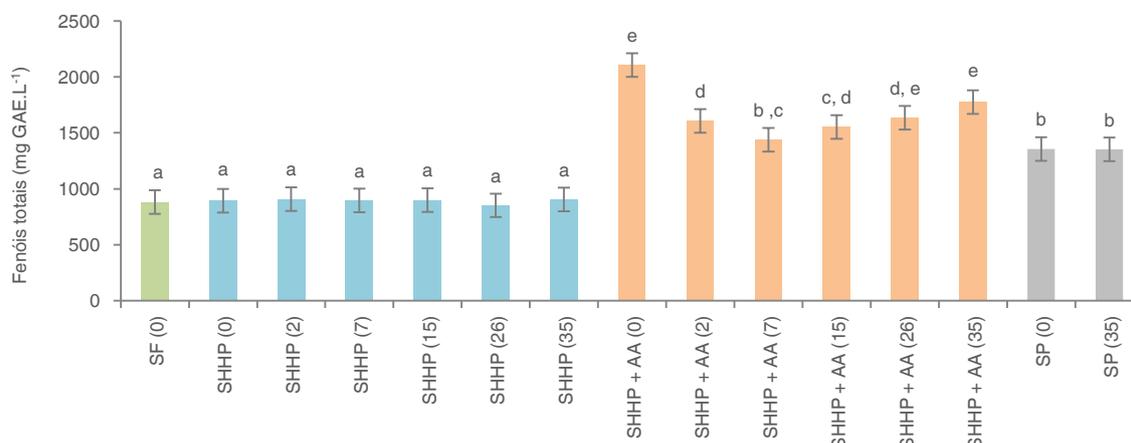


Figura 4.4. Efeito dos processos de conservação aplicados vs sumo fresco no conteúdo fenólico total ao longo do tempo de armazenamento.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogêneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Através da Figura 4.4 pode observar-se que o teor fenólico total das amostras de sumo fresco (SF) e sumo tratado a altas pressões (SHHP) não apresentaram resultados significativamente diferente ($p > 0,05$), apresentando os níveis mais baixos comparativamente às restantes amostras. No caso de SF o resultado obtido poderá ser consequência da atividade da PPO, uma vez que não se efetuou um tratamento que promovesse a sua inibição e, por isso, nenhuma restrição para a sua atuação no tempo que antecedeu o controlo analítico. A amostra SHHP, tratada a altas pressões sem adição de ácido ascórbico, não demonstrou variações significativas do conteúdo fenólico ao longo do tempo de armazenamento (35 dias). Esta tendência dever-se-á à gama de pressões aplicadas não ter sido suficiente para a inibição da PPO e, aquando da medição dos fenóis totais, a enzima já teria atuado sobre o substrato existente transformando os compostos fenólicos em compostos corados. Estes resultados são concordantes com o descrito por Suárez-Jacobo *et al.* (2011) que, apesar de em condições de tratamento diferentes (100 a 300 MPa), também observaram a mesma tendência em sumo de maçã. Ferrari *et al.* (2011), após aplicação de 400 MPa em sumo de romã, e Esteve *et al.* (2008) após tratamento a 400 MPa em sumo de laranja, também obtiveram a mesma tendência após o tratamento.

A amostra de sumo pasteurizado (SP) demonstrou elevada estabilidade mantendo o teor de fenóis semelhante após o tratamento e após 35 dias de armazenamento, não sendo os resultados

estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Esta tendência reflete a efetividade do tratamento térmico na inibição da PPO, mantendo o conteúdo fenólico estável ao longo tempo de armazenamento em análise.

A amostra tratada a altas pressões com a adição de ácido ascórbico (SHHP+AA) apresentou o teor de fenóis mais elevado ao longo de t_A , no entanto denota variabilidade entre os valores obtidos e diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). O teor de fenóis mais elevado observa-se no dia 0 (2105,2 mgGAE.L⁻¹). Esta amostra, relativamente a SHHP, foi sujeita ao mesmo tratamento de estabilização com a distinção da adição de 0,1% de ácido ascórbico. Esta variável poderá ter sido o principal e mais importante parâmetro diferenciador entre as duas amostras pois, tal como Will *et al.* (2000) concluíram, o ácido ascórbico apresenta uma ação inibitória na atividade da PPO, interagindo como intermediário da oxidação enzimática ou como agente redutor, reconvertendo as quinonas aos compostos fenólicos originais. Desta forma, poder-se-á perspetivar que o tratamento de altas pressões aplicado (500 MPa, 18 °C, 120 segundo), por si só, não terá o impacto desejado na manutenção do conteúdo fenólico total, existindo a necessidade de introdução de agentes externos que promovam a inibição dos parâmetros que degradam esta componente de elevada importância nos sumos de maçã, tal como referido por Tomas-Barberan *et al.* (2001).

4.2.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi medida segundo 3 metodologias distintas, dado que cada uma atua sobre radicais livres distintos, conferindo uma maior credibilidade aos resultados obtidos.

• SEGUNDO METODOLOGIA DE CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH

A Figura 4.5 apresenta os resultados da capacidade antioxidante total das amostras avaliadas, segundo a metodologia de captura do radical livre DPPH.

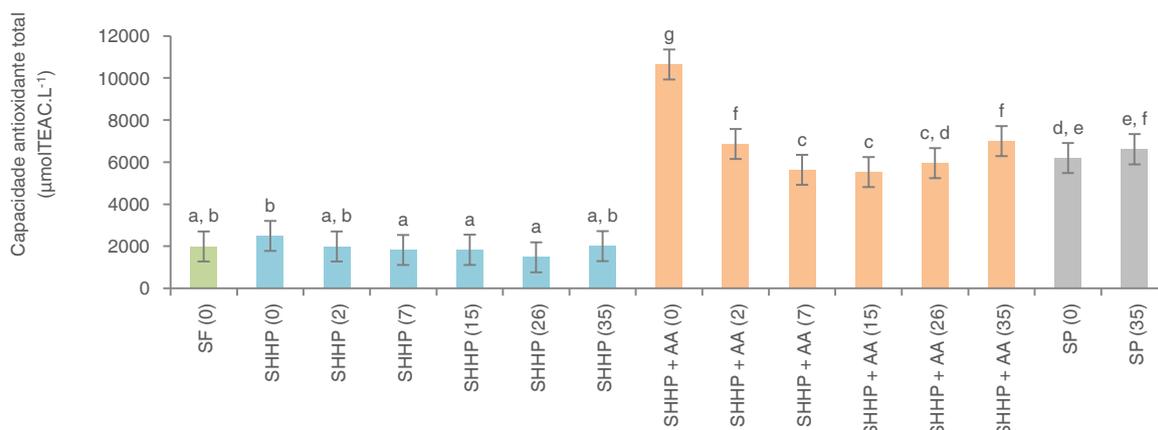


Figura 4.5. Efeito dos processos de conservação aplicados vs sumo fresco na capacidade antioxidante total, segundo metodologia DPPH, ao longo do tempo de armazenamento.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogêneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Através da Figura 4.5 pode verificar-se que a capacidade antioxidante total das amostras SF e SHHP, na gama de t_A estudada, não foi significativamente diferente ($p > 0,05$), apresentando os níveis mais baixos comparativamente às restantes amostras.

O sumo pasteurizado (SP), após o tratamento e no final do armazenamento, demonstra um poder antioxidante sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre si.

A amostra tratada a altas pressões com adição de ácido ascórbico (SHHP+AA) apresenta valores de poder antioxidante mais elevados relativamente às restantes, contudo revela variabilidade de resultados com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os vários tempos de armazenamento. A análise efetuada logo após ao processamento (dia 0) foi a que revelou um poder antioxidante superior, de cerca de $10644,9 \mu\text{molTEAC.L}^{-1}$, comparativamente às restantes amostras analisadas.

• SEGUNDO METODOLOGIA DE REDUÇÃO DO FERRO – FRAP

Na Figura 4.6 apresentam-se os resultados da capacidade antioxidante total das amostras avaliadas, segundo a metodologia de redução do ferro (FRAP).

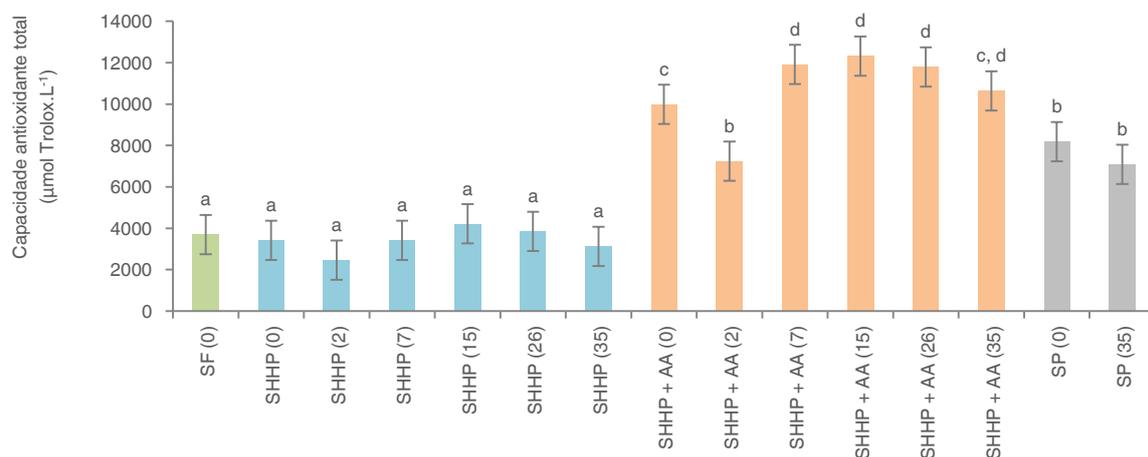


Figura 4.6 – Efeito dos processos de conservação aplicados vs sumo fresco na capacidade antioxidante total, segundo metodologia FRAP, ao longo do tempo de armazenamento.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogêneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Observando a Figura 4.6 verifica-se que o poder antioxidante total das amostras SF e SHHP, no tempo de armazenamento estudado, não foi significativamente diferente ($p > 0,05$), verificando-se os níveis mais baixos comparativamente às restantes amostras.

A amostra de sumo pasteurizado (SP) manteve a capacidade antioxidante semelhante ($p > 0,05$) após 35 dias de armazenamento.

A amostra SHHP+AA revela uma atividade antioxidante superior, demonstrando alguma variabilidade nos valores com diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento. O poder antioxidante mais elevado regista-se passado 15 dias de armazenamento (em média de $12317,9 \mu\text{molTEAC.L}^{-1}$), comparativamente às restantes amostras em estudo.

• SEGUNDO METODOLOGIA DE CAPTURA DO RADICAL LIVRE ABTS

A Figura 4.7 apresenta os resultados da capacidade antioxidante total das amostras avaliadas, segundo a metodologia de captura do radical livre ABTS.

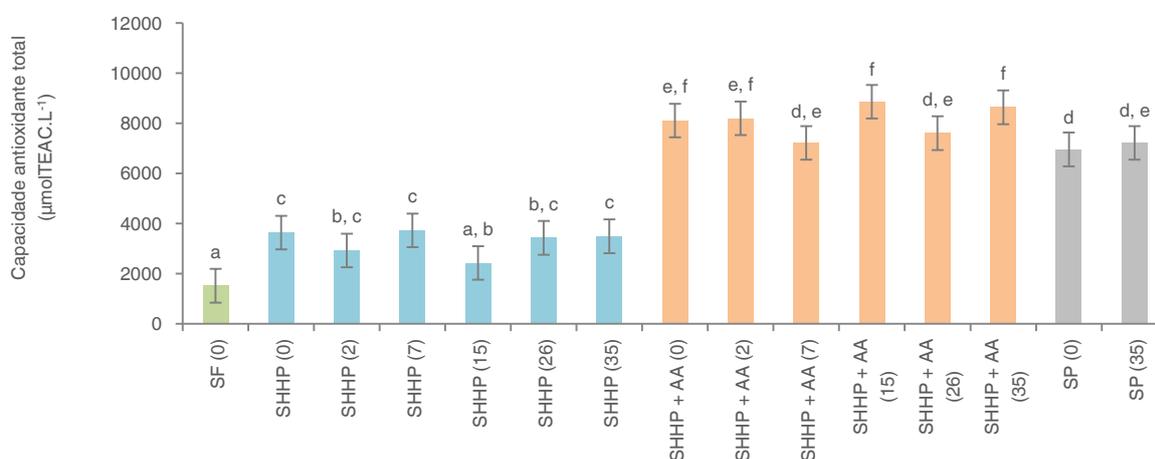


Figura 4.7. Efeito dos processos de conservação aplicados vs sumo fresco na capacidade antioxidante total, segundo metodologia ABTS, ao longo do tempo de armazenamento.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogêneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Através da Figura 4.7 pode observar-se que o sumo fresco (SF) revela o poder antioxidante mais baixo (em média de $1515,27 \mu\text{molTEAC.L}^{-1}$) comparativamente às restantes amostras.

A amostra tratada a altas pressões sem aditivo (SHHP), ao longo dos 35 dias estudados, apresenta resultados que denotam alguma variabilidade, porém mantém a mesma gama de valores revelada nas anteriores metodologias.

A amostra tratada termicamente (SP), manteve o seu poder antioxidante semelhante, revelando resultados que não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

A amostra SHHP+AA demonstra um poder antioxidante superior ao longo de t_A , verificando-se, novamente, variabilidade nos valores com diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Após 15 dias de armazenamento, observa-se um maior poder antioxidante comparativamente ao valor encontrado nas restantes amostras.

Face às três metodologias utilizadas para a medição da capacidade antioxidante total, denota-se coerência entre os resultados obtidos de um modo generalista. O sumo fresco foi o que apresentou níveis de capacidade antioxidante inferiores, resultado da atividade da PPO estar no seu expoente

máximo e, assim oxidar os compostos fenólicos presentes, diminuindo consideravelmente o poder antioxidante do sumo.

Também o sumo tratado a altas pressões (SHHP) apresenta valores baixos pelos três métodos, próximos aos encontrados no sumo fresco, revelando uma perda considerável dos compostos antioxidantes. Apesar do tratamento aplicado, a perda inerente de capacidade antioxidante demonstra que a aplicação de altas pressões nos níveis testados, por si só, não foi suficiente para inibir a atividade da PPO e, por isso, existir uma degradação dos compostos antioxidantes.

O sumo tratado termicamente (SP) revela um poder antioxidante constante após o tratamento e ao fim de 35 dias pelas 3 metodologias, demonstrando elevada estabilidade. Pelos resultados obtidos denota-se que o tratamento térmico foi eficaz na inativação da PPO, mantendo os compostos fenólicos antioxidantes estáveis ao longo do tempo de armazenamento estudado. No entanto é de verificar que, apesar da elevada estabilidade que apresenta, o tratamento térmico promoveu a degradação de compostos que conferem capacidade antioxidante do sumo, comparativamente às restantes amostras.

O sumo tratado a altas pressões com adição de ácido ascórbico (SHHP+AA), apesar de revelar alguma variabilidade nos resultados ao longo do tempo de armazenamento, apresenta um poder antioxidante superior às restantes amostras avaliadas, nomeadamente ao sumo pasteurizado. Os resultados demonstram um comportamento lógico e espetável, dado que a esta amostra foi adicionado 0,1% de ácido ascórbico, um antioxidante e que, segundo Will *et al.* (2000) pode ser um fator inibitório à atividade da PPO. Aleado a esta condição favorável, pode validar-se que a aplicação de altas pressões hidrostáticas tem uma maior capacidade de manutenção dos compostos bioativos, comparativamente ao tratamento térmico. No entanto, é de referir, que este sumo denota alguma variabilidade ao longo do tempo de armazenamento, sinónimo de instabilidade e ineficiente inibição da PPO, causa que não permite um elevado tempo de vida útil.

De notar, ainda, que os resultados obtidos da capacidade antioxidante total deverão estar de acordo com os obtidos para o conteúdo fenólico total, dado que os compostos fenólicos são os elementos que conferem a grande maioria do poder antioxidante do sumo de maçã. Essa tendência encontra-se em sintonia para todos os pontos quando a capacidade antioxidante total foi medida pelo método de captura do radical livre DPPH que, segundo Rufino *et al.* (2007) é o método mais indicado na medição desta componente em fruta e seus derivados.

4.2.5 COR (CIELAB) E ÍNDICE DE ESCURECIMENTO

• LUMINOSIDADE (PARÂMETRO L)

A Figura 4.8 apresenta os resultados de luminosidade (parâmetro L), do sistema de cor CIElab, das amostras avaliadas.

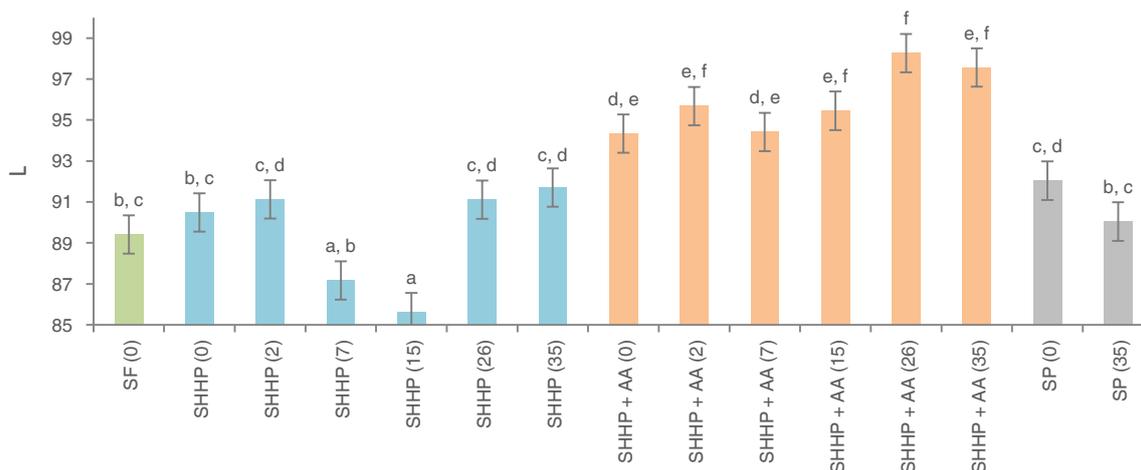


Figura 4.8. Efeito dos processos de conservação aplicados vs sumo fresco na luminosidade (L) da cor, ao longo do tempo de armazenamento.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogêneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Após processamento das diferentes amostras, verifica-se que o sumo fresco (SF) e SHHP (sem adição de ácido ascórbico) apresentam a luminosidade mais baixa, de cerca de 89,41 e 90,49, respetivamente, não apresentando resultados significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre si. O sumo pasteurizado (SP) também revela um valor na gama das anteriores amostras. O sumo tratado a altas pressões e aditivado com 0,1% de ácido ascórbico revela o valor mais alto de luminosidade, de cerca de 94,34, configurando a esta um menor nível de escurecimento.

Analisando a evolução das amostras estudadas ao longo do tempo de armazenamento pode verificar-se que o sumo tratado a altas pressões (SHHP) apresenta alguma variabilidade na luminosidade. Até ao 15º dia de armazenamento observa-se uma diminuição do parâmetro L, apresentado o valor mais baixo (≈ 86), revelando baixa luminosidade e transparência. No entanto, após 26 e 35 dias de armazenamento o parâmetro L aumenta para valores de ≈ 92 , significando que o sobrenadante do sumo ficou mais claro, facto que poderá ser explicado pelo arrastamento das partículas coradas para o fundo das embalagens.

Ao longo dos 35 dias de armazenamento, a luminosidade da amostra SHHP+AA apresenta uma tendência crescente, apesar dos resultados não se revelarem significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Estes resultados poderão, também, dever-se ao aumento aparente do volume do depósito, resultado da atividade da PME, promovendo a formação de pectatos de cálcio que, ao aglomerarem-se, poderão ter promovido o arrastamento das partículas coradas, diminuindo a concentração de partículas suspensas no sumo.

O sumo pasteurizado (SP) apresenta estabilidade durante o armazenamento, observando-se valores de luminosidade que não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) entre si.

• CROMATICIDADE (PARÂMETRO C)

Na Figura 4.9 apresentam-se os resultados de cromaticidade (parâmetro c), do sistema de cor CIElab, das amostras avaliadas.

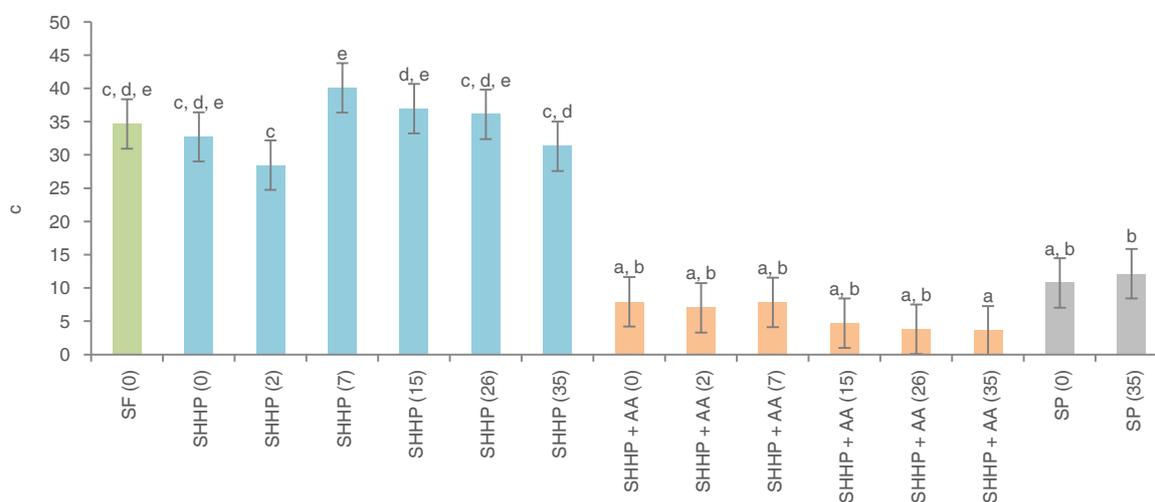


Figura 4.9. Efeito dos processos de conservação aplicados vs sumo fresco na cromaticidade (c) da cor, ao longo do tempo de armazenamento.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogéneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Os valores do parâmetro c, na generalidade das amostras, revelam resultados expectáveis dado que demonstram tendências opostas ao obtido para o parâmetro L. Quanto maior for o grau de escurecimento e turbidez do sobrenadante do sumo, maior será a sua cromaticidade e, consequentemente, menor luminosidade.

Esta tendência é observada para as amostras SF e SHHP, que revelaram um L relativamente baixo e é-lhes observado um valor de cromaticidade mais elevado comparativamente às restantes amostras.

As amostras SHHP+AA e SP, que apresentaram um L em média superior às restantes, revelam um valor de cromaticidade inferior e concordante, dado que o sobrenadante poderá não se encontrar tão saturado de partículas suspensas.

• ÍNDICE DE ESCURECIMENTO (WI)

Na Figura 4.10 apresentam-se os resultados do índice de escurecimento (WI) das amostras avaliadas.

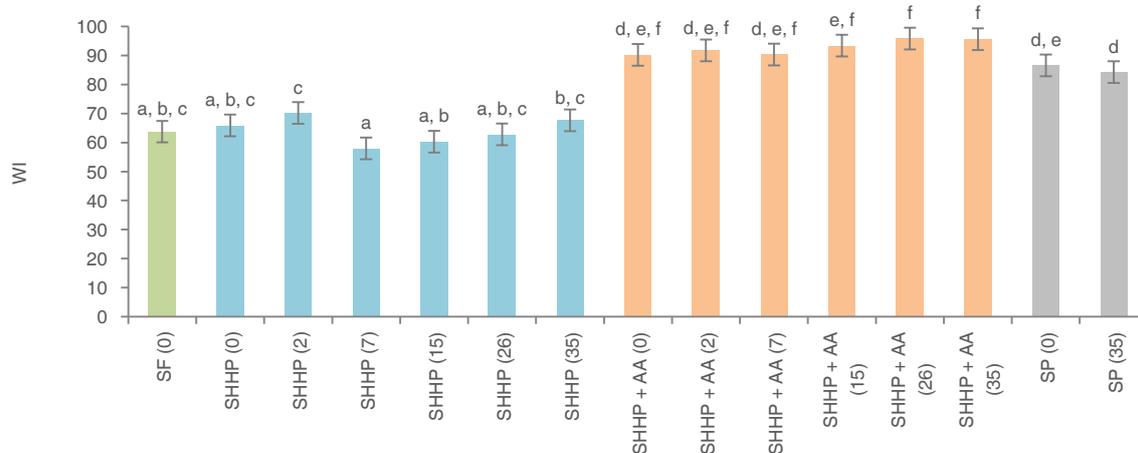


Figura 4.10. Efeito dos processos de conservação no Índice de escurecimento, ao longo do tempo de armazenamento.

As letras iguais indicam que as amostras fazem parte do mesmo grupo homogéneo, ou seja, não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As bandas de variação correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Após o processamento das diferentes amostras verifica-se que o sumo fresco (SF) e tratado a altas pressões sem adição de AA (SHHP) denotam níveis inferiores do índice de escurecimento que correspondem à intensificação do escurecimento, apresentando resultados que não são estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$). Facto que é justificado pela ineficácia do tratamento na inibição da atividade da PPO. O sumo pasteurizado apresenta um escurecimento superior às anteriormente mencionadas, porém ligeiramente inferior à amostra tratada a altas pressões com adição de AA (SHHP+AA). Esta amostra poderá ter sofrido um ligeiro escurecimento durante o processo de pasteurização devido a processos de caramelização potenciados pela aplicação de elevadas temperaturas. A amostra SHHP+AA, após o processamento, apresenta o menor grau de escurecimento quando comparada às restantes amostras. Este resultado poderá derivar de uma parcial inibição da atividade da PPO após aplicação do tratamento de estabilização aliado à adição de

ácido ascórbico, atenuando a atividade da enzima. Estes resultados correlacionam-se com os obtidos anteriormente para os parâmetros da cor avaliados (L e c).

Analisando as várias amostras ao longo do tempo de armazenamento, verifica-se que o sumo tratado a altas pressões (SHHP) apresenta variabilidade, porém não significativa ($p>0,05$), nos valores de WI. A estagnação do nível de escurecimento poderá dever-se à inibição da ação da PPO por falta de substrato, ou por outro lado, a enzima poderá continuar a oxidar o sumo com a formação de compostos acastanhados, porém dada a saturação de cor do sumo, a formação de novos compostos já não é mensurável e por isso o índice de escurecimento mantém-se constante.

O sumo tratado a altas pressões com a adição de ácido ascórbico (SHHP+AA) demonstra um WI sem variabilidade significativa ($p>0,05$) ao longo do tempo de armazenamento estudado. Este facto permite manter o tempo de vida útil previamente estabelecido pela indústria.

O índice de escurecimento do sumo tratado termicamente (SP), ao longo do tempo de armazenamento, não se demonstrou estaticamente diferente ($p>0,05$).

De um modo geral, é possível verificar-se que a aplicação de 500 MPa, por si só, não contribui para a manutenção da cor original dos sumos, existindo reações de escurecimento enzimático inerentes que só foram colmatadas nas amostras onde foi adicionado 0,1% de ácido ascórbico.

Os resultados observados não estão de acordo com o reportado por Polydera *et al.* (2003) que em sumo de laranja, aplicando um tratamento de 500 a 600 MPa, 35 a 40 °C, durante 4 a 5 min, observaram alterações na cor sem correlação com o tratamento de altas pressões nem com a temperatura de armazenamento (4 °C). Em 2005, também em sumo de laranja, os mesmos autores observaram, na maioria das amostras, taxas de alteração de cor inferiores no sumo tratado a altas pressões comparativamente ao tratado termicamente. A diferença de resultados relativamente ao presente estudo poderá ser explicada, além da diferente matriz alimentar, pelas condições distintas, nomeadamente na temperatura e tempo de aplicação do tratamento. A aplicação de altas pressões com temperaturas e tempos superiores poderão surtir num efeito mais inibitório da enzima.

De notar que, segundo Vaikousi *et al.* (2008) a oxidação do ácido ascórbico poderá ser um fator de escurecimento associado ao escurecimento de sumos de fruta.

4.3 BALANÇO INTERCALAR

O processo de conservação por altas pressões hidrostáticas do sumo de maçã de 500 MPa, durante 120 segundos, a 18 °C não é suficiente no que respeita à estabilidade da componente enzimática (polifenoloxidase e pectinametilsterase), da cor e da componente bioativa do sumo. A

adição prévia de 0,1% de ácido ascórbico é determinante pois atua como fator inibitório da atividade enzimática, promovendo a estabilidade da cor do sumo durante os 35 dias a 4 °C e, conseqüentemente a atividade antioxidante superior ao sumo tratado termicamente, verificando-se a hipótese 1.

5. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO DE SUMO DE MAÇÃ POR ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS

Paralelamente, por forma a complementar H_1 , propôs-se o estudo de outros níveis de pressão, passíveis de serem aplicados na indústria, de modo a verificar se a sua estabilidade seria melhorada.

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A verificação do impacto de diferentes níveis de pressão na qualidade do sumo de maçã baseou-se na seguinte hipótese:

Hipótese 2 (H_2): Existe um nível de pressão, entre 450 e 600 MPa (120 segundos, 18 °C), comparativamente ao atualmente utilizado na indústria, que demonstra maior eficácia na promoção de estabilidade do sumo, à temperatura de 4 °C.

Por forma a validar H_2 o plano de amostragem bem como o tratamento estatístico foi elaborado segundo o delineamento DCCR, considerando duas variáveis independentes. Assim, para a determinação das amostras necessárias foi efetuada a descodificação da matriz inicial contemplando as duas variáveis independentes em causa [pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A)], em que os respetivos intervalos de variação foram de P: 450 a 600 MPa e de t_A : 0 a 60 dias. O delineamento considerado incluiu 12 ensaios independentes, com 4 pontos relativos ao planeamento fatorial completo ($n_q = 2, 3, 10$ e 11), 4 pontos estrela ($n_e = 1, 4, 9$ e 12) e 4 repetições do ponto central ($n_e = 5, 6, 7$ e 8), como se encontra apresentado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Matriz das variáveis independentes (P e t_A) na forma codificada e descodificada.

MATRIZ CODIFICADA		MATRIZ DESCODIFICADA	
A	B	PRESSÃO (MPa)	TEMPO DE ARMAZENAMENTO (DIAS)
-1,41421	0,00000	450	30
-1,00000	-1,00000	472	9
-1,00000	1,00000	472	51
0,00000	-1,41421	525	0
0,00000	0,00000	525	30
0,00000	0,00000	525	30
0,00000	0,00000	525	30
0,00000	0,00000	525	30
0,00000	1,41421	525	60
1,00000	-1,00000	578	9
1,00000	1,00000	578	51
1,41421	0,00000	600	30

A quantificação das amostras, para cada condição de pressão, foi determinada pela conformação que a matriz de combinação de variáveis definiu no que respeita aos tempos de análise a que cada amostra seria submetida. De referir que o sumo foi sempre aditivado com 0,1% de ácido ascórbico e todos os tratamentos decorreram durante 120 segundos à temperatura de 18 °C. A caracterização bem como a quantificação das amostras requeridas encontram-se discriminadas na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Caracterização e quantificação das amostras estudadas para validação de H₂.

AMOSTRAS	PRESSÃO (MPa)	QUANTIDADE DE AMOSTRAS
Sumo de maçã tratado a 450 MPa S(450)	450	6
Sumo de maçã tratado a 472 MPa S(472)	472	12
Sumo de maçã tratado a 525 MPa S(525)	525	36
Sumo de maçã tratado a 578 MPa S(578)	578	12
Sumo de maçã tratado a 600 MPa S(600)	600	6
TOTAL		72

Após o processamento, as amostras foram armazenadas a 4 °C até à data do controlo analítico definido pelo delineamento experimental.

Os atributos em avaliação (variáveis dependentes) compreenderam as seguintes determinações: conteúdo fenólico total, cor (CIElab) e índice de escurecimento (WI); atividade das enzimas PPO e PME e análise dos compostos do aroma.

Em ambos os estudos (4 e 5) as amostras foram introduzidas na câmara de pressão, após monitorização do tratamento que se pretendia, tal como se encontra ilustrado na Figura 5.1.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas se apresentam os modelos cujos ajustes foram considerados adequados (r^2 e $r^2_{ajust.}$ próximos da unidade e diferença entre eles inferior a 1 décima e as variáveis que demonstraram significado estatístico ($p < 0,05$).

5.2.1 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE

O modelo que expressa a inibição da PPO (Eq. 5), após eliminação dos efeitos P^2 , t_A e $P \cdot t_A$, apresentou coeficientes de variância não elevados ($r^2 = 0,57$ e $r^2_{ajust} = 0,48$), mantendo a diferença entre si pretendida, de cerca de 1 décima.

$$\text{Inativação da PPO (\%)} = -44,296 + 0,192 P + 0,003 t_A^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

Apesar de não apresentar o ajuste desejado e, por isso, um carácter pouco preditivo, através da sua representação gráfica é possível observar a tendência inerente (Figura 5.1).

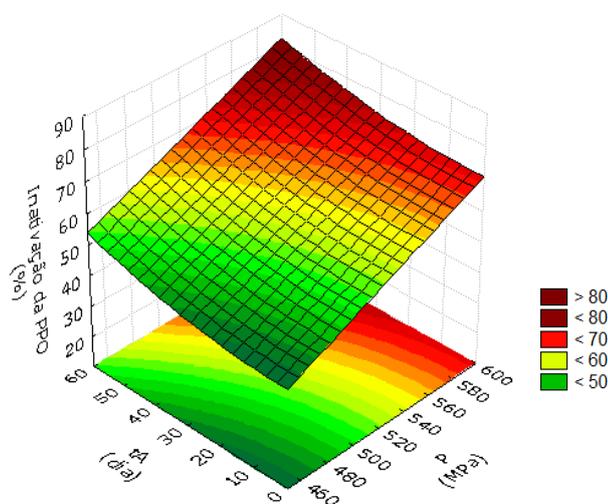


Figura 5.1. Superfície de resposta da variação da % inativação da PPO em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).

Para a gama de pressão e tempos de armazenamento testados, a Figura 5.1 bem como a equação correspondente demonstram que a % de inibição da PPO aumenta com os acréscimos de t_A (componente quadrática) e de P (componente linear), de 50 a 80%, não existindo uma inativação efetiva (100%) nas condições testadas. A tendência observada remete que para um tratamento aplicando uma $P = 450$ MPa é esperado obter-se uma inibição da atividade da PPO $< 50\%$; enquanto que $P = 600$ MPa é expectável obter-se uma inibição entre 60 e 70% da sua atividade inicial. A inibição da atividade da enzima é incrementada com o aumento do t_A , em que após aplicação de $P = 600$ MPa e 50 dias de armazenamento poderá observar-se uma inibição superior a 80%. Este resultado está concordante com o obtido por Anese *et al.* (1995) em sumo de maçã, que observaram uma redução de 90% da atividade da PPO imediatamente após aplicação de um tratamento de 900 MPa. No entanto, a tendência não está de acordo com o reportado por Riahi *et al.* (2003) que, na mesma matriz, reportaram uma inativação efetiva da PPO após aplicação de 400 MPa, durante 25 minutos, podendo este último fator ter sido o parâmetro diferenciador entre os estudos. Valdramidis *et al.* (2009) também em sumo de maçã, tendo como variáveis distintas do presente estudo a temperatura (10 a 50 °C) e o

tempo de aplicação do tratamento (10 a 90 minutos), verificaram que após o tratamento a 750 MPa atingiu 51,4% de inibição da atividade da PPO, a qual apresentou uma tendência de aumento quanto maior a temperatura aplicada durante o tratamento aplicado ao sumo.

5.2.2 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE

O modelo que expressa a inibição da PME (Eq. 6), após eliminação do efeito P^2 , apresentou um ajuste adequado, expresso pela falta de ajuste não significativa e erro puro significativo, quer pelos coeficientes de variância próximos da unidade ($r^2 = 0,94$; $r^2_{ajust} = 0,90$) e diferença entre eles, inferior a uma décima.

$$\text{Inativação da PME (\%)} = 35,356 + 0,107 P + 0,460 t_A + 0,002 t_A^2 - 0,001 P * t_A \quad (\text{Eq. 6})$$

O resultado obtido significa que cerca de 94% da variância total em torno da média é explicada pela equação do modelo (Eq. 6), ficando apenas 6% atribuída a resíduos, sendo a inclusão dos efeitos considerados adequados para a qualidade da previsão das respostas.

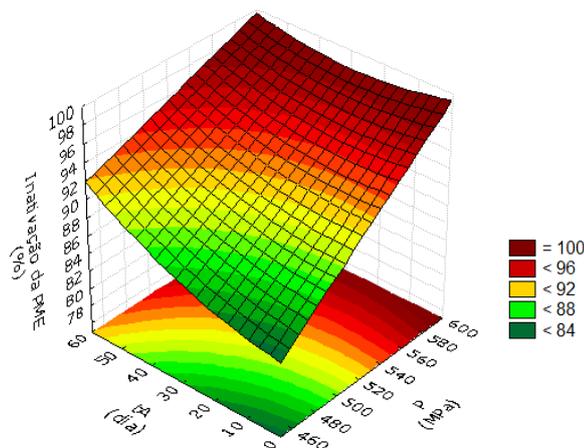


Figura 5.2. Superfície de resposta da variação da % inativação da PME em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).

Para a gama de pressão e tempos de armazenamento testados, a Figura 5.2 bem como a equação correspondente demonstram que a % de inibição da PME aumenta com os acréscimos de t_A (componente linear e quadrática) e de P (componente linear), de 84 a 100%, tendo sido alcançada a inativação total (100%) dentro da gama testada. A inibição efetiva (100%) da PME é representada pela região mais escura, delimitada para valores de $P \geq 580$ MPa, quando $t_A = 0$ dias e/ou $P \geq 560$ MPa, se $t_A = 60$ dias. Desta forma, é possível constatar que a PME é menos barorresistente que a PPO na gama de pressão testada, resultado também obtido por Valdramidis *et al.* (2009) que após aplicar um

tratamento a $P = 750$ MPa em sumo de maçã, observaram uma inibição de 81,44% da atividade da PME, ao invés de 51,4% para a PPO.

Os resultados obtidos poderão significar que o volume de depósito presente na amostra tratada a 600 MPa, e a maioria formado nas restantes amostras, terá tido origem durante o intervalo de tempo entre a trituração do sumo e o tratamento a altas pressões. A aplicação de $P \geq 580$ MPa e a minimização do tempo intercalar entre estas duas operações poderá melhorar significativamente a qualidade do sumo ao nível da diminuição da atividade da PME e, conseqüentemente, a redução do volume de depósito formado.

5.2.3 COR (CIELAB)

• LUMINOSIDADE (PARÂMETRO L)

O modelo que expressa a tendência da luminosidade (parâmetro L) do sistema de cor CIElab (Eq. 7), após eliminação dos efeitos P , P^2 , t_A^2 e $P \cdot t_A$, apresentou coeficientes de variância não elevados ($r^2 = 0,54$ e $r^2_{ajust} = 0,50$), mantendo a diferença entre si pretendida, de cerca de 1 décima.

$$L = 94,970 + 0,065 t_A \quad (\text{Eq. 7})$$

Dado que o ajuste do modelo não foi o adequado e, por isso não apresenta carácter preditivo, observa-se apenas a sua tendência através da representação gráfica na Figura 5.3.

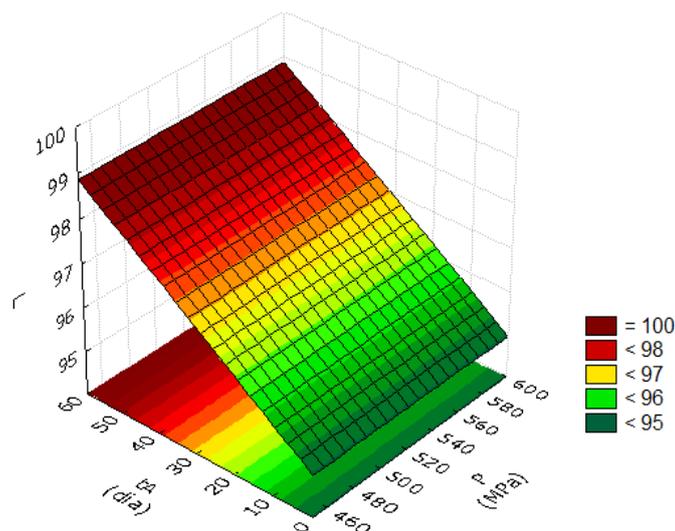


Figura 5.3. Superfície de resposta da variação de luminosidade (L) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).

Para a gama de pressão e tempos de armazenamento testados, a Figura 5.3 bem como a equação correspondente demonstram que a luminosidade aumenta, apenas, com os acréscimos de t_A

(componente linear), de 95 a 100, pelo que P não gerou qualquer efeito na variação deste valor. Tal tendência pode ser justificada pelo aumento aparente do volume de depósito ao longo do tempo de armazenamento, podendo ter existido o aumento da formação de pectatos de cálcio, causado pela atividade da PME, que ao aglomerarem-se poderão ter promovido um arrastamento progressivo das partículas coradas, diminuindo a concentração de partículas suspensas nas amostras.

- CROMATICIDADE (PARÂMETRO c)

O modelo que expressa o valor de cromaticidade (parâmetro c) do sistema de cor CIElab (Eq. 8), após eliminação dos efeitos P, P² e P*t_A, apresentou coeficientes de variância aceitáveis (r² = 0,88 e r²_{ajust} = 0,85), mantendo a diferença entre si pretendida, de cerca de 1 décima.

$$c = 7,358 - 0,153 t_A + 0,001 t_A^2 \quad (\text{Eq. 8})$$

Através da Figura 5.4 é possível prever a tendência da variação deste parâmetro no sumo e condições estudadas.

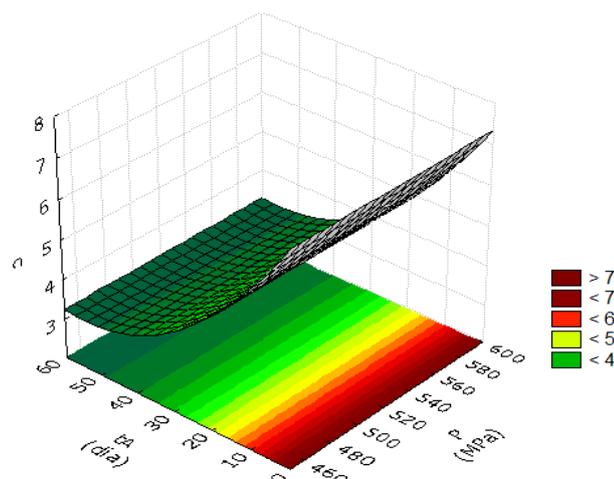


Figura 5.4. Superfície de resposta da variação de cromaticidade (c) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).

Para a gama de pressão e tempos de armazenamento testados, a Figura 5.4 bem como a equação correspondente demonstram que a cromaticidade aumenta apenas com os acréscimos de t_A (componentes linear e quadrática) de 4 a 7, não tendo P influenciado na sua variação. Prevê-se que a saturação do sumo diminua ao longo de t_A, resultado que é suportado e concordante com o obtido para o parâmetro L. O aumento aparente do volume de depósito, possivelmente gerado pela atividade da PME, poderá ter promovido um arrastamento das partículas da cor, levando a uma menor saturação de

compostos no sobrenadante. Desta forma, o valor de c apresentou uma diminuição progressiva do seu valor absoluto inicial ao longo do tempo de armazenamento.

5.2.4 REGISTOS FOTOGRÁFICOS

As amostras foram colocadas em tubos de ensaio, tapadas com parafilme e mantidas em câmara de refrigeração (4°C) e observada a evolução da cor ao longo dos 60 dias de armazenamento.

Através da observação dos registos fotográficos foi possível avaliar três componentes características dos sumos após abertura: o volume e cor do depósito formado e a cor das amostras após agitação (Figura 5.5).

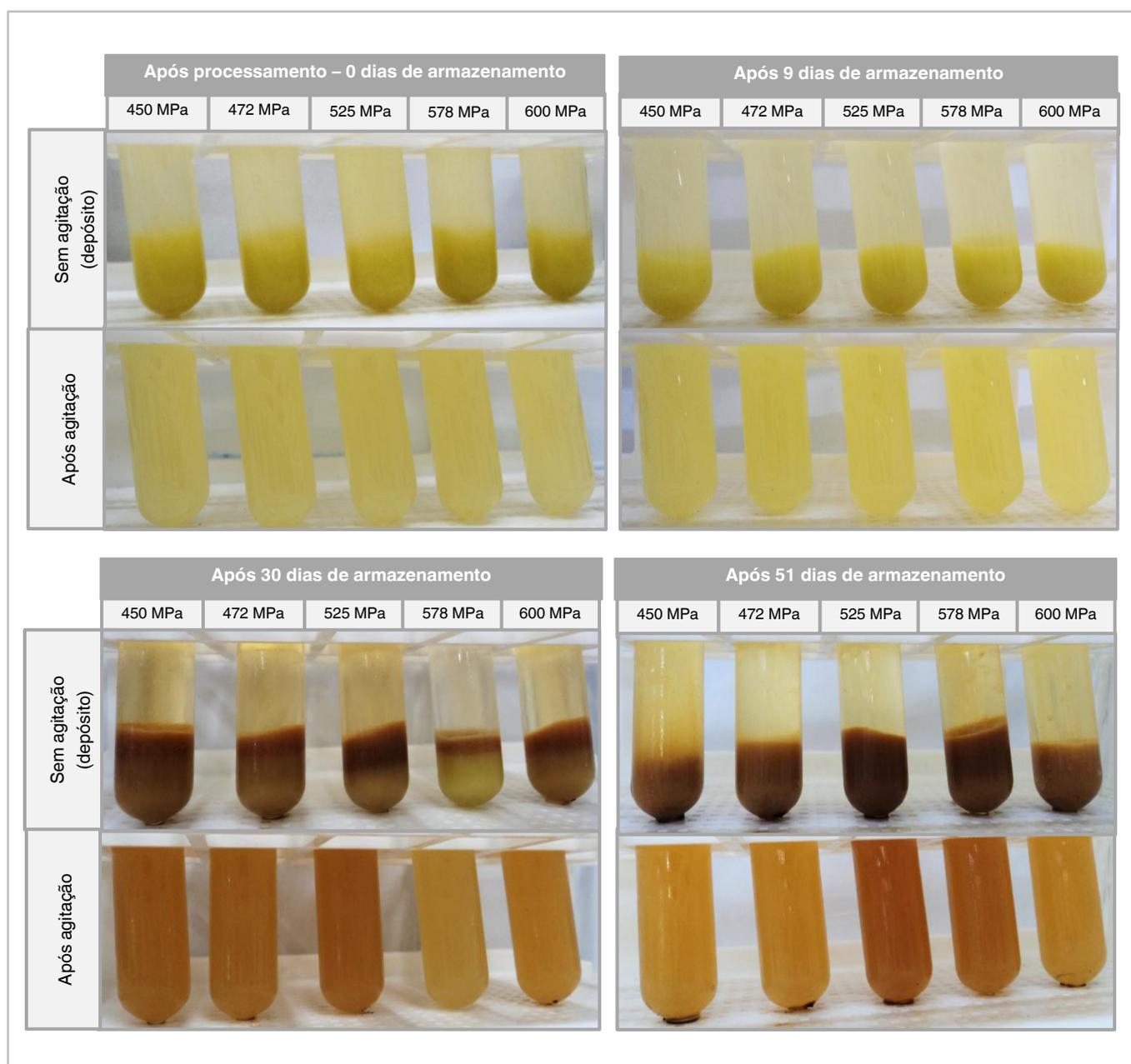


Figura 5.5. Registos fotográficos das amostras tratadas a 450, 472, 525, 578 e 600 MPa ao longo do tempo em estudo.

Os registros fotográficos após o processamento e até 9 dias de armazenamento não demonstram diferenças aparentes de cor e volume do depósito em todas as amostras.

A transição entre os dias 9 e 30 de armazenamento destaca-se devido à elevada alteração de cor das amostras. Após 30 dias de armazenamento todas as amostras apresentam um escurecimento elevado do depósito formado, excetuando a amostra tratada a 578 MPa que apresenta um menor escurecimento quando comparada com as restantes. Após agitação observa-se um nítido escurecimento, concordante com as colorações do depósito formado.

Após 51 de armazenamento todas as amostras apresentam depósitos bastante escurecidos. De salientar a amostra tratada a 600 MPa aparenta um depósito inferior comparativamente às restantes. Após agitação, as amostras apresentam uma cor muito escura face aos anteriores tempos.

A tendência que se verifica está concordante com os resultados anteriormente obtidos, pois todas as amostras apresentaram um escurecimento progressivo ao longo do tempo em estudo, consequência da ineficácia do tratamento aplicado (450 – 600 MPa) na inibição da atividade da PPO. Além desta constatação, também é possível validar-se a tendência anteriormente discutida acerca da inativação da PME. A amostra tratada a 600 MPa manteve, aparentemente, o volume de depósito formado ao longo do tempo de armazenamento consequência da inibição da atividade da enzima. Esta constatação poderá significar que os pectatos de cálcio formados pela ação da PME sobre o substrato (pectina) existente poderão ter tido origem no intervalo de tempo entre a operação de trituração e o tratamento de estabilização, podendo a minimização/otimização dos tempos intercalares entre estas duas operações reduzir significativamente a formação do depósito dos sumos.

5.2.5 COMPOSIÇÃO AROMÁTICA

A composição aromática foi estudada em termos de concentração dos compostos voláteis totais e compostos voláteis que se demonstraram mais evidenciados nos cromatogramas obtidos.

5.2.5.1 COMPOSTOS VOLÁTEIS TOTAIS

No que respeita ao teor de compostos voláteis totais (CVT) o modelo que expressa a sua tendência não apresentou um ajuste adequado. No entanto, foi possível fazer-se uma comparação das áreas totais dos compostos voláteis totais das amostras de cada ponto da matriz em análise relativamente ao sumo fresco (SF) e ao sumo pasteurizado (SP) no tempo zero, tendo-se obtido os resultados expressos na Figura 5.6.

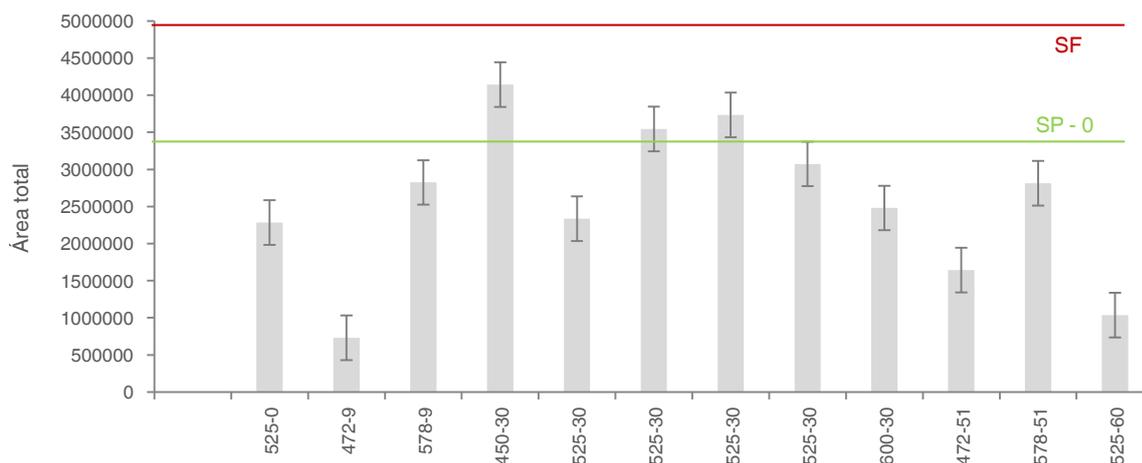


Figura 5.6. Área correspondente aos compostos voláteis totais dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo zero.

Pela observação da Figura 5.6 constata-se que, para a gama de P e t_A em estudo, todas as amostras têm uma composição total de compostos voláteis inferior ao sumo fresco (SF). Face a este, a amostra que mais se aproxima é a tratada a 450 MPa, após 30 dias de armazenamento, tendo cerca de 86,7% do teor total de compostos voláteis. Nos mesmos termos comparativos, observa-se que a amostra tratada a 600 MPa, após 30 dias de armazenamento, apresenta cerca de 51,9% dos compostos voláteis totais. Desta forma, poderá constatar-se que o aumento da pressão causa uma diminuição no teor total de compostos voláteis, que poderá dever-se a processos de degradação e/ou processos de encapsulamento.

De igual modo de comparação, face ao sumo pasteurizado a amostra tratada a 450 MPa, após 30 dias de armazenamento, apresenta cerca de 121,4% do total de compostos voláteis, ao passo que a amostra tratada a 600 MPa, no mesmo tempo de análise, denota um teor de compostos voláteis menor, de cerca de 79,9%. Deste modo poder-se-á retirar vantagens na utilização de altas pressões hidrostáticas comparativamente a tratamentos térmicos no que respeita à manutenção dos compostos voláteis do sumo, mantendo as suas características próximas ao seu congénere em fresco.

De notar o impacto do tratamento térmico (SP) na composição total de compostos aromáticos, revelando uma quebra de 30% dos compostos presentes no sumo fresco (SF). Esta tendência foi também constatada por Su *et al.* (2002) que observaram uma redução em todas as frações voláteis características do fruto em fresco. Também Perédi *et al.* (1981) afirmaram que sumos tratados termicamente perdem cerca de metade dos componentes voláteis do fruto original.

5.2.5.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS MAIS REPRESENTATIVOS DO PERFIL DO AROMA

Ao longo do estudo foram identificados 4 picos de compostos voláteis considerados como os mais representativos devido à elevada área que apresentaram nos cromatogramas (Tabela 5.3). O cálculo da sua representatividade foi efetuado em termos de % relativa ao teor total de compostos voláteis.

Tabela 5.3. Compostos voláteis que apresentaram maior representatividade nos cromatogramas ao longo do estudo.

COMPOSTOS VOLÁTEIS	TEMPO DE RETENÇÃO (s)
Acetato de hexilo	13,76
X_A	14,14
X_B	19,19
X_C	24,40

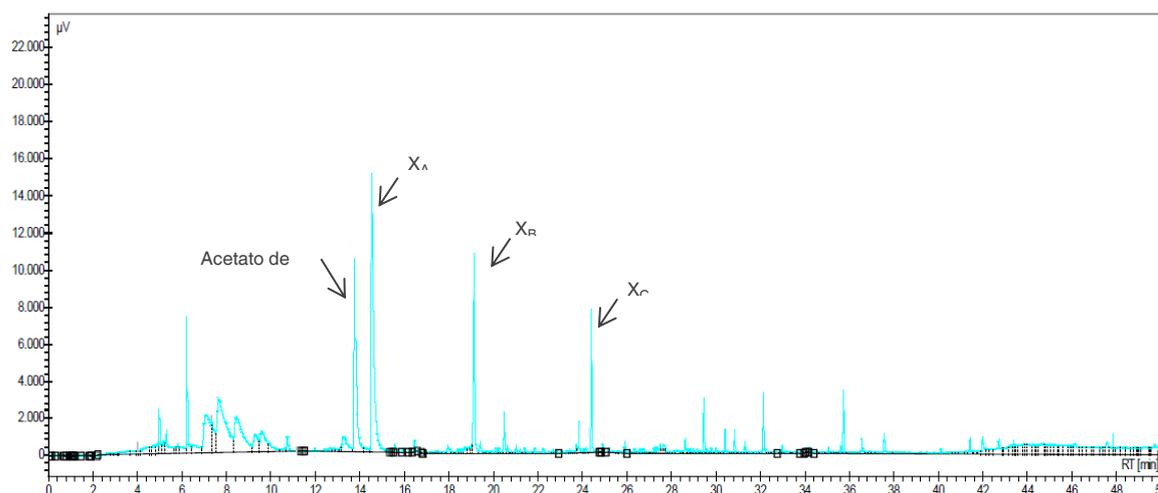


Figura 5.7. Cromatograma obtido com a definição dos picos mais representativos observados em todas as amostras estudadas.

• ACETATO DE HEXILO

O modelo que expressa a variação da % de acetato de hexilo (Eq. 9), após eliminação dos efeitos P , P^2 , t_A^2 e $P * t_A$, apresentou um ajuste adequado, expresso pela falta de ajuste não significativa e erro puro, quer pelos coeficientes de variância próximos da unidade ($r^2 = 0,92$ e $r^2_{ajust} = 0,86$) e diferença entre eles, inferior a uma décima.

$$\text{Acetato de hexilo (\%)} = 11,564 - 0,154 t_A \quad (\text{Eq. 9})$$

O modelo obtido significa que cerca de 92% da variância total em torno da média é explicada pela equação do modelo (Eq. 9), ficando apenas 8% atribuída a resíduos, sendo a inclusão dos efeitos considerados adequados para a qualidade da previsão das respostas.

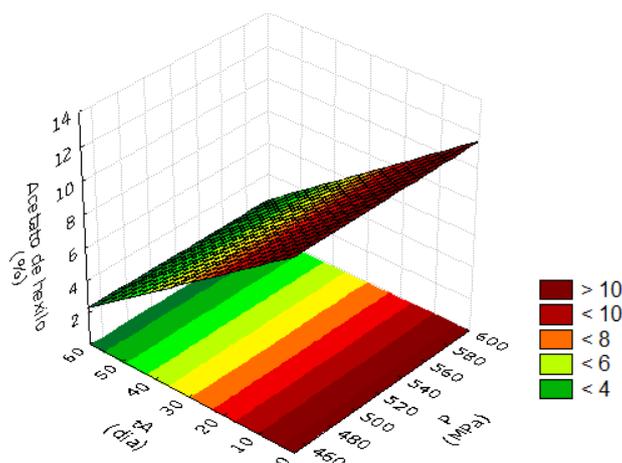


Figura 5.8. Superfície de resposta da variação da % de acetato de hexilo em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).

Para a gama de pressão e tempos de armazenamento testados, a Figura 5.8 bem como a equação correspondente demonstraram que a % relativa de acetato de hexilo diminui com o acréscimo de t_A , de 4 a 10%, demonstrando que P , na gama testada, não influenciou a sua variação. Segundo Reis *et al.* (2009) este composto é característico da composição volátil de maçãs e seus derivados e apresenta o sabor maçã, pêra, doce e floral como descritores de aroma associados.

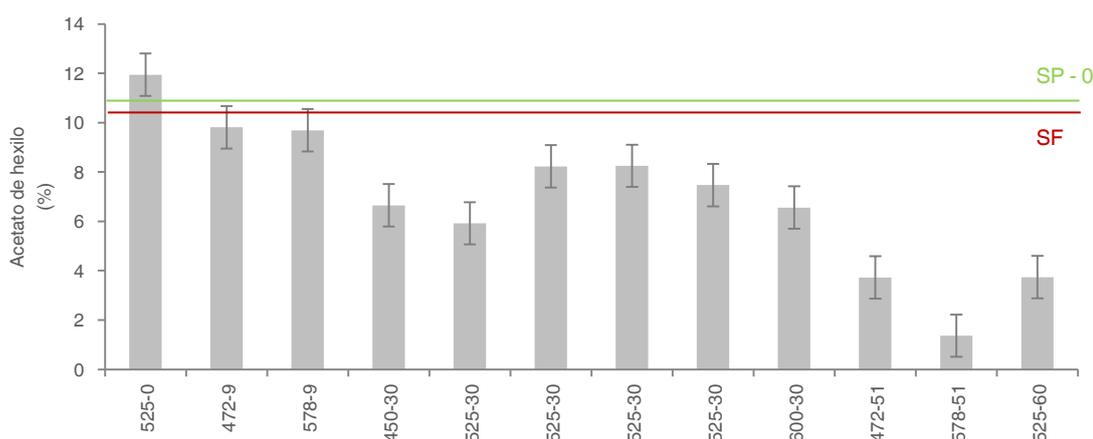


Figura 5.9. Área correspondente ao acetato de hexilo dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo zero.

A Figura 5.9 complementa a tendência que nos é revelada pela superfície de RSM (Figura 5.8). Através desta poderá ainda constatar-se que, além de independente da pressão aplicada, também se

revela independente do tipo de tratamento aplicado, observando-se pouca variação na sua % relativa no sumo tratado termicamente e tratado a altas pressões, no tempo 0, comparativamente ao sumo fresco.

• COMPOSTO X_A

O modelo que expressa a tendência da variação da % de X_A ($tR = 14,60$ s), após eliminação do efeito P, apresentou coeficientes de variância aceitáveis ($r^2 = 0,82$ e $r^2_{ajust} = 0,72$), apresentando a diferença inferior a uma décima entre si.

$$X_A (\%) = 16,900 + 0,001 P^2 + 2,481 t_A - 0,029 t_A^2 - 0,002 P * t_A \quad (\text{Eq. 10})$$

O modelo não apresentou um ajuste adequado e, por isso, carácter pouco preditivo, porém através da sua representação gráfica é possível observar a tendência (Figura 5.10).

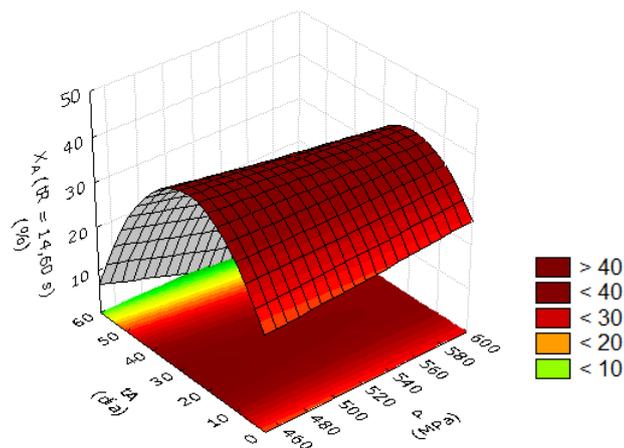


Figura 5.10. Superfície de resposta da variação da % de X_A ($tR = 14,60$ s) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).

Para a gama de pressão e tempos de armazenamento testados, a Figura 5.10 bem como a equação correspondente demonstraram que a % relativa de X_A ($tR = 14,60$ s) aumenta com os acréscimos de t_A , de 0 a 40%, demonstrando que P não teve influência na sua variação. Este composto é o mais representativo dos cromatogramas obtidos e, também, o que demonstra sofrer mais variações na sua concentração ao longo do tempo de armazenamento. A partir da Figura 5.10 pode observar-se que até 40 dias de armazenamento a % relativa da sua concentração é de cerca de 40%, quando $t_A \geq$

40 dias a sua % relativa diminui abruptamente chegando a valores <10%. Dado que esta análise é efetuada com base em % relativas, a sua variação pode dever-se a um impacto bastante negativo do tempo de armazenamento bem como à formação de outros compostos voláteis que, em termos relativos, podem causar a diminuição do peso deste relativamente ao total de compostos voláteis presentes, não tendo obrigatoriamente diminuído a sua concentração absoluta nos níveis apresentados.

Além das considerações anteriores, e efetuando a análise idêntica ao anterior composto analisado (acetato de hexilo), a Figura 5.11 demonstra a evolução deste composto comparativamente ao sumo fresco (SF) e sumo tratado termicamente (SP).

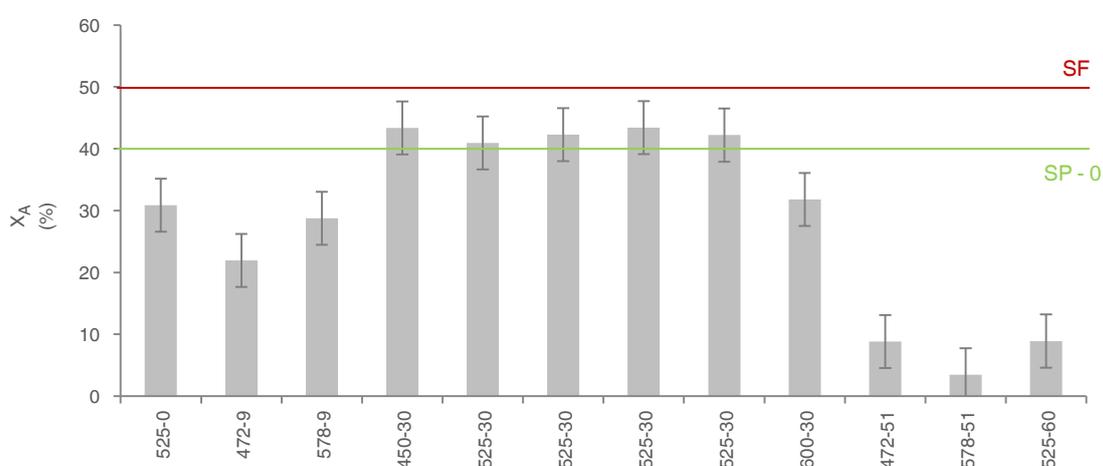


Figura 5.11. Área correspondente ao composto X_A ($tR = 14,60$ s) dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo 0.

A Figura 5.11 revela, como seria expectável, a tendência que nos é revelada pela superfície de RSM (Figura 5.10). Pode observar-se que o sumo fresco (SF) apresenta uma % relativa de X_A ($tR = 14,60$ s) superior em todas as amostras avaliadas. Face ao sumo fresco, o sumo pasteurizado (SP) e o sumo tratado a $P = 525$ MPa no tempo zero detém cerca de 78,8% e 60,8%, respetivamente. O mesmo sumo pressurizado (525 MPa), após 30 dias de armazenamento, apresenta cerca de 83,1% da concentração relativa de X_A comparativamente ao sumo fresco. Esta análise poderá elucidar que o tratamento de conservação, por altas pressões ou por temperatura, afetam a % de X_A presente no sumo. No entanto é de reforçar que, de igual modo, existem outros compostos presentes no sumo que poderão causar esta variação relativa, não sendo possível obter uma % absoluta para fazer uma análise exata.

• COMPOSTO X_B

O modelo que expressa a variação da % de X_B ($tR = 19,19$ s) (Eq. 11), após eliminação dos efeitos P , P^2 , t_A^2 e $P * t_A$, apresentou coeficientes de variância não elevados ($r^2 = 0,75$ e $r^2_{ajust} = 0,73$) e diferença entre eles, inferior a uma décima.

$$X_B (\%) = 6,072 - 0,079 t_A \quad (\text{Eq. 11})$$

O modelo não apresentou um ajuste adequado e, por isso, carácter pouco preditivo, porém através da sua representação gráfica é possível observar a tendência (Figura 5.12).

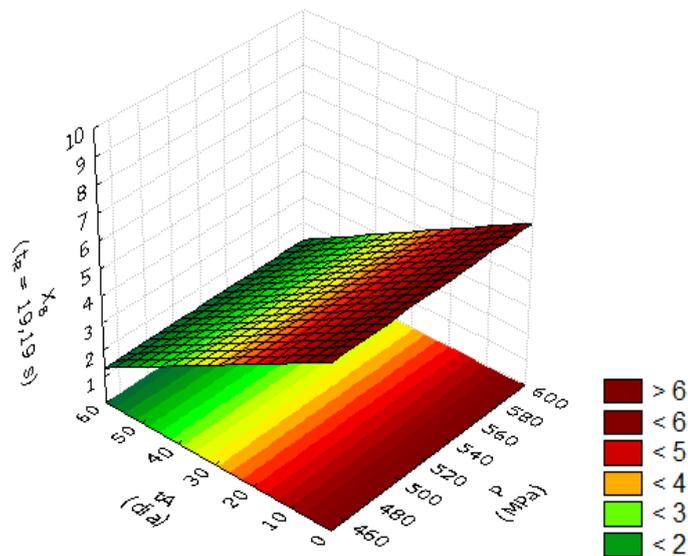


Figura 5.12. Superfície de resposta da variação da % de X_B ($tR = 19,19$ s) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).

Para a gama de pressão e tempos de armazenamento testados, a Figura 5.12 bem como a equação correspondente demonstraram que a % relativa de X_B ($tR = 19,19$ s) diminui com o aumento de t_A , de 2 a 6%, demonstrando que P , na gama testada, não influenciou a sua variação.

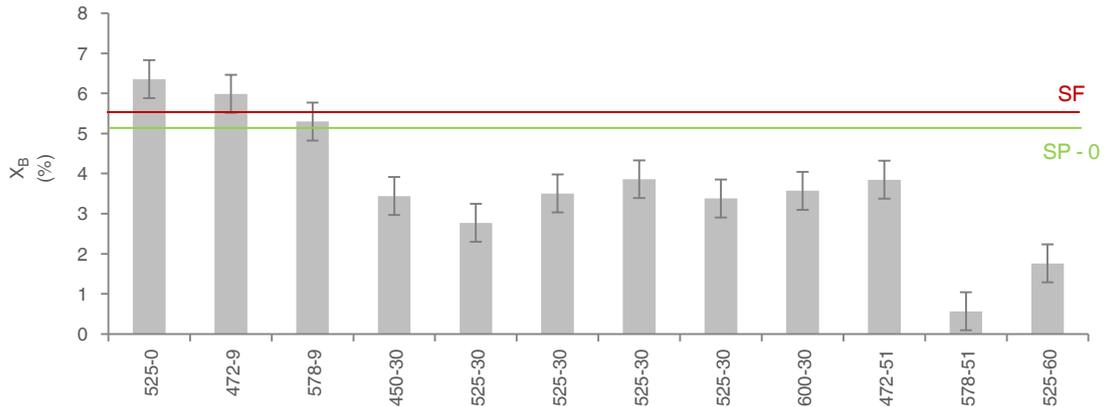


Figura 5.13. Área correspondente ao composto X_B (t_R = 19,19 s) dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo 0.

A Figura 5.13 está de acordo com a tendência obtida pela superfície de RSM (Figura 5.12). Face ao sumo fresco (SF), as amostras pressurizadas a 525 MPa, no tempo zero, e 472 MPa, após 9 dias de armazenamento, denotam uma % relativa superior, de cerca de 116,6% e 109,9% respetivamente, enquanto o sumo pasteurizado (SP) apresenta uma perda de cerca de 4% deste composto. Esta interpretação, apesar das limitações conhecidas, poderá significar que o tratamento aplicado não terá implicações diretas na evolução da concentração deste composto.

• COMPOSTO X_C

O modelo que expressa a variação da % de X_C (t_R = 24,40 s) (Eq. 12), após eliminação do efeito P², apresentou um ajuste adequado, expresso pela falta de ajuste não significativa e erro puro, quer pelos coeficientes de variância próximos da unidade ($r^2 = 0,92$ e $r^2_{ajust} = 0,86$) e diferença entre eles, inferior a uma décima.

$$X_C (\%) = 8,324 - 0,010 P - 0,199 t_A + 0,001 t_A^2 + 0,001 P * t_A \quad (\text{Eq. 12})$$

O modelo obtido significa que cerca de 92% da variância total em torno da média é explicada pela equação do modelo (Eq. 12), ficando apenas 8% atribuída a resíduos, sendo a inclusão dos efeitos considerados adequados para a qualidade da previsão das respostas.

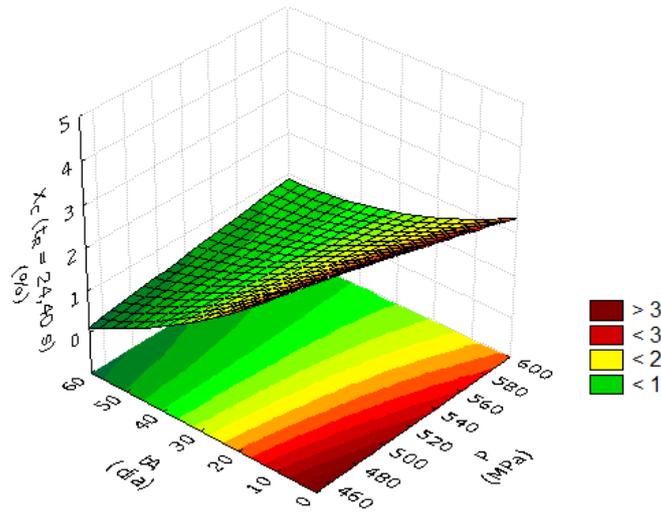


Figura 5.14. Superfície de resposta da variação da % de X_C ($t_R = 24,40$ s) em função da pressão (P) e tempo de armazenamento (t_A).

Para a gama de pressão e tempos de armazenamento testados, a Figura 5.14 bem como a equação correspondente demonstraram que a % de X_C ($t_R = 24,40$ s) diminui com o aumento de t_A , de 1 a 3%, e o aumento de P aplicada no tratamento, na gama testada, é diretamente proporcional à diminuição da concentração relativa deste composto. De salientar que, quando $t_A \geq 35$ dias verificou-se que a concentração de X_C é independente da sua concentração inicial, evidenciando uma concentração no sumo <1%.

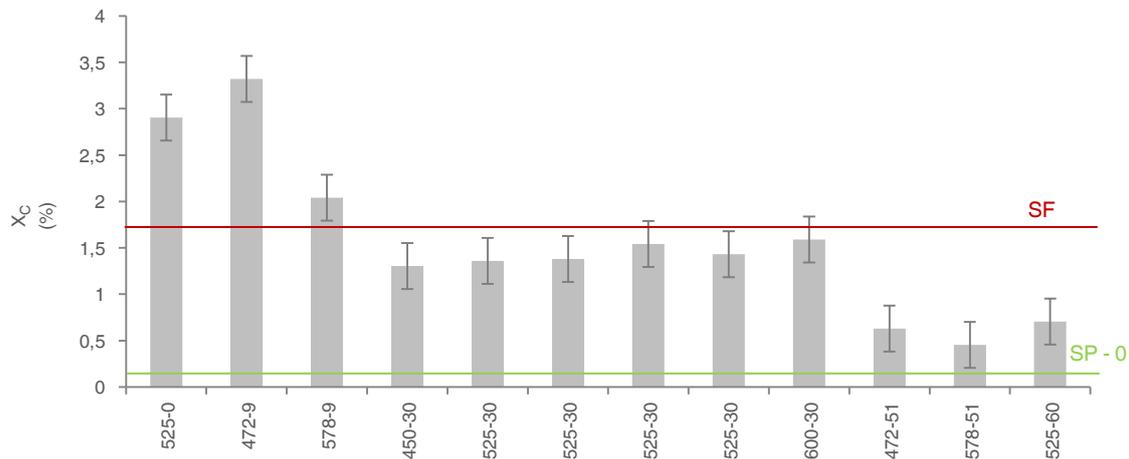


Figura 5.15. Área correspondente ao composto X_C ($t_R = 24,40$ s) dos pontos da matriz comparativamente ao sumo fresco (SF) e pasteurizado (SP) no tempo zero.

A Figura 5.15 demonstra que, face ao sumo fresco (SF), existe uma variabilidade de resultados interessantes a discutir. Face ao sumo fresco (SF), e analisando de forma independente cada gama de pressão aplicada, pode constatar-se que a amostra pressurizada a 525 MPa, após a aplicação do

tratamento (tempo 0) é refletida um incremento de X_C de cerca de 70%. Após 30 dias de armazenamento, face a SF, verifica-se em média uma diminuição de cerca de 15%. Após 60 dias de armazenamento a diminuição atingiu valores de cerca de 60%. Desta forma poderá entender-se que o tempo de armazenamento influencia na degradação deste composto.

Além desta constatação torna-se interessante a observação da variabilidade de resultados obtidos no mesmo tempo de análise, apenas com variação da pressão aplicada. As amostras analisadas após 9 dias de armazenamento, pressurizadas a 472 e 578 MPa, demonstram uma % relativa da concentração do composto X_C de cerca de 95% e 20% acima do sumo fresco, respetivamente. Após 51 dias de armazenamento observa-se uma diminuição da % relativa, no entanto a tendência de resultados mantém-se: a amostra tratada a 472 MPa demonstra uma % relativa inferior ao sumo fresco porém mantém-se superior ao sumo tratado a 578 MPa, com uma diferença relativa entre elas de cerca de 10,3%.

O sumo tratado termicamente (SP) demonstra uma perda de X_C em cerca de 80%, comparativamente ao sumo fresco, denotando que a temperatura poderá ter efeitos negativos no que concerne à manutenção dos níveis deste composto no sumo.

Dadas as interpretações anteriores é possível antever que a sinergia entre aplicação de pressões elevadas e longos tempos de armazenamento não serão favoráveis à manutenção deste composto. Por outro lado, é de salientar que este composto deverá ser sensível a gamas de temperaturas elevadas e, possivelmente, a processos de oxidações. Este último deve-se ao fato do valor obtido no sumo fresco, que aparentava elevada oxidação, comparativamente às amostras que revelaram uma maior concentração. No entanto é de referir que, dada a não injeção de padrão interno para averiguar concentrações absolutas, a incerteza dos resultados mantém-se.

De um modo geral observa-se que alguns compostos voláteis mais representativos do sumo de maçã são afetados pela aplicação de altas pressões bem como com o tempo de armazenamento. No entanto dever-se-á salientar que, dado que X_A , X_B e X_C não foram devidamente identificados, estes podem ser provenientes do próprio fruto bem como poderão ser compostos formados durante o tratamento aplicado e/ou resultantes de reações de oxidação/hidrólise, como referido por Reis *et al.* (2009).

5.3 BALANÇO INTERCALAR

A aplicação de altas pressões hidrostáticas a sumo de maçã aditivado com 0,1% de ácido ascórbico na gama entre 450 – 600 MPa, durante 120 segundos a 18 °C, não é suficiente para a estabilização físico-química do sumo:

- A aplicação de pressão de 600 MPa implicou uma inibição da polifenoloxidase (PPO) de cerca de 60-70%, sendo que a inibição tendencialmente aumentava com o tempo de armazenamento;
- Inibição efetiva (100%) da atividade da pectinametilsterase (PME) quando $P > 580$ MPa;
- Diminuição do teor de compostos voláteis totais face ao sumo fresco, podendo significar uma diminuição dos compostos responsáveis pelo aroma do sumo.

Desta forma a gama de pressões aplicadas demonstrou uma melhoria da estabilidade do sumo, tendo-se verificado a hipótese 2. No entanto a estabilidade desejada (inativação da componente total enzimática) por forma a aumentar o tempo de vida útil do sumo não foi alcançada.

6. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUMO DE MAÇÃ POR MICROONDAS

Devido à resistência à pressão das enzimas envolvidas na alteração do sumo de maçã verificada nos anteriores estudos, sendo esta condição limitativa na eficácia da utilização das altas pressões hidrostáticas como tratamento de estabilização, efetuou-se um estudo de aplicação de microondas como um possível tratamento térmico alternativo/complementar a aplicar. Pretendeu-se compreender se este teria um impacto mais vantajoso ao nível da estabilidade enzimática e de cor, aproximando as características de qualidade ao sumo fresco.

6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A validação do impacto de tratamento térmico através de microondas teve como pressuposto a seguinte hipótese:

Hipótese 3 (H₃): O processamento por microondas (na gama de 87 a 105 °C) é mais eficiente na redução da atividade e/ou inativação das enzimas PPO e PME, comparativamente às altas pressões hidrostáticas, com a capacidade de manutenção das características sensoriais do sumo em níveis semelhantes ao sumo fresco.

Para a validação de H₃ o delineamento experimental teve por base o delineamento DCCR considerando três variáveis independentes. A determinação das amostras necessárias foi efetuada após descodificação da matriz inicial contemplando as variáveis independentes do processo em causa [temperatura do tratamento (T), tempo de rampa (t_R) e tempo de *holding* (t_H)], cujos intervalos de variação foram T: 87 a 105 °C, t_R: 76 a 300 segundos e t_H: 0 a 180 segundos. O estudo incluiu 20 ensaios independentes, em que 8 foram relativos ao planeamento fatorial completo (n_q = 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18 e 19), 6 pontos estrela (n_e = 1, 6, 7, 14, 15 e 20) e 6 repetições do ponto central (n_e = 8, 9, 10, 11, 12 e 13), de acordo com a matriz apresentada na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Matriz das variáveis independentes (T, t_R e t_H) na forma codificada e descodificada.

MATRIZ CODIFICADA			MATRIZ DESCODIFICADA		
A	B	C	TEMPERATURA (°C)	TEMPO DE RAMPA (s)	TEMPO DE HOLDING (s)
-1,6818	0,0000	0,0000	87	188	90
-1,0000	-1,0000	-1,0000	91	121	36
-1,0000	-1,0000	1,0000	91	121	144
-1,0000	1,0000	-1,0000	91	255	36
-1,0000	1,0000	1,0000	91	255	144
0,0000	-1,6818	0,0000	96	76	90
0,0000	0,0000	-1,6818	96	188	0
0,0000	0,0000	0,0000	96	188	90
0,0000	0,0000	0,0000	96	188	90
0,0000	0,0000	0,0000	96	188	90
0,0000	0,0000	0,0000	96	188	90
0,0000	0,0000	0,0000	96	188	90
0,0000	0,0000	0,0000	96	188	90
0,0000	0,0000	1,6818	96	188	180
0,0000	1,6818	0,0000	96	300	90
1,0000	-1,0000	-1,0000	101	121	36
1,0000	-1,0000	1,0000	101	121	144
1,0000	1,0000	-1,0000	101	255	36
1,0000	1,0000	1,0000	101	255	144
1,6818	0,0000	0,0000	105	188	90

Os atributos avaliados (variáveis dependentes) compreenderam as seguintes determinações: atividade das enzimas PPO e PME e a identificação e quantificação do teor em 5-hidroximetilfurfural. A quantificação do 5-hidroximetilfurfural é importante dado tratar-se de um composto resultante da decomposição térmica dos açúcares e poder constituir um bom indicador da implicação negativa do tratamento térmico na qualidade do sumo.

O tratamento de estabilização foi realizado utilizando um forno de microondas (CEM MARS5 SW 846-3051), programado para atuar a uma potência de 300 W em sistema descontínuo. Para cada condição da matriz foram processados 4 vasos de 20 mL de sumo de maçã, por forma a garantir a homogeneidade de incidência das microondas, sendo um deles o vaso-controlo, que possuía o sensor de temperatura para controlo das condições estipuladas, tal como se encontra esquematizado na Figura 6.1. Após o tratamento, as amostras foram rapidamente congeladas a -80 °C de modo a preservar a possível atividade enzimática residual.

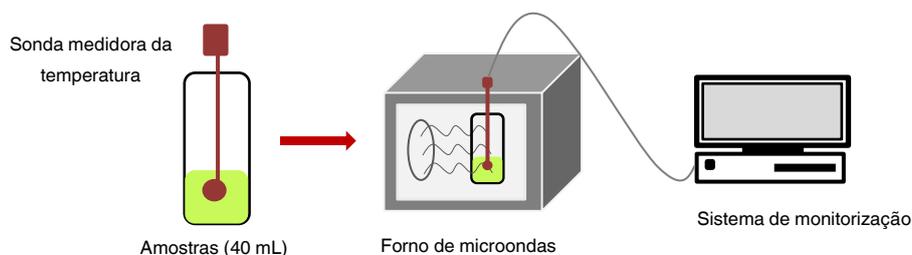


Figura 6.1. Esquema do forno de microondas.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas se apresentam os modelos cujos ajustes foram considerados adequados (r^2 e $r^2_{\text{ajust.}}$ próximos da unidade e diferença entre eles inferior a 1 décima e as variáveis que demonstraram significado estatístico ($p < 0,05$).

6.2.1 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE

O modelo (Eq. 13) que expressa a % de inibição da PPO em função das variáveis independentes em estudo (T , t_R e t_H) apresentaram ajustes adequados, expressos pela falta de ajuste não significativa e erro puro significativo, quer pelos coeficientes de variância próximos da unidade ($r^2 = 0,94$; $r^2_{\text{ajust.}} = 0,89$) e diferença entre eles, inferior a uma décima.

$$\begin{aligned} \text{Inibição da PPO (\%)} = & 1165,782 - 28,201 T + 0,180 T^2 + 1,280 t_R + 0,002 t_R^2 - 0,077 t_H + 0,003 t_H^2 \\ & - 0,019 T * t_R - 0,005 T * t_H + 0,001 t_R * t_H \end{aligned} \quad (\text{Eq. 13})$$

Cerca de 94% da variância total em torno da média é explicada pelas equações do modelo, ficando apenas 6% atribuída a resíduos, sendo a inclusão dos efeitos considerados adequados para a qualidade da previsão das respostas.

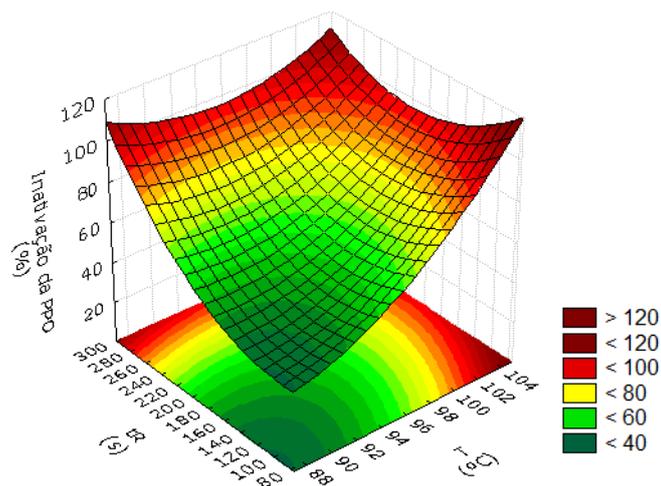


Figura 6.2. Superfície de resposta da variação da % de inativação da PPO em função da temperatura (T) e tempo de rampa (t_R).

Para a gama estudada, assumindo como variáveis independentes a temperatura (T) e o tempo de rampa (t_R), a Figura 6.2 demonstra que a % de inativação da PPO aumenta com os acréscimos T e t_R , de 20 a 100%, tendo sido alcançada a inativação efetiva dentro da gama de tempo e intensidade térmica testada. A inibição efetiva (100%) da PPO é representada pela região mais escura, delimitada para valores de $T = 87\text{ °C}$ e $t_R \geq 280\text{ s}$ e/ou $T \geq 101\text{ °C}$ e $t_R \geq 80\text{ s}$.

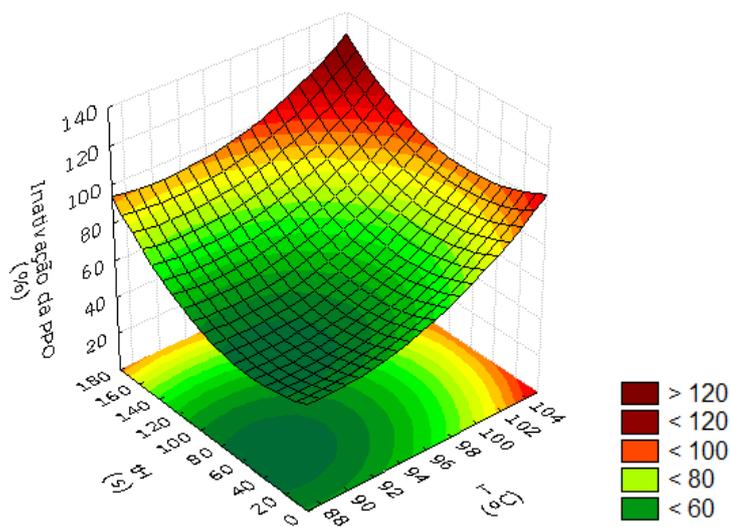


Figura 6.3 Superfície de resposta da variação da % de inativação da PPO em função da temperatura (T) e tempo de *holding* (t_H).

Para a gama estudada, considerando como variáveis independentes a temperatura (T) e o tempo de *holding* (t_H), a Figura 6.3 demonstra que a % de inativação da PPO aumenta com os acréscimos T e t_H , de 20 a 100%, tendo sido alcançada a inativação efetiva dentro da gama de tempo e intensidade

térmica testada. A inibição da atividade da enzima é representada pela zona mais escura do gráfico, em que foi previsto uma inativação da PPO na combinação de T e t_H nas condições extremas do tratamento aplicado ($T = 105\text{ }^\circ\text{C}$ e $t_H = 180\text{ s}$).

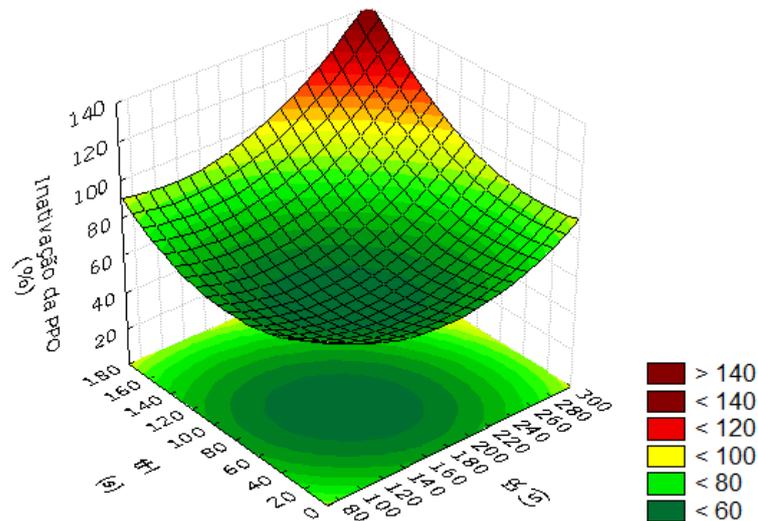


Figura 6.4 Superfície de resposta da variação da % de inativação da PPO em função do tempo de rampa (t_R) e tempo de *holding* (t_H).

Para a gama estudada, assumindo como variáveis independentes o tempo de rampa (t_R) e o tempo de *holding* (t_H), pela Figura 6.4 observa-se uma inativação total da PPO no intervalo das condições estudadas, demonstrando aumentar com os acréscimos t_R e t_H , de 20 a 100%. A inibição da atividade da enzima é representada pela zona mais escura do gráfico, em que foi previsto uma inativação da PPO na combinação de t_R e t_H nas condições extremas do tratamento aplicado.

A efetividade da inibição da PPO foi atingida dentro da gama de temperatura (T), tempo de rampa (t_R) e tempo de *holding* (t_H) testados, sendo a temperatura e o tempo de rampa os parâmetros com maior peso para a eficácia do tratamento ($T = 87\text{ }^\circ\text{C}$ e $t_R > 280\text{ s}$ e/ou $T \geq 101\text{ }^\circ\text{C}$ e $t_R \geq 80\text{ s}$). De salientar que, apesar de se ter atingido a sua inibição completa, desconhece-se se esta está reversível ou irreversivelmente inativada, pois segundo Miyagawa *et al.* (1964) esta situação pode reverter ao longo do tempo de armazenamento.

6.2.2 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE

A análise efetuada para avaliação da inibição da PME demonstrou uma inativação efetiva (100%) em todas as condições de tratamento estudadas.

6.2.3 5-HIDROXIMETILFURFURAL

O modelo (Eq. 14) que expressa a variação da concentração de 5-hidroxiacetilfurfural ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função das variáveis independentes em estudo (T , t_R e t_H), após eliminação dos efeitos t_R^2 e $t_R * t_H$, demonstrou coeficientes de variância aceitáveis ($r^2 = 0,85$; $r^2_{\text{ajust}} = 0,77$), sendo inferior a uma décima a diferença entre si.

$$[\text{5-HMF}] (\mu\text{g.L}^{-1}) = -2.046 + 0,072 T - 0,001 T^2 - 0,013 t_R - 0,006 t_H + 0,001 T * t_R + 0,001 T * t_H$$

(Eq. 14)

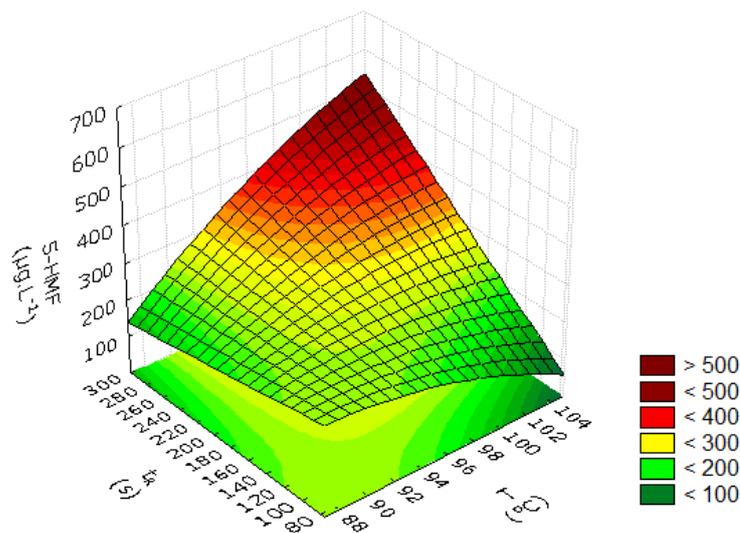


Figura 6.5. Superfície de resposta da variação da concentração de 5-hidroxiacetilfurfural ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função da temperatura (T) e tempo de rampa (t_R).

Assumindo como variáveis independentes a temperatura (T) e o tempo de rampa (t_R), pela interpretação da Figura 6.5 observa-se um aumento da concentração de 5-HMF com o aumento de T e de t_R , de 150 a 550 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os teores mais elevados são expressos pelos tons mais escuros e verificam-se quando $T > 98 \text{ }^\circ\text{C}$ e $t_R > 220 \text{ s}$.

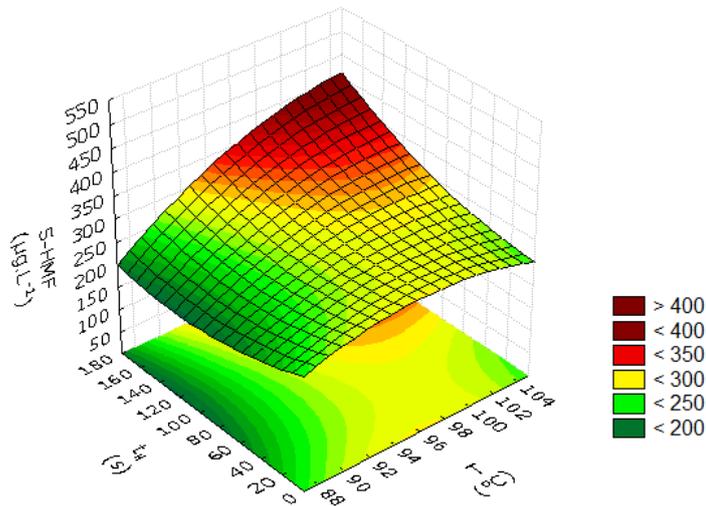


Figura 6.6. Superfície de resposta da variação da concentração de 5-hidroximetilfurfural ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função da temperatura (T) e tempo de *holding* (t_H).

Considerando como variáveis independentes o tempo de *holding* (t_H) e a temperatura (T), pela interpretação da Figura 6.6 observa-se a mesma tendência descrita anteriormente, existindo um aumento proporcional com o aumento de T e, embora com menor expressão, com o aumento de t_H , de 200 a 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os teores mais elevados são expressos pelos tons mais escuros e verificam-se quando $t_H > 120$ s e $T > 96$ °C.

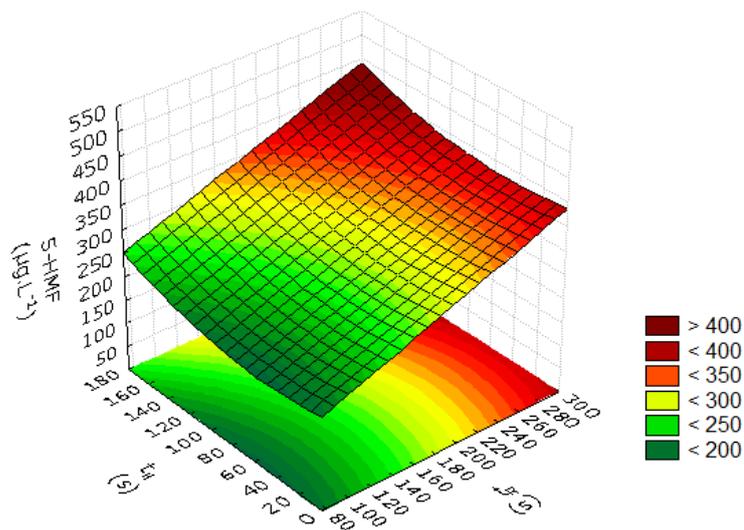


Figura 6.7. Superfície de resposta da variação da concentração de 5-hidroximetilfurfural (mg.L^{-1}) em função do tempo de rampa (t_R) e tempo de *holding* (t_H).

Assumindo como variáveis independentes o tempo de *holding* (t_H) e o tempo de rampa (t_R), pela interpretação da Figura 6.7 observa-se um aumento com os acréscimos de t_R , sendo t_H menos

expressivo nesta evolução, de 150 a 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os teores mais elevados são expressos pelos tons mais escuros e verificam-se quando $t_r > 220$ s. Desta forma pode constatar-se que os parâmetros de temperatura (T) e tempo de rampa (t_r) são os que mais influenciaram na formação deste composto.

Atendendo que a inibição da atividade enzimática da PPO se revelou determinante nas condições dos tratamentos testados, e que esta só foi conseguida quando $T = 87$ °C e $t_r \geq 280$ s e/ou $T \geq 101$ °C e $t_r \geq 80$ s, constata-se que em ambas as condições existiu a formação de 5-HMF numa concentração variável de 150 a 550 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em ambos os casos a formação de 5-HMF excedeu o limiar de deteção reportado por Saison *et al.* (2009), que em cerveja obtiveram um LD de cerca de 35,784 $\mu\text{g.L}^{-1}$ deste composto, o que poderá significar uma desvantagem da utilização das microondas como tratamento alternativo. No entanto mais ensaios deverão ser efetuados no sentido de otimizar os binómios aplicados por forma a melhorar a *performance* do tratamento, encontrando a melhor combinação entre inativação enzimática e qualidade sensorial do sumo de maçã.

De notar ainda, que os tratamentos foram aplicados de forma independente às altas pressões hidrostáticas, porém um estudo mais específico que objetive encontrar uma sinergia entre os dois processos de estabilização poderá ser o caminho para a produção de sumo de maçã com as características semelhantes ao sumo fresco, com a durabilidade de um sumo pasteurizado.

6.3 BALANÇO INTERCALAR

A aplicação de microondas, numa gama de temperatura entre 87 e 105 °C, tempo de rampa entre 70 e 300 s e tempo de *holding* entre 0 e 180 s, promoveu:

- Inativação efetiva (100%) da atividade da polifenoloxidase quando $T = 87$ °C e $t_r \geq 280$ s e/ou $T \geq 101$ °C e $t_r \geq 80$ s;
- Inativação efetiva (100%) da atividade da pectinametilsterase em todas as condições testadas;
- Formação de 5-hidroxiacetilfurfural em concentrações a variar de 150 a 550 $\mu\text{g.L}^{-1}$, acima do seu limiar de deteção (35,784 $\mu\text{g.L}^{-1}$), na gama de inativação efetiva da componente enzimática em estudo.

Desta forma o processamento por microondas, na gama de condições testadas, mostrou-se mais eficaz na redução/inibição efetiva da atividade das enzimas avaliadas, comparativamente às altas pressões hidrostáticas, porém a manutenção das características semelhantes ao sumo fresco ficaram comprometidas devido à formação de 5-hidroxiacetilfurfural acima do seu limiar de deteção.

O tratamento de conservação por altas pressões hidrostáticas (500 MPa, 120 segundos, 18 °C) não se revelou suficiente para a estabilização física, química e bioquímica do sumo de maçã. A adição prévia de 0,1% de ácido ascórbico ao sumo tornou-se essencial e indispensável para a manutenção da cor e da componente bioativa ao longo de 35 dias (4 °C). Nas condições testadas verificou-se:

- Atividade residual da polifenoloxidase de cerca de 65% face à atividade da enzima no sumo fresco. Nos sumos com a adição prévia de 0,1% de ácido ascórbico observou-se uma atividade residual da polifenoloxidase de cerca de 33% face ao sumo fresco;
- Atividade residual da pectinametilesterase de cerca de 15% face à atividade da enzima no sumo fresco;
- O sumo aditivado com 0,1% de ácido ascórbico apresentou conteúdo fenólico e capacidade antioxidante superior face aos valores obtidos no sumo tratado termicamente.

O estudo de otimização da aplicação do tratamento de conservação por altas pressões hidrostáticas (gama de 450 a 600 MPa, 120 segundos, 18 °C, com adição de 0,1% de ácido ascórbico) ao sumo de maçã promoveu uma melhoria na estabilidade do sumo, no entanto a inativação efetiva da componente enzimática não foi alcançada. Nas condições testadas verificou-se:

- Após aplicação do tratamento (0 dias de armazenamento) a atividade residual da polifenoloxidase foi de cerca de 30-40% face à atividade da enzima no sumo fresco quando a pressão aplicada foi de 600 MPa, demonstrando tendencialmente uma diminuição com o aumento do tempo de armazenamento. Esta tendência poderá ser explicada pelo consumo de substrato ao longo do tempo e, por isso, quando $P = 600$ MPa e $t_A = 50$ dias de armazenamento a inibição estimada foi superior a 80%;
- Inibição efetiva (100%) da atividade da pectinametilesterase quando a pressão aplicada foi superior a 580 MPa. A aplicação de $P \geq 580$ MPa e a minimização do tempo intercalar entre duas operações de trituração e tratamento de estabilização poderá melhorar significativamente a qualidade do sumo ao nível da diminuição da atividade da pectinametilesterase e, conseqüentemente, a redução do volume de depósito formado.
- Diminuição do teor de compostos voláteis totais face ao sumo fresco, podendo a aplicação de altas pressões hidrostáticas causar processos de degradação e/ou encapsulamento de aromas. De notar que, tendencialmente, a percentagem relativa de compostos voláteis totais diminuía quanto mais

elevada era a pressão aplicada. Face ao sumo pasteurizado a aplicação de altas pressões hidrostáticas demonstrou-se mais vantajosa na manutenção dos compostos do aroma.

O estudo de otimização das condições de inativação enzimática de sumo de maçã por microondas ($T = 87$ a 105 °C, $t_R = 76$ a 300 segundos, $t_H = 0$ a 180 segundos) como processo alternativo e/ou complementar ao tratamento por altas pressões hidrostáticas revelou eficácia na inativação da componente enzimática envolvida nas alterações do sumo. Nas condições testadas verificou-se:

- Inibição efetiva (100%) da atividade da polifenoloxidase quando aplicado uma temperatura de 87 °C e tempo de rampa ≥ 280 segundos e/ou temperatura ≥ 101 °C e tempo de rampa ≥ 80 segundos;
- Inibição efetiva (100%) da pectinametilesterase em toda a gama de temperatura, tempo de rampa e tempo de *holding* testados;
- Na gama de inativação enzimática existiu a formação de 5-hidroxiacetilfurfural em concentrações a variar de 150 a 550 $\mu\text{g.L}^{-1}$, acima do limiar de deteção considerado ($35,784$ $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Desta forma o tratamento por microondas, na gama de temperatura, tempo de rampa e tempo de *holding* testados, revelou-se mais eficaz na redução/inibição efetiva da atividade das enzimas avaliadas, comparativamente às altas pressões hidrostáticas. Porém a manutenção das características semelhantes ao sumo fresco ficaram comprometidas devido à formação de 5-hidroxiacetilfurfural acima do seu limiar de deteção.

A otimização da utilização das microondas como processo complementar às altas pressões hidrostáticas poderá ser um passo importante na melhoria da conservação de sumo de maçã 100%, aleando o melhor dos dois mundos: características sensoriais semelhantes ao sumo fresco com um período de vida útil mais próximo aos sumos tratados termicamente.

8. SUGESTÕES DE MELHORIA À UNIDADE INDUSTRIAL

Por forma a melhorar a qualidade do sumo de maçã produzido na Frubaça, dado os resultados obtidos e as conclusões retiradas, numa primeira instância poder-se-á:

- Aplicar um nível de pressão mais elevado por forma a inibir a atividade da pectinametilesterase e minimizar a atividade residual da polifenoloxidase;
- Minimizar o tempo que medeia a operação de trituração do fruto e o processo de conservação. Com esta redução poder-se-á minimizar a ação da pectinametilesterase e, conseqüentemente, diminuir o volume de depósito formado.

De notar que, outros estudos deverão ser efetuados por forma a objetivar as melhorias a aplicar.

O trabalho apresentado consiste numa primeira abordagem ao desenvolvimento de eventuais linhas de investigação futuras relativas ao sumo de maçã:

- Avaliação de outras condições do processamento de conservação por altas pressões hidrostáticas, analisando outras variáveis passíveis de serem modeladas no processo, como o tempo e a temperatura de aplicação do tratamento;
- Estudo da implicação do tempo que decorre entre a operação de trituração do fruto e o processo de conservação;
- Análise detalhada dos compostos voláteis (GC) que conferem a componente aromática do sumo, identificando os compostos presentes, a sua concentração absoluta mediante a injeção de um padrão interno de concentração conhecida, bem como a sua origem (fruto *vs* processamento);
- Análise detalhada dos compostos que conferem o sabor do sumo (HPLC), identificando a sua concentração absoluta através da injeção de um padrão interno de concentração conhecida bem como a origem (fruto *vs* processamento)
- Estudo da viabilidade da aplicação das microondas como processo de conservação alternativo ou complementar à aplicação de altas pressões hidrostáticas, modelando um espectro diferente de temperatura, tempo de rampa e tempo de *holding*, por forma a inativar a componente enzimática sem implicações nos parâmetros sensoriais original do sumo fresco e a promoção de um tempo de vida útil semelhante ao sumo tratado termicamente.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J.B., Almeida, D.P.F., Bautista-Ortín, A.B., Bayindirli, A., Romaro-Cascales, I., Castaldo, D., Cautela, D., Ceci, L.N., Egea, I., Ferreira, D.C.M., Giovane, A., Gokmen, V., Gómez-Plaza, E., Goulao, L.F., Kubota, L.T., Lozano, J.E., Mello, L.D., Mendes, R.K., Oey, I., Oliveira, C.M., Parenicová, L., Pretel, M.T., Romojaro, F., Roubos, J.A., Sánchez-Bel, P., Servillo, L., Song, J., Berg, M.A. (2010) *Enzymes in fruit and vegetables processing – chemistry and engineering applications*. Alev Bayindirli, New York.

Anese, M., Nicoli, M.C., Dall'aglio, G., Lerici, C. (1995) *Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities*. **Journal Food Biochemistry**, v. 18, p. 285-293

Anuário Nielsen – Food (2010)

Arteaga, G.E., Li Chan, E., Vazquez-Arteaga, M.C., Nazaki, S. (1994) *Systematic experimental designs for product formula optimization*. **Trends of Food Science and Technology**, v. 5(8), p. 243-254

Balasubramaniam, V.M., Farkas, D. (2008a) *High-pressure Food Processing*. **Food Science and Technology International**, v. 14(5), p. 413-418

Balasubramaniam, V.M., Farkas, D., Turek, E.J. (2008b) *Preserving foods through high-pressure processing*. **Food Technology**, p. 33-37

Barba, F.J., Esteve, M.J., Frígola A. (2013) *Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing*. **Food Research**, v. 50(2), p. 545-549

Barba, F.J., Esteve, M.J., Frígola, A. (2012) *High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 307-322

Barbosa-Cánovas, G.V., Juliano, P. (2008) *Food sterilization by combining high pressure and thermal energy*. In: Gutiérrez-López, G.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., Parada Arias, E., editors. *Food engineering: Integrated approaches*. New York: Springer, p. 9-46

Barbosa-Cánovas, G.V., Rodríguez, J.J. (2002) *Update on nonthermal food processing technologies, irradiation and ultrasound*. **Food Australia**, v. 54, p. 11-19

Baron, A., Dénes, J., Durier, C. (2006) *High-pressure treatment of cloudy apple juice*. **LWT-Food Science Technology**, v. 39(9), p. 1005-1013

- Basak, S. (2001) *Studies on high-pressure processing of orange juice: Enzyme inactivation, microbial destruction, and quality changes, process verification and storage*. PhD Thesis, McGill University, Canada
- Black, E.P., Setlow, P., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Kelly, A.L., Hoover, D.G., (2007) *Response of spores to high-pressure processing*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6(4), p. 103-119
- Bolin, H.R., Huxsoll, C.C. (1991) *Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling*. **Journal of Food Science**, v. 56(2), p. 416-418
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) *Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30.
- Bull, M.K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea D., Paramanandhan, P., Stockman R., Sellahewa, J., Szabo, E.A., Johnson, R.L., Stewart, C.M. (2004) *The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of valencia and navel orange juice*. **Innovative Food Science Emerging Technology**, v. 5, p. 135-149
- Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Carpi, G., Galassi, S. (2000) *Effects of high hydrostatic pressure processing and of glucose oxidase-catalase addition on the colour stability and sensorial score of grape juice*. **Food Science Technology**, v. 6, p. 17-23
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., Basak, T. (2013) *Microwave food processing – a review*. **Food Research International**, v. 52, p. 243-261.
- Considine, K.M., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Sleator, R.D. (2008) *High-pressure processing – effects on microbial food safety and food quality*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281(1), p. 1-9
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B. (2008) *Extraction of anthocyanins from grape by products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9(1), p. 85-91
- Cortés, C., Esteve, M., Frigola, A. (2008) *Color of orange juice treated by high intensity pulsed electric fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice*. **Food Control**, v. 19, p. 151-158
- Crues, W.V. (1924) *Commercial Fruit and Vegetables Products*. **New York: McGraw-Hill**
- Daoudi, L., Quevedo, J.M., Trujillo, A.J., Capdevila, F., Bartra, E., Mínguez, S., Guamis, B. (2002) *Effects of high-pressure treatment on the sensory quality of white grape juice*. **High Pressure Research**, v. 22, p. 705-709

- Datta, A.K., (2003) *Microwave food preservation*. In: D. R. Heldman (Ed) *Encyclopedia of Agricultural, Food and Biological Engineering*, p. 657-661. New York.
- Dede, S., Alpas, H., Bayindirli, A. (2007) *High hydrostatic pressure treatment and storage of carrots and juices: antioxidante activity and microbial safety*. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 85, p. 790-796
- Del Pozo-Insfran, D., Del Follo-Martínez, A., Talcott, S.T., Brenes, C.H. (2007) *Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure*. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 3267-3274
- Deliza, R., Rosenthal, A., Abadio, F.B.D., Silva, C.H.O., Castillo, C. (2005a) *Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers*. **Journal Food Engineering**, v. 67, p- 241-246
- Deliza, R., Rosenthal, A., Silva, A.L.S. (2005b) *Consumer attitudes towards informations on non-conventional technology*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p. 43-49
- Dixon, J., Hewett, E.W. (2000) *Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 28, p. 155-173
- Esteve, M.J., Frígola, A. (2008) *The effects of termal and nonthermal processing on vitamin C, carotenoids, phenolic compounds and total antioxidante capacity in orange juice*. **Tree and Foresting Science and Biotechnology**, p. 128-134
- Farkas, D.F., Hoover, D.G. (2000) *High pressure processing*. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 47-64
- Fernández-García A., Butz, P., Bognàr A., Tauscher, B. (2001) *Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging*. **European Food Research Technology**, v. 213, p. 290-296
- Férnandez-García, A., Butz, P., Tauscher, B. (2000) *Does the antioxidant potential of high pressure treated apple juice change during the storage?* **High Pressure Research**, v. 19, p. 543-550
- Ferrari, G., Maresca, P., Ciccarone, R. (2011) *The effects of high hydrostatic pressure on the polyphenols and anthocyanins in red fruit products*. **Procedia Food Service**, v. 1, p. 847-853
- Fryer, P., Versteeg, C. (2008) *Processing technology innovation in the food industry*. **Innovation: Management, Policy & Practice**, v. 10, p. 74-90

- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M., Hugas, M. (2002) *Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage*. **Food Microbiology**, v. 19, p. 509-518
- Gokmen, V., Acar, J. (1999) *Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reserved-phase liquid chromatography*. **Journal of Chromatography**, v. 847, p. 69-74
- Gui, F. Q., Wu, J., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., Wang, Z. (2007). *Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide*. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1678-1685
- Guo, J., Yue, T., Yuan, Y. (2012) *Feature selection and recognition from nonspecific volatile profiles for discrimination of apple juices according to variety and geographical origin*. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 1090-1096
- Heinz, V., Knoch, A., Lickert, T. (2009) *Product innovation by high pressure processing*. **New Food**, v. 2, p. 43-44
- Hendrickx, M., Knorr, D. (2002) *Ultra high pressure treatments of foods*. New York, United States: Kluwer Academic/plenum Publishers, p. 55-76
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Broeck, I.V.D., Weemaes, C. (1998) *Effects of high pressure on enzymes related to food quality*. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 197-203
- Hite, B.H., Giddings, N.J., Weakly, C.E. (1914) *The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables*. **West Virginia Agriculture Experimental Station Bulletin**, v. 146, p. 1-67.
- Hogan, E., Kelly, A.L., Sun, D.W. (2005) *High pressure processing of foods: an overview*. **Emerging Technologies for Food Processing**, p. 3-32
- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M., Martínez-Navarrete, N. (2010) *Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice*. **Food Chemistry**, v. 118, p. 291-299
- Indrawati, Loey, A.V., Hendrickx, M. (2004) *Pressure and temperature stability of water-soluble antioxidants in orange and carrot juice: a kinetic study*. **European Food Research and Technology**, v. 219(2), p. 161-166
- Kadam, P.S., Jadhav, B.A., Salve, R.V., Machewad, G.M. (2012) *Review on the high pressure technology (HPT) for food preservation*. **Food Processing and Technology**, v. 3(1), p. 1000135

- Kimball, D.A. (1991) *Citrus processing – quality control and technology*. New York: Van Nostrand Reinhold
- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., Schoessler, K. (2011) *Emerging technologies in food processing*. **Annual Reviews Food Science Technology**, v. 2, p. 203-235
- Komthong, P., Igura, N., Shimoda, M. (2007) *Effect of ascorbic acid on the odours of cloudy apple juice*. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1342-1349
- Linnemann, A.R., Meerdink, G., Meulenber, M.T.G., Jongen, W.M.F. (1999) *Consumer-oriented technology development*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 409-414.
- Mathys, A.M. (2008) *Inactivation mechanisms of Geobacillus and Bacillus spores during high pressure thermal sterilization*. **Technischen Universitat Berlin**, v. 177
- Mattheis, J.P., Fellman, J.K. (1999) *Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables*. **Postharvest Biology Technology**, v. 15, p. 227-232
- Mertens, B., Deplace, G. (1993) *Engineering aspects of high pressure technology in the food industry*. **Food Technology**, v. 47(6), p. 164-169
- Meyer, R.S., Cooper, K.L., Knorr, D., Lelieveld, H.M.L. (2000) *High pressure sterilization of foods*. **Food Technology**, v. 54, p. 67-72.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000) *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer*. **Pharmacological Reviews**, v. 52(4) p. 673-751.
- Miyagawa, K., Sanno, K., Suzuki, K. (1964) *Studies on taka-amylase A under high pressure treatment*. **Biochemistry and Biophysics**, v. 106, 467-474
- Montgomery, D.C. (1991) *Design and analysis of experiments*. 3rd Edition, John Wiley and Sons, New York
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Tonello-Samson, C., Welti-Chanes, J., Torres, J.A. (2011) *High pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods*. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 969-985
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. (1994) *Enzymatic browning reactions in apple and apple products*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 109-157

- Niu, S., Xu, Z., Fang, Y., Zhang, L., Yang, Y., Liao, X, Hu, X. (2010) *Comparative study on cloudy apple juice qualities from apple slices treated by high pressure carbon dioxide and mild heat*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 91-97
- Nogueira, A., Santos, L.D., Wiecheteck, F.V.B., Guyot, S., Wosiacki, G. (2003) *Processing effects on the content of phenol compounds in apple juice*. **UEPG**, v. 9(3), p. 7-14
- Norton, T., Sun, D.W. (2008) *Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry*. **Food Bioprocess Technology**, v. 1, p. 2-34
- Oey, I., Plancken, I.V., Loey, A.V., Hendrickx, M. (2008) *Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems?* **Trends in Food Science and Technology**, 19(6), 300-308
- Parish, M.E. (1998) *Orange juice quality after treatment by thermal pasteurization or isostatic high pressure*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 31, p. 439-442
- Patterson, M.F. (2005) *Microbiology of pressure-treated foods*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1400-1409
- Perédi, K., Vamos-Vigyazo, L., Kiss-Kutz, N. (1981) *Flavor losses in apple juice manufacture*. **Nahrung. Food**, v. 25, p. 573-582
- Polydera, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2003) *Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstituted orange juice*. **Journal of Food Engineering**, v. 60(1), p. 21-29
- Polydera, A.C., Stoforos, N.G., Taouski, P.S. (2005) *Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh navel orange juice: nutritional parameters and shelf life*. **Innovative Food Science Emerging Technology**, v. 6, p. 1.9
- Porreta, S., Birzi, A., Ghizzoni, C., Vicini, E. (1995) *Effects of ultra-high hydrostatic pressure treatments on the quality of tomato juice*. **Food Chemistry**, v. 55(1), p. 35-41
- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjan, K., Knorr, D. (2007) *Opportunities and challenges in high pressure processing of foods*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.112, p. 47-69
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., Brunton, N. (2011) *Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances*. **Food Research International**, v. 44, p. 1875-1887

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) *Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 185-194
- Reis, S.F.A.R., Rocha, S.M., Barros, A.S., Delgadillo, I., Coimbra, M.A. (2009) *Establishment of the volatile profile of "Bravo de Esmolfe" apple variety and identification of varietal markers*. **Food Chemistry**, v. 113, p. 513-521
- Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011) *Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review*. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1251-1260
- Riahi, E., Ramaswamy, H.S. (2003) *High-pressure processing of apple juice: kinetics of pectinase inactivation*. **Biotechnology**, v. 19, p. 908-914
- Riu-Aumatell, M., Castellari, M., López-Tamames, E., Galassi, S., Buxaderas, S. (2004) *Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS*. **Food Chemistry**, v. 87, p. 627-637
- Rocha, A.M.C.N., Morais, A.M.M.B. (2001). *Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from "Jonagold" apple*. **Food Control**, v. 12(2), p. 85-90
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.D. (2006) *Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)*. **Comunicado técnico nº 125**. Embrapa.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.D. (2007) *Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. **Comunicado técnico nº 127**, Embrapa.
- Saison, D., Schutter, D.P., Uyttenhove, B., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2009) *Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1206-1215.
- Salazar-González, C., Martín-González, M.F.S., López-Malo, A., Sosa-Morales, M.E. (2012) *Recent studies related to microwave processing of fluid foods*. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 31-46
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De-Ancos, B., Martín-Belloso, O., Cano, M.P. (2005) *Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4403-4409

- San-Martín, M.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (2002) *Food processing by high hydrostatic pressure*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42(6), p. 627-645
- StatSoft, Inc., STATISTICA (data analysis software system), version 7 (www.statsoft.com)
- Su, S.K., Wiley, R.C. (1998) *Changes in apple juice flavor compounds during processing*. **Journal of Food Science**, v. 63(4), p. 688-691
- Suárez-Jacobo, A., Rufer, C.E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X., Saldo, J. (2011) *Influence of ultra-high pressure homogenization on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice*. **Food Chemistry**, v. 127, p. 447-454
- Swain, T., Hillis, W.E. (1959) *The phenolic constituents of Prunus domestica I – The quantitative analysis of phenolic constituents*. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 10, p. 63-68
- Tajchakavit, S., Ramaswamy, H.S., Ramaswamy, H.S. (1997) *Thermal vs. microwave inactivation kinetics of pectinmethylesterase in orange juice under batch mode heating conditions*. **Lebensmittel Wissenschaftund Technologie**, v. 30(1), p. 85-93
- Takahashi, F., Pehrsson, P.E., Rovere, P., Squarcina, N. (1998) *High pressure processing of fresh orange juice*. **Industria Conserve**, v. 73(4), p. 363-368
- Tewari, G. (2007) *Advances in thermal and non-thermal food preservation: chapter 5 "Microwave and Radio-Frequency Heating*. Gaurav Tewari, Vijay K. Juneja. Blackwell Publusing, Iowa, USA.
- Ting, E., Balasubramaniam, V.M., Raghubeer, E. (2002) *Determining thermal effects in high pressure processing*. **Food Technology**, v. 56, p. 31-35
- Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J. (2009) *Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices*. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 137-145
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., Knorr, D. (2006) *Review: Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing*. **Food Reviews International**, v. 22, p. 405-423
- Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C. (2001) *Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.18, p. 853-876
- Tortoe C., Orchard, J., Beezer, A. (2007) *Prevention of enzymatic browning of apple cylinders using different solutions*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 1475-1481

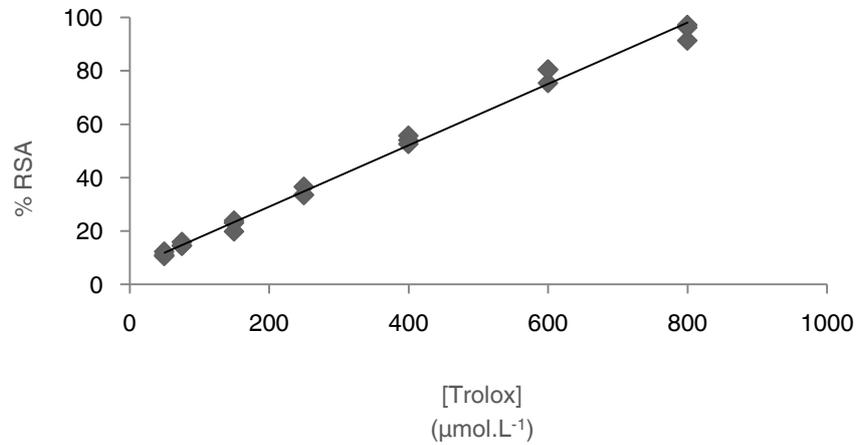
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., Khanizadeh, S. (2005) *Which polyphenol compounds contribute to the total antioxidant activities of apple?*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53(12), p. 4989-4995
- Vadivambal, R., Jayas, D.S. (2010) *Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials – a review*. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 161-171
- Vaikousi, H., Koutsoumanis, K., Biliaderis, C. (2008) *Kinetic modeling of non-enzymatic browning of apple juice concentrates differing in water activity under isothermal and dynamic heating conditions*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 785-796
- Valdramidis, V.P., Geeraerd, A.H., Poschet, F., Ly-Nguyen, B., Van-Opstal, I., Van-Loyed, A.M., (2007) *Model based process design of the combined high pressure and mild heat treatment ensuring safety and quality of a carrot simulant system*. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1010-1021
- Valdramidis, V.P., Graham, W.D., Beattie, A., Linton, M., McKay, A., Fearon, A.M., Patterson, M.F. (2009) *Defining the stability interfaces of apple juice: Implications on the optimization and design of high hydrostatic pressure treatment*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 396-404
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006) *Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht: Springer.
- Welti-Chanes, J., Lopez-Malo, A., Palou, E., Bermudez, D., Guerrero-Beltran, J.A., Barbosa-Cánovas, G.V. (2005) *Fundamentals and applications of high pressure processing to foods*. **Novel Food Processing Technologies**, p. 157-181
- Wilinska, Al., Rodrigues, A.S.F., Bryjak, J., Polakovie, M. (2008) *Thermal inactivation of exogenous pectin methylesterase in apple and cloudberry juices*. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 459-465
- Will, F., Bauckhage, K., Dietrich, H. (2000) *Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices*. **European Food Research and Technology**, v. 211(4), p. 291-297
- Yaldagard, M., Mortazavi, S.A., Tabatabaie, F (2008) *The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: a review of microbiological and quality aspects*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7(16), p. 2739-2767
- Zhang, C., Trierweiler, B., Li, W., Butz, P., Xu, Y., Rufer, C.E., Maa, Y., Zhao, X. (2011) *Comparison of thermal, ultraviolet-c and high pressure treatments on quality parameters of watermelon juice*. **Food Chemistry**, v. 126, p. 254-260

Zhu, J., Kuznetsov, A.V., Sandeep, K.P. (2007) *Mathematical modeling of continuous flow microwave heating of liquids (effects of dielectric properties and design parameters)*. **International Journal of Thermal Sciences**, v. 46, p. 328-341

ANEXOS

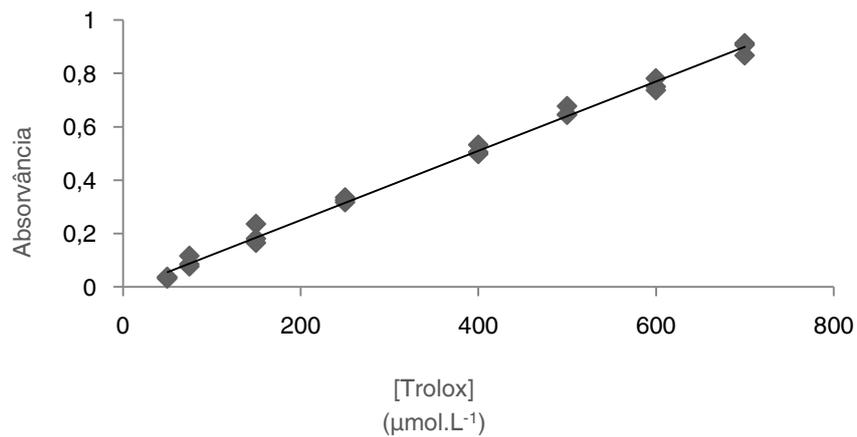
CURVAS DE CALIBRAÇÃO

- Curva de calibração utilizada na metodologia de capacidade antioxidante segundo método de captura do radical livre DPPH



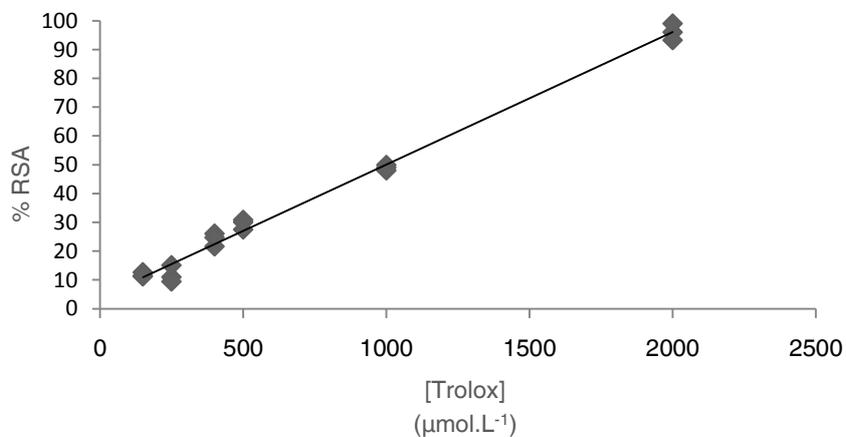
$$\% \text{ RSA} = 0,115 \text{ AA}_{\text{DPPH}} + 6,1092$$
$$r^2 = 0,9923$$

- Curva de calibração utilizada na metodologia de capacidade antioxidante segundo método de redução do ferro (FRAP):



$$\text{Absorvância} = 0,0013 \text{ AA}_{\text{FRAP}} - 0,0094$$
$$r^2 = 0,9951$$

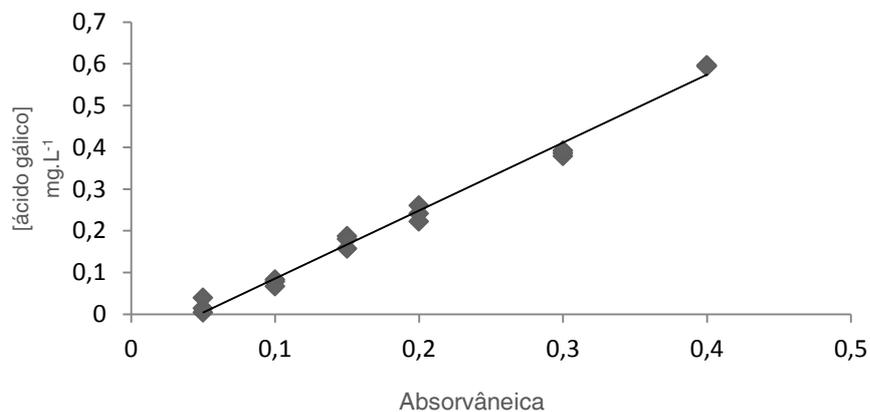
- Curva de calibração utilizada na metodologia de capacidade antioxidante segundo método de captura do radical livre ABTS:



$$\% \text{ RSA} = 0,046 \text{ AA}_{\text{ABTS}} + 4,0804$$

$$r^2 = 0,9918$$

- Curva de calibração utilizada na metodologia de medição do conteúdo fenólico total:



$$[\text{ácido gálico}] = 1,628 \text{ Abs.} - 0,0771$$

$$r^2 = 0,9903$$

Tabela A. Matriz de resultados que reportam os resultados do capítulo 5 – Otimização das condições de processamento de sumo de maçã por altas pressões hidrostáticas.

PRESSÃO (MPa)	TEMPO DE ARMAZENAMENTO (dias)	FENÓIS TOTAIS (mg GAE.L ⁻¹)	COR						PME (μmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹)	PPO (Abs.min ⁻¹ .ml ⁻¹)
			L	a	b	c	h	WI		
525	0	0,5304	95,11	1,72	6,98	7,18	1,33	91,314	0,0463	19,075
472	9	0,4240	96,25	1,32	5,57	5,72	1,34	93,157	0,0306	17,290
578	9	0,4084	95,12	1,62	6,46	6,65	1,33	91,747	0,0362	15,365
450	30	0,6753	95,95	0,97	4,19	4,30	1,35	94,090	0,0807	47,005
525	30	0,4917	96,03	1,14	4,71	4,84	1,33	93,740	0,0458	23,240
525	30	0,5753	94,79	0,62	3,97	4,02	1,42	93,425	0,0382	29,785
525	30	0,4696	98,17	0,63	3,72	3,77	1,40	95,809	0,0433	21,350
525	30	0,4084	97,07	0,88	4,30	4,39	1,38	94,722	0,0349	30,450
600	30	0,5482	98,31	0,50	3,09	3,13	1,41	96,444	0,0287	15,435
472	51	0,4021	98,89	0,33	2,86	2,88	1,46	96,912	0,0358	17,045
578	51	0,4360	99,39	0,32	2,89	2,91	1,46	97,031	0,0314	17,885
525	60	0,4183	98,01	0,63	3,60	3,66	1,40	95,839	0,0294	14,035

Tabela B. Matriz de resultados que reportam os resultados do capítulo 6 – Otimização das condições de inativação enzimática de sumo de maçã por microondas.

TEMPERATURA (°C)	TEMPO DE RAMPA (s)	TEMPO DE HOLDING (s)	PME ($\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	PPO ($\text{Abs.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$)	5-HMF (mg.mL^{-1})	SACAROSE (mg.mL^{-1})	GLUCOSE (mg.mL^{-1})	FRUTOSE (mg.mL^{-1})
87	188	90	0	34,23	0,134	9,978	21,026	71,291
91	121	36	0	28,82	0,847	7,416	29,653	77,396
91	121	144	0	23,63	0,278	12,590	26,100	77,336
91	255	36	0	17,22	0,302	5,714	26,367	66,838
91	255	144	0	1,89	0,233	18,118	26,821	83,869
96	76	90	0	27,09	0,229	17,420	24,294	74,253
96	188	0	0	25,62	0,229	6,545	30,368	70,445
96	188	90	0	27,83	0,467	6,038	31,180	86,273
96	188	90	0	26,99	0,255	5,994	28,481	82,064
96	188	90	0	24,42	0,207	8,034	35,059	91,836
96	188	90	0	23,84	0,277	5,824	29,501	75,878
96	188	90	0	23,94	0,521	6,115	29,857	82,057
96	188	90	0	25,79	0,495	4,635	32,717	71,901
96	188	180	0	0	0,099	4,245	29,221	74,304
96	300	90	0	0	1,427	3,956	29,814	74,218
101	121	36	0	6,93	0,196	8,784	36,246	95,025
101	121	144	0	5,99	0,468	8,597	31,967	84,525
101	255	36	0	12,92	0,245	5,987	32,451	85,839
101	255	144	0	0	0,663	6,633	41,687	83,342
105	188	90	0	0	0,040	7,129	37,721	80,382