



**Sara Sofia
da Graça Pato**

**Concentrado de maçã: otimização
enzimática/deteção de *Alicyclobacillus***



**Sara Sofia
da Graça Pato**

**Concentrado de Maçã: otimização
enzimática/deteção de *Alicyclobacillus***

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho Pós-Doutorada do QOPNA, Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Engenheiro Oswaldo António Sancho Trabelo, Diretor Geral da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo incansável apoio.

o júri

presidente

Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Dulcineia Maria de Sousa Ferreira Wessel
professora adjunta do Departamento de Indústrias Alimentares da Escola Agrária de Viseu

agradecimentos

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

Um agradecimento muito especial aos meus pais e ao meu núcleo familiar que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, permitindo-me a oportunidade de concretizar o percurso académico que mais desejava.

Ao Professor Manuel António Coimbra e à Doutora Elisabete Coelho gostaria de agradecer a disponibilidade e o apoio prestado para a realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Oswaldo Trabulo pela oportunidade que me proporcionou de poder realizar este estágio na empresa, assim como apoio prestado.

A todos os colaboradores da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A. pela excelente receção e simpática. Gostaria deixar um especial agradecimento à Engenheira Andreia Lopes pelo apoio e amizade ao longo dos últimos nove meses.

A todos os meus amigos e colegas com quem me cruzei ao longo dos últimos anos académicos, pois também eles contribuíram para aquilo que sou hoje. Um especial agradecimento à minha amiga de sempre, Márcia Silva, pelo apoio e amizade.

palavras-chave

Concentrado de sumo de maçã, turbidez, amilases, pectinases, otimização enzimática, *Alicyclobacillus*.

resumo

Em Portugal, a maçã representa um dos principais frutos frescos consumidos e produzidos. A fruta que não é consumida em fresco, por exemplo, as maçãs de baixo calibre são canalizadas para a produção de concentrado de sumo.

Para avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do sumo concentrado de maçã são realizadas análises do grau Brix (70-71 °Brix) e do valor de turbidez (< 3,0 NTU). Sob o ponto de vista microbiológico salienta-se a análise de bolores e leveduras, contagens totais de microrganismos aeróbios e de *Alicyclobacillus*, um microrganismo não patogénico e deteriorativo.

Este trabalho de estágio, desenvolvido na Indumape, Industrialização de Fruta, S.A., teve como principais objetivos a otimização enzimática a fim de reduzir os valores de turbidez, bem como o desenvolvimento de uma metodologia que permite implementar na empresa um método reprodutível para pesquisar a presença de *Alicyclobacillus*.

A elevada turbidez relaciona-se com a presença de amido e de polissacarídeos pécnicos no concentrado de sumo de maçã. A análise a açúcares e ácidos urónicos realizada no decorrer deste trabalho a concentrados com valores distintos de turbidez (1,64 NTU e 5,44 NTU), permitiu concluir que um dos principais fatores de diferenciação entre os valores de turbidez é a elevada concentração de açúcares, nomeadamente o ácido urónico, arabinose, galactose e glucose. Este facto sugere a presença de pectina altamente ramificada e amido no concentrado com valor mais elevado de turbidez.

Pela análise dos registos enzimáticos utilizados no período da campanha (setembro a dezembro de 2013) foi possível rastrear quais as enzimas utilizadas neste período, as amilases Distizym AG e Amilase AG 300L. A Distizym AG está frequentemente associada aos valores mais elevados de turbidez. Determinou-se a atividade enzimática variando os valores de pH e temperatura. Os resultados permitiram concluir que para os mesmos valores de pH e temperatura ótima, a pH 4,0 e a 50°C, a atividade média enzimática da Amilase AG 300L (465,5 µmol/min) é sensivelmente o dobro da atividade da amilase Distizym AG (235,3 µmol/min), o que sugere um menor rendimento enzimático da Distizym AG.

Para a deteção do *Alicyclobacillus* foram testados diferentes diluições do concentrado, temperaturas e tempos de incubação. Após a realização destes ensaios foi possível elaborar um procedimento de deteção, pela diluição de 1:10 do concentrado de sumo, à temperatura ambiente por um período mínimo de 24h e um posterior período de incubação a 45°C. Para além disso, estabeleceu-se um protocolo de confirmação, que é aplicável no imediato com os recursos atuais da empresa.

keywords

Apple juice concentrate, turbidity, amylases, pectinases, enzymatic optimization, *Alicyclobacillus*.

abstract

In Portugal, apples represent one of the most consumed and produced fresh fruits. In the case of fruits that are not consumed in fresh, for instance, due to its low caliber, they are used for the production of concentrated juice.

To evaluate the physicochemical and microbiological characteristics of apple juice concentrate, several analyses were carried out, such as determination of Brix degree (70-71°Brix) and turbidity (< 3,0 NTU). The microbiological studies concerned the analysis of yeasts and molds, total counts of the aerobic microorganisms and the *Alicyclobacillus*, a deteriorating and non-pathogenic microorganism.

This thesis, developed in Indumape, Industrialização de Fruta, S.A., had as main objectives the optimization of enzymatic processes in order to reduce the turbidity of apple juice concentrate, as well as the development and implementation of a reproducible methodology that allows detection of *Alicyclobacillus*.

The high turbidity values are related to the presence of pectic polysaccharide and starch in apple juice concentrate. During the present work analysis of sugar and uronic acids was done to juice concentrates with different values of turbidity (1.64 NTU and 5.44 NTU), these results allowed to conclude that major differences between the turbidity values were related to the sugar composition, namely uronic acid, arabinose, galactose and glucose. These results suggest the presence of a high branched pectin and starch in the apple juice concentrate with higher turbidity.

With the analysis of the enzymatic records that were used during the campaign period (September to December 2013) it was possible to identify which enzymes were used in this period: amylases Distizym AG and AG 300L. The enzyme activity was determined by changing the pH values and temperature. The results showed that for the same optimal pH and temperature values, at pH 4.0 and 50°C, the average activity of Amylase AG 300L (465.5 µmol/min) was almost twice of the Distizym AG activity (235.3 µmol/min), which suggests a lower enzymatic yield of the Distizym AG.

For the detection of *Alicyclobacillus* different dilution of concentrate, temperatures and incubation times were tested. After these tests it was possible to develop a procedure for *Alicyclobacillus* detection, by diluting in 1:10 the juice concentrate at room temperature for a minimum period of 24 hours and a subsequent incubation at 45°C. In addition, a confirmation protocol was established that is applicable immediately with the current resources of the company.

Índice Geral

I.	APRESENTAÇÃO DA ENTIDADE DE ACOLHIMENTO.....	1
1.	Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.	2
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.	Maçã.....	4
a.	Distribuição geográfica.....	5
b.	Maçã em Portugal	6
c.	Principais espécies em Portugal	7
2.	Principais polissacarídeos.....	8
a.	Polissacarídeos pécticos.....	8
b.	Amido	14
3.	O amadurecimento e a sua influência sobre o processo de produção industrial de sumos de fruta	17
4.	Sumo de Maçã.....	21
a.	Definição de sumo de fruta.....	21
b.	Etapas do Processo de produção de concentrado de sumo de maçã	22
5.	Pontos críticos de controlo no processo de produção de concentrado de sumo de fruta	26
6.	<i>Alicyclobacillus</i> spp.....	27
a.	Métodos de deteção e quantificação de <i>Alicyclobacillus</i>	29
7.	Objetivos do trabalho de estágio	31
III.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
1.	Amostras de maçã utilizadas.....	33
2.	Caracterização físico-química do concentrado de sumo de maçã.....	33
a.	Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix)	33
b.	Determinação da turbidez.....	34
c.	Determinação da cor e da claridade	35
d.	Determinação do pH	35
e.	Determinação da acidez.....	36
3.	Análise de açúcares.....	36
f.	Hidrólise ácida	37

g.	Redução e acetilação.....	37
h.	Análise por GC-FID.....	38
4.	Análise de ácidos urónicos	38
5.	Análise enzimática.....	39
a.	Enzimas.....	39
b.	Determinação da atividade enzimática das amilases pelo método de DNS.....	39
c.	Curva de calibração dos açúcares redutores	39
d.	Determinação da atividade enzimática.....	40
6.	Análise Microbiológica	40
a.	Colheita da amostra	41
b.	Determinação de Bolores e Leveduras e contagens totais	41
c.	Determinação de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	42
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
1.	Análises físico-químicas.....	45
2.	Análise de Ácidos Urónicos e Açúcares.....	46
3.	Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática	49
4.	Estudo microbiológico.....	53
4.1	Análise microbiológica	53
4.2	Metodologia de deteção de <i>Alicyclobacillus</i> e confirmação/distinção entre <i>A. acidoterrestris</i> e <i>A. acidocaldarius</i>	58
a.	<i>Metodologia de deteção da presença de Alicyclobacillus</i>	58
b.	<i>Metodologia de confirmação/distinção de A.acidoterrestris e A.acidocaldarius</i>	58
V.	CONCLUSÃO.....	59
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	61
VII.	ANEXOS	68
A	– Curva de Calibração de glucose	69
B	– Atividade enzimática a 25°C da Distizym AG e da Amilase AG 300L, a diferentes gamas de pH	70
C	– Atividade enzimática variando a gama de temperatura, mantendo o pH 4,0 no caso da Amilase AG 300L e pH 4,5 no caso da Distizym AG.....	73
D	– Atividade enzimática da Distizym AG e da Amilase AG 300L a 50°C, variando os valores de pH	77

Índice de Figuras

Figura 1 Representação esquemática da estrutura de uma maçã.	4
Figura 2 Mapa representativo com as latitudes com maior produção de maçã.	5
Figura 3 Principais áreas de produção de maçã em Portugal Continental.	6
Figura 4 Calendário de produção/comercialização da maçã em Portugal	7
Figura 5 Representação esquemática da interação dos iões de cálcio com sequências de poligalacturonato.	9
Figura 6 Representação esquemática da estrutura da pectina	9
Figura 7 Estrutura da homogalacturonana e representação dos locais de metil-esterificação e O-acetilação	10
Figura 8 Estrutura da xilogalacturonana.	11
Figura 9 Estrutura de uma cadeia de RG-I e as suas ramificações	11
Figura 10 Estrutura da RG-II e as suas ramificações	12
Figura 11 Modo de ação das pectinases sobre uma molécula de pectina	13
Figura 12 Estrutura da amilose. A. Estrutura helicoidal da amilose em forma cristalina. B. Representação da estrutura primária da amilose.	15
Figura 13 Estrutura da amilopectina. A. Estrutura da amilopectina na forma cristalina. B. Representação da estrutura primária da amilopectina	16
Figura 14 Alterações no diâmetro e na firmeza da maçã.	17
Figura 15 Alterações na atividade enzimática da α - e β -amilases e no conteúdo em amido e açúcares solúveis durante o desenvolvimento da maçã. ●, α -amilase; ■, β -amilase; ▲, amido; ▽, frutose; □, glucose; Δ, sacarose; FW, peso das amostras de maçã frescas.	19
Figura 16 Produção de concentrado de sumo de maçã (Aehle, 2007).	23
Figura 17 Variação média da turbidez no concentrado de sumo de maçã na campanha de 2013.	26
Figura 18 Ácidos gordos ω -alíclico. A. Ácido gordo ω -ciclohexil. B. Ácido gordo ω -cicloheptil	28
Figura 19 Estrutura química do guaiacol.	29
Figura 20 Principais maçãs utilizadas na produção de concentrado de sumo de maçã. A. Golden Delicious. B. Royal Gala.	33
Figura 21 Turbidímetro.	35
Figura 22 Determinação da acidez. A. Determinação e estabilização do pH do sumo. B. Titulação de NaOH até o sumo atingir um pH 8,1.	36

Figura 23 Atividade enzimática da Amilase AG 300L e da Distizym AG, variando os valores de pH.	49
Figura 24 Atividade enzimática das enzimas em estudo, variando os valores de temperatura.	50
Figura 25 Atividade enzimática da Distizyma AG, por um período de 180 minutos. A. Atividade enzimática da Distizym AG a 25°C. B. Atividade enzimática da Distizym AG a 50°C.....	52
Figura 26 Atividade enzimática da Amilase AG 300L, por um período de 180 minutos. A. Atividade enzimática da Amilase AG 300L a 25°C. B. Atividade enzimática da Amilase AG 300L a 50°C.	52
Figura 27 Resultados obtidos após incubação do sumo utilizando diferentes diluições e após diferentes períodos de permanência à temperatura ambiente. A. Ausência de colônias. B. Presença de uma colônia de <i>Alicyclobacillus</i> . C. Presença de duas colônias de <i>Alicyclobacillus</i> . D. Número incontável de colônias de <i>Alicyclobacillus</i>	54
Figura 28 Reta de calibração de glucose, obtida pelo método de DNS.	69
Figura 29 Atividade enzimática a 25°C, pH 3,0 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).	70
Figura 30 Atividade enzimática a 25°C, pH 3,5 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).	70
Figura 31 Atividade enzimática a 25°C, pH 4,0 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).	71
Figura 32 Atividade enzimática a 25°C, pH 4,5 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).	71
Figura 33 Atividade enzimática a 25°C, pH 5,0 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).	72
Figura 34 Atividade enzimática a 30°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.	73
Figura 35 Atividade enzimática a 35°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.	73
Figura 36 Atividade enzimática a 40°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.	74
Figura 37 Atividade enzimática a 45°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.	74
Figura 38 Atividade enzimática a 50°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.	75

Figura 39 Atividade enzimática a 55°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.	75
Figura 40 Atividade enzimática a 60°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.	76
Figura 41 Atividade enzimática a 50°C, pH 2,5 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.	77
Figura 42 Atividade enzimática a 50°C, pH 3,0 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.	77
Figura 43 Atividade enzimática a 50°C, pH 3,5 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.	78
Figura 44 Atividade enzimática a 50°C, pH 4,0 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.	78
Figura 45 Atividade enzimática a 50°C, pH 4,5 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.	78
Figura 46 Atividade enzimática a 50°C, pH 5,0 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.	78
Figura 47 Atividade enzimática a 50°C, pH 5,5 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.	78
Figura 48 Atividade enzimática a 50°C, pH 6,0 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.	78

Índice de Tabelas

Tabela 1 Análises físico-químicas realizadas a concentrados de sumo, segundo as especificações da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.	45
Tabela 2 Composição química em ácidos urónicos e açúcares dos polissacarídeos dos concentrados de sumo A e B.....	46
Tabela 3 Variação dos valores médios de turbidez (NTU), consoante a enzima utilizada no processo de despectinização, entre setembro e dezembro de 2013.	48
Tabela 4 Análise microbiológica aos concentrados A e B.	53
Tabela 5 Resultados obtidos após o processo de confirmação.	56
Tabela 6 Grelha de resultados que permitem confirmar a presença de <i>Alicyclobacillus</i> e distinguir entre o <i>A. acidoterrestris</i> e o <i>A. acidocaldarius</i> após o espalhamento em placa.....	58

Lista de Símbolos e Abreviaturas

°Brix – Teor de sólidos solúveis totais

ACB – *Alicyclobacillus* spp.

AJC – Concentrado de sumo de maçã

APCER – Associação Portuguesa de Certificação

Ara – Arabinose

BAT – *Bacillus acidoterrestris* termofílico

DNS – Ácido dinitrosalicílico

DOP – Denominação de Origem Protegida

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

Fuc – Fucose

Gal – Galactose

GalA – Ácido galacturónico

GC-FID – Cromatografia em fase gasosa acoplado a um detetor de ionização de chama

Glc – Glucose

GPP – Gabinete de Planeamento e Políticas

HG – Homogalacturonanas

IFU – Federação Internacional de Sumos de Fruta

IGP – Indicações Geográficas Protegidas

INE – Instituto Nacional de Estatística

Man – Manose

NTU – Unidade Nefelométrica de Turbidez

OMAIAA – Observatório dos Mercados Agrícolas e Importações Agro-alimentares

PME – Pectina metil esterase

PG – Poligalacturonase

PL – Pectato liase

PMG – Polimetilgalacturonase

PMGL – Polimetilgalacturonato liase

Rha – Ramnose

RG-I – Ramnogalacturonanas do tipo I

RG-II – Ramnogalacturonanas do tipo II

RNA – Ácido ribonucleico

UFC – Unidades formadoras de colónias

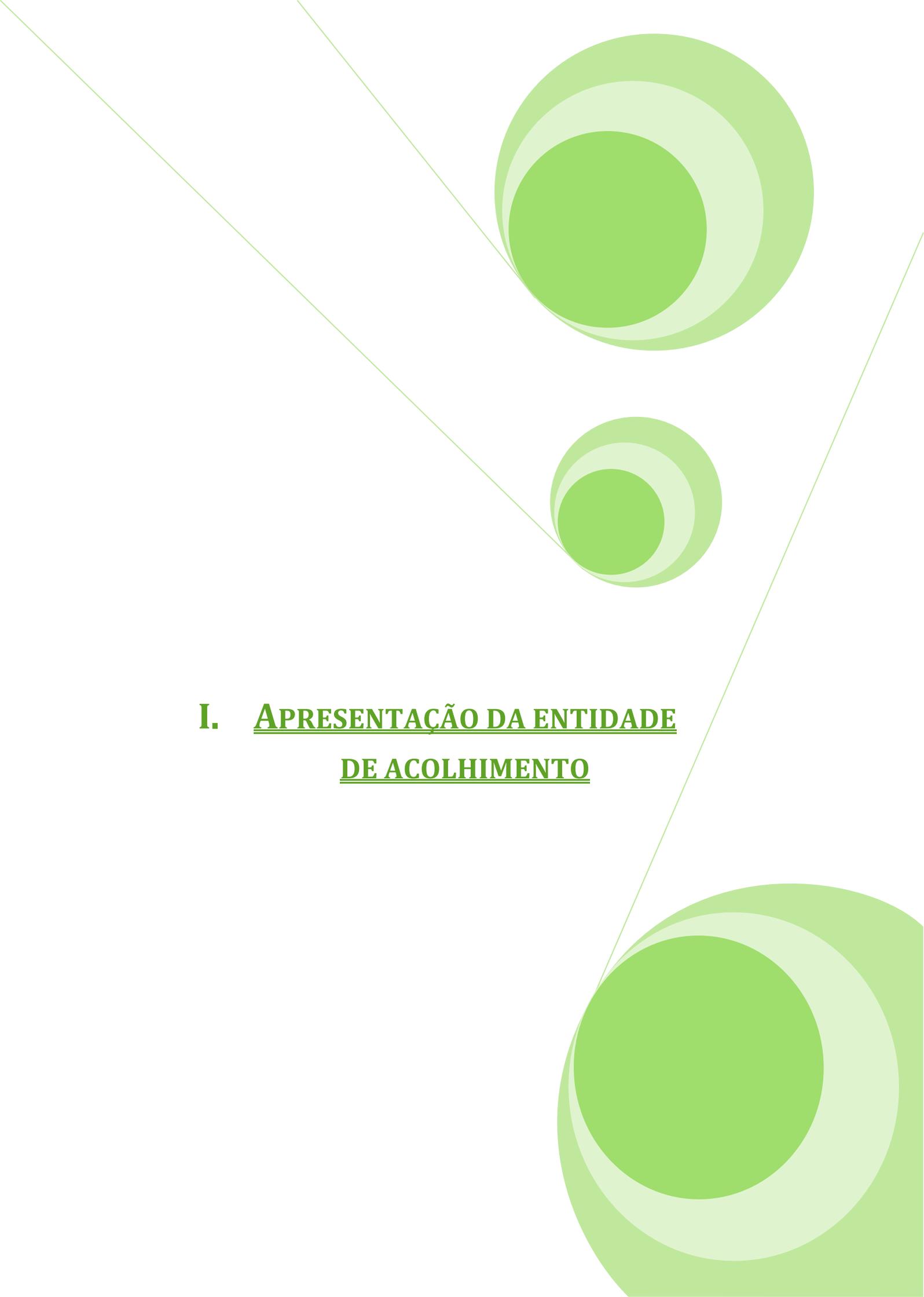
USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América

UE – União Europeia

XGA - Xilogalacturonana

Xyl – Xilose

YSG – Meio de cultura constituído com uma mistura de leveduras, amido e glucose.

The page features a decorative design with three large, overlapping green circles of varying sizes. The largest circle is at the top right, a medium one is in the center, and another large one is at the bottom right. Two thin green lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the central text area.

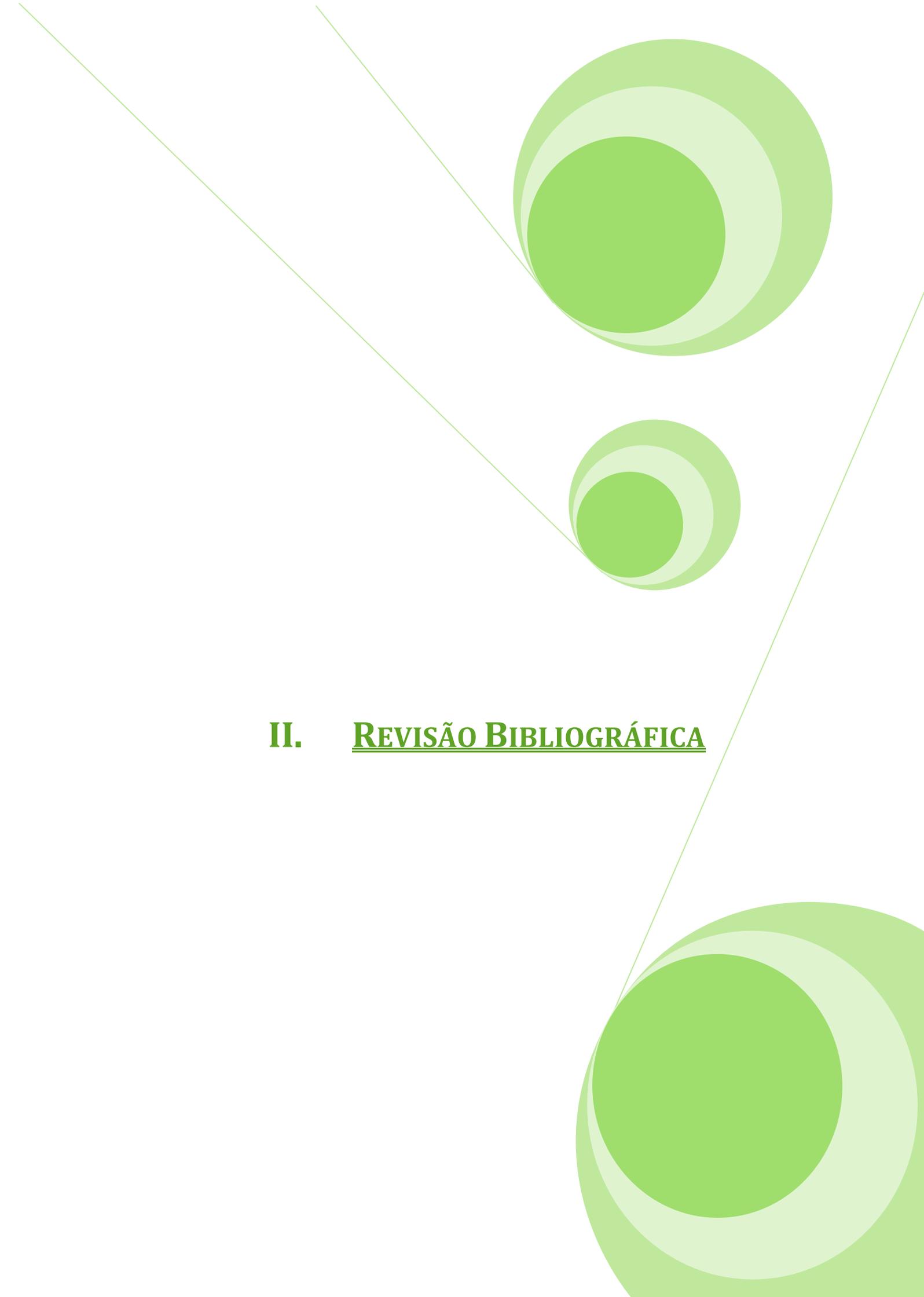
I. APRESENTAÇÃO DA ENTIDADE
DE ACOLHIMENTO

1. Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.

A **Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.** é uma empresa portuguesa, sediada no Parque Industrial Manuel da Mota, Pombal, especializada na produção de sumos de fruta concentrados, essencialmente maçã e pêra, e os seus aromas, destinados à indústria de sumos e néctares nacional e internacional. Para além disso, iniciou a produção de concentrado de sumo de uva branca, em 2014, realizando também a prestação de serviços para Adeegas e vitivinicultores, de dessulfurização de mostos de uva amuados.

Os primórdios desta empresa remontam a 1978. Passados 28 anos, em outubro de 2007, a Indumape, Industrialização de Fruta, S.A., como a conhecemos atualmente, inicia a sua atividade industrial numa nova fábrica, mais moderna e com equipamento tecnológico bastante atualizado face ao mercado internacional (Indumape - Industrialização de Fruta, S.A., 2011; Indumape - Industrialização de Fruta, S.A., 2012).

Hoje em dia, a Indumape, Industrialização de Fruta, S.A. é considerada a maior transformadora de fruta portuguesa, com recolha a nível nacional, exportando mais de 90% da sua produção, especialmente para a Inglaterra, Alemanha e Espanha (Indumape - Industrialização de Fruta, S.A., 2011; Indumape - Industrialização de Fruta, S.A., 2012).

The page features a decorative design with three green circles of varying sizes, each composed of concentric layers of different shades of green. Two thin green lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The text 'II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA' is centered in the lower half of the page.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Maçã

A maçã (*Malus domestica*) é uma fruta não climatérica da macieira, da família das *Rosaceae*, sendo geralmente classificada tendo em conta a sua subfamília *pomoideae*, mais regulamente denominada fruta pomo (Janick *et al.*, 1996; Sinha, 2006).

A maçã é uma fruta carnuda, com um endocarpo cartilaginoso, derivado de um ovário inferior (Simpson, 2006). Esta fruta é caracterizada pela presença de dois a cinco carpelos sobre um revestimento carnudo (Janick *et al.*, 1996). Cada um destes carpelos é constituído por uma a várias sementes, mantidos juntos por uma recetáculo carnudo (Hedrick, 1922). O recetáculo é considerado a parte comestível da maçã, que não só protege a fruta como fornece um exterior atrativo para os animais, encorajando a sua ingestão e, conseqüentemente o transporte das sementes para outros locais (Arthey & Ashurst, 1996). Na Figura 1 é possível ver uma representação esquemática dos principais constituintes da estrutura da maçã.

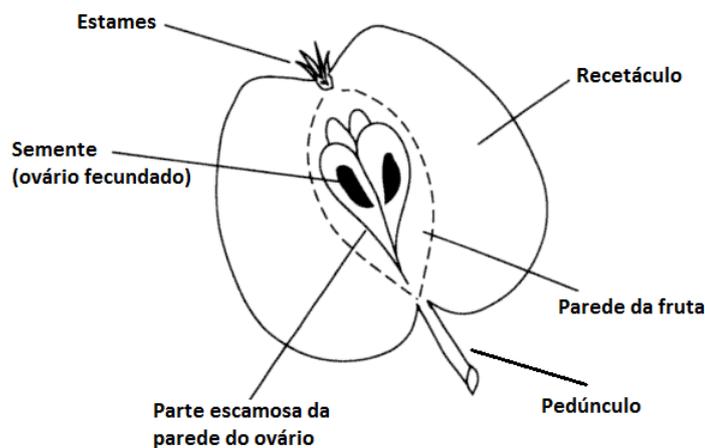


Figura 1 Representação esquemática da estrutura de uma maçã (Arthey & Ashurst, 1996).

A maçã é constituída por aproximadamente 85% de água, 12-14% de hidratos de carbono, 0,3% de proteínas, lípidos (<0,10%), minerais, e vitaminas, valores expressos em base húmida (Sinha, 2006; USDA, 2007). A variação destes componentes pode sofrer alterações consoante o local de cultivo, a variedade, o estado de maturação e as condições ambientais e agronómicas (Sinha, 2006).

Aproximadamente 80% dos hidratos de carbono presentes são açúcares solúveis, como a sacarose (cerca de 2,0%), a glucose (cerca de 2,4%) e a frutose (cerca de 6,0%). Os restantes 20% estão presentes na forma de amido (cerca de 0,6%). O conteúdo em fibra representa cerca de 2% da composição da maçã. O ácido málico é o principal ácido orgânico presente na maçã (0,3-1,0%). Este valor de ácido málico pode variar consoante a variedade, as condições ambientes de crescimento e armazenamento, bem como o amadurecimento do fruto, que origina uma diminuição progressiva dos teores de ácido málico (Sinha, 2006). A maçã é ainda rica em vitaminas como a tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), piridoxina (vitamina B₆) e ácido fólico (vitamina B₉) e minerais como o magnésio, o ferro e o potássio (Sinha, 2006).

a. Distribuição geográfica

Na Figura 2 é possível verificar as principais áreas de produção mundial da maçã, com destaque para as regiões com uma latitude entre os 35° e os 50°N e os 30° e os 45°S, consideradas as áreas mais representativas para o crescimento de maçã (Barrett *et al.*, 2005).

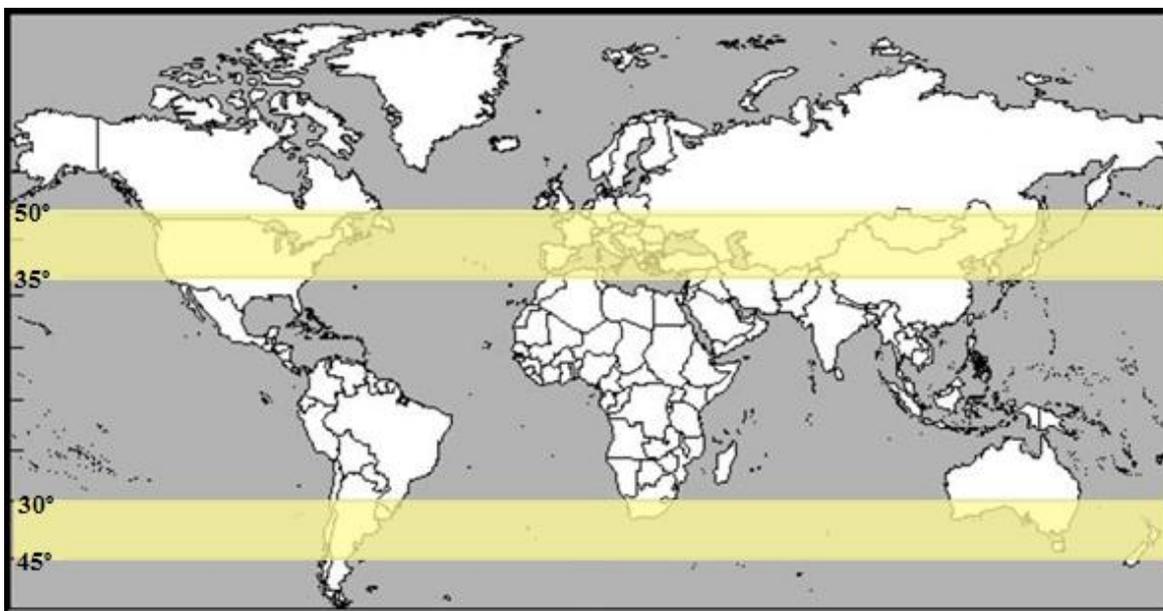


Figura 2 Mapa representativo com as latitudes com maior produção de maçã.

Em 2010, segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, cerca de 67% da maçã produzida é consumida fresca, enquanto que a restante é processada

(USDA, 2012). Da maçã processada, uma maior percentagem é utilizada para fabrico de sumo e cidra, podendo também ser utilizada para o fabrico de maçã enlatada, congelada ou seca. Para além disso, uma pequena percentagem é ainda utilizada para o fabrico de produtos diversos, como o vinagre, a sidra ou a geleia (Barrett *et al.*, 2005; USDA, 2012).

b. Maçã em Portugal

Em Portugal, a maçã representa a fruta com maior volume (26,5%) de produção de frutos frescos ao nível do Continente (INE, 2007; OMAIAA, 2012). A produção nacional corresponde a cerca de 2% da produção anual na UE-27 (GPP, 2013). Na Figura 3 podemos observar as principais áreas de produção concentrada e dispersa de maçã em Portugal Continental (OMAIAA, 2012).



Figura 3 Principais áreas de produção de maçã em Portugal Continental.

A principal região de produção de maçã é o Ribatejo e Oeste, representando 40% em área e produção total de maçã em Portugal Continental. Segue-se a região de Trás-os-Montes, com 30% em área e produção. A Beira Litoral e Beira Interior representam, em conjunto, 25% em área e produção de maçã (INE 2007; OMAIAA, 2012). Da maçã

produzida em território nacional, a quase totalidade destina-se ao mercado interno, com valores a rondar os 85% em 2011. As exportações correspondem a um volume de cerca de 8% da produção nacional, no mesmo ano. Contudo, a produção nacional não consegue fazer face ao consumo da população, sendo assim necessário recorrer ao mercado internacional, o que implica um défice de trocas com o exterior, contabilizando-se, em 2011, um valor de importações em torno dos 40 milhões de euros, face um valor de exportações de 11 milhões de euros (GPP, 2013). O principal fornecedor de maçã a Portugal é a França, com 41% do volume de importação da maçã em Portugal. Seguem-se-lhe a Espanha, com 37%, o Brasil, com 9%, a Itália com 5%, o Chile e a Argentina com 3% e 2%, respetivamente (OMAIAA, 2012).

c. Principais espécies em Portugal

As principais maçãs produzidas e consumidas em Portugal são a maçã Golden Delicious, Bravo de Esmolfe, Red Delicious, Reineta, Royal Gala e Fuji (OMAIAA, 2012).

Atendendo à Figura 4 podemos observar que o período de produção e comercialização de maçãs ocorre, essencialmente, entre meados de setembro e maio/junho.

Em Portugal, apenas a Maçã Bravo Esmolfe se encontra classificada como Denominação de Origem Protegida (DOP). A Indicação Geográfica Protegida (IGP) é atribuída às maçãs de Alcobaça, Beira Alta, Cova da Beira e Portalegre.

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Golden Delicious												
Red Delicious												
Reinetas												
Royal Gala												
Bravo de Esmolfe												

Figura 4 Calendário de produção/comercialização da maçã em Portugal (OMAIAA, 2012).

2. Principais polissacarídeos

a. Polissacarídeos pécticos

Os polissacarídeos pécticos representam 0,5-1,6% do tecido da maçã, com um peso molecular que varia entre os 200-360 kDa. Estes polissacarídeos são ricos em ácido galacturónico na sua composição, constituídos maioritariamente por resíduos de ácido galacturónico metil-esterificado (pectinas), resíduos de ácido galacturónico desesterificado (ácidos pécticos) e os seus sais (pectato) (Caffall & Mohnen, 2009; Coimbra *et al.*, 1998; Jayani *et al.*, 2005; Ridley *et al.*, 2001).

A pectina é um polissacarídeo estrutural constituído por ácido D-galacturónico, em ligação glicosídica ($\alpha 1 \rightarrow 4$), com um grau variável de grupos carboxílicos metil-esterificados. As cadeias laterais são compostas principalmente por arabinose e galactose, podendo a molécula apresentar simultaneamente zonas muito e/ou pouco ramificadas (Coimbra, 1993; Ridley *et al.*, 2001).

Estruturalmente, as pectinas formam um grupo heteromolecular de polissacarídeos estruturais constituintes da lamela média e da parede celular de plantas dicotiledóneas (Grassin & Coutel, 2010; Vorage *et al.*, 2009). Este polímero tem um papel muito importante no crescimento da planta, no seu desenvolvimento, morfogénese, defesa, adesão entre responsável pela adesão entre as células, pela resistência mecânica da parede celular e desenvolvimento do fruto (Grassin & Coutel, 2010; Nunes *et al.*, 2012; Vorage *et al.*, 2009). Quanto à principal característica funcional, a pectina apresenta uma grande capacidade de formação de géis. A pectina altamente metoxilada pode formar géis com açúcares e ácidos. Por outro lado, a pectina com um baixo grau metoxilação necessita de iões de cálcio para formar o gel, através de um mecanismo denominado modelo “caixa de ovos” (Figura 5). Este modelo envolve a junção de zonas formadas entre cadeias de poligalacturonato ligado aos iões de cálcio, por ligações eletrostáticas e iónicas dos grupos carboxílicos (Brownleader *et al.*, 1999; Sriamornask, 2003).

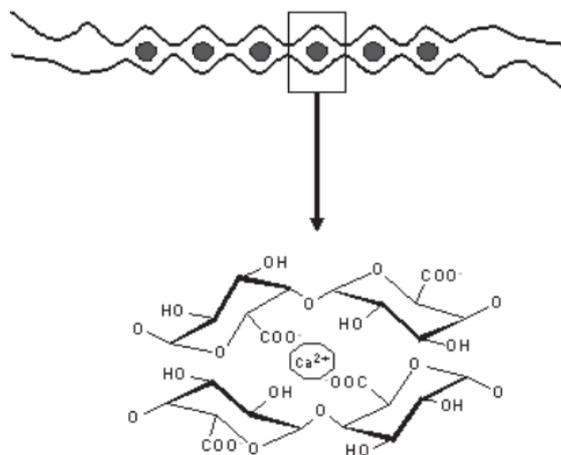


Figura 5 Representação esquemática da interação dos íons de cálcio com seqüências de poligalacturonato.

Por ação enzimática sobre as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácido galacturônico não esterificados, a pectina pode originar diferentes polissacarídeos pécicos (Figura 6): homogalacturonanas (HG), xilogalacturonana (XGA), ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) (Echavarría et al., 2011; Grassin & Coutel, 2010; Harholt et al., 2010).

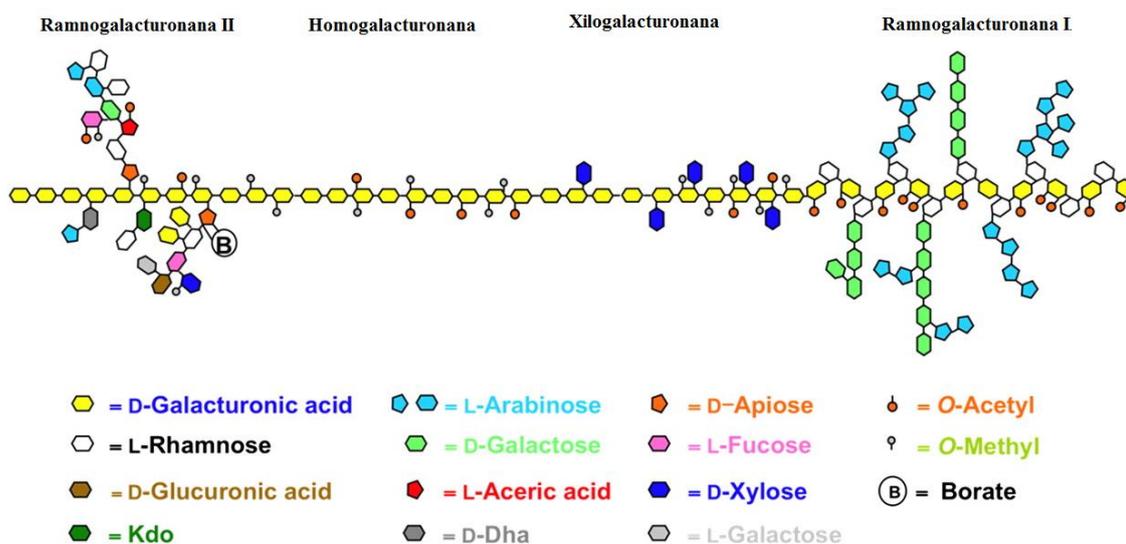


Figura 6 Representação esquemática da estrutura da pectina (Harholt et al., 2010).

As homogalacturonanas (HG) são homopolímeros lineares constituídos por 100-200 resíduos de ácido D-galacturónico (GalA), em ligação α -(1 \rightarrow 4), conhecidas pela sua capacidade em formar um gel. As HG são consideradas os polissacarídeos pécticos mais abundantes, representando entre 60-70% das pectinas da parede celular da planta. Os resíduos de ácido galacturónico podem estar metil-esterificados no grupo carboxílico C-6 ou O-acetilado em C-3 ou C-2 (Figura 7). O facto de apresentarem um elevado grau de metilação (75-92%), este tipo de polissacarídeo é resistente à ação de enzimas como a endo-poligalacturonase, por desesterificação e retratamento da homogalacturonana com a enzima, a HG poderá originar mono-, di- ou trissacarídeos (Caffall & Mohnen, 2009; Coimbra, 1993; Grassin & Coutel, 2010; Knox *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2012; Ridley *et al.*, 2001).

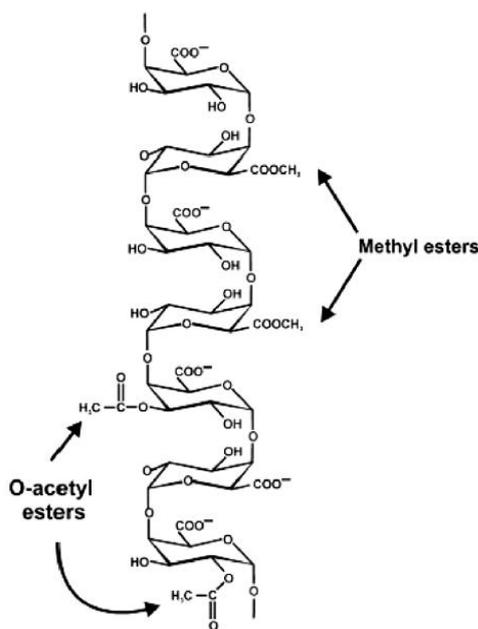


Figura 7 Estrutura da homogalacturonana e representação dos locais de metil-esterificação e O-acetilação (Ridley, et al., 2001).

A xilogalacturonana (XGA) é uma homogalacturonana substituída por resíduos de D-xilose em C-3 dos resíduos de ácido galacturónico da cadeia principal (Figura 8). O grau de substituição pelos resíduos de D-xilose na maçã é 75%, estando presente

maioritariamente nos tecidos reprodutivos como os frutos e as sementes (Caffall & Mohnen, 2009; Vorage *et al.*, 2009).

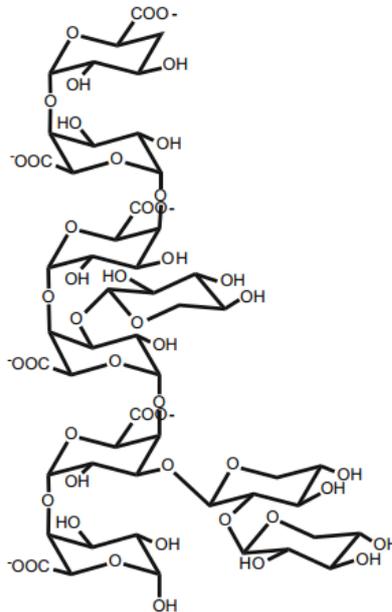


Figura 8 Estrutura da xilolacturonana (Vorage et al., 2009).

As ramnolacturonanas-I (RG-I) (Figura 9) são polissacarídeos constituídos por cerca de 100 unidades repetitivas do dissacarídeo [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow)]. Aproximadamente 50% dos resíduos de ramnose, em C-4, são pontos de ramificação de

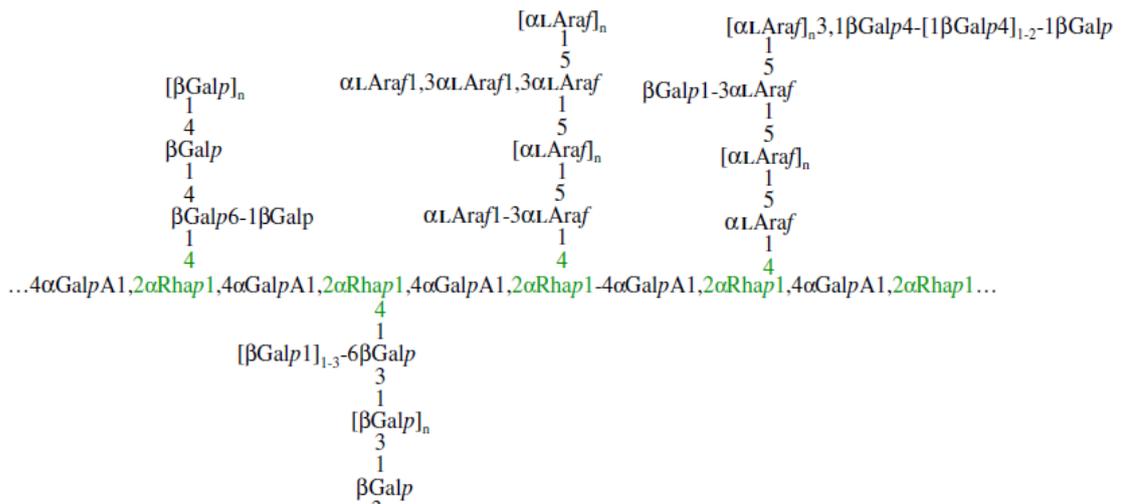


Figura 9 Estrutura de uma cadeia de RG-I e as suas ramificações (Caffall & Mohnen, 2009).

cadeias laterais curtas, ricas em arabinose e/ou galactose, distribuídas de forma não regular (Caffall & Mohnen, 2009; Coimbra, 1993).

As ramnogalacturonanas-II (**RG-II**) (Figura 10) são moléculas de baixo peso molecular, que possuem uma estrutura invulgar, sendo constituídas por 12 açúcares diferentes, alguns deles raros, como apiose, ácido acérico (ou 3-carboxi-5-deoxi-L-xilose), 2-*O*-metil xilose, 2-*O*-metil fucose, Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico) e Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico), que ocorrem como cadeias laterais de (ramno)galacturonanas com ligações diretas a C-2 ou C-3 de resíduos de ácido galacturónico (Caffall & Mohnen, 2009; Coimbra, 1993; O'Neill *et al.*, 1996).



Figura 10 Estrutura da RG-II e as suas ramificações (O'Neill *et al.*, 1996).

i. Enzimas pectinolíticas

As pectinases são o grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pecticas através de uma enorme variedade de mecanismos como as reações de

despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases). Na natureza, as pectinases desempenham um papel muito importante para as plantas pois auxiliam o processo de amadurecimento do fruto. Na indústria, estas enzimas são utilizadas no processo de clarificação dos sumos e vinhos e maceração do tecido vegetal (Jayani *et al.*, 2005; Jacob, 2009).

Na Figura 11 estão representadas algumas das pectinases que atuam sobre a pectina, como são o caso da pectina metil esterase (PME), pectato liase (PL) e poligalacturonase (PG).

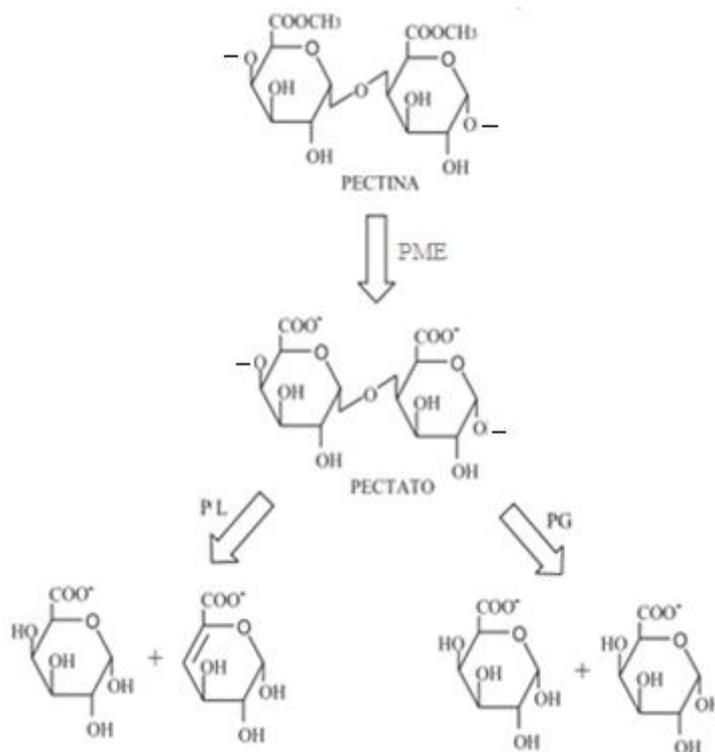


Figura 11 Modo de ação das pectinases sobre uma molécula de pectina (Uenojo & Pastore, 2007).

Das enzimas acima apresentadas, a pectina metil esterase e poligalacturonase desempenham um papel preponderante no amadurecimento do fruto.

Durante o processo de amadurecimento do fruto ocorre um aumento da pectina solúvel, ácidos pécticos e pectato de cálcio, normalmente acompanhado pela diminuição da protopectina, um polissacarídeo péctico insolúvel em água, que permanece intacto no tecido, podendo ser degradada por hidrólise enzimática durante o amadurecimento. Este aumento da solubilização e despolimerização está diretamente relacionado com a

diminuição da firmeza do tecido e conseqüentemente com o aumento do estado de maturação do fruto (Jayani *et al.*, 2005; Wakabayashi, 2000).

A poligalacturonase (PG) é considerada o elemento chave no processo de despolimerização dos frutos. Esta enzima revela um aumento significativo da sua atividade durante o amadurecimento, levando a uma diminuição do tamanho e da massa molecular das pectinas e ácidos pécnicos, pela hidrólise das ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) entre dois resíduos de ácido poligalacturônico. Pode ser classificada como endo-PG (EC 3.2.1.15) ou exo-PG (EC 3.2.1.67), sendo que a primeira catalisa de forma aleatória a hidrólise de ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) no ácido pécnico, ao passo que a segunda catalisa a hidrólise sequencial das ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) no ácido pécnico, começando a atuar sobre as extremidades não redutores do substrato, produzindo monogalacturonato (Brownleader *et al.*, 1999; Kashyap *et al.*, 2001; Uenojo & Pastore, 2007).

A ação da PG é regulada pela atividade de uma outra enzima, a pectina metil esterase (PME). A PME (EC 3.1.1.11) catalisa reações de desesterificação dos grupos éster metílico da pectina, originando ácido pécnico ou pectato (polímero não esterificado) e metanol. Esta enzima atua preferencialmente sobre os grupos éster metílico das unidades de galacturonato próxima a uma unidade de galacturonato não esterificado. A PME atua antes da poligalacturonase (PG) e da pectato liase (PL), que necessitam de substratos não esterificados. A PL procede à hidrólise das ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) do ácido pécnico por *trans*-eliminação, podendo ser classificada como endo-PL ou exo-PL. No entanto, esta enzima tem uma particularidade que a distingue, pois requer iões de cálcio para proceder à sua atividade, sendo fortemente inibida por substâncias quelantes como o EDTA (Brownleader *et al.*, 1999; Jayani *et al.*, 2005; Kashyap, et al., 2001).

b. Amido

O amido, o principal polissacarídeo de reserva do reino vegetal, é um hidrato de carbono encontrado em abundância na natureza. É encontrado em todas as formas vegetais de folhas verdes, seja nas suas raízes, caules, sementes ou frutas, representando cerca de 0,6% do conteúdo da maçã (Sinha, 2006). Apresenta-se na forma de grânulos com formatos e tamanhos distintos, dependendo da sua origem botânica. Os grânulos de amido

são misturas heterogêneas de duas macromoléculas distintas, a amilose e a amilopectina, que diferem no tamanho molecular e no grau de ramificação. A proporção destes polissacarídeos nas plantas é controlada geneticamente, mas, de forma geral, a concentração de amilose é superior à concentração de amilopectina. Para além destas substâncias, os grânulos de amido contêm ainda compostos nitrogenados, lípidos e minerais, que apesar de estarem presentes em pequenas proporções, podem influenciar as propriedades do amido (Blennow *et al.*, 2000; Buléon *et al.*, 1998).

A amilose é uma molécula essencialmente linear, formada por unidade de D-glucose em ligação glicosídica ($\alpha 1 \rightarrow 4$), apresentando um pequeno número de ramificações. O comprimento desta cadeia varia consoante a planta de onde é extraída, mas em geral possui

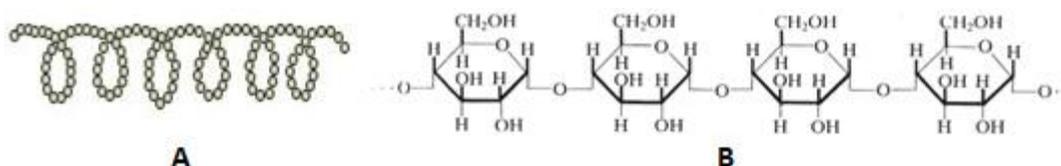


Figura 12 Estrutura da amilose. **A.** Estrutura helicoidal da amilose em forma cristalina. **B.** Representação da estrutura primária da amilose (Dziedzic & Kearsley, 1995).

entre 500 a 2000 unidades de glucose, formando uma cadeia linear com peso molecular entre os 80 e 320 kDa, dependendo da espécie vegetal e da maturidade. Na forma cristalina, a molécula de amilose apresenta uma conformação helicoidal (Figura 12), ou seja, forma uma hélice com grupos hidroxilo orientados para fora da hélice e os átomos de hidrogénio voltados para o interior da molécula, conferindo um carácter hidrofóbico à hélice (Buléon *et al.*, 1998; Parker & Ring, 2001; Smith *et al.*, 1997; Tester *et al.*, 2004).

Por outro lado, a amilopectina é uma molécula altamente ramificada, também formada por unidades de glucose em ligação glicosídica ($\alpha 1 \rightarrow 4$), mas com 5 a 6% de ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 6$), nos pontos de ramificação, conferindo à molécula uma forma esférica (Figura 13). As ramificações contribuem para o aumento do tamanho quando comparada à amilose, no entanto, o comprimento das cadeias lineares apresentam geralmente entre 25 a 30 unidade de glucose (Buléon *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1997; Tester *et al.*, 2004).

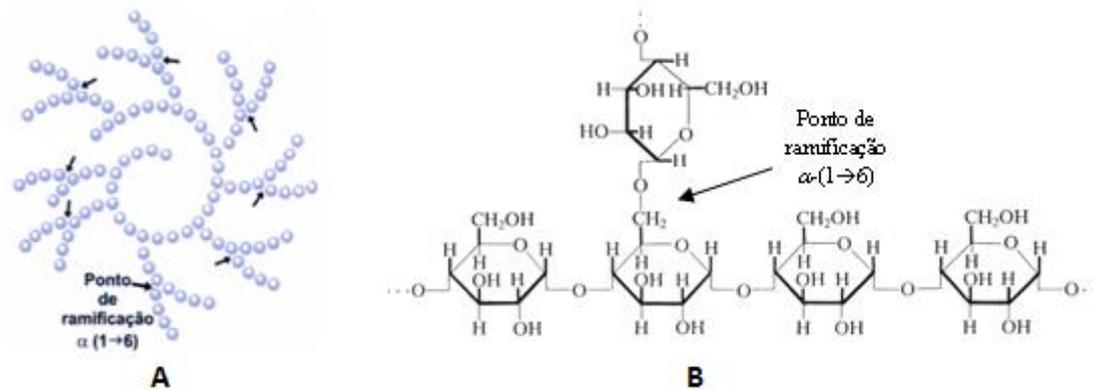


Figura 13 Estrutura da amilopectina. **A.** Estrutura da amilopectina na forma cristalina. **B.** Representação da estrutura primária da amilopectina (Dziedzic & Kearsley, 1995).

i. Amilases

Muitas enzimas estão envolvidas no processo de degradação do amido, mas maioritariamente a α -amilase (α 1,4-D-glucano glucano-hidrolase, EC 3.2.1.1), β -amilase (α 1,4-D-glucano malto-hidrolase, EC 3.2.1.2) e a amiloglicosidases (α 1,4-D-glucano gluco-hidrolase, EC 3.2.1.3) são as mais utilizadas (Goesaert, et al., 2010).

A α -amilase é considerada uma endo-amilase, provocando a hidrólise das ligações glicosídicas (α 1 \rightarrow 4), de forma aleatória. Estas enzimas são consideradas enzimas liquificadoras, pois provocam uma hidrólise rápida na fração de amilose, no interior da cadeia, produzindo maltose e maltotriose, originando uma diminuição brusca da viscosidade, seguida de uma hidrólise lenta nos oligossacarídeos produzidos e, consequentemente, na formação de moléculas de açúcares redutores como produtos finais, como são o caso da glucose e da maltose (Goesaert, et al., 2010; Karrer *et al.*, 1991; Kraemer *et al.*, 2001).

A β -amilase é considerada uma exo-amilase, provocando a hidrólise das ligações glicosídicas (α 1 \rightarrow 4), a partir da extremidade não-redutora do polissacarídeo, produzindo moléculas de maltose e maltotriose. Esta enzima não hidrolisa as ligações (α 1 \rightarrow 6) na amilopectina, de forma que a sua ação termina no ponto de ramificação, originando dextrinas (Goesaert, et al., 2010; Kraemer *et al.*, 2001; Ziegler, 1999).

As amiloglicosidases ou glucoamilases são também consideradas exo-amilases, hidrolisando as ligações glicosídicas (α 1 \rightarrow 4) a partir da extremidade não redutora,

originando maltose e isomaltose. No entanto, ao contrário da β -amilase, esta enzima tem ainda a capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 6$), mas a uma velocidade muito baixa (Goesaert, et al., 2010).

3. O amadurecimento e a sua influência sobre o processo de produção industrial de sumos de fruta

O estado de maturação do fruto constitui um fator determinante para a aceitabilidade do produto, o tempo de prateleira, a capacidade de transporte e resistência ao cisalhamento e o ataque por insetos, fungos e bactérias. Para além de todos estes fatores, o amadurecimento também representa um papel preponderante para a indústria produtora de sumos de fruta, influenciando fatores como a dose e o tempo de atuação enzimática. Esta afirmação está relacionada com o facto de o processo de amadurecimento estar diretamente relacionado com as diversas alterações bioquímicas coordenadas que podem ocorrer sobre o amido e os polissacarídeos pécnicos.

Sob o ponto de vista fisiológico, ao longo do amadurecimento ocorre um aumento do diâmetro da maçã, seguindo-se uma posterior estabilização, até atingir o seu máximo. Posteriormente e, por ação enzimática ocorre uma diminuição da firmeza do fruto (Figura 14).

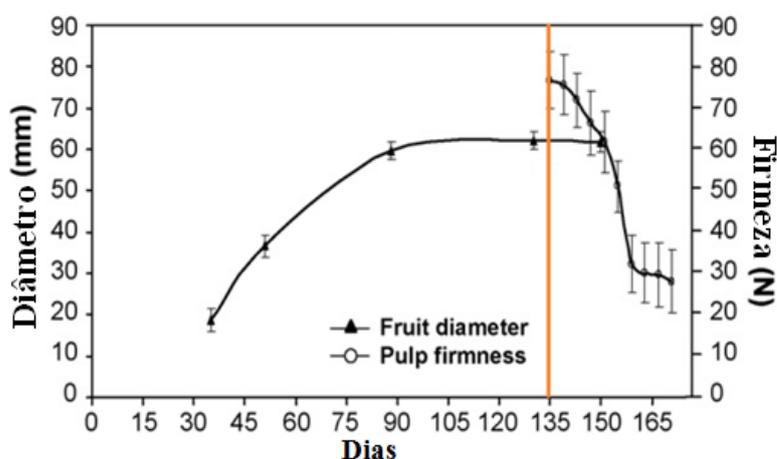


Figura 14 Alterações no diâmetro e na firmeza da maçã.

Na Figura 14, encontra-se representado através da linha laranja o período a partir da qual começa a campanha, ou seja, a recolha da maçã. O período da campanha é definido com base em critérios de maturidade comercial (Goulão, et al., 2007). A firmeza é o indicador mais importante sobre o estado de maturidade e a qualidade da maçã. O método mais indicado e recomendado para a determinação desta característica é o método Magness-Taylor (Goulão, et al., 2007; Plocharski, et al., 2000). Este método é considerado um método destrutivo, pois a sua realização implica a utilização de instrumentos como o 'Instron', que permite exercer uma pressão, a velocidade constante e linear, sobre a superfície de uma maçã, previamente descascada até uma profundidade de 11 milímetros. A firmeza é determinada pela força máxima exercida sobre a superfície da maçã, sendo expressa em newton (N) (Plocharski, et al., 2000). O início da campanha, sobre o ponto de vista comercial, ocorre quando a firmeza se encontra entre os 80-90 N. Neste caso específico (Figura 14), trata-se de maçãs do tipo 'Mondial Gala', do grupo 'Gala', cujo período de campanha para as maçãs destes grupo começa aos 135 dias após a antese, ou seja, após o período de floração da macieira. Após o início da campanha é registada uma redução acentuada da firmeza da maçã, que poderá estar associada à diminuição significativa do conteúdo em galactose da parede celular, associado ao aumento da atividade da β -galactosidase na fase final do amadurecimento. Contudo, o período de tempo mínimo necessário para o início da campanha é bastante variável, dependendo de fatores como o clima ou o tipo de maçã, pois no caso da Golden Delicious, por exemplo, o período de recolha ocorre cerca de 150 dias após a antese (Goulão, et al., 2007).

Na grande maioria dos casos as maçãs colhidas em início de campanha não apresentam o estado de maturação adequado, revelando elevados níveis de amido e polissacarídeos pécnicos, o que dificultará o processo de produção industrial. Em 2002, Dapeng e Yongzhang avaliaram a variação da atividade enzimática das amilases (α e β) e a concentração de amido e açúcares, como a glucose, a frutose e a sacarose em maçãs do tipo 'Starkrimson', até 160 dias após a antese (Figura 15). Apesar deste estudo abordar um tipo específico de maçã, as alterações que ocorrem durante o processo de maturação são comuns aos vários tipos de maçãs.

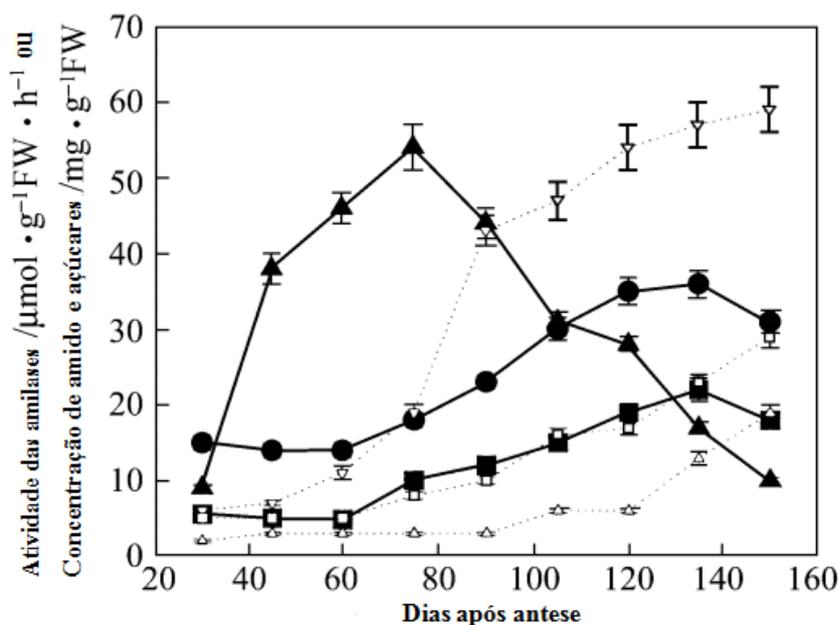


Figura 15 Alterações na atividade enzimática da α - e β -amilases e no conteúdo em amido e açúcares solúveis durante o desenvolvimento da maçã. ●, α -amilase; ■, β -amilase; ▲, amido; ▽, frutose; □, glucose; △, sacarose; FW, peso das amostras de maçã frescas (Adaptado de Dapeng & Yongzhang, 2002).

Ora como podemos observar pela Figura 15, o estudo revelou que neste caso específico, com o desenvolvimento do fruto há uma acumulação de amido até sensivelmente ao dia 75, onde atinge o seu máximo. Posteriormente, e com o aumento da atividade enzimática das amilases há uma diminuição do conteúdo em amido e consequente aumento dos açúcares. Podemos ainda constatar que a partir do dia 150 a concentração em amido atinge níveis mínimos, levando assim a uma diminuição progressiva da atividade das amilases (Dapeng & Yongzhang, 2002).

Relativamente aos valores de pectina, durante o amadurecimento há um aumento da concentração em açúcares neutros, sobretudo arabinose, galactose e xilose. Estes valores estão diretamente relacionados com o aumento da atividade enzimática de enzimas como a pectina metil esterase (PME), a pectato liase (PL) e a poligalacturonase (PG). O pH da fruta constitui um fator essencial para a atividade destas enzimas. Aquando do amadurecimento ocorre uma diminuição do pH, até valores de pH inferiores a 4,0, no caso da maçã. Ora PME e a PL apresentam atividades enzimáticas ótimas a pH alcalino. Assim sendo, é expectável que estas enzimas apresentem uma atividade enzimática ótima nos primeiros estágios de amadurecimento. Aliás, a PME é uma enzima determinante para o amadurecimento pois é responsável pela desesterificação dos grupos metil éster da pectina, permitindo assim a ação de enzimas como a PL e a PG. A ação da PG representa um fator

de suma importância no processo de amadurecimento, pois é responsável pela despolimerização da pectina, verificando na maçã uma atividade enzimática quase em exclusivo da exo-PG (Denès *et al.*, 2000; Goulão *et al.*, 2007; Kashyap *et al.*, 2001; Vries *et al.*, 1982). Podemos assim concluir que o processo de amadurecimento é determinante para a diminuição/despolimerização do teor em polissacarídeos, que quando presentes em grandes quantidades poderão ser extraídos para o sumo e estarem na origem de elevados valores de turbidez nos sumos.

Para minimizar os problemas associados aos níveis de turbidez provocados pelos polissacarídeos, no processo industrial é utilizada uma mistura de enzimas contendo poligalacturonases, pectina liase, celulase, proteases e amilases, que vão atuar sobre os componentes em suspensão no sumo e que contribuem largamente para o aumento da turvação do sumo. A atuação destas enzimas no processo industrial permite aumentar a eficiência do processo de extração de sumo de fruta e reduzir os custos associados ao processo industrial (Echavarría *et al.*, 2011).

As pectinases são as enzimas líderes no sector de processo de produção de sumos de fruta produzidos comercialmente, atuando na degradação da pectina. Estas enzimas utilizadas industrialmente são produzidas a partir do *Aspergillus niger*. As amilases também desempenham um papel preponderante na produção de sumos de fruta, principalmente da maçã, sobretudo a maçã mais verde que contém uma concentração inicial de amido muito elevada. Estas enzimas à semelhança das pectinases têm como principal origem o *Aspergillus niger* (Echavarría *et al.*, 2011).

No entanto, e apesar da utilização regular destas enzimas na indústria produtora de sumos de fruta, muitas vezes são detetados valores elevados de turbidez. Este facto pode estar relacionado com diversos fatores, entre eles a ação enzimática incompleta. Assim sendo, aquando da utilização enzimática é necessário ter em atenção diversos fatores como o estado de maturação da fruta, a quantidade de enzima utilizada, o tempo de atuação enzimática, bem como, o pH e a temperatura do sumo, uma vez que as enzimas apresentam gamas de pH e temperaturas ótimos muito específicos que poderão influenciar a ação das mesmas.

Para além da ação enzimática sobre o processo de maceração e despectinização, o processo de ultrafiltração também é um dos fatores que poderá influenciar os valores finais

de turbidez, uma vez que este processo permite reter um grande número de partículas ou macromoléculas, assim como microrganismos.

Quando qualquer uma destas etapas não ocorre nas melhores condições, poderão estar presentes pequenas quantidades de amido ou pectina, que após concentração estarão na origem de valores elevados de turbidez no concentrado de sumo.

4. Sumo de Maçã

a. Definição de sumo de fruta

O sumo de fruta pode ser definido como o conteúdo em fluidos extraídos de células ou tecidos de material vegetal de uma ou mais espécies, obtidos por um processo mecânico de esmagamento ou prensagem. O sumo pode ser clarificado ou concentrado e, posteriormente reconstituído a consistência inicial pela adição de água, mantendo a composição e qualidade do sumo (FAO, 2001).

As maçãs constituem um dos frutos mais utilizados para produção de sumo clarificado e concentrado (FAO, 2001; USDA, 2010). Por cada quilograma de concentrado de sumo de maçã são necessários sete quilogramas de maçã como matéria-prima, sendo que estas representam entre 60-70% do custo do concentrado (USDA, 2010). Os maiores produtores de sumo de concentrado de maçã são a China, a Polónia e a Argentina (Aehle, 2007). Para além do sumo clarificado e concentrado, a maçã poderá ainda ser utilizada para a produção de outros tipos de sumos como néctares e polpas.

b. Etapas do Processo de produção de concentrado de sumo de maçã

i. Colheita

A maior parte da maçã colhida tem como objetivo o consumidor final, sendo apenas uma pequena parte colhida intencionalmente para processamento (FAO, 2001). As maçãs utilizadas para processamento são maçãs consideradas de calibre e qualidade inferior, não sendo consideradas apelativas para o consumidor final. No entanto, seja para o consumidor final ou para processamento, é de evitar frutas recolhidas diretamente do chão que estejam podres ou parcialmente danificadas, de modo a evitar a contaminação com leveduras e fungos, bem como a contaminação com *Alicyclobacillus* (ACB) ou fungos do género *Penicillium*, que estão na origem de uma micotoxina muito frequente nos sumos de maçã – a patulina (FAO, 2001; Pitt & Hocking, 2009).

ii. Processamento

Na Figura 16 está presente uma representação esquemática das principais etapas do processo de produção de concentrado de sumo de maçã.

a) “Prejuicing” – pré-sumo

Esta etapa constitui a etapa inicial desde a receção da fruta até ao processo de moagem. As maçãs são trazidas para a fábrica geralmente através de um camião ou por palotes e posteriormente despejadas para um silo. Posteriormente, as maçãs são transportadas por canais de água, de modo a proceder a uma primeira fase de lavagem, bem como permitir a deposição de objetos estranhos (Barrett, et al., 2005; FAO, 2001). Este passo pode constituir uma importante fonte de contaminação, devido a parâmetros como a qualidade microbiológica da água ou o tempo de permanência no silo (FAO, 2001).

Em seguida, a fruta é lavada com um pulverizador equipado com um composto antimicrobiano devidamente reconhecido para o uso na indústria alimentar, como o peróxido de hidrogénio. Nesta fase há, muitas vezes, um processo de inspeção visual, onde há uma seleção das maçãs que se encontram visivelmente danificadas ou podres (FAO, 2001).

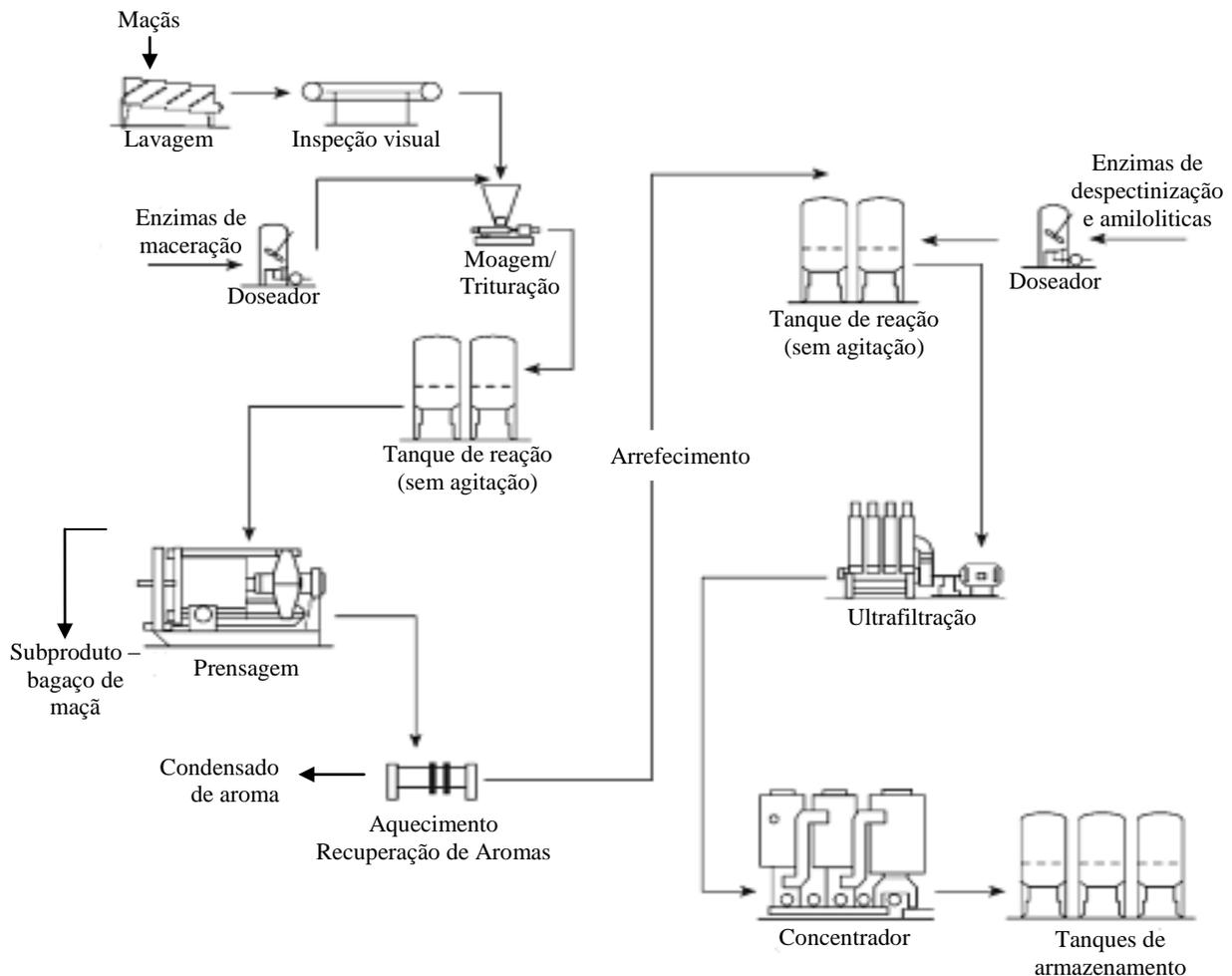


Figura 16 Produção de concentrado de sumo de maçã (Aehle, 2007).

As maçãs passam então por um processo de trituração/moagem para promover um aumento da extração do sumo. Para tal, pode ser utilizado um desintegrador, um moinho de martelo ou um moinho de grade, de modo a aumentar a eficácia do processo de extração, minimizando a presença de compostos das sementes para o sumo. Para além do tipo de equipamento utilizado, a utilização de enzimas comerciais de maceração permite aumentar

a eficácia do processo de extração, pois estas enzimas, geralmente uma solução com uma elevada concentração em pectinase, permite hidrolisar as paredes celulares para libertar mais sumo e diminuir a viscosidade.

b) Extração/prensagem

A prensagem é uma fase de extração, pois permite extrair uma maior quantidade de sumo através da polpa restante, dos quais resulta o sumo e o subproduto, constituído pelos restos da maçã, como as sementes e os pedúnculos. O processo de extração pode ser contínuo ou em *batch*, com uma ação giratória que permite manter a prensa limpa por remoção do bagaço da maçã – subproduto, que sai por uma das extremidades da prensa. Este produto é depois recolhido, armazenado e muito utilizado para a alimentação animal direta (FAO, 2001).

c) Aquecimento/Recuperação de aromas

Até à fase de concentração, o sumo é sujeito a várias fases de aquecimento. Numa das primeiras fases o sumo é evaporado a 20 °Brix, a 90 °C e os vapores são recolhidos para recuperar os compostos voláteis (FAO, 2001; Ziegler & Ziegler, 1998). Dependendo do tipo de fruta, 10-40% dos primeiros vapores extraídos apresentam um elevado conteúdo em compostos voláteis, que posteriormente são recuperados. A mistura de vapor de água/compostos voláteis é posteriormente separada por uma coluna de destilação. Os compostos voláteis são depois condensados por uma coluna de fracionamento ou retificação. A coluna de retificação permite a destilação de uma mistura de líquidos pela separação dos seus componentes em frações, dependendo da diferença de volatilidade dos seus componentes. Esta condensação permite aumentar a concentração de compostos voláteis entre 100 a 200 vezes. Os vapores que saem da coluna de retificação contêm ainda um elevado teor em componentes voláteis do aroma, que podem ser condensados, recorrendo a temperaturas baixas. Assim sendo, os aromas de fruta são um líquido com um odor é característico da maçã e a composição química, na sua grande maioria *trans*-2-hexanal e álcoois em C-6, depende da variedade e do estado de maturação da maçã (El Hadi, et al., 2013; Ziegler & Ziegler, 1998).

d) Despectinização

O nome despectinização pode sugerir o uso exclusivo de enzimas pectinolíticas durante o tratamento enzimático. No entanto, na indústria, o processo de despectinização envolve o uso de enzimas pectinolíticas e amilolíticas, que irão atuar sobre a pectina e o amido presentes na polpa de maçã que contribuem para o aumento da viscosidade do sumo. Este processo tem uma grande influência sobre o processo de filtração, pois o material em suspensão pode obstruir os filtros, diminuindo a eficácia do processo de filtração e poderá estar na origem de problemas de turbidez, pois a taxa de filtração do sumo reduz-se em cerca de um terço com os sumos não tratados enzimaticamente (Alvarez *et al.*, 1998; FAO, 2001).

e) Ultrafiltração

O processo de ultrafiltração é um passo essencial para obter sumos clarificados, através da remoção de material em suspensão e microrganismos, diminuindo assim o risco de problemas de turbidez no sumo de fruta (FAO, 2001). O processo de ultrafiltração consiste assim em fazer passar o sumo por uma membrana, geralmente de polisulfona, com uma porosidade que pode variar entre os 5 kDa e os 500 kDa, sendo que para o sumo de maçã é geralmente utilizada uma membrana com um porosidade entre os 10 kDa e os 50 kDa, utilizando uma pressão superior a 155 kPa, que permite separar macromoléculas e partículas coloidais (1 nm – 10 µm) a partir do sumo em suspensão (Bowen & Williams, 1996; Zárate-Rodríguez *et al.*, 2001).

f) Concentração

Os sumos de fruta são concentrados de modo a prolongar o seu tempo de vida e minimizar os custos de distribuição e armazenamento (Spiess & Schubert, 1989).

O processo de concentração, realizado em diferentes tipos de evaporadores, sujeita o sumo de fruta a diferentes estágios de temperatura. Num primeiro estágio, o sumo é evaporado a 20-25°Brix, a 90°C (recuperação do aroma), durante cerca de 60 segundos. Posteriormente o sumo é concentrado a 40-45°Brix, 100°C, durante alguns segundos. A uma temperatura de 45°C, o sumo é concentrado a 50-60°Brix e por último, à mesma temperatura, até atingir os 70°Brix (FAO, 2001).

5. Pontos críticos de controlo no processo de produção de concentrado de sumo de fruta

Um dos principais pontos críticos associados à produção de concentrados de sumos de fruta reside no facto destes por vezes registarem valores elevados de turbidez no produto final.

Para melhor entender a variação do valor de turbidez foram analisados os valores de turbidez no concentrado de sumo de maçã ao longo da campanha (setembro a dezembro de 2013) e pós-campanha de 2013 (janeiro a maio de 2014). A produção de lotes de concentrado sumo de maçã foi maior no período da campanha, cerca de 60% entre setembro e dezembro, do que nos restantes meses do período em estudo. A variação dos valores de turbidez encontra-se apresentada na Figura 17. A linha a vermelho representa o valor máximo de turbidez admitido para o concentrado de sumo de maçã, segundo as especificações da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A..

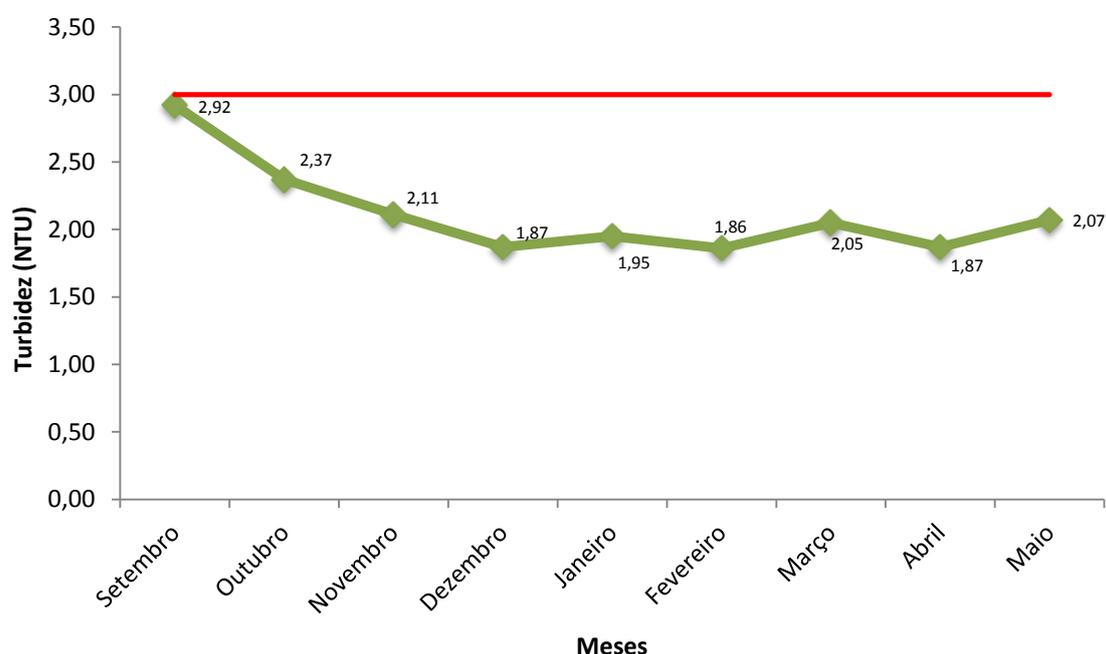


Figura 17 Variação média da turbidez no concentrado de sumo de maçã na campanha de 2013.

Pela análise da Figura 17 é possível constatar que no início da campanha, em setembro, há um pico nos valores da turbidez no concentrado, quando comparado com o restante período do ano. Este valor pode ser explicado pela chegada de fruta por vezes muito verde, sem o tempo de maturação adequado, o que poderá dificultar o processo de produção de concentrado de sumo de maçã, nomeadamente no processo de ultrafiltração e concentração. Este facto irá influenciar os valores de turbidez final, sendo que cerca de 90% dos concentrados obtidos com elevados valores de turbidez, ou seja, com um NTU superior 3,0 são obtidos durante a campanha. No período de pós-campanha (janeiro a maio de 2014) há uma estabilização dos níveis de turbidez.

A turbidez é causada pela presença de diversos materiais em suspensão, de tamanho e natureza variados no sumo de maçã, na grande maioria polissacarídeos pécicos e amido. Estes polissacarídeos, quando presentes no produto final poderão estar na origem de diversos problemas de turbidez e viscosidade durante o processo de extração, filtração, clarificação e concentração dos sumos de fruta (Echavarría, et al., 2011).

A adição de enzimas durante o processamento dos sumos de fruta desempenha assim um papel de máxima importância, pois a sua ação sobre os polissacarídeos e o amido irá resultar na diminuição destes compostos de elevado peso molecular, representando assim uma redução da viscosidade e um aumento do rendimento do processo de extração do sumo de fruta (Uenojo & Pastore, 2007).

6. *Alicyclobacillus* spp

As características físico-químicas do concentrado de sumo de maçã, tais como o pH ácido, abaixo de 4, a baixa atividade da água, a alta viscosidade, a elevada concentração de açúcar (70 °Brix) e baixa concentração de oxigénio, aliada aos tratamentos térmicos industriais, usualmente inibem a maior parte dos microrganismos patogénicos. Entretanto, os sumos de fruta são ainda suscetíveis a alguns microrganismos deteriorativos, como os bolores, as leveduras ou as bactérias termorresistentes, como é o caso das bactérias do género *Alicyclobacillus* (Chang & Kang, 2004; Pontius *et al.*, 1998).

O *Alicyclobacillus* spp. (ACB) é uma bactéria estritamente aeróbia, gram-positiva, acidofílica e termofílica, não patogénica e formadora de esporos, características estas que

lhe conferem a capacidade de sobreviver ao processo de pasteurização. Dependendo da espécie, o ACB apresenta uma gama de temperatura de crescimento entre os 20-70 °C, com uma temperatura ótima entre os 42-60 °C. Quanto ao pH, esta bactéria apresenta uma gama de crescimento entre os 2,5-6,0 (Chang & Kang, 2004; Groenewald *et al.*, 2009; Silva & Gibbs, 2001; Yokota *et al.*, 2007).

Em 1980, pensou-se ter descoberto uma nova espécie de *Bacillus*, isolada no sumo de maçã, na altura denominado como *Bacillus acidoterrestris*. No entanto, em 1992, esta bactéria foi reclassificada como pertencendo a um novo género, *Alicyclobacillus*. Esta alteração foi baseada na presença de um ácido gordo incomum, componente maioritário da membrana celular – ω -alicíclico. Estes ácidos gordos possuem na sua estrutura celular um radical aquilo cíclico terminal, podendo-se apresentar na forma de ω -ciclo-hexilo ou ω -ciclo-heptilo (Figura 18). Este padrão de ácidos gordos está diretamente relacionado com a resistência do *Alicyclobacillus* às condições de acidez e temperatura elevadas. Das espécies atualmente conhecidas de *Alicyclobacillus*, a mais comumente associada à degradação dos sumos de fruta é o *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Chang & Kang, 2004; Groenewald *et al.*, 2009; Komitopoulou *et al.*, 1999; Pontius *et al.*, 1998; Yokota *et al.*, 2007).

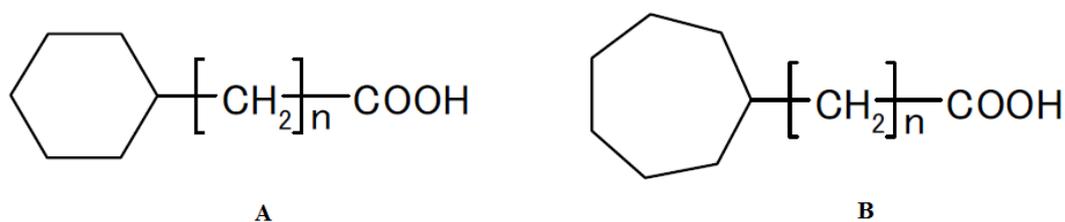


Figura 18 Ácidos gordos ω -alicíclico. **A.** Ácido gordo ω -ciclo-hexilo. **B.** Ácido gordo ω -ciclo-heptilo (Yokota *et al.*, 2007).

Apesar de não ser um microrganismo patogénico, o ACB pode provocar nos sumos de fruta clarificados a formação de um sedimento branco, nebulosidade ou turbidez. Contudo, a principal característica degradativa deste microrganismo assenta sobretudo na formação de guaiacol (2-metoxifenol) (Figura 19) (Chang & Kang, 2004; Groenewald *et al.*, 2009). O guaiacol é um composto fenólico reconhecido na indústria alimentar como estando na origem de sabores e odores desagradáveis, sobretudo quando associado a vinho e a sumos de fruta. Nestes casos, o guaiacol constitui um factor de degradação do produto,

apresentando uma origem microbiana, como é o caso do *Alicyclobacillus* (Chang & Kang, 2004).

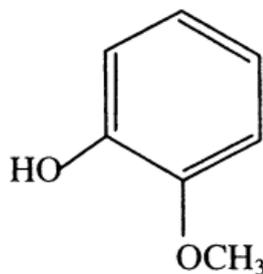


Figura 19 Estrutura química do guaiacol.

Por estas razões, o ACB tem potencial para originar graves problemas económicos na indústria dos sumos de fruta. O facto da contaminação deste microrganismo ocorrer sobretudo na fase da colheita da fruta, quando não há uma limpeza adequada da mesma, a presença de ACB pode ser tido como um fator de qualidade do sumo de fruta (Chang & Kang, 2004).

a. Métodos de deteção e quantificação de *Alicyclobacillus*

Na indústria alimentar, um método rápido, simples e de baixo custo é essencial para detetar a presença deste microrganismo, evitando assim os riscos microbiológicos associados a esta bactéria. No entanto, ainda não existe um método padrão de deteção de ACB utilizado em todos os países ou grupos representativos da indústria dos sumos de fruta que especifique o tipo apropriado de meio de crescimento, o valor de pH, as condições de choque térmico, o método de plaqueamento e a temperatura e tempo de incubação (Bevilacqua *et al.*, 2008; Chang & Kang, 2004 Henczka, *et al.*, 2013).

A Federação Internacional de Produtores de Sumos de Fruta (IFU), em 2004, propôs um método padrão de deteção de ACB em sumos de fruta (IFU Method No.12, intitulado “Method on the Detection of Taint Producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices”). Este é o método mais genericamente utilizado pela indústria dos sumos de fruta na Europa, recomendando a utilização do meio K Agar (pH 3,7) em combinação com o meio BAT

Agar (*Bacillus acidoterrestris* thermophilic, pH 4,0) ou o meio YSG Agar (Yeast Starch Glucose, pH 3,7), este último muito utilizado na indústria de sumos de citrinos. A temperatura recomendada para este processo de incubação nas placas é 45°C, por um período de 2-5 dias. Por outro lado, a Associação Americana de Saúde Pública recomenda a utilização do meio K Agar e uma temperatura de incubação de 43°C durante 3 dias. Já a Associação Japonesa de Sumos de Fruta (JFJA) recomenda a utilização do meio YSG Agar com uma temperatura de incubação de 30°C, por 5 dias (Henczka, et al., 2013; Yokota, et al., 2007; Chang & Kang, 2004).

Outros estudos comprovam que os meios mais aconselhados para o processo de detecção de *Alicyclobacillus* spp. seriam os meios BAT Agar, YSG Agar e K Agar (Henczka, et al., 2013; Yokota, et al., 2007).

O tempo e temperatura do choque térmico também representa um ponto essencial para o processo de detecção do ACB. O choque térmico permite a ativação e germinação dos esporos e a eliminação de outros contaminantes microbiológicos, como leveduras e bactérias lácticas, prevenindo o aparecimento de resultados falso-positivos. Vários estudos revelam que uma temperatura de 80°C, 10 minutos é o recomendado para provocar a ativação dos esporos de ACB (Henczka, et al., 2013; Yokota, et al., 2007).

Para evitar a contaminação microbiológica, muitos estudos recomendam ainda a filtração do sumo após o choque térmico, recorrendo ainda a uma membrana com uma porosidade entre os 0,45 e os 0,47 µm. Este método é muito mais sensível que o processo de plaqueamento convencional (Henczka, et al., 2013; Yokota, et al., 2007).

A temperatura de incubação também é um parâmetro muito importante no processo de detecção, pois apesar de o ACB crescer numa gama bastante variada de temperatura, este valor irá variar ligeiramente consoante o tipo de estirpe que se pretende isolar e o meio de cultura utilizado, sendo que a uma temperatura superior a 55°C, o crescimento do *A. acidoterrestris* fica claramente inibido. Posto isto, a temperatura de incubação mais utilizada que permite a detecção da maioria das espécies de ACB é de 45°C, num período de 5 dias (Henczka, et al., 2013; Yokota, et al., 2007).

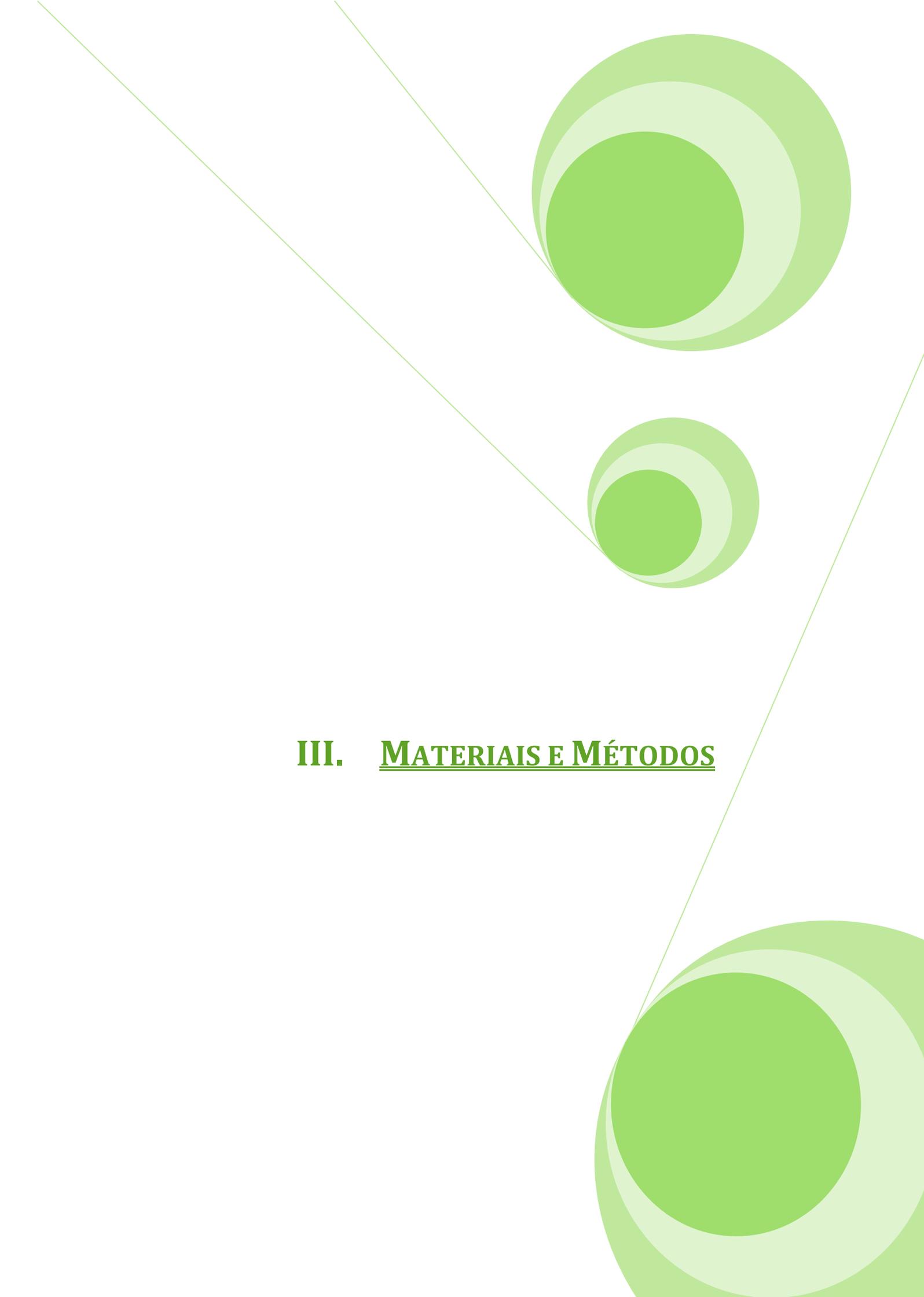
7. Objetivos do trabalho de estágio

A maçã é um dos principais frutos frescos consumidos em todo o mundo, sendo em Portugal Continental o mais consumido, representando cerca de 26,5%. A produção de maçã assume assim particular relevância socioeconómica na zona do Ribatejo e Oeste, onde se destaca uma maior área em macieiras (I.N.E, 2007).

O sumo de maçã, muito comercializado devido à sua fácil associação com outros sumos, é um sumo com elevado valor nutricional, rico em compostos fenólicos e açúcares de fácil ingestão como a glucose e a frutose. Os elevados valores turbidez, sobretudo no concentrado de sumo maçã, constitui um dos principais fatores de rejeição por parte do consumidor. Para reduzir a concentração de polissacarídeos, principais responsáveis pelos elevados valores de turbidez no sumo, são utilizadas enzimas amilolíticas e pectinolíticas que atuam sobre o amido e os polissacarídeos pécticos, respetivamente. A utilização adequada destas enzimas, sobre determinadas condições de temperatura e pH, poderá reduzir os custos de produção e aumentar a qualidade do produto final.

Para além dos problemas relacionados com os níveis de turbidez no concentrado de sumo de maçã, este produto encontra-se por vezes associado à presença de um microrganismo deteriorativo – *Alicyclobacillus*. Este microrganismo, quando presente no produto final poderá originar graves problemas económicos à indústria produtora, uma vez que está na origem de sabores desagradáveis, maus odores e turbidez, sendo assim um fator de rejeição por parte do cliente.

Assim sendo, os principais objetivos deste trabalho serão a determinação da principal causa associada aos elevados valores de turbidez registados, bem como a determinação da atividade enzimática das principais enzimas utilizadas no processo, variando o pH e a temperatura do processo. Para além disso, pretende-se implementar uma metodologia eficaz de deteção e confirmação da presença de *Alicyclobacillus* spp. no concentrado de sumo de maçã.

The page features a decorative design with three large, overlapping green circles of varying sizes. Two thin green lines intersect at the top left, forming a triangular shape that frames the circles. The circles are composed of concentric layers of different shades of green, creating a 3D effect.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de concentrado de sumo de maçã (concentrado A, B, C e D) utilizadas foram analisadas de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos pela Indumape, Industrialização de Fruta S.A., para a caracterização do produto.

1. Amostras de maçã utilizadas

Os concentrados A e B foram produzidos no início da campanha, no mês de setembro de 2013, ao passo que os concentrados C e D foram produzidos no final da campanha, em novembro e dezembro de 2013, respectivamente. Quanto às maçãs que lhe deram origem foram maioritariamente Golden Delicious e Royal Gala (Figura 20).



Figura 20 Principais maçãs utilizadas na produção de concentrado de sumo de maçã.
A. Golden Delicious. B. Royal Gala.

2. Caracterização físico-química do concentrado de sumo de maçã

a. Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix)

A determinação do grau Brix (°Brix) é um parâmetro muito importante na indústria alimentar, assumindo particular importância na indústria produtora de sumos de fruta, pois a medição do índice de refração permite analisar a concentração de sólidos presentes na solução, desde açúcares, hidratos de carbono, proteínas, entre outros. Este valor é preponderante para avaliar o nível de concentração de produto e consequentemente a

aceitabilidade do mesmo. Este valor expressa-se em °Brix e os níveis aceitáveis para o concentrado de sumo de maçã, segundo a Indumape, situa-se entre os 70-71°Brix.

A quantificação do teor de sólidos solúveis presentes na amostra foi efetuada através de um refratómetro automático Reichert AR6 Series, previamente calibrado com água destilada e devidamente seco. Para a análise deve ser colocada, com uma vareta de vidro, uma pequena porção de amostra, de modo a cobrir o óculo do refratómetro, procedendo-se à respetiva leitura. Esta leitura é realizada no mínimo duas vezes até obter um valor concordante.

b. Determinação da turbidez

A determinação da turbidez constitui, a par da determinação do °Brix um dos principais fatores de rejeição para os concentrados de sumos de fruta para a maioria dos clientes. Este parâmetro permite avaliar a presença de matérias em suspensão, de tamanho e natureza variados. A presença destes compostos em suspensão origina a dispersão e absorção da luz que atravessa a amostra, contrariamente à transmissão em linha reta. A turbidez é assim a expressão desta propriedade ótica e é indicada em termos de unidades de turbidez (NTU – *Nephelometric Turbidity Unit*) (EPA, 1999). Os valores de turbidez para este tipo de produto, segundo a Indumape, situam-se numa gama inferior a 3,0 NTU.

A determinação deste parâmetro foi efetuada num turbidímetro Hanch 2100 AN, devidamente calibrado antes da utilização. A calibração é efetuada utilizando um Kit de calibração específico da marca, que compreende um conjunto de seis padrões de formazina com diferentes concentrações (<0,1 NTU a 7500 NTU). Para a leitura, a amostra foi diluída para 11,5 °Brix. Esta diluição foi realizada através da pesagem de 11,50 g de concentrado de sumo de maçã numa balança de precisão Shimadzu UX620H e posterior adição de água destilada. O volume de água destilada adicionado foi determinado subtraindo ao valor do °Brix determinado em a) valor de 11,5 °Brix (exemplo: a uma amostra com 70,0 °Brix, subtrai-se a este valor 11,5 °Brix obtendo-se um valor de 58,5, correspondente ao volume de água a ser adicionado). Esta mistura foi posteriormente homogeneizada numa placa de agitação magnética Heidolph MR 3001, sendo em seguida colocado numa célula de 95 mm x 25 mm um volume de aproximadamente 30 mL. Em

seguida a célula foi colocada no interior do turbidímetro, sendo lido o valor da turbidez em NTU (Figura 21).



Figura 21 Turbidímetro.

c. Determinação da cor e da claridade

A cor e a claridade são parâmetros físico-químicos determinados num espectrofotómetro a 440 nm e 625 nm, respetivamente, e expressos em percentagem de Transmitância (%T). Na Indumape, estes valores situam-se acima dos 45 %T no caso da cor e acima dos 95 %T no caso da claridade. Estes valores foram determinados num espectrofotómetro Lange DR 500 UV/Vis. Para tal, foi medida a transmitância da amostra diluída a 11,5 °Brix, numa célula de vidro. A amostra foi medida contra o branco de água destilada.

d. Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada utilizando um potenciómetro Thermo Orion 3 Star acoplado a um eletrodo. O potenciómetro encontra-se equipado com uma sonda que determina a temperatura, permitindo assim fazer a correção do valor do pH consoante a mesma. Antes da utilização, o eletrodo deve estar devidamente higienizado e calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0 da marca. A leitura foi obtida após a imersão do eletrodo de vidro na solução. Neste caso a solução vai consistir na diluição de 10 g de concentrado do sumo de maçã em 40 g de água destilada, devidamente agitada na placa de agitação magnética (Figura 22 – A).

e. Determinação da acidez

A determinação da acidez foi determinada pela titulação de NaOH 0,1 M para a solução anteriormente descrita (10,0 g de concentrado de sumo de maçã para 40,0 g de água) até atingir um pH de 8,1 (Figura 22). Este valor é expresso em % (w/w) e no caso da Indumape este valor situa-se entre os 0,8-2,0 %.

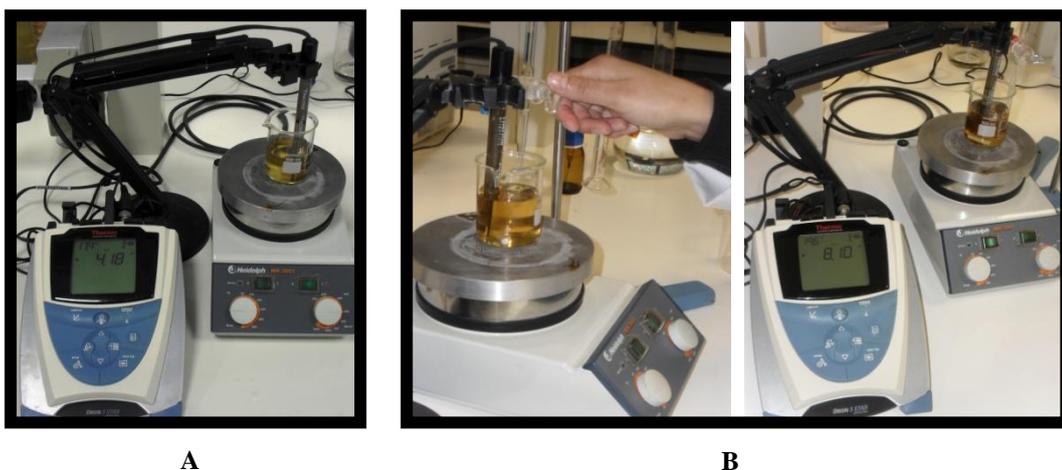


Figura 22 Determinação da acidez. **A.** Determinação e estabilização do pH do sumo. **B.** Titulação de NaOH até o sumo atingir um pH 8,1.

3. Análise de açúcares

Foram analisados os teores em açúcares neutros da fração dialisada (10-12 kDa) e liofilizada de um concentrado de sumo de maçã com valores normais de turbidez (menor ou igual a 3,0 NTU, neste caso com 1,64 NTU) e de um concentrado de sumo de maçã com valores elevados de turbidez (maior que 3,0 NTU, neste caso com 5,44 NTU). Os monossacarídeos foram obtidos por hidrólise ácida, seguida de redução e posterior acetilação. A análise dos acetatos de alditol resultantes foi realizada por cromatografia de fase gasosa (GC-FID) (Coimbra, et al., 1996; Selvendran, et al., 1979).

f. Hidrólise ácida

Em tubos de cultura, pesou-se cerca de 2 mg de cada amostra, ao qual foram adicionados 200 µL de H₂SO₄ a 72%, seguindo-se de uma período de incubação de 3 horas à temperatura ambiente, com agitação ocasional. Após este período de incubação, adicionou-se 2,2 mL de água destilada, procedendo-se a uma hidrólise a 100°C, num bloco de aquecimento, durante 2,5 horas. Após a primeira hora, das 2,5 horas anteriormente referidas, colocaram-se os tubos num banho de água fria e retirou-se 0,5 mL de hidrolisado que posteriormente será utilizado para análise de ácidos urónicos. A hidrólise continuou por mais 1,5 horas no bloco de aquecimento. No final do período de incubação, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo (Selvendran, et al., 1979).

g. Redução e acetilação

Após a adição de 200 µL de padrão interno (2-desoxiglucose 1 mg/mL), foram transferidos 0,5 mL de cada amostra anteriormente hidrolisada para um novo tubo de cultura, os quais foram neutralizados por 200 µL de NH₃ a 25%, procedendo-se a uma confirmação do valor de pH. Posteriormente, procedeu-se à redução, pela adição de 100 µL de NaBH₄ (15% (m/v) em NH₃ 3M) e incubou-se num bloco de aquecimento a 30°C durante uma hora. Findo o período de incubação, as amostras são arrefecidas num banho de gelo e a adicionados duas vezes 50 µL a cada tubo uma solução de ácido acético glacial. Posteriormente, transferiu-se 300 µL da solução anterior para tubos de SORVIREL, num banho de gelo, procedeu-se à adição de 450 µL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético. Após uma rápida agitação, colocou-se os tubos a incubar num bloco de aquecimento a 30°C, durante 30 minutos. Após o período de incubação, colocou-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclometano, seguindo-se de uma forte agitação. As amostras foram centrifugadas cerca de 30 segundos a 3000 rpm, seguindo-se de uma aspiração da fase aquosa por sucção. Repetiu-se este mesmo procedimento mais duas vezes e uma terceira vez pela adição de 3,0 mL de água destilada até remover totalmente a fase aquosa, sem deixar água na parede dos tubos. A fase orgânica de cada amostra foi então transferida para tubos *speedvac* e colocados num evaporador centrífugo (UNIVAPO 100H), a fim de evaporar o

diclorometano. De seguida, foram adicionados 1 mL de acetona anidra às amostras e voltou-se a evaporar. Procedeu-se à repetição deste procedimento (Coimbra, et al., 1996).

h. Análise por GC-FID

Os acetatos de alditol foram dissolvidos com 50 µL de acetona anidra e analisados por GC-FID, no cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400, usando uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura).

4. Análise de ácidos urónicos

A análise de ácidos urónicos das duas amostras (concentrado com valores elevados de turbidez e concentrado com valores normais de turbidez) foi realizada consoante o método colorimétrico modificado do *m*-fenilfenol (Selvendran, et al., 1979; Coimbra, et al., 1996).

A hidrólise foi realizada em simultâneo com a análise dos açúcares neutros. Durante esta etapa foi recolhida uma alíquota de 0,5 mL de hidrolisado de cada amostra, após a primeira hora de incubação, para a realização da análise dos ácidos urónicos. A este volume de hidrolisado recolhido são adicionados 3,0 mL de água destilada (Selvendran, et al., 1979).

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

5. Análise enzimática

a. Enzimas

Foram utilizadas duas amilases distintas, com o nome comercial de Distizym AG e Amilase AG 300L, a primeira das quais produzida e comercializada pela *Erbsloh* e a segunda produzida pela *Novozymes* e comercializada pela *Univar*. Ambas as enzimas foram obtidas pela seleção de estirpes de *Aspergillus niger*.

b. Determinação da atividade enzimática das amilases pelo método de DNS

A atividade das amilases em estudo foi determinada recorrendo à reação com o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Neste método a quantificação dos açúcares com poder redutor é feita com base na oxidação do grupo aldeído dos açúcares redutores com redução do DNS. Os grupos carbonilo do açúcar são oxidados a carboxilos, obtendo-se ácidos aldónicos, enquanto que o DNS passa a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. Este composto apresenta uma cor vermelho-acastanhada, sendo a sua intensidade medida por colorimetria (540 nm). A sua absorvância é diretamente proporcional à concentração de açúcares redutores da amostra (BeMiller, 2010).

c. Curva de calibração dos açúcares redutores

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

Em seguida preparou-se a solução padrão de glucose 5,0 mmol/L. Da solução anteriormente preparada, transferiu-se 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,70; 0,90 e 1,0 mL para tubos e ensaio e perfaz-se o volume total de cada tubo até 1,0 mL com água destilada.

Preparou-se um duplicado para cada concentração. No tubo com o branco utilizou-se 1,0 mL de água destilada. A cada concentração adicionou-se 1,0 mL de solução de DNS. Os tubos foram então homogeneizados e aquecidos num banho em ebulição (Heating Mantles Nahita Model 655) durante 5,0 minutos. Em seguida, foram arrefecidos e diluídos até 10,0 mL com água destilada. Efetuou-se a leitura no espectrofotómetro (Lange DR 500 UV/Vis) a 540 nm.

d. Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática das duas amilases em estudo foi realizada pela quantificação dos açúcares redutores, variando os valores de pH do meio e a temperatura de incubação. Para tal, pipetou-se 1,0 mL de uma solução de amido 2,5 mmol/L e adicionou-se 1,0 mL de água destilada. No tubo do branco utilizou-se 2,0 mL de água destilada. A cada um dos tubos pipetou-se ainda 1,0 mL de solução tampão de acetato (pH 2,5 – 6,0) e incubou-se num banho-maria Julabo TW 20 com temperatura controlada (25°C – 60°C), durante 5 minutos. Findo este período, adicionou-se, em intervalos de 15 segundos, 1,0 mL de solução enzimática convenientemente diluída (1:500 para a Amilase AG 300L e 1:250 para a Distizym AG). Agitou-se bem e incubou-se durante 3 horas. Ao longo destas 3 horas, foram-se retirando tubos após os 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos, procedendo-se à paragem da reação pela adição de 2,0 mL de DNS a cada, igualmente em intervalos de 15 segundos. Todos os valores obtidos foram analisados em duplicado.

6. Análise Microbiológica

A análise microbiológica a que foram submetidas as amostras de concentrado de sumo de maçã seguiu a metodologia de controlo de qualidade a nível microbiológico aplicável pela empresa. Tendo em conta os critérios estabelecidos, procedeu-se à deteção de bolores e leveduras, contagens totais e *Alicyclobacillus*.

a. Colheita da amostra

Aquando da recolha de amostra para este tipo de análise deve-se recorrer a uma metodologia diferente para evitar outros tipos de contaminações externas. Assim, antes da recolha da amostra pulverizou-se a torneira do tanque onde se encontrava o concentrado que se pretendia recolher com álcool etílico 97%, para minimizar o risco de contaminação. A recolha foi então feita para um frasco estéril devidamente rolhado e conservado num frigorífico para uso laboratorial até ao momento da análise.

b. Determinação de Bolores e Leveduras e contagens totais

O procedimento para a determinação de bolores e leveduras e contagens totais é bastante semelhante, registando apenas variações ao nível do meio de cultura, do tempo e da temperatura de incubação adequados para a determinação dos mesmos.

Para ambos os casos, as análises microbiológicas realizaram-se sob condições de assepsia, numa câmara de fluxo laminar TelStar Bio-II-A. Procedeu-se à diluição (1:20) da amostra de concentrado, através da pesagem de 5,0 g de concentrado e diluindo até perfazer um volume de 100 mL, com água estéril e desmineralizada, agitando-se até à completa dissolução. Em seguida, transferiu-se 1,0 mL da solução, com o auxílio de uma pipeta estéril diretamente no centro do filme inferior de cada uma das membranas *Petrifilm* Count Plates 3M: *Petrifilm* Aerobic Count Plate, para contagens totais, e *Petrifilm* Yeast and Mold Count Plate, para deteção de bolores e leveduras. Posteriormente, procedeu-se à distribuição uniforme da amostra com o auxílio de difusor plástico *Petrifilm* YM, no caso dos bolores e leveduras e de um difusor plástico *Petrifilm* AC, no caso das contagens totais, posicionado no centro da placa e pressionando levemente o centro do difusor plástico, imediatamente após a colocação da amostra, para evitar a formação do gel. No primeiro caso, colocou-se os *petrifilms* numa estufa Binder de 35°C, durante 48 h, no segundo caso, colocou-se numa estufa Binder de 25°C, durante 120 h.

Findo o período de incubação, foi realizada a leitura dos microrganismos em UFC/g, contudo é diferenciada a identificação dos microrganismos nestas membranas. No caso do *Petrifilm* Aerobic Count Plate, são contabilizadas colónias vermelhas, independentemente do tamanho ou da intensidade. No caso do *Petrifilm* Yeast and Mold Count Plate, os

bolores apresentam colónias grandes, com bordas difusas, com uma aparência plana e centro escuro, com uma cor bastante variável que pode passar por azul, preto ou amarelo. Já as leveduras apresentam colónias pequenas, com bordas definidas, as colónias parecem elevadas, possuem um centro uniforme e a cor pode variar de castanho-avermelhado ou verde-azulado. Na Ilustração 1, está representada o procedimento para a determinação destes microrganismos.

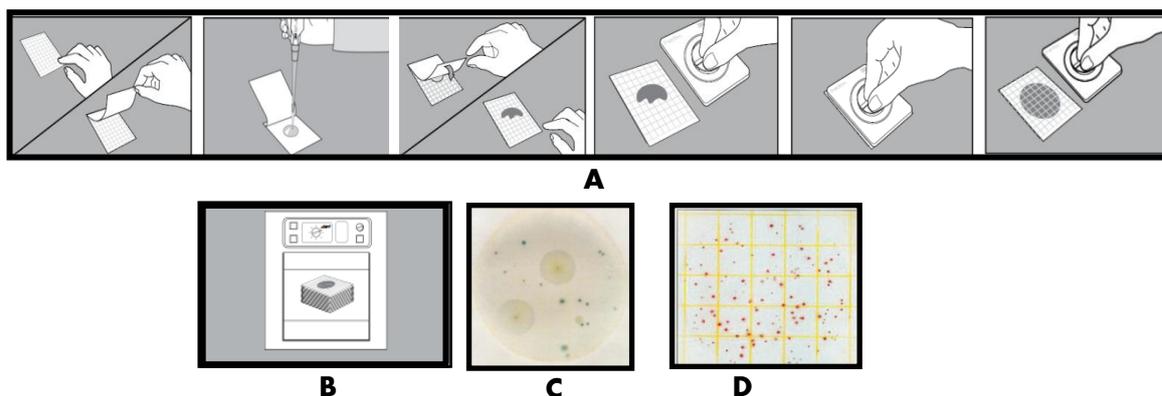


Ilustração 1 Representação esquemática do procedimento para deteção de bolores e leveduras, com recurso a *petrifilms*. **A** – etapas para a colocação da amostra no *petrifilm*. **B** – Incubação em estufa dos *petrifilms*. **C** – *Petrefilm* com colónias características de bolores. **D** – *Petrefilm* com colónias características de leveduras.

c. Determinação de *Alicyclobacillus* spp.

A determinação do *Alicyclobacillus* ocorre sob condições de assepsia na câmara de fluxo laminar, procedendo-se à diluição da amostra de 11,5 °Brix. Seguidamente procede-se à sua agitação até à completa dissolução da solução. Em seguida, a diluição preparada é colocada à temperatura ambiente, num frasco estéril, por um período mínimo de 24 horas.

Findo esse período retira-se 1,0 mL da amostra anteriormente preparada e coloca-se à superfície das placas contendo o meio de cultura BAT Agar.

O meio de cultura BAT Agar é um meio característico para a determinação deste microrganismo. Este meio foi preparado seguindo as instruções presentes na embalagem, ou seja, procede-se à dissolução de 29 g de BAT Agar em 1 L de água desmineralizada e aquece-se até à fervura a fim de obter uma completa dissolução. Posteriormente, leva-se a solução ao autoclave durante 15 minutos a 121°C. Em seguida, a solução é arrefecida até

45-50°C, afim de proceder ao ajuste do pH a $4,0 \pm 0,2$ adicionando 2 M H₂SO₄. Por fim, coloca-se o meio em placas devidamente estéreis e procede-se à sua conservação numa temperatura de 2 a 8 °C, num período não superior a duas semanas.

As placas foram a incubar durante numa estufa Binder a 45 °C, num período de 3-5 dias.

As colónias formadas são pequenas e apresentam uma tonalidade amarelada.

i. Confirmação dos resultados de Alicyclobacillus spp.

O processo de confirmação dos resultados que determinaram a presença de *Alicyclobacillus* spp. é muito importante pois permite confirmar se as colónias obtidas são efetivamente de *Alicyclobacillus*. Para tal, procedeu-se ao espalhamento de uma pequena porção de colónias em meios distintos e a diferentes temperaturas. O espalhamento foi assim feito em meio neutro (PCA), 45°C numa estufa Binder, durante cinco dias; em meio BAT Agar, 65°C, 3 dias e 30°C, 5 dias e ainda 45°C, 5 dias, em meio K Agar. A ausência de colónias em meio neutro é uma fator determinante para a confirmação deste tipo de microrganismos, uma vez que devido às suas características, o *Alicyclobacillus* não cresce em meios com pH neutro. Por outro lado, o crescimento em meio BAT Agar a 65°C e 30°C constitui um ponto de distinção entre diferentes estirpes de *Alicyclobacillus*. Das duas principais estirpes de *Alicyclobacillus*, *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius*, a primeira delas não cresce a temperaturas superiores a 60°C, ao passo que a segunda sim. A utilização do meio K Agar é opcional uma vez que este meio permite o crescimento de ambas as estirpes anteriormente mencionadas, no entanto é mais específico para o crescimento do *A. acidocaldarius*.

The page features a decorative design with three large, overlapping green circles of varying sizes. Two are positioned in the upper right quadrant, and one is in the lower right quadrant. Thin green lines extend from the top left and bottom right corners towards the center, framing the text.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análises físico-químicas

Para avaliar as possíveis causas que influenciam os valores de turbidez no concentrado de sumo, foram selecionados dois concentrados com valores distintos de turbidez, produzidos sensivelmente na mesma altura (início da campanha): um concentrado com valores “normais” de turbidez ($\leq 3,0$ NTU), aqui apresentado como o concentrado A, e um concentrado com valores elevados de turbidez ($> 3,0$ NTU), denominado como o concentrado B. Para além disso, foram ainda selecionados dois concentrados para testar várias técnicas de deteção do *Alicyclobacillus*: o concentrado C, negativo para ACB e o concentrado D, positivo para ACB. Este tema será abordado mais pormenorizadamente na seção correspondente às análises microbiológicas.

Na Tabela 1 estão representadas as análises físico-químicas realizadas na Indumape, Industrialização de Fruta, S.A., para a caracterização dos concentrados, bem como as especificações para este tipo de concentrado.

Tabela 1 Análises físico-químicas realizadas a concentrados de sumo, segundo as especificações da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.

Concentrado de sumo de maçã (AJC)	Data de Produção	°Brix	Acidez (%)	Turbidez (NTU)	Cor 440 nm (% T)	Claridade 625 nm (% T)	pH
Especificações Indumape	-	70 - 71	0,80 - 2,0	$\leq 3,00$	$\geq 45,0$	$\geq 95,0$	-
A	05/09/2013	70,40	1,42	1,64	59,8	97,2	3,70
B	12/09/2013	70,28	1,50	5,44	58,6	96,8	3,62
C	27/11/2013	70,32	1,33	1,43	60,4	97,8	3,62
D	16/12/2013	70,43	1,44	1,27	61,7	98,3	3,67

Como é possível verificar na Tabela 1, parâmetros como o grau Brix, a acidez, a cor e a claridade encontram-se dentro dos limites previamente estabelecidos pela Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.. No entanto, verifica-se uma clara diferença nos valores de turbidez entre os concentrados A e B anteriormente apresentados. Supõe-se que a principal razão para a tão grande diferença registada nos valores de turbidez esteja relacionada com o teor em polissacarídeos, nomeadamente em amido e substâncias pécnicas, principais

polissacarídeos presentes na maçã e muitas vezes associados a níveis elevados de turbidez nos sumos de fruta (Carrín, et al., 2004).

Assim sendo, foram utilizados estes concentrados (A e B), que apresentam valores tão distintos de turbidez para proceder à análise da composição em ácidos urónicos e açúcares neutros, componentes maioritários da pectina e do amido.

2. Análise de Ácidos Urónicos e Açúcares

A composição em ácidos urónicos e açúcares neutros presentes nos concentrados de sumo avaliados estão presentes na Tabela 2. Esta tabela permite ilustrar as principais diferenças presentes ao nível da composição em açúcares nos concentrados de sumo com valores distintos de turbidez, sendo que o concentrado A representa um concentrado de sumo com valores “normais” de turbidez ($\leq 3,0$ NTU) e o concentrado B representa um concentrado de sumo com valores elevados de turbidez ($> 3,0$ NTU). Os rendimentos obtidos foram 0,24 % (m/m) para o concentrado A e 0,69 % (m/m) para o concentrado B.

Tabela 2 Composição química em ácidos urónicos e açúcares dos polissacarídeos dos concentrados de sumo A e B.

	Concentrado A ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Concentrado B ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Ácido Urónico	281 \pm 14	386 \pm 22
Açúcares Neutros		
Rha	0 \pm 0	43 \pm 0
Fuc	0 \pm 0	2 \pm 2
Ara	19 \pm 1	615 \pm 10
Xyl	0 \pm 0	30 \pm 2
Man	0 \pm 0	14 \pm 4
Gal	0 \pm 0	106 \pm 0
Glc	0 \pm 0	77 \pm 14
Total Açúcares	300	1273

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 2 é possível constatar uma maior concentração em ácidos urónicos no concentrado B, em relação ao mesmo valor do

concentrado A. Esta diferença de valores torna-se ainda mais evidente tendo em conta o rendimento das fracções liofilizadas, uma vez que o rendimento da fracção proveniente do concentrado B é cerca de três vezes superior à fracção resultante do concentrado A. Tendo em conta que os polissacarídeos pécticos são constituídos maioritariamente por ácidos urónicos (Ridley *et al.*, 2001), os resultados obtidos permitem concluir que ambas as amostras de concentrados de sumo de maçã analisadas possuem polissacarídeos pécticos, sendo que a amostra turva revela teores em polissacarídeos pécticos muito mais elevados.

A concentração em açúcares neutros também constitui um factor de diferenciação entre as duas amostras analisadas, como é possível constatar pela Tabela 2. O concentrado B regista elevados valores de açúcares neutros, sobretudo arabinose (Ara), galactose (Gal), ramnose (Rha) e glucose (Glc). Atendendo a estes resultados, podemos afirmar que o concentrado B apresenta uma pectina altamente ramificada, com resíduos de ramnose, açúcar presente na cadeia principal de pectinas, e arabinose e galactose, açúcares que fazem parte da cadeia lateral dos polissacarídeos pécticos. Para além dos polissacarídeos pécticos, os elevados níveis de glucose sugerem ainda um elevado teor em amido no concentrado com valores mais elevados de turbidez.

Estes resultados podem ser explicados pelo facto dos concentrados terem sido produzidos no início da campanha com maçãs ao que tudo indica colhidas verdes, ou seja, sem o estado de maturação adequado. O facto do concentrado B revelar resíduos de pectina muito ramificados sugere que as principais enzimas intrínsecas ao fruto (pectina metil esterase e poligalacturonase), necessárias para o amadurecimento do fruto, não hidrolisaram completamente os resíduos de pectina. No caso específico da PME, o seu papel é de elevada importância pois catalisa as reacções de desesterificação da pectina, originando pectato, permitindo assim a atividade de outras enzimas como a PG. Esta última desempenha um papel preponderante no amadurecimento do fruto, catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) entre dois resíduos de ácido galacturónico (Kashyap *et al.*, 2001; Ridley *et al.*, 2001; Uenojo & Pastore, 2007).

Na Tabela 2 fica ainda evidente o total de açúcares que compõem os concentrados A e B. No entanto, como podemos constatar o total em açúcares no concentrado B (1273 $\mu\text{g}/\text{mg}$) apresenta-se sobrestimado. Este valor sugere a presença de um erro experimental originado durante o processo de quantificação de ácidos urónicos e açúcares neutros.

Avaliando os registos enzimáticos durante o período da campanha, período no qual há maior produção de lotes e de concentrados com valores de turbidez superior a 3,0 NTU, podemos observar através da Tabela 3, que foi utilizada a mesma pectinase (Fructozym P6-L) durante o período em estudo e duas amilases distintas, Amilase AG 300L e Distizym AG, de fornecedores distintos. Durante o mês de setembro foram usadas as duas enzimas intercaladamente. No mês de outubro só foi utilizada a Distizym AG e no mês de novembro foi utilizada exclusivamente a Amilase AG 300L. Os resultados correspondentes aos valores médios de turbidez no concentrado de sumo de maçã entre setembro e dezembro de 2013 para cada uma das enzimas estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3 Variação dos valores médios de turbidez (NTU), consoante a enzima utilizada no processo de despectinização, entre setembro e dezembro de 2013.

Enzimas		Fornecedor	Média de NTU	Mínimo de NTU	Máximo de NTU
Pectinase	Fructozym P6-L	Erbsloh	2,05	1,28	2,67
Amilase	Amilase AG 300L	Novozymes			
Pectinase	Fructozym P6-L	Erbsloh	3,28	2,45	5,44
Amilase	Distizym AG	Erbsloh			

Pela análise da Tabela 3 podemos observar uma clara diferença entre os valores de NTU no concentrado de sumo de maçã, o que poderá levar a concluir que as enzimas, nomeadamente a amilase utilizada, uma vez que durante o período em estudo foi utilizada a mesma pectinase (Fructozym P6-L), poderá ter uma influência direta sobre os valores de turbidez. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de Distizym AG não ser adequada para o processo de clarificação de sumos de fruta. Esta enzima encontra-se referenciada pelo fornecedor (Erbsloh) como uma enzima indicada para a hidrólise de produtos farináceos, não sendo portanto específica para a utilização em sumos de fruta. No entanto, o factor monetário é um factor muito importante para indústria e, sob o ponto de vista económico a Distizym AG (4,50€ por bilha de 25 litros) é mais barata que a Amilase AG 300L (6,94€ por bilha), constituindo assim um factor determinante para a escolha desta

enzima. A atividade enzimática das duas amilases foi determinada variando parâmetros como o pH e a temperatura de incubação enzimática.

3. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática

O estudo do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática avaliou a atividade enzimática das amilases, Distizym AG (Erbsloh) e Amilase AG 300L (Novozymes) variando os valores de pH e temperatura de incubação enzimática.

Na Figura 23 encontra-se representada a variação da atividade enzimática variando os valores de pH.

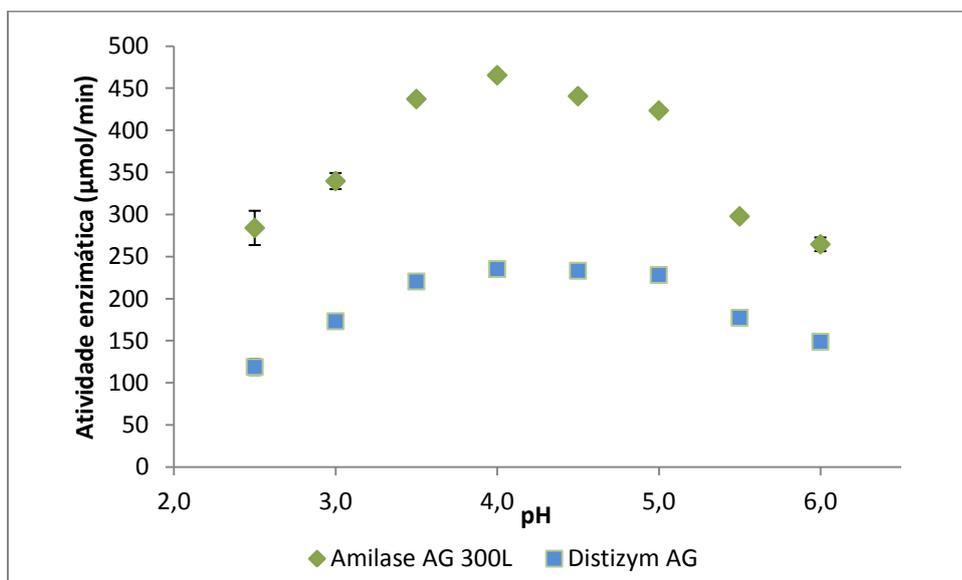


Figura 23 Atividade enzimática da Amilase AG 300L e da Distizym AG, variando os valores de pH.

Pela análise da Figura 23 podemos constatar que ambas as enzimas apresentam uma atividade óptima a pH 4,0 (465,5 µmol/min para a Amilase AG 300L e 235,3 µmol/min para a Distizym AG). A Amilase AG 300L, numa gama de pH 3,5-5,0 apresenta uma atividade enzimática que ronda os 90%, não se verificando uma variação significativa entre os registos enzimáticos. Estes valores estão dentro do esperado, uma vez que o pH do sumo de maçã varia entre pH 3,5 a 4,0. Com o distanciamento em relação a esta gama de pH verifica-se uma diminuição progressiva da atividade enzimática apresentando um

mínimo de atividade enzimática a pH 6,0, onde a sua atividade é reduzida em 45%. Assim como na Amilase AG 300L, a Distizym AG apresenta uma gama óptima de pH entre 3,5 e 5,0, com um rendimento enzimático superior a 90%. Com a variação do pH a sua atividade enzimática reduz-se significativamente apresentando um mínimo a pH 2,5 onde a sua atividade enzimática ficou reduzida em 50%.

O estudo do efeito da temperatura sobre a actividade enzimática encontra-se representado na Figura 24.

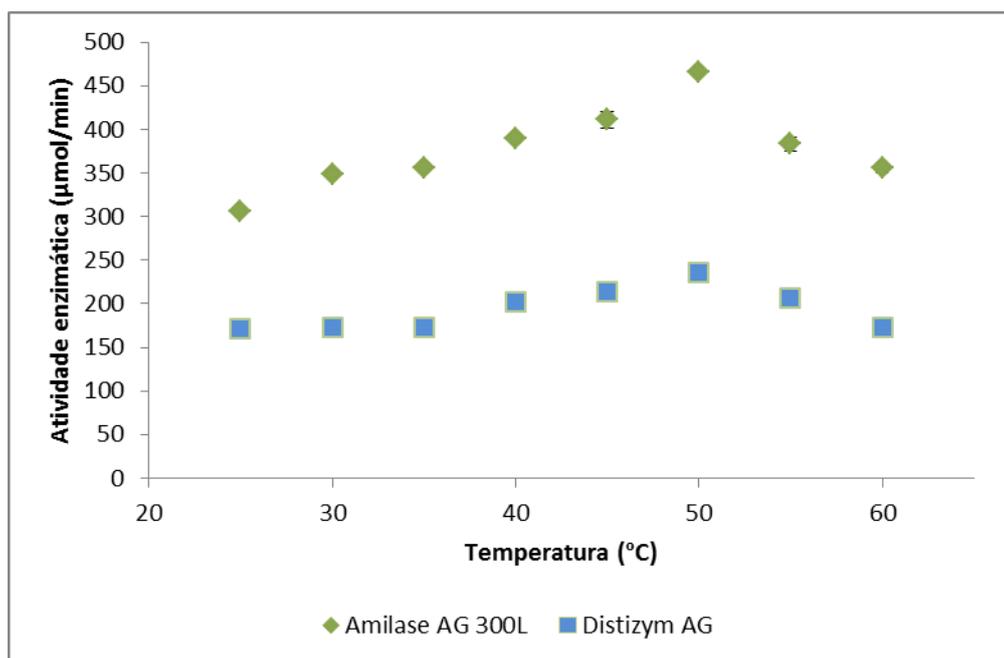


Figura 24 Atividade enzimática das enzimas em estudo, variando os valores de temperatura.

Pela análise da Figura 24 é possível constatar que em qualquer valor de temperatura a atividade enzimática da Amilase AG 300L é superior à atividade enzimática da Distizym AG. A temperatura de maior atividade enzimática é registada a 50°C, apresentando uma atividade enzimática de 465,5 µmol/min no caso da Amilase AG 300L e 235,3 µmol/min no caso da Distizym AG. Os resultados revelam ainda que entre os 45°C e os 55°C, temperaturas mais próximas da temperatura óptima, as enzimas revelam uma atividade enzimática com um rendimento superior a 80%. No entanto, com um maior distanciamento face à temperatura óptima de acção enzimática, a atividade enzimática reduz-se significativamente. Esta redução da atividade enzimática é mais significativa no caso da Distizym AG, que a 25°C apresenta um rendimento de acção enzimática de 65%, menor

quando comparado ao mesmo valor da Amilase AG 300L, com um rendimento enzimático de 72%, a 25°C.

A variação da atividade enzimática a diferentes temperaturas permitiu calcular a energia de activação (E_a) ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$), com base na lei de Arrhenius expressa na equação 1.

$$k = A_f e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

A lei de Arrhenius expressa a dependência da constante de velocidade (k) relativamente à temperatura, onde R é a constante dos gases perfeitos ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K) e A_f é o factor pré-exponencial que representa a frequência de colisões. Esta equação pode ser expressa de forma logarítmica por,

$$\ln k = \ln A_f - \frac{E_a}{RT} \quad (2)$$

A atendendo à equação 2 foi possível calcular a energia de ativação para a Amilase AG 300L e para a Distizym AG pela variação da constante de velocidade em função da temperatura.

A energia de ativação de estimada para a Amilase AG 300L é $1,44 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. A Distizym AG apresenta uma energia de ativação estimada de $4,04 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Estes dados permitem concluir que a energia necessária para a ativação enzimática de Distizym AG é maior que a energia despendida para a ativação da Amilase AG 300L. Estes valores sugerem que é necessário uma maior quantidade de energia para proceder à ativação da Distizym AG quando comparada com a Amilase AG 300L.

Avaliando separadamente a variação da atividade enzimática durante 180 minutos, a 25°C e 50°C da Distizym AG e da Amilase AG 300L (Figura 25 e Figura 26, respectivamente), podemos concluir que a atividade enzimática apresenta um

comportamento semelhante na Amilase AG 300L e na Distizym AG, em ambas as temperaturas. Durante os primeiros 15 minutos há uma redução significativa da atividade enzimática, redução esta que pode chegar aos 70% nos primeiros minutos. Em seguida há uma redução progressiva até aos 60 minutos, período após o qual as enzimas evidenciam apenas uma atividade enzimática residual.

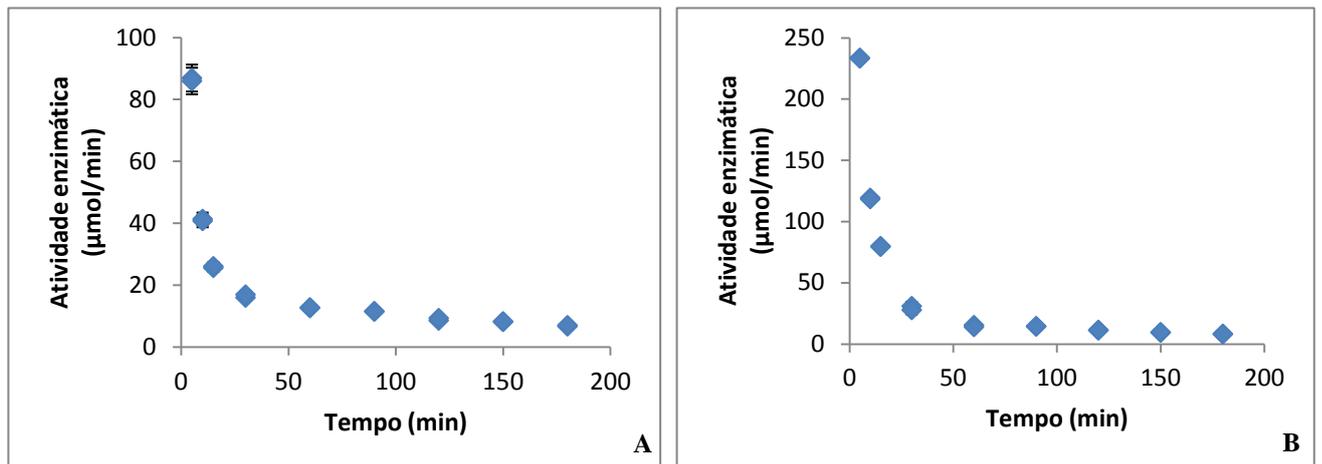


Figura 25 Atividade enzimática da Distizyma AG, por um período de 180 minutos. **A.** Atividade enzimática da Distizym AG a 25°C. **B.** Atividade enzimática da Distizym AG a 50°C.

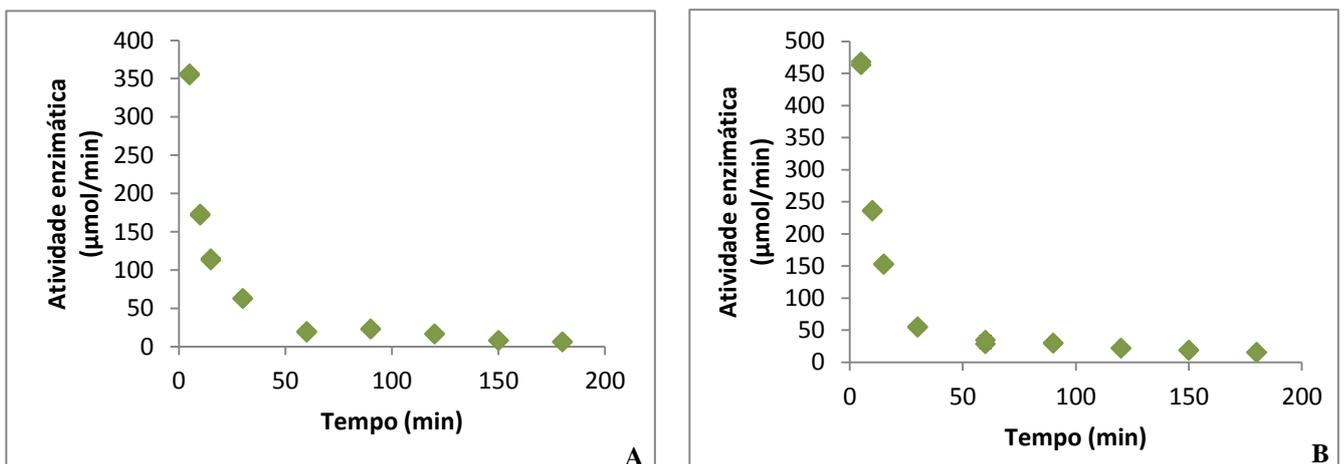


Figura 26 Atividade enzimática da Amilase AG 300L, por um período de 180 minutos. **A.** Atividade enzimática da Amilase AG 300L a 25°C. **B.** Atividade enzimática da Amilase AG 300L a 50°C.

A análise das Figuras 25 e 26 permite concluir que a diminuição da atividade enzimática verificada é originada por inibição pelo substrato e não pela temperatura, pois em ambas as temperaturas o comportamento enzimático é semelhante.

4. Estudo microbiológico

4.1 Análise microbiológica

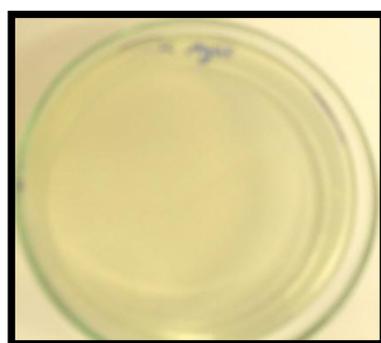
Tabela 4 Análise microbiológica aos concentrados A e B.

Concentrado de sumo de maçã (AJC)	Contagens Totais (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>Alicyclobacillus</i> spp.
Especificações Indumape	100	30	Neg.
A	0	0	Neg.
B	0	0	Neg.
C	0	0	Neg.
D	0	0	Positivo

Na Tabela 4 encontram-se os valores de contagem totais de microrganismos aeróbios e de bolores e leveduras realizados aos concentrados de sumo de maçã. Os concentrados encontram-se de acordo os limites pré-estabelecidos pela Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.. No entanto, para além das contagens totais e dos bolores e leveduras, a deteção de *Alicyclobacillus* constitui um fator essencial para avaliar a qualidade microbiologia do concentrado de sumo de maçã.

Para tal, foram testados vários parâmetros como a escolha da diluição, o tempo e a temperatura de incubação, o tempo de permanência na estufa, bem como técnicas de confirmação rápidas que possam ser aplicadas no contexto da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.. Para tal foi utilizado um concentrado previamente identificado por um laboratório externo (GFL) como contendo ACB – concentrado D e um concentrado também identificado por um laboratório externo (Eurofins) como não contendo ACB – concentrado C.

A partir destes concentrados foram feitas várias alterações ao IFU No. 12, nomeadamente no modo de preparação dos meios, pois durante o período de incubação verificava-se uma redução do meio de cultura das placas. Este problema foi solucionado pela fervura dos meios de cultura, o que foi promover a gelatinização do amido dos meios de cultura. Este processo permitiu solucionar o problema relacionado com a secagem dos meios de cultura, no entanto, continuou-se a verificar a ausência de colónias de ACB (Figura 27 – A). Foram então testados diferentes temperaturas e tempos de pré-aquecimento, testando-se um período de pré-aquecimento de 10 e 20 minutos a 100°C e 80°C, respetivamente, bem como a ausência de qualquer pré-aquecimento. Os resultados obtidos comprovam a ausência de qualquer colónia de ACB. Foi então testada uma diluição de 11,5 °Brix, a diluição de sumo comumente utilizada na Indumape e colocou-se à temperatura ambiente durante um período mínimo de 24 horas, a fim de potenciar a ativação dos esporos. Em seguida, colocou-se 1,0 mL da solução em meio BAT Agar, indo a incubar 5 dias a 45°C. Após o primeiro dia à temperatura ambiente já se torna evidente a formação de colónias ao quinto dia de permanência na estufa a 45°C. No entanto, o número de colónias é de tal forma elevado que torna-se impossível a contagem das mesmas (Figura 27 – D). Assim sendo, foram realizadas novas diluições do sumo, bem como alterações às quantidades de amostra colocadas em meio BAT Agar. Para a diluição de 11,5 °Brix anteriormente testada colocou-se 0,5 mL e 0,1 mL de solução em meio BAT Agar. Para além disso fizeram-se novas diluições de 1:10 e 1:20 e colocaram-se em meio BAT Agar 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL.



A



B

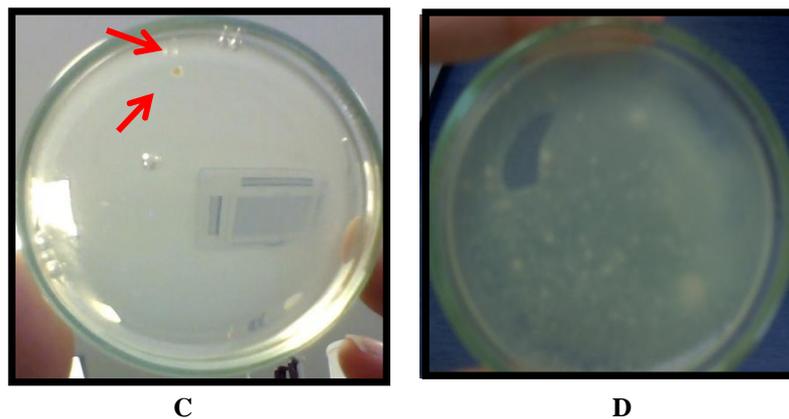


Figura 28 Resultados obtidos após incubação do sumo utilizando diferentes diluições e após diferentes períodos de permanência à temperatura ambiente. **A.** Ausência de colônias. **B.** Presença de uma colônia de *Alicyclobacillus*. **C.** Presença de duas colônias de *Alicyclobacillus*. **D.** Número incontável de colônias de *Alicyclobacillus*.

Os resultados obtidos comprovam que para qualquer uma das diluições em estudo a quantidade mínima de 0,1 mL de solução não é uma opção viável, pois mesmo após 7 dias de permanência à temperatura ambiente não se verifica qualquer colônia em meio BAT Agar (Figura 27 – A). Já utilizando 1,0 mL de solução é possível observar a presença de uma colônia ao primeiro dia de permanência à temperatura ambiente numa diluição de 1:20 e duas colônias na diluição de 1:10 (Figura 27 – B e C). Após o primeiro dia, o número de colônias aumenta consideravelmente, sendo que ao terceiro dia de permanência da solução à temperatura ambiente o número de colônias é completamente incontável (Figura 27 – D). Por outro lado, colocando um volume de solução de 0,5 mL em meio BAT Agar, só é possível observar colônias ao segundo dia de permanência à temperatura ambiente (uma colônia na diluição de 1:20 e duas colônias na diluição de 1:10), após o segundo dia o número de colônias aumenta consideravelmente (Figura 27 – D).

Tendo em conta, os resultados obtidos, podemos concluir que utilizando uma diluição de 1:10 e colocando 1,0 mL de solução em meio BAT Agar tem-se um maior rendimento sob o ponto de vista do tempo despendido para obtenção de resultados.

a. Confirmação/Distinção entre *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius*

A confirmação constitui um ponto essencial para avaliar se as colónias obtidas correspondem efetivamente a *Alicyclobacillus*, uma vez que se trata de um microrganismo com uma tolerância na indústria alimentar de 0 UFC/g.

Assim sendo, para confirmar se as colónias anteriormente formadas eram efetivamente de ACB e qual a estirpe foi necessário estabelecer a um método rápido e eficaz e que pudesse ser facilmente aplicado ao contexto da empresa. Deste modo, e tendo em conta as características fisiológicas do microrganismo bem como dos meios geralmente utilizados para a deteção deste tipo de microrganismo foi possível elaborar um método de confirmação.

Assim sendo, para efetuar o processo de confirmação recolheu-se um número significativo de colónias e procedeu-se ao espalhamento em meios, temperaturas e tempos de incubação distintos. Os resultados obtidos estão presentes na Tabela 5.

Tabela 5 Resultados obtidos após o processo de confirmação.

Modo de Espalhamento	Presença de colónias	Ausência de colónias
1. Espalhamento em meio neutro (PCA), 45°C 5 dias;		X
2. Espalhamento em meio BAT Agar, 30°C 5 dias;	X	
3. Espalhamento em meio BAT Agar, 65°C 2/3 dias;		X
4. Espalhamento em meio BAT Agar, 45°C 5 dias;	X	
5. Espalhamento em meio K Agar, 45°C 5 dias.		X

No primeiro caso foi feito um espalhamento das colónias de ACB obtidas após a inoculação do sumo diluído a partir do concentrado de sumo de maçã em meio neutro, a

45°C durante 5 dias. Após o período de incubação não se verificou a presença de nenhuma colónia, o que vai de encontro ao esperado uma vez que este microrganismo cresce sobretudo em meios ácidos até no máximo pH 6,0, dependendo da estirpe. Assim sendo, a pH 7,0 o seu crescimento é inibido (IFU, 2007; Yokota, et al., 2007).

Em seguida foi feito o espalhamento em meio BAT Agar e meio K Agar. O meio BAT Agar é o meio mais utilizado a nível europeu para a deteção de *Alicyclobacillus*, suportando o crescimento de muitas espécies mas sobretudo do *A. acidoterrestris*, a estirpe mais comum para este tipo de produtos. Já o meio K Agar não é meio tão utilizado a nível europeu, suportando o crescimento de algumas espécies de *Alicyclobacillus*, nomeadamente o *A. acidocaldarius*, uma outra estirpe também muito comum (Chang & Kang, 2004; Yokota, et al., 2007). Como se pode observar pelos resultados (Tabela 5), apenas se verificou o crescimento em meio BAT Agar. Estes resultados permitem confirmar os resultados anteriormente obtidos após o processo de inoculação direta do sumo, ou seja, o crescimento em meio BAT Agar e o não crescimento em meio K Agar, o que à exclui a presença de *A. acidocaldarius* (IFU, 2007).

Posteriormente foram feitos espalhamentos em meio BAT Agar e colocados numa estufa a 65°C e a 30°C, verificando o crescimento exclusivamente a 30°C. Apesar deste microrganismo apresentar uma gama muito variada de temperaturas que pode ir dos 20-70°C, o *Alicyclobacillus acidoterrestris* apresenta uma temperatura ótima de crescimento entre os 25-60°C. Já o *Alicyclobacillus acidocaldarius* apresenta uma gama de crescimento entre os 45-70°C (Chang & Kang, 2004; IFU, 2007; Yokota, et al., 2007).

Posto isto, e tendo em conta os resultados anteriormente apresentados, podemos concluir que as colónias obtidas eram de *Alicyclobacillus*, muito presumivelmente de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Os resultados obtidos permitiram elaborar uma metodologia eficaz de deteção de *Alicyclobacillus* e confirmação/distinção entre *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius* que pode ser já implementada no contexto laboratorial da empresa.

4.2 Metodologia de deteção de *Alicyclobacillus* e confirmação/distinção entre *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius*

a. Metodologia de deteção da presença de *Alicyclobacillus*

1. Diluir o concentrado, numa diluição de 1:10, num frasco estéril, sob condições de assepsia.
2. Colocar o frasco, devidamente rolhado à temperatura ambiente, por um período de 24h.
3. Após as 24h retirar 1,0 mL de solução e colocar em meio BAT Agar, procedendo-se ao seu espalhamento
4. Colocar o meio de cultura numa estufa a 45°C, por um período de 5 dias.
5. Proceder à contagem das colónias.

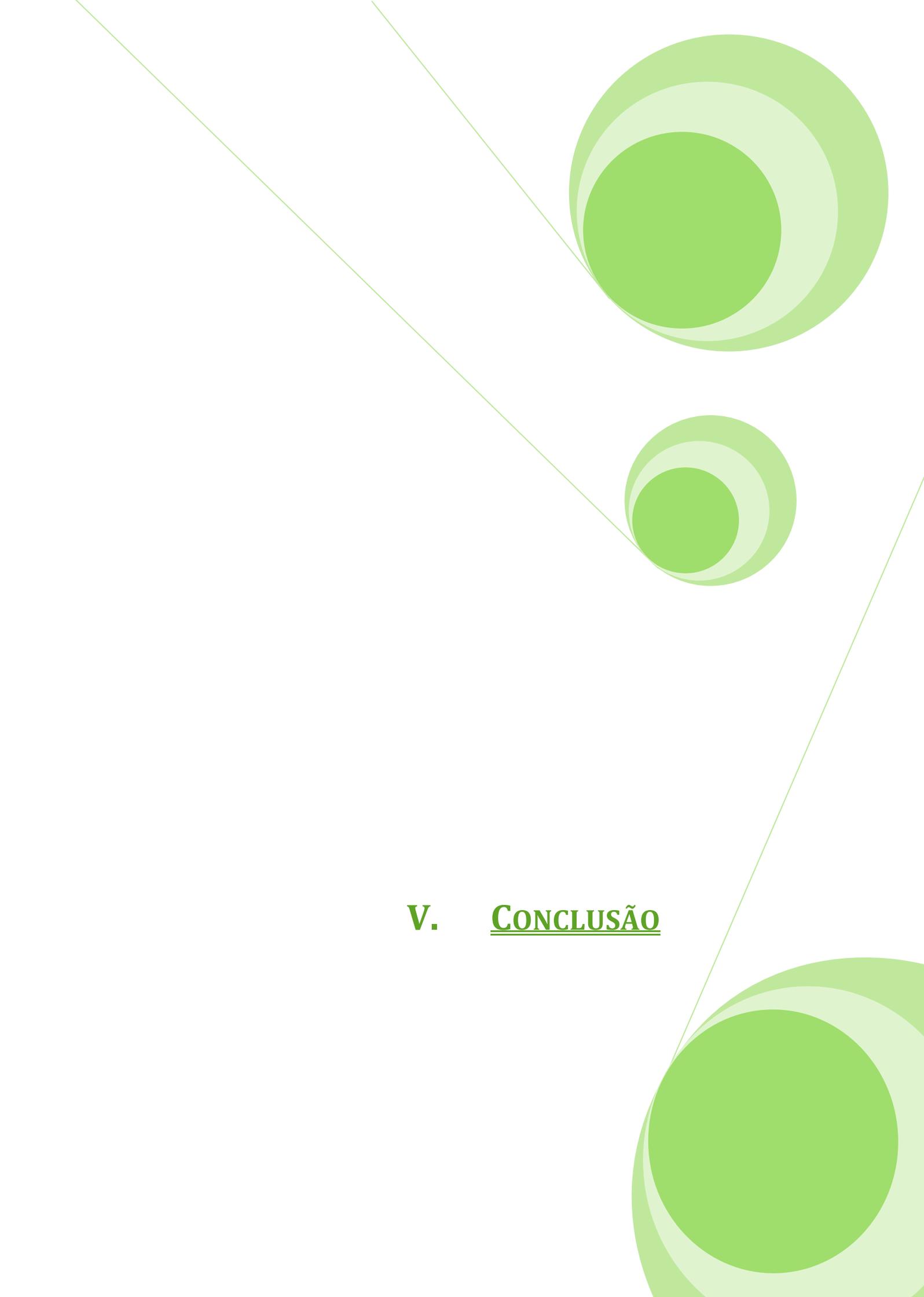
b. Metodologia de confirmação/distinção de *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius*

1. Proceder ao espalhamento em meio PCA, 5 dias, 45°C;
2. Espalhamento em meio BAT Agar, 3 dias, 65°C;
3. Espalhamento em meio BAT Agar, 5 dias, 30°C;
4. Espalhamento em meio K Agar, 5 dias, 30°C.

Na Tabela 6 está representado um guia dos possíveis resultados que poderão ocorrer que permitem identificar se os resultados obtidos serão efetivamente de *Alicyclobacillus*.

Tabela 6 Grelha de resultados que permitem confirmar a presença de *Alicyclobacillus* e distinguir entre o *A. acidoterrestris* e o *A. acidocaldarius* após o espalhamento em placa.

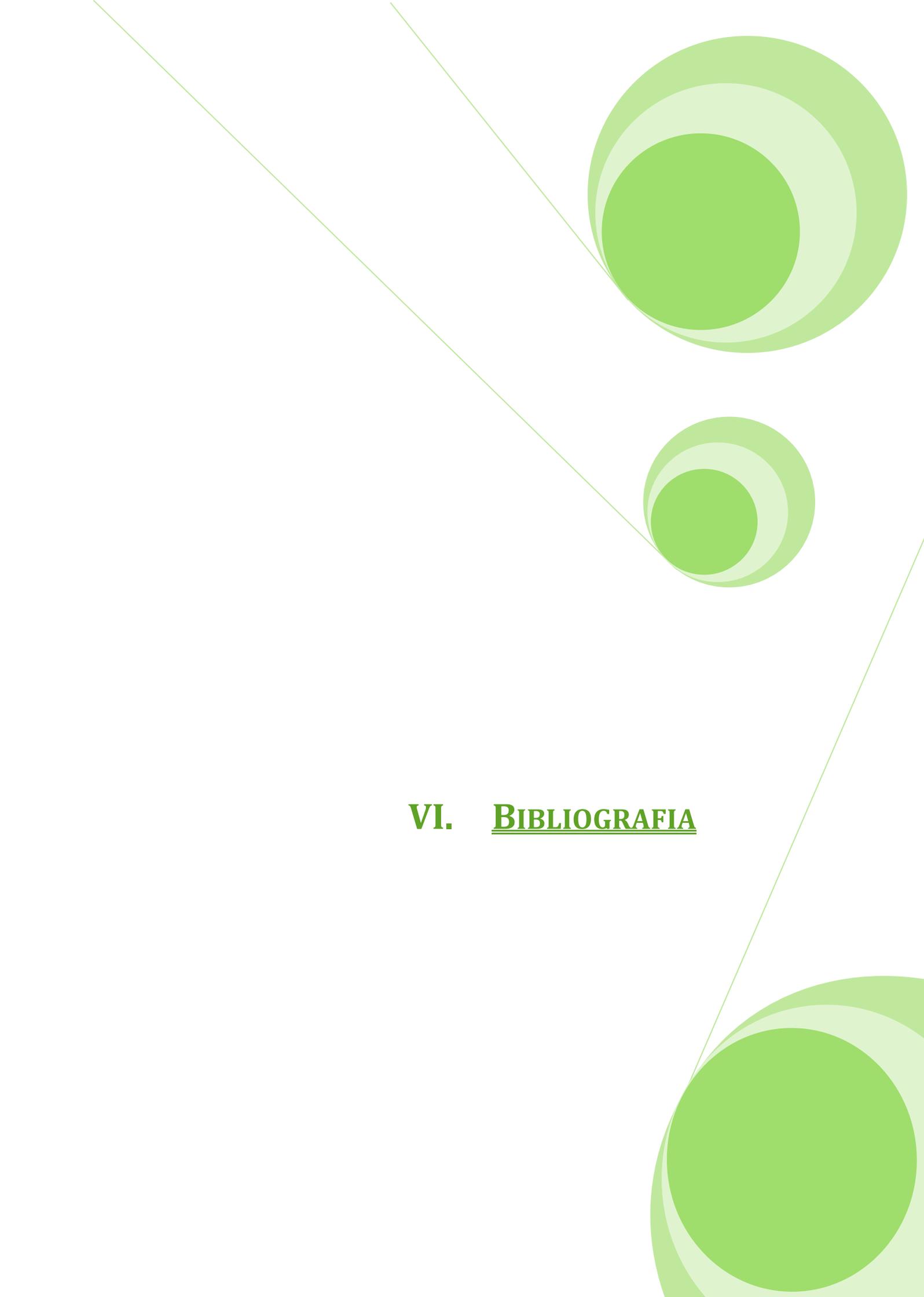
	Meio PCA, 5 dias, 45°C	Meio BAT Agar, 3 dias, 65°C	Meio BAT Agar, 5 dias, 30°C	Meio K Agar, 5 dias, 30°C
<i>A. acidoterrestris</i>	-	-	+	-
<i>A. acidocaldarius</i>	-	+	+	+
Negativo para ACB	+	-	-	-

The page features a decorative design with three green circles of varying sizes, each composed of concentric layers of different shades of green. Two thin green lines intersect at the top left, extending diagonally across the page. The text 'V. CONCLUSÃO' is centered in the lower half of the page.

V. CONCLUSÃO

Este trabalho permite concluir que os polissacarídeos (polissacarídeos pécnicos e amidos) estão na origem dos elevados valores de turbidez nos concentrados de sumo de maçã. Estes valores poderão estar relacionados com a diferente eficiência das enzimas utilizados durante o processo de produção do concentrado de sumo de maçã. A enzima mais indicada para o processo de produção de concentrado de sumo de maçã é a Amilase AG 300L, pois é a que quando utilizada industrialmente apresenta melhores valores de turbidez. A Distizym AG não é recomendada para a produção de sumos, apresentando como tal uma melhor especificidade em relação ao substrato.

Quanto à deteção do *Alicyclobacillus*, o desafio deste trabalho residiu sobretudo em encontrar um método capaz de promover a ativação dos esporos. Uma vez encontrado através de diluições sucessivas de concentrado de sumo de maçã, à temperatura ambiente, e posterior incubação, foi possível realizar otimizar o método por alterações correspondentes à diluição do sumo, ao volume de amostra utilizado e ao tempo de permanência à temperatura ambiente.

The page features a decorative design with three large, overlapping green circles of varying shades (light, medium, and dark green) arranged in a diagonal line from the top right to the bottom right. Two thin, light green lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, one passing through the top of the largest circle and the other through the top of the middle circle.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aehle, W., 2007. *Enzymes in Industry - Production and Applications*. 3ª Edição. Weinheim: Wiley-VCH.
- Alvarez, S., Alvarez, R., Riera, F. A., Coca, J., 1998. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Physicochemical and Engineering Aspects*, 138, 377-382.
- Arthey, D., Ashurst, P. R., 1996. *Fruit Processing*. 1ª Edição. London: Blackie Academic & Professional.
- Barrett, D. M., Somogyi, L., Ramaswamy, H., 2005. *Processing Fruits - Science and Technology*. Second Edition ed. Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- BeMiller, J. N., 2010. Carbohydrate Analysis. In Nielsen, S. S., *Food Analysis*. 4ª Edição. USA: Springer, 152-174.
- Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Corbo, M. R., 2008. Alicyclobacillus acidoterrestris: New methods for inhibiting spore germination. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 103-110.
- Blennow, A., Engelsen, S. B., Munck, L., Moller, B. L., 2000. Starch molecular structure and phosphorylation investigated by a combined chromatographic and chemometric approach. *Carbohydrate Polymers*. 41, 163-174.
- Bowen, W. R., Williams, P. M., 1996. Dynamic ultrafiltration model for proteins: a colloidal interaction approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 125-135.
- Brownleader, M. D., Jackson, P., Mobasheri, A., Pantelides, A. T., Sumar, S., Trevan, M., Dey, P. M., 1999. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(2), 149-164.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S., 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.
- Caffall, K. H., Mohnen, D., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344, 1879-1900.
- Carrín, M. E., Ceci, L. N., Lozano, J. E., 2004. Characterization of starch in apple juice and its degradation by amylases. *Food Chemistry*, 87, 173-178.
- Chang, S. S., Kang, D. H., 2004. *Alicyclobacillus spp.* in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 55-74.
- Coimbra, M. A., 1993. *Isolamento e caracterização dos polissacarídeos das paredes celulares da azeitona*. Tese de doutoramento. Universidade de Aveiro.

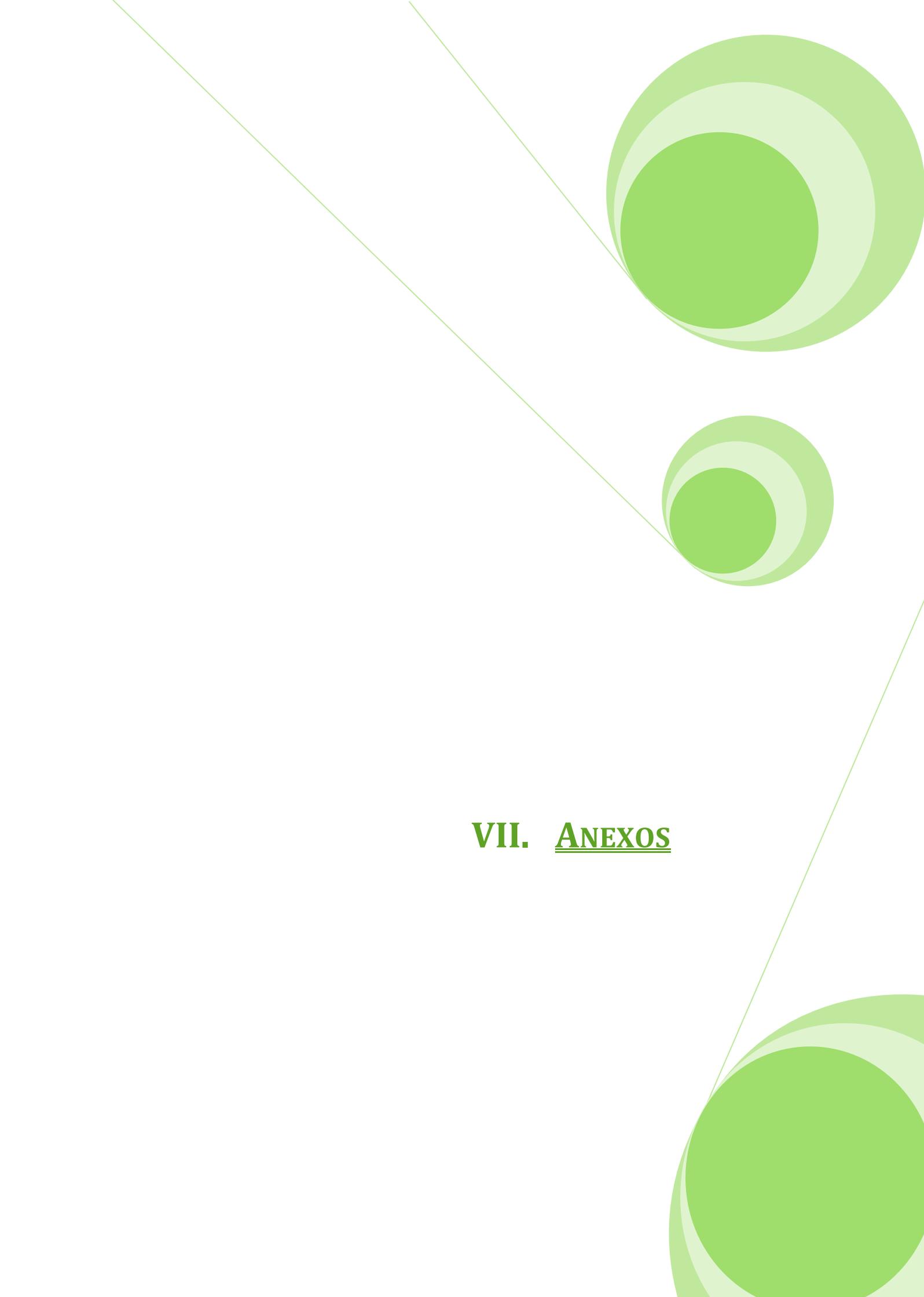
- Coimbra, M. A.; Barros, A.; Barros, M.; Rutledge, D. N.; Delgadillo, I., 1998. Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 37, 241-248
- Coimbra, M. A., Degadillo, I., Waldron, K. W., Selvendran, R. R., 1996. Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. *Modern Methods of Plant Analysis*, 17, 19-44.
- Dapeng, Z., Yongzhang, W., 2002. β -amylase in developing apple fruits: activities, amounts and subcellular localization. *Science in China*, 45, 429-440.
- Denès, J. M., Baron, A., Renard, C. M., Péan, C., Drilleau, J. F., 2000. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research*, 327, 385-393.
- Dziedzic, S. Z., Kearsley, M. W., 1995. *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives*. Berlin: Springer.
- Echavarría, A. P., Torras, C., Pagán, J., Ibarz, A., 2011. Fruit juice processing and membrane technology application. *Food Engineering*, 3, 136-158.
- El Hadi, M. A., Zhang, F. J., Wu, F. F., Zhou, C. H., Tao, J., 2013. Advances in Fruit Aroma Volatile Research. *Molecules*, 18, 8200-8229.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2001. Principles and practices of small- and medium-scale fruit juice processing.
- Food Ingredients Brazil (FIB), 2009. As Micotoxinas. *Revista FIB Food Ingredients*, 7, 32-40.
- Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP), 2013. *Maçã*. Ministério da Agricultura e do Mar.
- Goesaert, H., Bijttebier, A., Delcour, J. A., 2010. Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: level of inner chain attack as an important analytical differentiation criterion. *Carbohydrate Research*, 345, 397-401.
- Goulão, L. F., Santos, J., Sousa, I., Oliveira, C. M., 2007. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology Technology*, 43, 307-318.
- Grassin, C., Coutel, Y., 2010. Enzymes in fruit and vegetable processing and juice extraction. In: *Enzymes in Food Technology*. 2ª Edição ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 236-263.
- Groenewald, W. H., Gouws, P. A., Witthuhn, R. C., 2009. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology*, 26, 71-76.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Scheller, H. V., 2010. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology*, 153(2), 384-395.

- Hedrick, U. P., 1922. *Cyclopedia of Hardy Fruits*. Bedford, Massachusetts: Applewood Books .
- Henczka, M., Djas, M., Filipek, K., 2013. Optimisation of a direct plating method for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Microbiological Methods*, 92, 1-8.
- Indumape - Industrialização de Fruta, S.A., 2011. [Online] Available at: www.indumape.pt [Accessed 09 dezembro 2013].
- Indumape - Industrialização de Fruta, S.A., 2012. *Apresentação da empresa*. Pombal
- Indumape, Industrialização de Fruta, S.A. , 2013. *Ficha técnica do Concentrado de Sumo de Maçã* . Pombal.
- Instituto Nacional de Estatística (I.N.E), 2007. *Maçã*. Ministério da Agricultura e do Mar.
- International Federation of Fruit Juice Producers (IFU). (2007). Method on the detection of taint producing *Alicyclobacillus* in fruit juices. *IFU Method No. 12*, 1-11.
- Jacob, N., 2009. Pectinolytic Enzymes. In: *Biotechnology for Agro-industrial residues utilisation*. Kerala: Springer Science , 383-396.
- Janick, J., Cummins, J. N., Brown, S. K., Hemmat, M., 1996. Chapter 1: Apple. In: *Fruit Breeding, Volume 1, Tree and Tropical Fruits*, 1-77.
- Jayani, R. S., Saxena, S., Grupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.* 40, 2931-2944.
- Karrer, E. E., Litts, J. C., Rodriguez, R. L., 1991. Differential expression of α -amylase genes in germinating rice and barley seeds. *Plant Molecular Biology*, 16, 797-805.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77, 215-227.
- Knox, J. P., Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W., 2001. Pectin: cell biology and prospects for function analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9-27.
- Komitopoulou, E., Bozlaris, I. S., Davles, Broughton, E., J. D., Adams, M., 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 81-85.
- Kraemer, J. E. G., Mundstock, E. C., Molina, S. C., 2001. Developmental Expression of Amylases during Barley Malting. *Journal of Cereal Science*, 33, 279-288.
- Li, K. T., 2012. Physiology and Classification of Fruits. In: *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. 2ª Edição. Iowa: Wiley-Blackwell Publishing, 3-12.

- Masmoudi, M., Besbes, S., Abbes, F., Robert, C., Paquot, M., Blcker, C., Attia, H., 2012. Pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice: effect of extraction conditions on chemical composition of pectins. *Food Bioprocess Technology*, 5, 687-695.
- Nunes, C., Silva, L., Fernandes, A.P., Domingues, M. R., Coimbra, M. A., 2012. Occurrence of cellobiose residues directly linked to galacturonic acid in pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 87, 620-626.
- Observatório dos Mercados Agrícolas e Importações Agroalimentares (OMAIAA), 2012. Maçã.
- Observatório dos Mercados Agrícolas e Importações Agroalimentares (OMAIAA), 2012. *Evolução de cotações: Maçã Golden Delicious e Gala*.
- O'Neill, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill A.G., Albersheim, P., 1997. Rhamnogalacturonan-II, a pectin polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *Biological Chemistry*, 271, 22923-22930.
- Parker, R., Ring, S., 2001. Aspects of Physical Chemistry of Starch. *Journal of Cereal Science*, 34, 1-17.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3ª Edição ed. New York: Springer.
- Plocharski, W. J., Konopacka, D., Zwierz, J., 2000. Comparison of Magness-Taylor's pressure test with mechanical, non-destructive methods of apple and pear firmness measurements. *International Agrophysics*, 14, 311-318.
- Pontius, A. J., Rushing, J. E., Foegeding, P. M., 1998. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *Journal of Food Protection*, 61(1), 41-46.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., Mohnen, D., 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929-967.
- Selvendran, R. R., March, J. F., Ring, S. G., 1979. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Analytical Biochemistry*, 96 (2), 282-292.
- Silva, F. V., Gibbs, P., 2001. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Food Science & Technology*, 12, 68-74.
- Simpson, M. G., 2006. *Plant Systematics*. 2ª Edição. Elsevier – Academic Press.
- Sinha, N. K., 2006. Apples. In: *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. 1ª Edição. Iowa: Blackwell Publishing, 265-278.
- Smith, A. M., Denyer, K., Martin, C., 1997. The Synthesis of the starch granule. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 67-87.

- Sorrivas, V., Genovese, D. B., Lozano, J. E., 2006. Effect of pectinolytic and amylolytic enzymes on apple juice turbidity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30, 118-133.
- Spieß, W., Schubert, H., 1989. Recovery and concentration of apple juice aroma compounds by pervaporation. *Journal of Food Engineering*, 10, 65-71.
- Sriamornask, P., 2003. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn University International Journal*, 3, 206-228.
- Tester, R. F., Karkalas, J., Qi, X., 2004. Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39, 151-165.
- Uenojo, M., Pastore, G., 2007. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 30, 388-394.
- United States Department of Agriculture (USDA), 2007. *Nutrient Database Laboratory*. [Online] Available at: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2200?fg=&man=&facet=&format=Stats&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup=apple> [Accessed 13 novembro 2013].
- United States Department of Agriculture (USDA), 2010. *Investment in processing industry turns chinese apples into juice exports*.
- United States Department of Agriculture (USDA), 2012. *Apples: processed utilization and season-average grower price, United States, 1980-2010*. [Online] Available at: <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1825> [Accessed 11 novembro 2013].
- United States Department of Agriculture (USDA), 2012. *World apple production, including top-producing countries, 1980-2010*. [Online] Available at: <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1825> [Accessed 11 novembro 2013].
- United States Environmental Protection Agency (EPA), 1999. *Guidance manual for compliance with the interim enhanced surface water treatment rule: turbidity provisions*.
- Vorage, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A., 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263-275.
- Vries, J. A., Vorage, A. G., Rombouts, F., Pilnik, W., 1982. Changes in the structure of apple pectic substances during ripening and storage. *Carbohydrate Polymers*, 4, 3-13.
- Wakabayashi, K., 2000. Changes in Cell Wall Polysaccharides during fruit ripening. *Journal of Plant Research*, 113(3), 231-237.

- Yokota, A., Fujii, T., Goto, K., 2007. *Alicyclobacillus - Thermophilic Acidophilic Bacilli*. Tokyo: Springer.
- Zárate-Rodríguez, E., Ortega-Rivas, E., Barbosa-Cánovas, G. V., 2001. Effect of membrane pore size on quality of ultrafiltered apple juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 663-667.
- Ziegler, E., Ziegler, H., 1998. *Flavourings: production, composition, applications and regulations*. Weinheim : Wiley-VCH.
- Ziegler, P., 1999. Cereal *Beta*-Amylases. *Journal of Cereal Science*, 29, 195-204.

The page features a decorative design with three large, overlapping green circles in the top right and bottom right corners. A thin green line runs diagonally from the top left towards the center, passing between the top two circles and above the middle one. The text 'VII. ANEXOS' is centered on the page.

VII. ANEXOS

A - Curva de Calibração de glucose

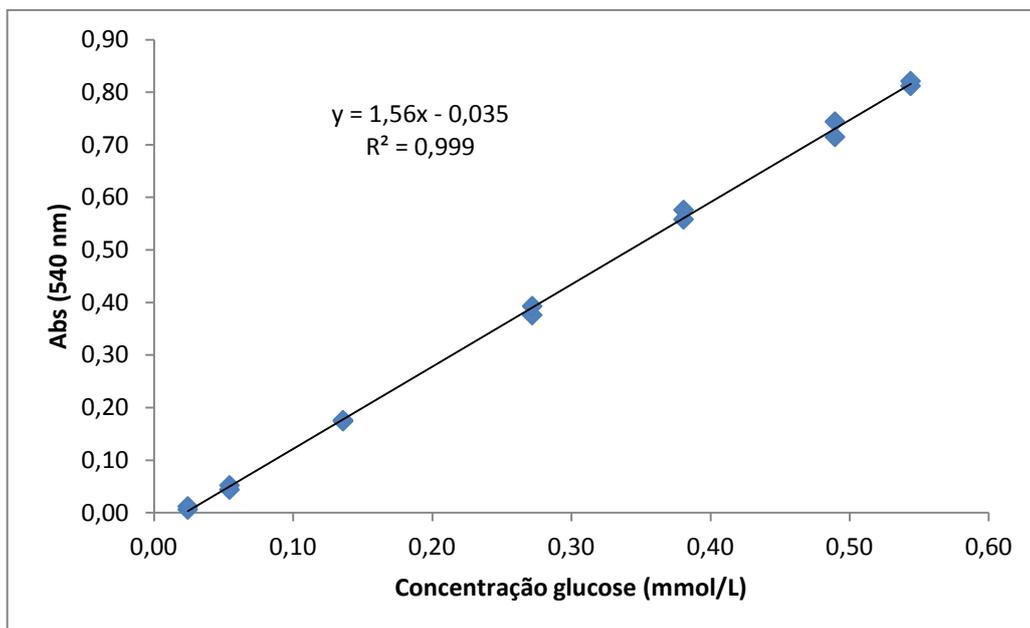


Figura 29 Reta de calibração de glucose, obtida pelo método de DNS.

B - Atividade enzimática a 25°C da Distizym AG e da Amilase AG 300L, a diferentes gamas de pH

a. pH 3,0

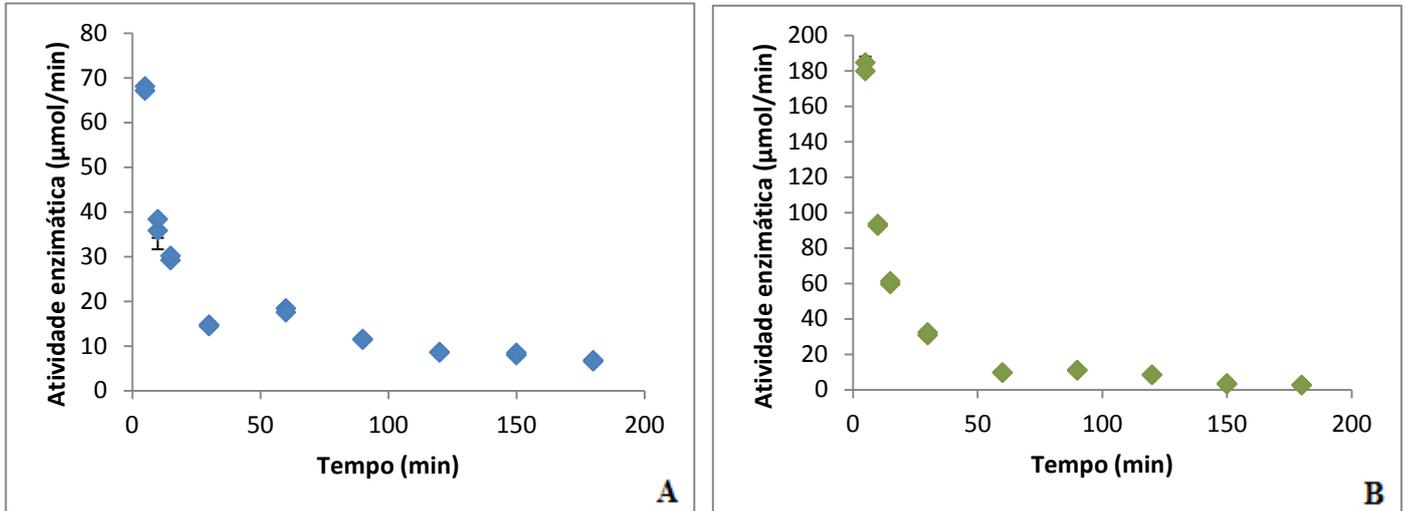


Figura 30 Atividade enzimática a 25°C, pH 3,0 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).

b. pH 3,5

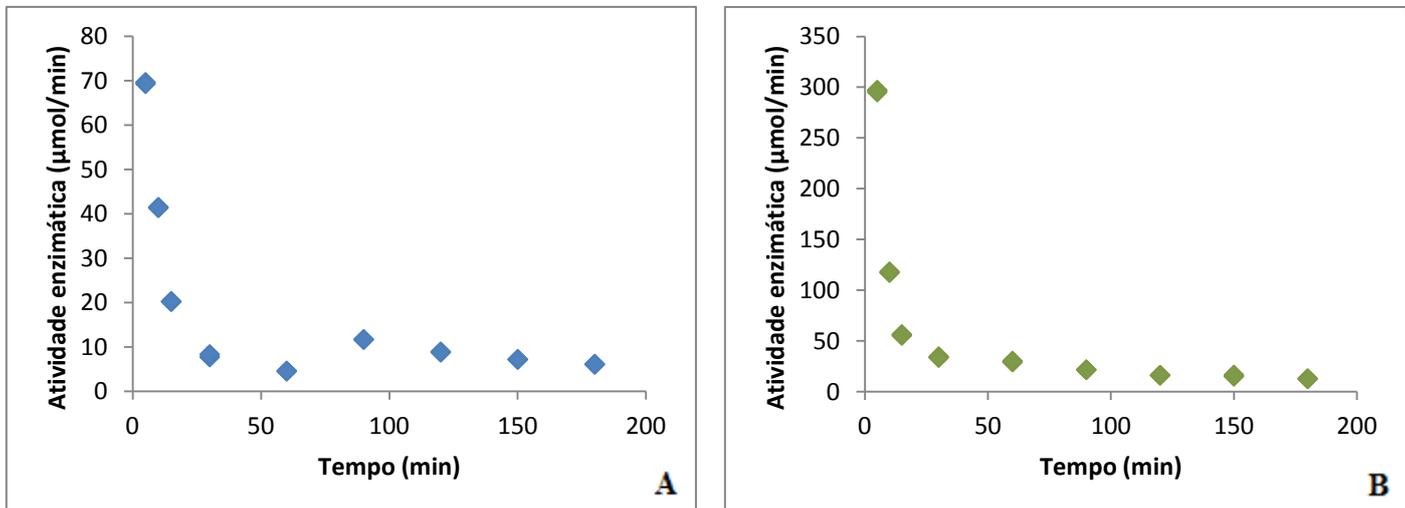


Figura 31 Atividade enzimática a 25°C, pH 3,5 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).

c. pH 4,0

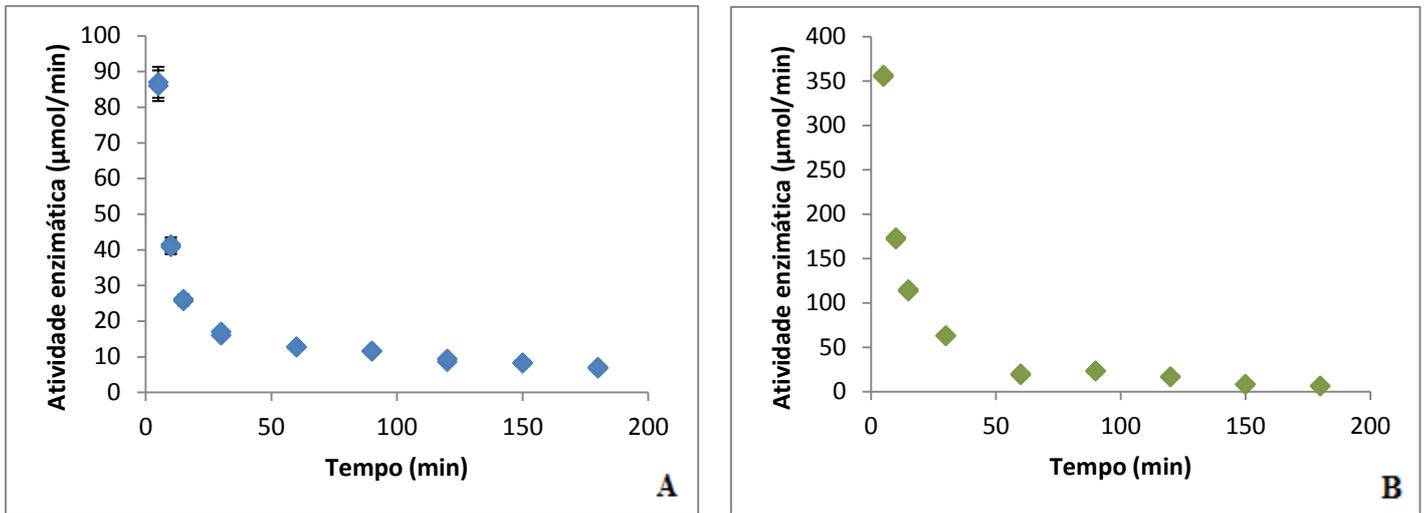


Figura 32 Atividade enzimática a 25°C, pH 4,0 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).

d. pH 4,5

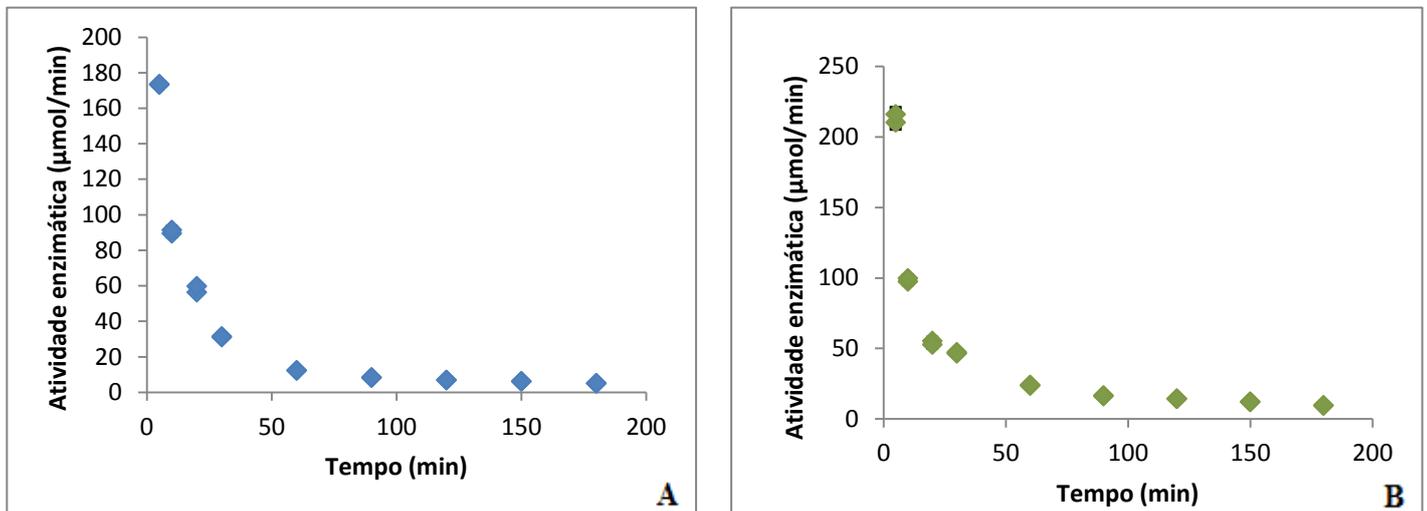


Figura 33 Atividade enzimática a 25°C, pH 4,5 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).

e. pH 5,0

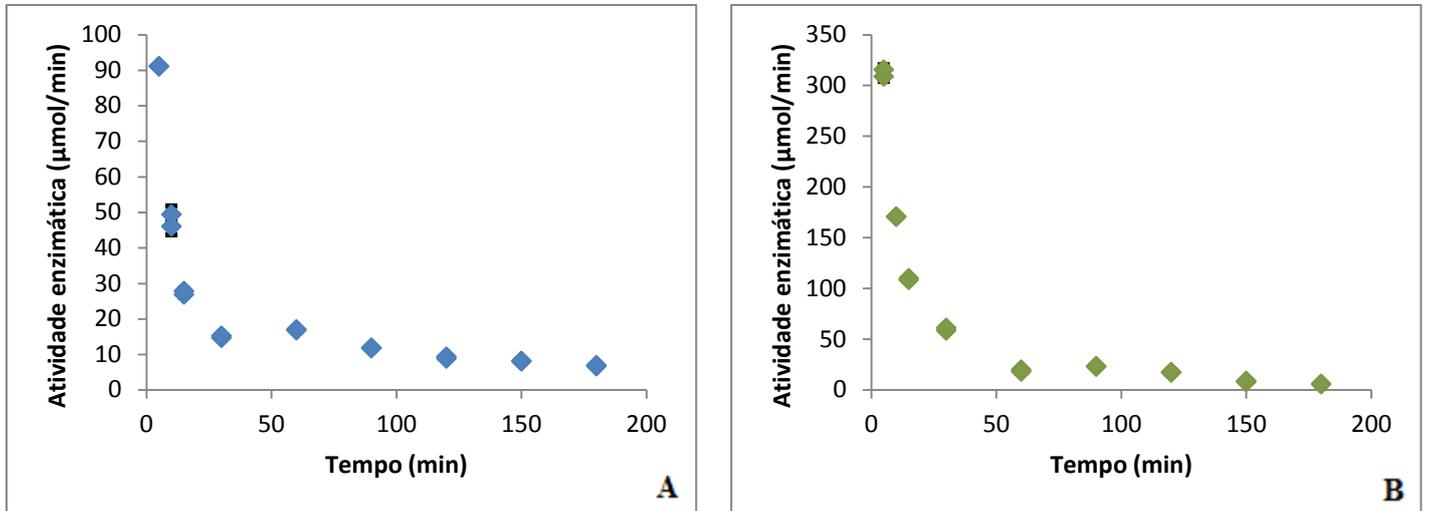


Figura 34 Atividade enzimática a 25°C, pH 5,0 utilizando a Distizym AG (A) e a Amilase AG 300L (B).

C - Atividade enzimática variando a gama de temperatura, mantendo o pH 4,0 no caso da Amilase AG 300L e pH 4,5 no caso da Distizym AG

a. Temperatura 30°C

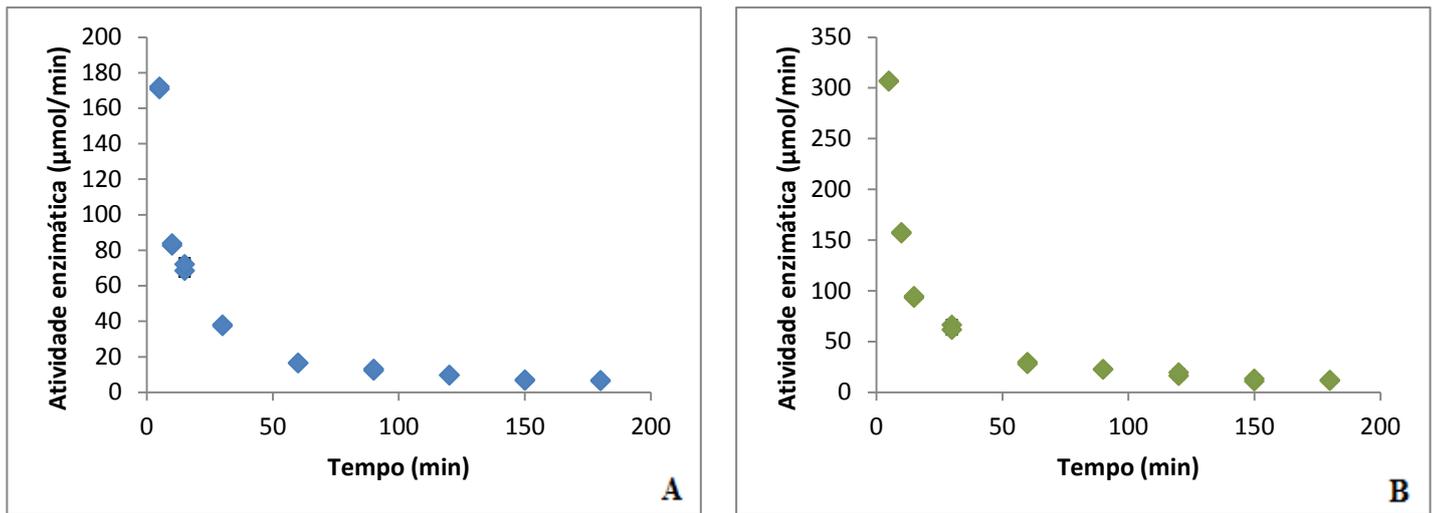


Figura 35 Atividade enzimática a 30°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.

b. Temperatura 35°C

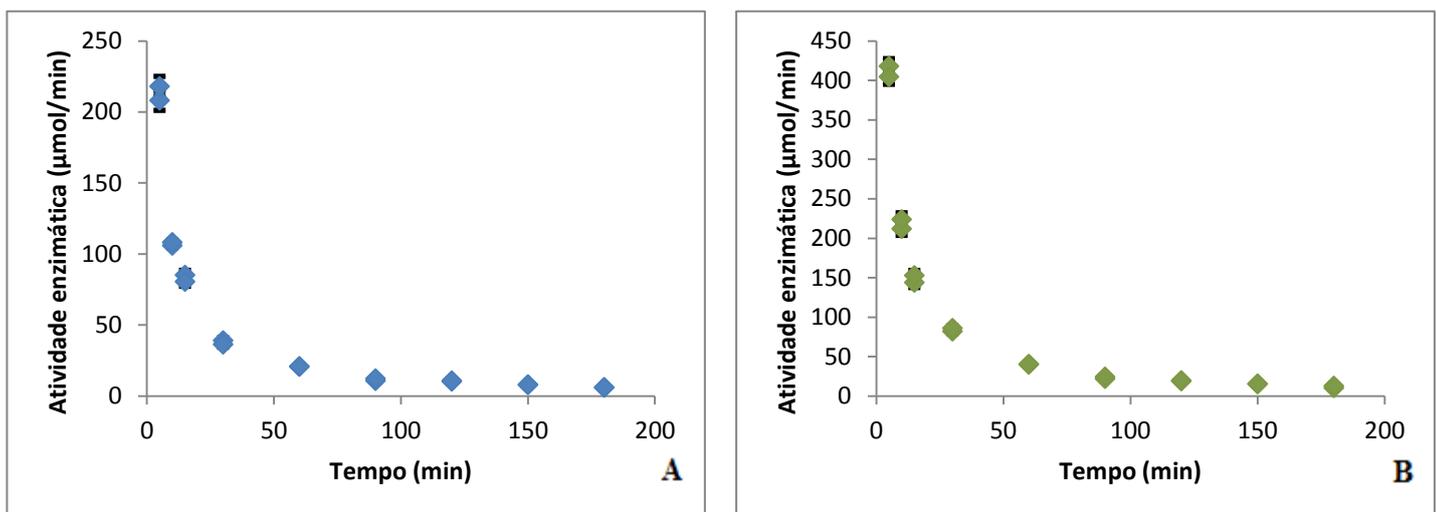


Figura 36 Atividade enzimática a 35°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.

c. Temperatura 40°C

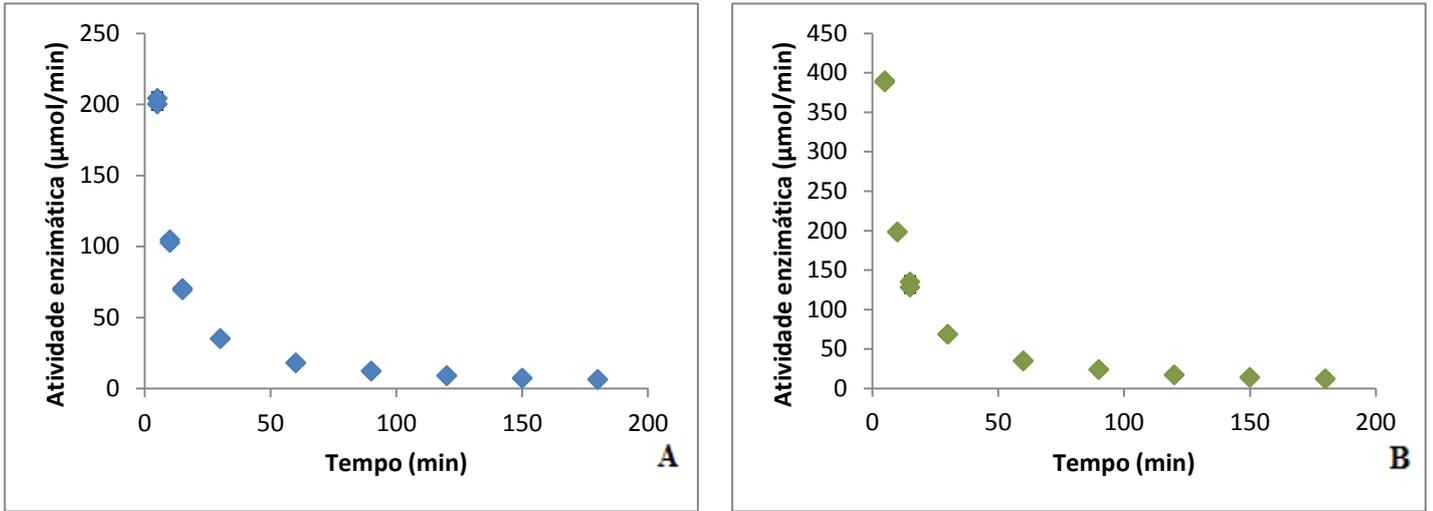


Figura 37 Atividade enzimática a 40°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.

d. Temperatura 45°C

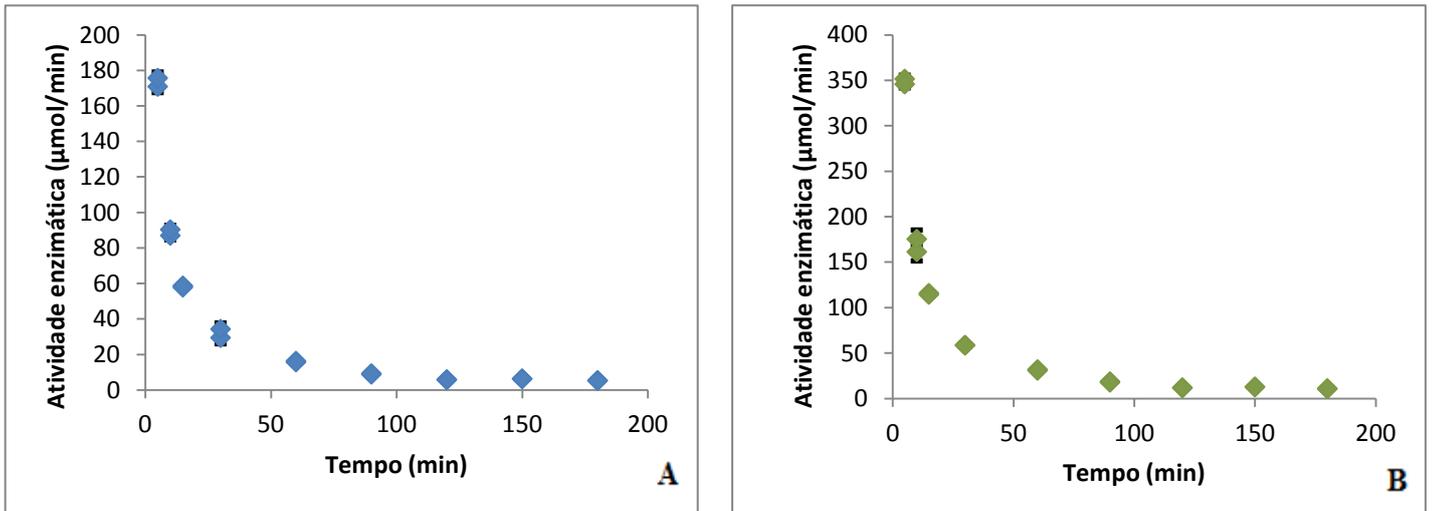


Figura 38 Atividade enzimática a 45°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.

e. Temperatura 50°C

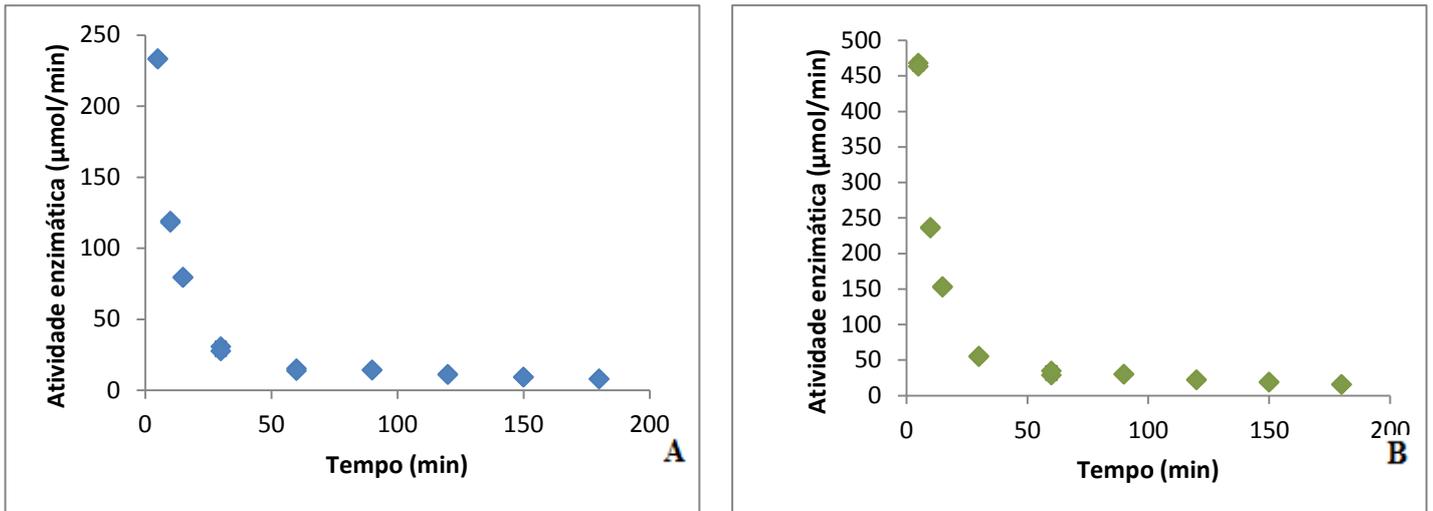


Figura 39 Atividade enzimática a 50°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.

f. Temperatura 55°C

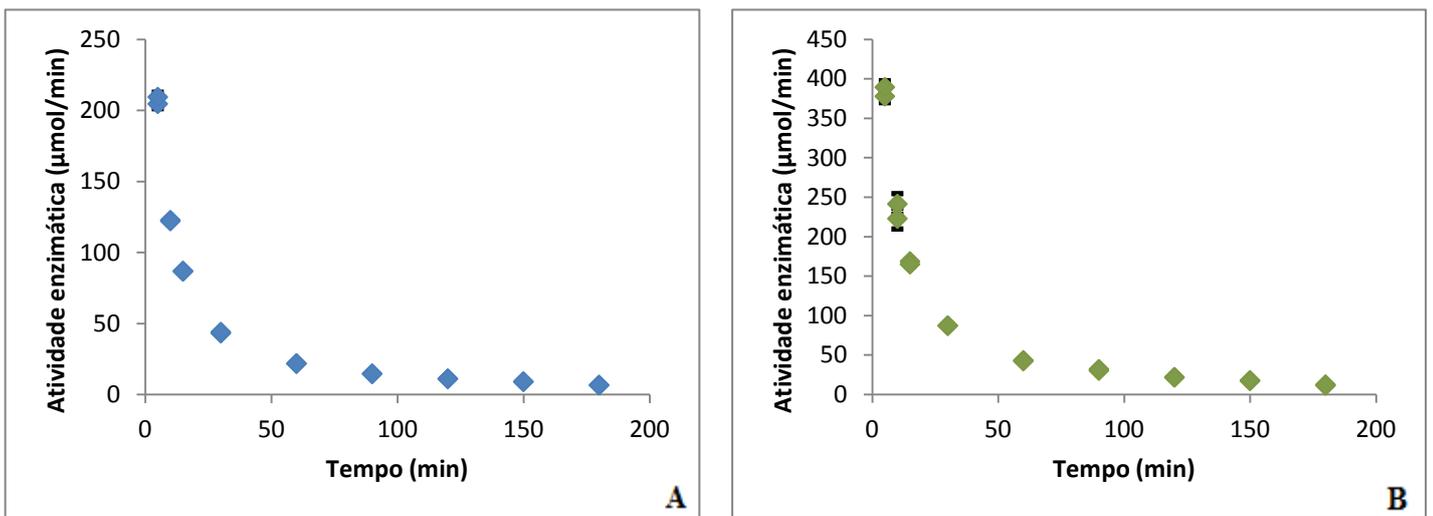


Figura 40 Atividade enzimática a 55°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.

g. Temperatura 60°C

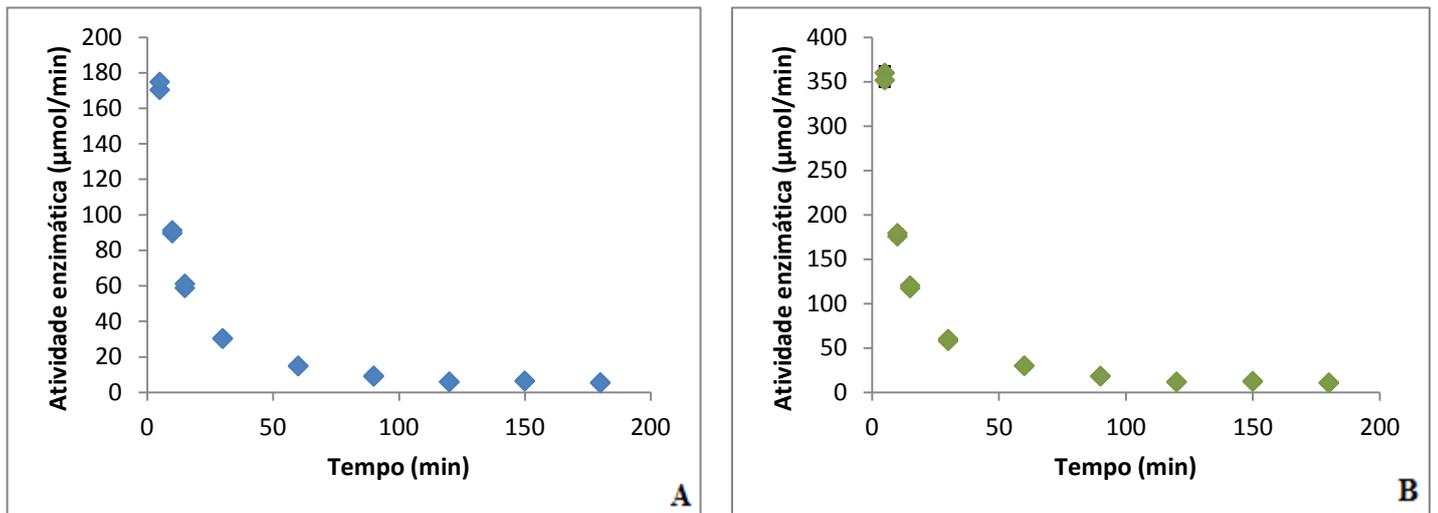


Figura 41 Atividade enzimática a 60°C, utilizando (A) Distizym AG a pH 4,5 e (B) Amilase AG 300L a pH 4,0.

D - Atividade enzimática da Distizym AG e da Amilase AG 300L a 50°C, variando os valores de pH

a. pH 2,5

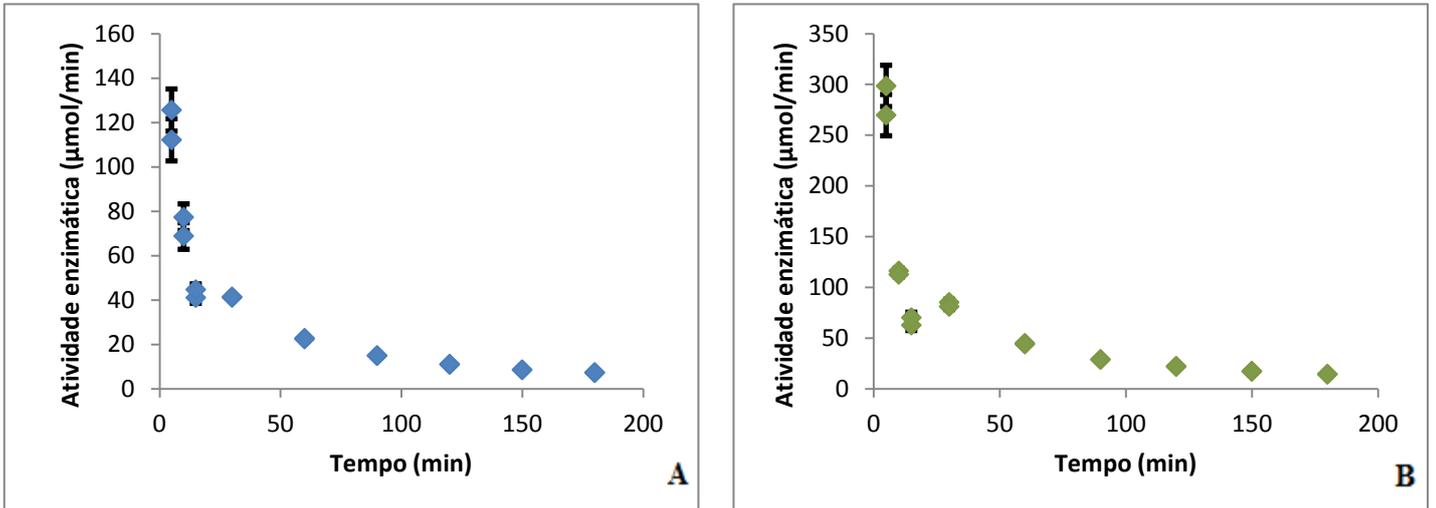


Figura 42 Atividade enzimática a 50°C, pH 2,5 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.

b. pH 3,0

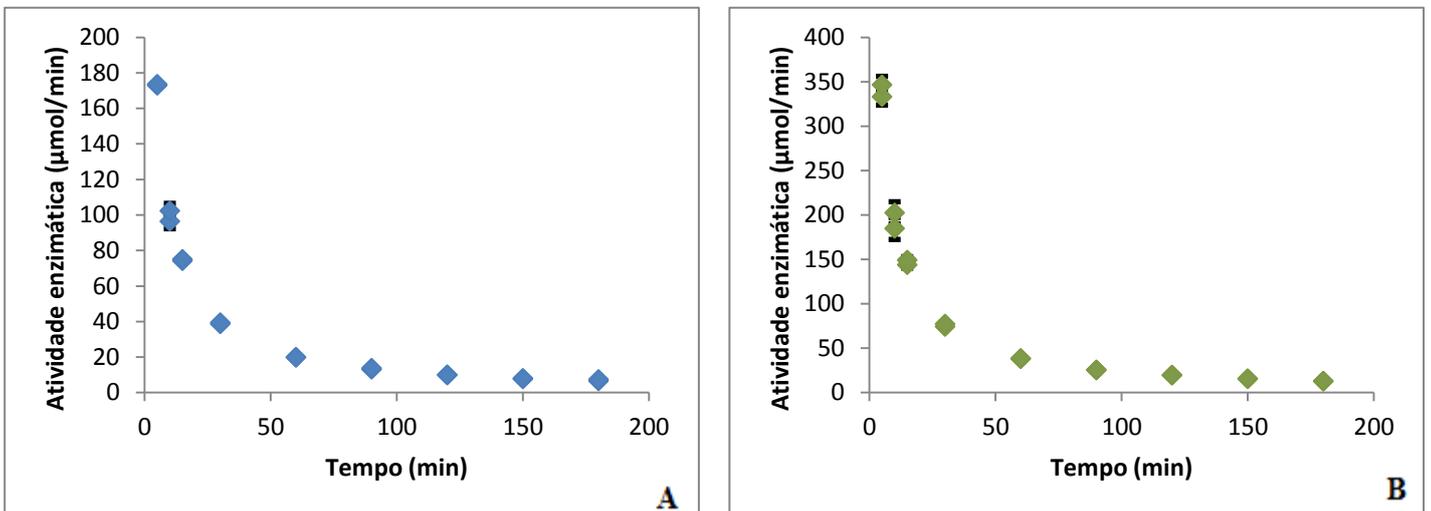


Figura 43 Atividade enzimática a 50°C, pH 3,0 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.

c. pH 3,5

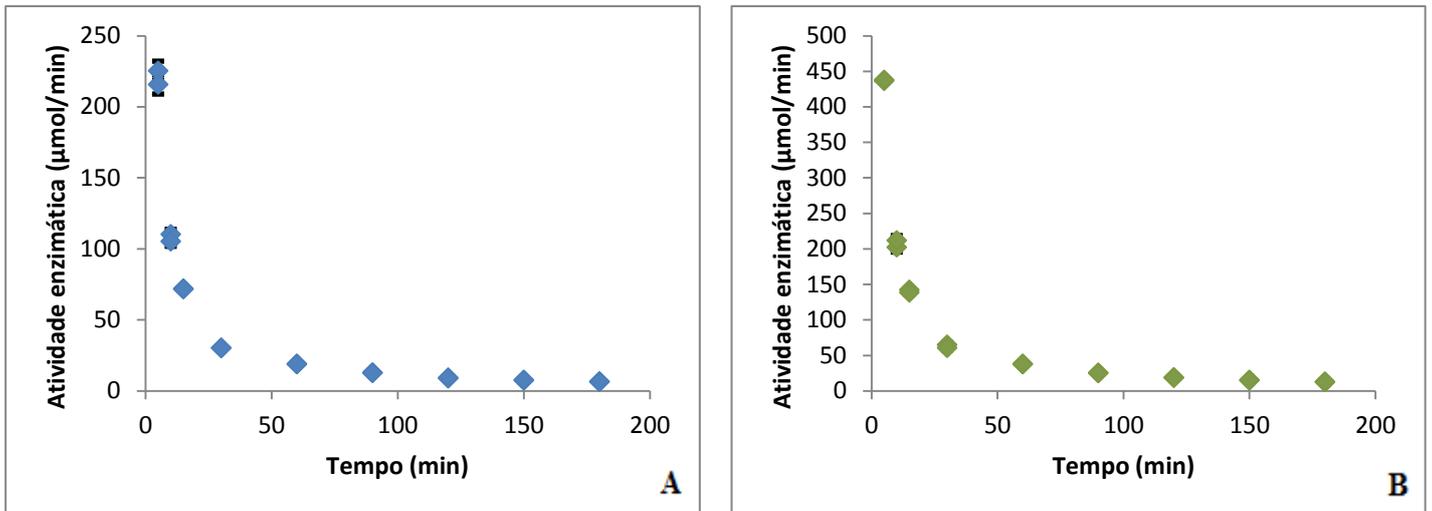


Figura 44 Atividade enzimática a 50°C, pH 3,5 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.

d. pH 4,0

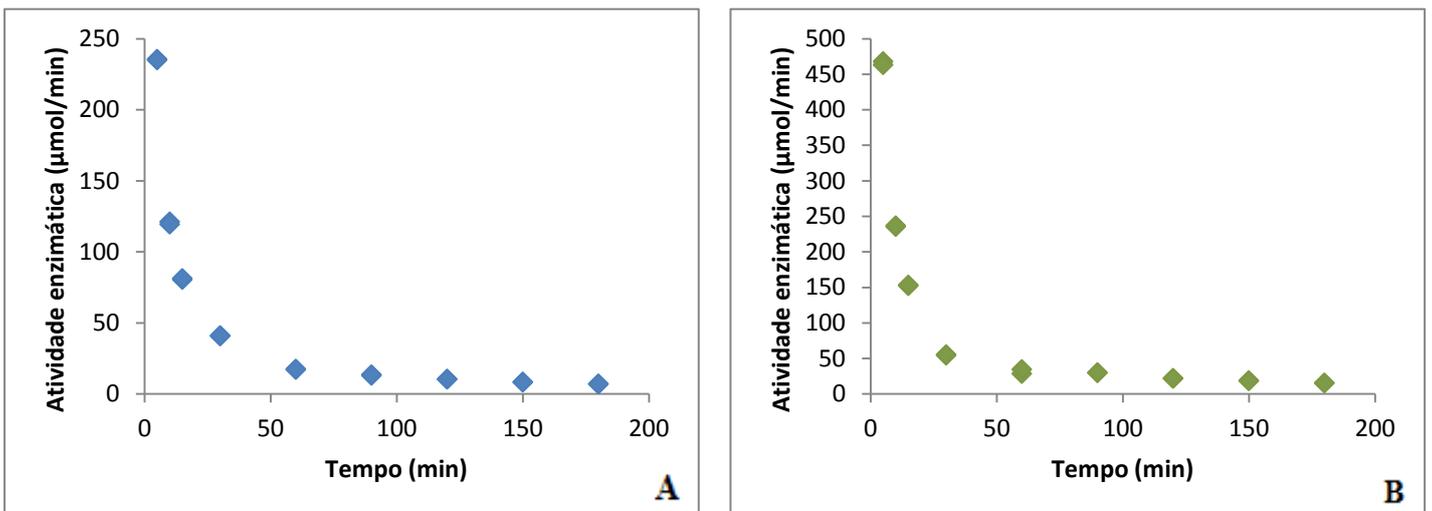


Figura 45 Atividade enzimática a 50°C, pH 4,0 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.

e. pH 4,5

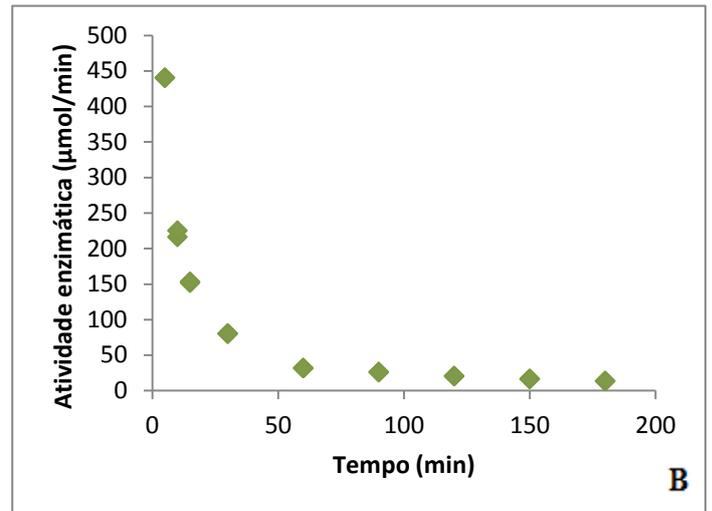
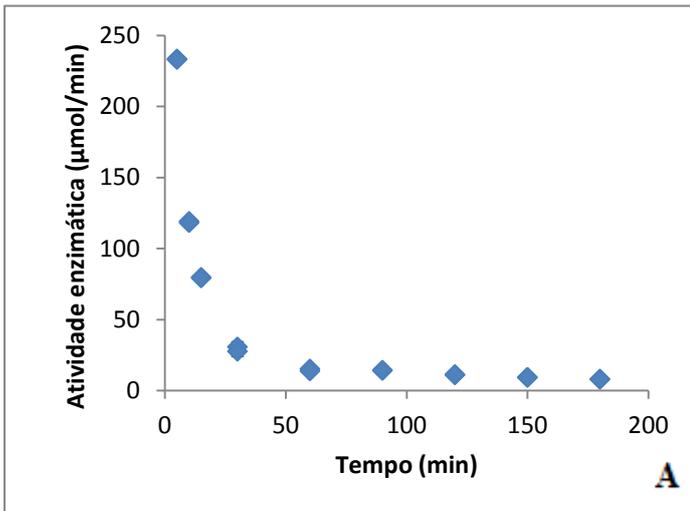


Figura 46 Atividade enzimática a 50°C, pH 4,5 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.

f. pH 5,0

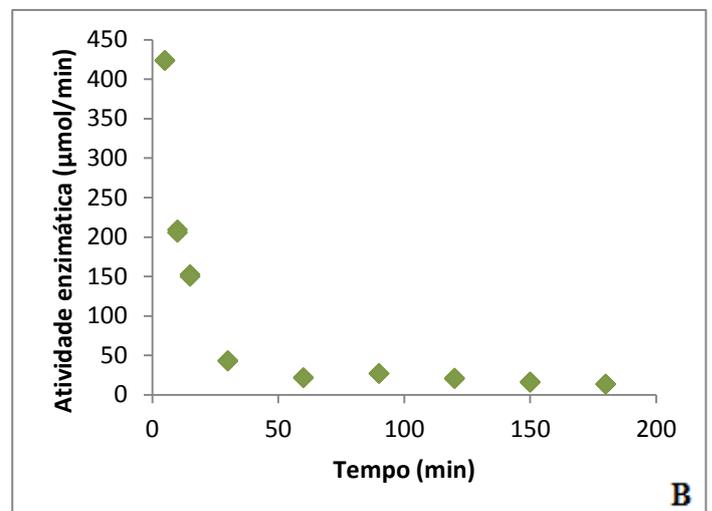
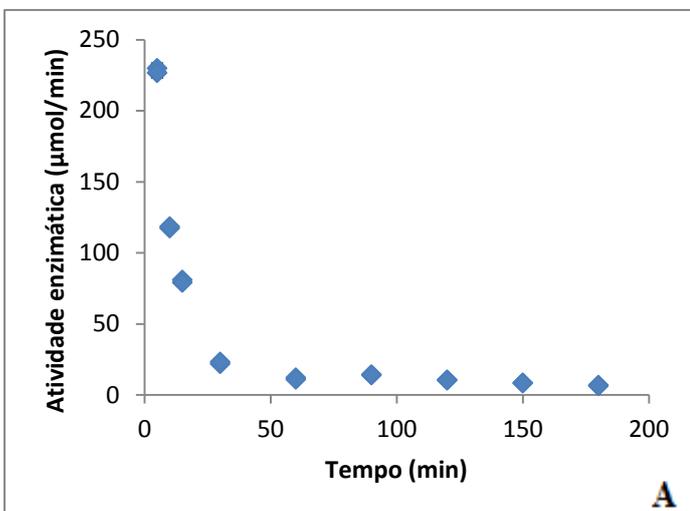


Figura 47 Atividade enzimática a 50°C, pH 5,0 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.

g. pH 5,5

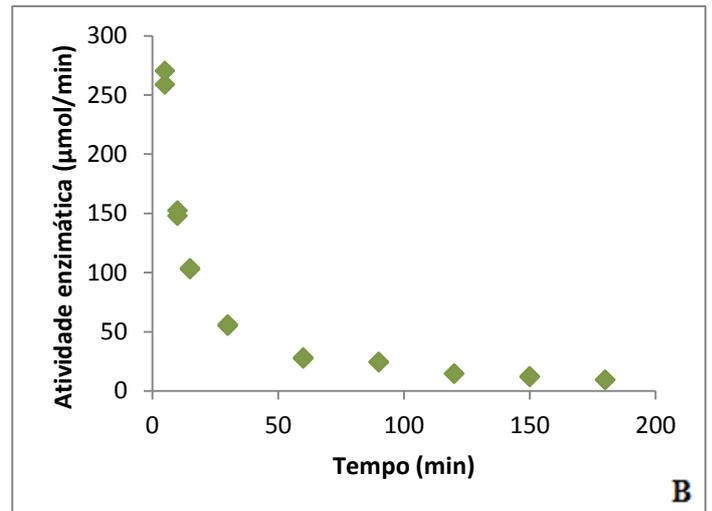
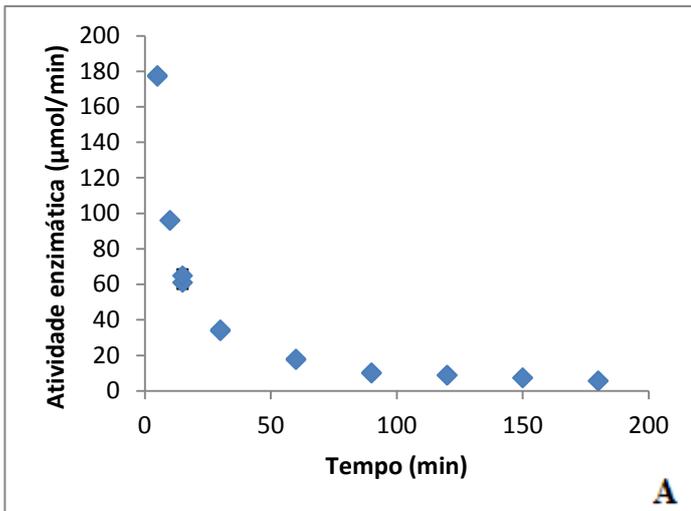


Figura 48 Atividade enzimática a 50°C, pH 5,5 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.

h. pH 6,0

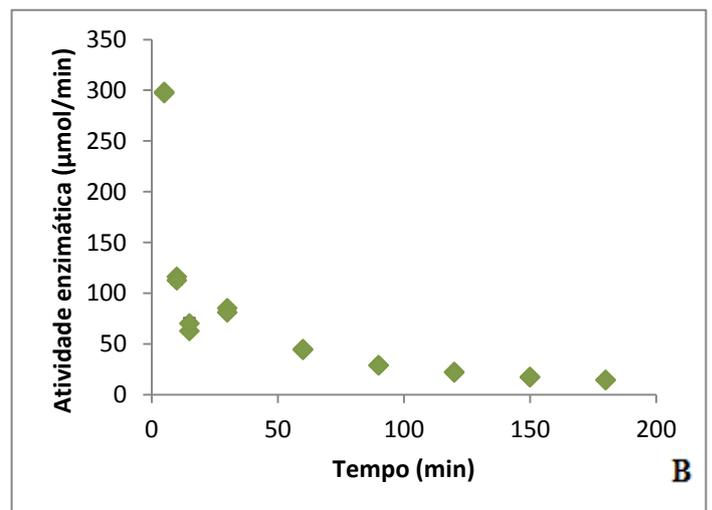
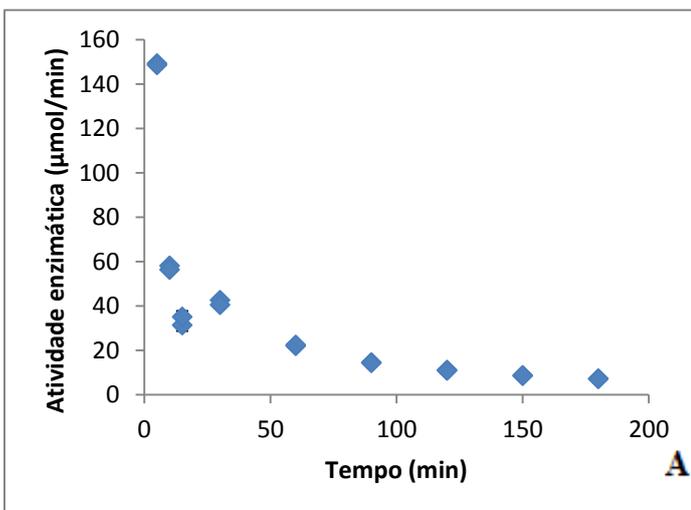


Figura 49 Atividade enzimática a 50°C, pH 6,0 da (A) Distizym AG e (B) Amilase AG 300L.