



Universidade de Aveiro
Ano 2014/2015

Departamento de Química

João Mendes Reboleira

**Otimização do processo de concentração de
sumo de maçã: análise da turbidez e dos
compostos voláteis do condensado de aroma**



João Mendes Reboleira

Otimização do processo de concentração de sumo de maçã: análise da turbidez e dos compostos voláteis do condensado de aroma

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, e do Engenheiro Oswaldo António Sancho Trabulo, Diretor Geral da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A

o júri

presidente

Professora Ivonne Delgadillo Giraldo
professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro (orientador)

Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Doutor Manuel António Coimbra pela orientação prestada, disponibilidade e permanente insistência no rigor científico.

À Doutora Elisabete Coelho e aos restantes membros do departamento de química da Universidade de Aveiro envolvidos no projeto ProfitApple, por todo o auxílio prestado tanto à distância como presencialmente, na elaboração deste trabalho.

Ao Engenheiro Oswaldo Trábulo, pela oportunidade proporcionada no estágio realizado e pela abertura e disponibilidade.

À Engenheira Andreia Lopes pelo incansável apoio, conhecimento e companhia prestada ao longo do decorrer do estágio

Aos restantes membros e colaboradores da Indumape, Industrialização de Fruta S.A., por toda a paciência, transparência, e conhecimento prático e teórico transmitido.

A todos os meus familiares e amigos chegados que sempre se estiveram ao meu lado durante a totalidade do meu percurso académico, com todo o tipo de apoio necessário e fonte de toda a inspiração e motivação necessária para chegar onde estou presentemente.

palavras-chave

Sumo concentrado de maçã; turbidez; amadurecimento; ultrafiltração; diafiltração; condensado de aroma de maçã; compostos voláteis; SPME; GC-FID

resumo

A Indumape, Industrialização de Fruta S.A. é uma empresa sediada em Pombal, Portugal, reconhecida pela produção de sumos concentrados de maçã e pera rocha. Na indústria alimentar, o fabrico destes sumos está associado a desafios que incentivam a criação, otimização e melhoramento dos processos atuais. O mais significativo destes desafios é a turbidez elevada do sumo concentrado. No âmbito deste trabalho de estágio, pretendeu-se compreender a instabilidade do parâmetro de turbidez, identificar as causas da sua persistência e a delinear soluções para o melhorar. A recente aquisição, por parte da empresa, de um sistema de cromatografia em fase gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama (GC-FID) permitiu realizar a quantificação de compostos voláteis presentes no condensado de aroma de maçã, com o objetivo de melhorar o controlo de qualidade efetuado sobre este produto e auxiliar a padronização do processo.

Foram realizados ensaios sobre os parâmetros de maturação da matéria-prima entre outubro de 2014 e fevereiro de 2015. Estes ensaios incluíram a medição do teor de sólidos solúveis (^oBrix) e acidez titulável (meq ácido málico/100 g). Foi também efetuado um controlo da turbidez (NTU) do produto final e durante o decorrer da ultrafiltração (UF) do sumo. A quantificação de compostos voláteis do condensado de aroma de maçã foi levada a cabo no sistema GC-FID, com a extração dos voláteis realizada por microextração em fase sólida (SPME). Várias amostras de condensado guardado em stock e condensado recém-produzido foram sujeitas à quantificação de cinco compostos de interesse, incluindo o trans-2-hexenal, hexenal, etil 2-metilbutirato, butanol e acetato de etilo.

Os ensaios de maturação mostraram que a matéria-prima recebida na fábrica durante a campanha é progressivamente mais madura. A monitorização da UF revelou uma subida acentuada da turbidez do permeado sujeito à fase final do processo, antecedendo a lavagem dos filtros. Foi também verificada uma subida da turbidez média do sumo concentrado fabricado em épocas de menor produção, salientando que interrupções no processo de filtração parecem explicar as subidas da turbidez. Foram feitas sugestões para implementar adaptações à UF de forma a combater esta subida. Ensaios de separação mostraram que a centrifugação do retentato é suficiente para permitir uma separação razoável das fases sólidas e líquidas do retentato.

A quantificação dos voláteis nas amostras de condensado de aroma foi bem-sucedida para quatro dos cinco compostos de interesse. Após implementação do método foi criado um guia de utilizador, de forma a facilitar a reprodução dos ensaios cromatográficos por parte do departamento de qualidade da Indumape.

keywords

Apple juice concentrate; turbidity; ripening; ultrafiltration; diafiltration; apple aroma condensate; volatile compounds; SPME; GC-FID

abstract

Indumape, Industrialização de Fruta S.A. is a company based in Pombal, Portugal, renowned for its production of apple and rocha pear juice concentrates. The manufacture of these products is associated with challenges that promote the optimization and improvement of current processes. The most significant of these problems is the high turbidity of the juice concentrates. This thesis aims to understand the instability of the turbidity of apple juice concentrate, to identify its sources and trace solutions for improving this parameter. The company's recent acquisition of a gas chromatography – flame ionization detector (GC-FID) system allowed the quantification of volatile compounds in the apple aroma condensate, with the goal of improving the quality control that this product undergoes and to assist in the standardization of its production.

Maturity parameter assays were carried on the raw material between September 2014 and February 2015. These assays included the measuring of soluble solids content (°Brix) and titrable acidity (meq malic acid/100 g). A control of the turbidity (NTU) of both the final product and the juice during ultrafiltration (UF) was performed. The quantification of volatile compounds in the apple aroma condensate was carried out in the GC-FID system, using solid phase microextraction (SPME) for the extraction of the volatiles. Several samples gathered from both the condensate in stock and from freshly produced condensate were subject to quantification of five compounds of interest, including trans-2-hexenal, hexanal, ethyl 2-methylbutyrate, butanol and ethyl acetate. The fruit maturity assays show that the raw materials received at the processing plant are progressively more ripened. The monitoring of the UF showed a rise in the permeate's turbidity during the final stages of the process, before the system's washing. A rise in the average turbidity of the juice concentrate during the low production season was also verified, emphasizing that interruptions in the filtration process seem to be behind the high turbidity. Adaptations to the UF system were proposed. Separation assays showed that a centrifugation is sufficient to allow a reasonable splitting of the solid and liquid phases of the retentate.

The quantification of volatiles in the aroma condensate samples was successful for four of the five compounds of interest. After the method's implementation, a user guide was created in order to facilitate the reproduction of the chromatographic assays by Indumape's quality department.

Índice Geral

1. Introdução	15
1.1. Descrição da empresa Indumape, Industrialização de Fruta S. A. e detalhe das suas atividades.	16
1.2. A matéria-prima do processo – Maçã	22
1.4. Características do fruto – De que forma a composição da maçã influencia o seu processamento.....	23
1.4.1. Açúcares e ácidos orgânicos.....	23
1.4.2. Pectina e persistência de turbidez	25
1.5. Amadurecimento - Influência das modificações da matéria-prima no processo de produção de sumos concentrados de fruta	31
1.5.1. Degradação da parede celular	31
1.5.2. Metabolismo dos ácidos orgânicos.....	34
1.5.3. Degradação do amido e aumento do teor de açúcares.....	35
1.6. Despectinização e Ultrafiltração – as atuais soluções para as dificuldades do processamento de sumo concentrado.....	36
1.6.1. Despectinização.....	36
1.6.2. Ultrafiltração	41
1.7. O produto secundário do fabrico de sumo concentrado - aroma de maçã.....	46
1.7.1 Extração dos compostos voláteis do aroma de maçã por SPME	51
2. Objetivos do trabalho de estágio	55
3. Materiais e Métodos	57
3.1. Amostragem	58
3.1.1. Matéria-prima do processo: Maçã	58
3.1.2. Sumo resultante da ultrafiltração	58
3.1.3. Sumo concentrado de maçã.....	58
3.1.4. Retentato.....	59
3.1.5. Aroma de maçã	59
3.2. Monitorização da turbidez do sumo e controlo dos parâmetros de maturação da maçã	60
3.2.1. Controlo da turbidez do sumo concentrado de maçã	60
3.2.2. Monitorização da turbidez do sumo resultante da ultrafiltração.....	61
3.2.3. Controlo dos parâmetros de maturação da fruta	62

3.2.4. Estratégias para diminuir o impacto da diafiltração na qualidade do sumo. Ensaio de precipitação e centrifugação.....	63
3.3. Quantificação dos compostos voláteis em condensados de aroma de maçã	64
3.3.1 Extração por SPME	64
3.3.2. Análise dos compostos voláteis por GC-FID.....	67
3.3.3. Implementação de procedimentos de manutenção do equipamento de GC-FID	69
3.4. Guia rápido para utilização do <i>software</i> OpenLAB Chromatography Data System nas análises de controlo de qualidade dos condensados de maçã.....	71
4. Resultados e Discussão	73
4.1 Turbidez e parâmetros de maturação.....	74
4.1.1. Evolução da turbidez do sumo concentrado ao longo do ano.....	74
4.1.2. Turbidez do sumo filtrado	76
4.1.3. Controlo dos parâmetros de maturação da maçã	79
4.1.5. Ensaio de precipitação e centrifugação.....	81
4.2. Identificação e quantificação dos compostos voláteis no aroma de maçã	85
5. Conclusão	97
6. Bibliografia	99
7. Anexos	105

Índice de Figuras

- Figura 1** Toneladas de maçã produzida à escala global durante o ano de 2012. (FAOSTAT, 2014)..... 22
- Figura 2** Representação dos principais domínios estruturais encontrados nos polissacarídeos pécticos. O esquema a) mostra um modelo clássico da molécula, no qual a cadeia principal é constituída em grande parte por homogalacturonanas e ramnogalacturonanas do tipo I. O esquema b) mostra um modelo proposto por Vincken *et al.* em 2003, no qual as homogalacturonanas, ramnogalacturonanas do tipo II, xilogalacturonanas e arabinogalactanas aparecem como ramificações de uma cadeia principal de ramnogalacturonanas do tipo I. (adaptado de Ferreira *et al.*, 2015)..... 25
- Figura 3** Representação dos locais de metil-esterificação e O-acetilação dos resíduos de ácido galacturónico de uma homogalacturonana (Rilley *et al.*, 2001)..... 26
- Figura 4** Demonstração da estrutura primária da ramnogalacturonana do tipo II (RG-II) com identificação das quatro cadeias laterais de oligossacarídeos. Enquanto que a estrutura das cadeias laterais é atualmente conhecida, não existem certezas quanto à posição relativa que estas assumem ao longo da cadeia principal de homogalacturonana. (Rilley *et al.*, 2001)..... 28
- Figura 5** Modelo estrutural do complexo homogalacturonana-cálcio responsável pelo efeito gelificante da pectina na presença de catiões bivalentes. (Shaikh *et al.*, 2012)..... 30
- Figura 6** Modelos de atividade enzimática avaliados durante o crescimento e maturação de maçã da variedade “Mondial Gala”. Os diferentes estados de maturação estudados foram: 1) Formação do fruto; 2) Crescimento do fruto; 3) Fruto formado imaturo; 4) Fruto na altura da apanha; 5) Início de senescência. Foram utilizados métodos espectrofotométricos sensíveis à presença de açúcares redutores cuja origem está diretamente relacionada com a atividade da enzima (Goulao *et al.*, 2006)..... 32
- Figura 7** Evolução da atividade de pectina metil esterase e poligalacturonase na ameixa da variedade “Rainha Cláudia Verde” com origem em dois pomares (VV: Vila Viçosa; CA: Cano). As atividades foram quantificadas para as frações de enzima solúveis (SF) e para frações associadas à parede celular por ligações iónicas (IF) e ligações covalentes (CF). Adaptado a partir de Nunes *et al.* (2009)..... 33
- Figura 8** Evolução da compressibilidade do tomate selvagem (WT), das variantes modificadas geneticamente com maturação inibida (rin, rin(C)) e do tomate com maturação inibida e incorporação do gene da poligalacturonase (rin(E8/PG)) (adaptado de Giovannoni *et al.* (1989))..... 34

- Figura 9** Quantidade de amido em macieiras da variedade Royal Gala ao longo da formação e amadurecimento dos frutos. Os resultados representados por ● corresponde à quantidade de amido por fruto (mg/fruto) e ▲ corresponde ao amido por grama de fruto (mg/g) (adaptado de Brookfield *et al.*, 1997)..... 35
- Figura 10** Representação do modo de ação da pectina metilesterase (PME) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécticos. As setas mostram o local onde a enzima exerce a sua atividade sobre a substância péctica (adaptado de Jayani *et al.*, 2005). 37
- Figura 11** Representação do modo de ação da poligalacturonase (PG) e polimetilgalacturonase (PMG) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécticos. A PMG consegue atuar sobre o GalA metil esterificado, o que é representado na figura ao substituir o R por um grupo metil (CH₃). O mesmo não acontece com a PG, que apenas exerce a sua função catalítica em resíduos desesterificados (R corresponde a um H). As setas mostram o local onde as enzimas exercem a sua atividade sobre a substância péctica (adaptado de Jayani *et al.*, 2005)..... 38
- Figura 12** Representação do modo de ação da pectina liase (PL) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécticos. Quando a cadeia de poligalacturonato se encontra metil esterificada, a atividade catalítica é realizada pela poligalacturonase liase (PGL), situação em que R corresponde a H. As setas mostram o local onde as enzimas exercem a sua atividade sobre a substância péctica (adaptado de Jayani *et al.*, 2005). 39
- Figura 13** Efeito da temperatura nas atividades de três preparados enzimáticos de pectinase (adaptado de Ortega *et al.*, 2004)..... 40
- Figura 14** Diagrama esquemático da unidade de ultrafiltração usada na clarificação de sumo de maçã. (Yazdanshenas *et al.*, 2005) 41
- Figura 15** Representação do tamanho das partículas mais importantes nos processos de filtração e das técnicas mais adequadas para retenção das mesmas (adaptado de Bucher Unipektin, 2007)..... 42
- Figura 16** Caudal do permeado em função da duração do processo de ultrafiltração) com uma membrana cerâmica de 100 kDa a 50^oC (Echavarria *et al.* 2010). 44
- Figura 17** Representação esquemática da primeira seringa de SPME lançado no mercado pela Supelco (Lord e Pawliszyn, 2000). 52
- Figura 18** Detalhe do suporte e fibra de SPME exposta. 52

Figura 19 Espalhamento da amostra de sumo concentrado no poço do refratómetro para medição do °brix.....	60
Figura 20 Introdução da célula de vidro com amostra no turbidímetro	61
Figura 21 Polpa de maçã usada nos ensaios de estado de maturação.	62
Figura 22 Cortes longitudinais da maçã antes da liquefação.	62
Figura 23 Preparação do frasco para extração de compostos voláteis.	65
Figura 24 Sistema utilizado na extração dos compostos voláteis da maçã por SPME.....	66
Figura 25 Sistema GC-FID e terminal de controlo do equipamento durante o condicionamento da fibra de SPME	67
Figura 26 Injetor do equipamento GC-FID desmontado para a verificação da integridade dos seus componentes.....	70
Figura 27 Remoção, com auxílio de um fragmento de coluna, de resíduos de septo que ficaram retidos no liner após utilização repetida do sistema GC-FID.	70
Figura 28 Registos da média mensal da turbidez do sumo concentrado de maçã produzido em 2014. A linha a vermelho corresponde ao limite de não-conformidade para o parâmetro de turbidez atribuído ao sumo concentrado de maçã.....	74
Figura 29 Turbidez, em NTU, do permeado resultante da ultrafiltração do sumo de maçã, ao longo de 12 horas de funcionamento em contínuo do aparelho.	76
Figura 30 Número de lotes finais de sumo concentrado de maçã produzidos em cada mês e média mensal da turbidez, em NTU, destes mesmos lotes, durante o ano de 2014.	78
Figura 31 Evolução do °brix e acidez titulável da maçã recebida na Indumape durante os meses de Outubro, Novembro e Dezembro de 2014 e Janeiro e Fevereiro de 2015.	79
Figura 32 Separação das diferentes fases do retentato pré (tubo da esquerda) e pós-diafiltração (tubo da direita) sujeito a uma centrifugação a 4185g durante 10 minutos.	81
Figura 33 Separação do retentato por sedimentação ao fim de 6 horas	82
Figura 34 Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de trans-2-hexenal 0,208 mg/L.....	86

Figura 35	Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de hexanal 0,2 mg/L	86
Figura 36	Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de butanol 15 mg/L.....	87
Figura 37	Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de etil 2-metilbutirato 0,2 mg/L.....	87
Figura 38	Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de acetato de etilo 0,225 µg/L onde não foi possível a obtenção de um pico único	87
Figura 39	Cromatograma associado à amostra de aroma AT3 (analisado segundo o programa de temperatura 2), com destaque para o intervalo onde foram detetados os picos dos compostos de interesse. (0,5 a 9 minutos).....	88
Figura 40	Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma de tanque 3 (AT3)	91
Figura 41	Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma de tanque 1 (AT1)	91
Figura 42	Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma de tanque 2 (AT2)	91
Figura 43	Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma fresco 1 (AF1).....	92
Figura 44	Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma fresco 3 (AF3).....	92
Figura 45	Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma fresco 2 (AF2).....	92
Figura 46	Índice de aroma da amostra AT1 para os compostos voláteis quantificados... 94	
Figura 47	Índice de aroma da amostra AF1 para os compostos voláteis quantificados... 95	
Figura 48	Processo de produção de sumos concentrados de maçã e pera. Adaptado a partir dos documentos fornecidos pelo departamento de qualidade da Indumape e de Falguera e Ibarz, 2014.	107
Figura 49	Painel de controlo virtual do sistema Agilent 7820A GC após ligação do aparelho.....	110
Figura 50	Painel de controlo virtual do sistema Agilent 7820A GC no modo de configuração das definições do detetor.....	110

Figura 51 Painel de controlo virtual do sistema Agilent 7820A GC no modo de configuração das definições do injetor.	110
Figura 52 Modo de <i>Method and Run Control</i> , com destaque para listagem de métodos gravados no sistema.	111
Figura 53 Seleção do menu de para edição de informações relativas à amostra sujeita a análise a partir da barra de menus principal, no modo “ <i>Method and Run Control</i> ”	111
Figura 54 Menu de edição das informações da amostra, com destaque para alguns dos parâmetros cuja edição é recomendada para uma mais fácil organização e tratamento de resultados.	112
Figura 55 Barra de estado do equipamento depois de carregado o método e atingidas as temperaturas indicadas.....	112
Figura 56 Modo de <i>Data Analysis</i> com destaque para o botão de edição de eventos/parâmetros de integração <i>Edit Integration Events</i>	113
Figura 57 Menu de edição de parâmetros de integração, com destaque para a seleção por rejeição de área ou altura.	114
Figura 58 Adição de novos eventos de integração para rejeição de picos em função do tempo de retenção	114
Figura 59 Ferramentas de integração manual	115
Figura 60 Menu de opções de calibração, com destaque para os comandos mais relevantes na elaboração de curvas de calibração.	116
Figura 61 Parte da barra de ferramentas do menu de calibração com destaque para os comandos de edição e emissão de relatório.	117
Figura 62 Menu de opções do método, no modo <i>Method and Run Control</i>	118
Figura 63 Menu de configuração do método <i>Method Setup</i> , com destaque para os parâmetros mais importantes no ajuste ou criação de um novo método.....	119

Índice de Tabelas

- Tabela 1** Listagem de alguns dos compostos voláteis relevantes ao aroma de maçã, com distinção da estrutura química, descritores sensoriais associados e limites de percepção sensorial. P/T: *Purge and Trap*; GC-FID: cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama; SPME: microextração em fase sólida; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa; SPE: extração em fase sólida (Dixon e Hewett, 2000; Su e Wiley, 1998; Aguilar-Rosas *et al.*, 2007; Young *et al.*, 1996)..... 48
- Tabela 2** Detalhes da preparação e origem das amostras de aroma de maçã utilizadas nos ensaios cromatográficos. A Indumape dispõe apenas de um tanque de armazenamento refrigerado dedicado ao aroma de maçã. Desta forma, os aromas de *stock* foram recolhidos a partir da mesma reserva. 64
- Tabela 3** Concentrações das diluições preparadas a partir dos padrões comerciais de trans-2-hexenal, hexanal, etil 2-metilbutirato, butanol e acetato de etilo. 69
- Tabela 4** Pressões nas fontes dos gases de alimentação do cromatógrafo..... 70
- Tabela 5** Compilação dos registos de turbidez do sumo concentrado de maçã produzido durante o ano de 2014 na Indumape, adaptado a partir dos registos de controlo de qualidade da empresa, aos quais foi acrescentada uma contagem do número de lotes não-conformes (n NC) produzidos a cada mês. 75
- Tabela 6** Tempos de retenção médios de cada um dos compostos identificados a partir da análise no sistema GC-FID, sob dois programas de temperatura diferentes. Programa 1: T inicial: 35⁰C durante 5 minutos, rampa até aos 220⁰C. Programa 2: T inicial 30⁰C durante 10 minutos, rampa até aos 220. Não se conseguiu obter uma separação aceitável para os compostos cujos tempos de retenção não estão mencionados. 85
- Tabela 7** Concentração dos compostos voláteis de interesse nas amostras de condensado de aroma sujeitas a análise cromatográfica..... 90
- Tabela 8** Concentração dos compostos voláteis de interesse nas amostras de condensado de aroma analisadas pela Universidade de Aveiro. 90

Abreviaturas

Ara – Arabinose

°Brix – Unidade do teor de sólidos solúveis totais

CA - Carbowax

CAR - Carboxen

DF – Diafiltração

DHS – Espaço de vapor dinâmico

DVB - Divinilbenzeno

Fuc – Fucose

Gal – Galactose

GalA – Ácido galacturónico

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

Glc – Glucose

GlcA – Ácido glucurónico

HG – Homogalacturonanas

IFU – Federação Internacional de Sumos de Fruta

Man – Manose

NTU – Unidade Nefelométrica de Turbidez

PA – Poliacrilato

PDMS - Polidimetilsiloxano

PME – Pectina metilesterase

PG – Poligalacturonase

PL –Pectato liase

Rha – Ramnose

RG-I – Ramnogalacturonanas do tipo I

RG-II – Ramnogalacturonanas do tipo II

SHS – Espaço de vapor estático

SPME – Microextração em fase sólida

UF – Ultrafiltração

XG - Xilogalacturonana

Xyl – Xilose

1. Introdução

1.1. Descrição da empresa Indumape, Industrialização de Fruta S. A. e detalhe das suas atividades.

A Indumape, Industrialização de Fruta S.A. é uma empresa do setor alimentar, sediada no Parque Industrial Manuel da Mota, Pombal, Portugal. Atualmente a empresa especializa-se na produção de sumos concentrados e aromas de maçã e pera nacional, com destino ao fabrico de sumos, néctares, vinagres e sidras. Foi dado recentemente início à produção de sumo concentrado de uva branca e a serviços de dessulfitação de mosto amuado para diversas adegas e vitivinicultores nacionais.

Em 2014, a Indumape é a maior transformadora de fruta de origem nacional, com volumes anuais de produção a atingir as 4 mil toneladas. É de salientar também que a empresa exporta cerca de 90% da sua produção para países dentro e fora da União Europeia, com empresas inglesas, alemãs e espanholas a assumir o papel de maiores clientes.

O processo de concentração revolucionou a comercialização dos sumos de fruta, trazendo soluções para muitos dos problemas associados à comercialização deste tipo de produtos alimentares (Onsekizoglu *et al.*, 2010; Falguera e Ibarz, 2014). A evaporação da água resulta numa redução de volume, que por sua vez facilita o transporte e reduz os custos associados ao armazenamento e embalamento dos sumos. O concentrado é também muito mais estável e resistente à degradação microbiológica e química, consequência da redução da atividade da água durante o processamento (Onsekizoglu *et al.*, 2010). Estas vantagens fizeram dos sumos concentrados de fruta um produto vastamente utilizado na indústria alimentar e ao qual é dado diversos fins, como a incorporação em sumos e néctares de fruta, ou o uso como substrato para as fermentações que dão origem a vinagres e sidras (Falguera e Ibarz, 2014).

No anexo 1 está representado o fluxograma da linha de produção dos sumos concentrados de pera e maçã fabricados pela Indumape.

a) Receção e armazenamento da matéria-prima

A produção dos sumos concentrados de maçã e pera tem início na chegada da matéria-prima à unidade fabril. O transporte da fruta é efetuado por camião, o qual é pesado e sujeito a uma avaliação da documentação do fornecedor. A carga é também revistada durante o despejo para os silos, onde fica armazenada ao ar livre até que seja dado início à produção. A duração máxima deste armazenamento raramente excede 48 horas (Falguera e Ibarz., 2014). Dada a natureza do processo de fabrico do sumo concentrado, torna-se praticamente impossível conhecer a origem da matéria-prima após esta etapa, algo que dificulta o sistema de rastreabilidade.

b) Lavagem da matéria-prima

A matéria-prima é retirada dos silos através de um sistema de canais de água subterrâneo, sendo transportada até uma passadeira. Aqui, a fruta é lavada por um sistema de aspersão, alimentado por água de rede, ou por água condensada, proveniente do concentrador. Esta lavagem é complementada com peróxido de hidrogénio, um agente antimicrobiano também ele aplicado por aspersão durante a passagem da fruta pela passadeira. A água utilizada nesta etapa do processo é constantemente reciclada, sendo renovada periodicamente de forma a contribuir o mínimo possível para o acréscimo da carga microbiana da fruta (Falguera e Ibarz., 2014).

É também efetuado um controlo visual da fruta à medida que esta circula pela passadeira, com o objetivo de remover objetos estranhos que possam danificar equipamentos ou comprometer a segurança do produto final.

c) Moagem

Diretamente a partir da passadeira onde é lavada, a fruta cai para dentro do equipamento de moagem, onde é triturada por ação mecânica de lâminas rotativas. Esta etapa serve principalmente para aumentar a eficiência da extração do sumo durante a prensagem.

Durante a moagem são também aplicadas enzimas comerciais de maceração. Principalmente constituídas por pectina metilesterase, estas soluções enzimáticas vão

facilitar a ação dos tratamentos enzimáticos posteriores e, ao mesmo tempo, aumentar o rendimento da prensagem (Falguera e Ibarz., 2014).

A polpa de fruta obtida é então mantida durante cerca de 45 minutos dentro dos tanques de polpa. Este período de espera evita a sobrecarga das prensas e permite uma completa atuação da enzima incorporada.

d) Prensagem

A Indumape dispõe de três prensas giratórias que permitem uma operação de prensagem em contínuo. Durante esta etapa, a polpa obtida na moagem é espremida e lavada, de forma a extrair a maior quantidade de sumo possível (Shalini e Gupta, 2010). É também gerada nesta fase uma grande quantidade de sub-produto, sob a designação de “bagaço de maçã/pera”.

O sub-produto é expelido pela rotação das prensas e encaminhado para um local de armazenagem fora da zona de produção, onde aguarda recolha para uma das várias aplicações que lhe são dadas (Shalini e Gupta, 2010). Um dos destinos mais comuns para este sub-produto é a incorporação em rações animais, sendo para aí que a grande maioria do bagaço de maçã e pera produzido pela Indumape é encaminhado.

e) Desaromatização

O primeiro tratamento térmico a que o sumo de fruta é sujeito (agora denominado Sumo Cru) é a desaromatização. Este processo decorre dentro do evaporador, onde o sumo é sujeito à temperatura de 90⁰C até adquirir 20⁰Brix. Esta subida de temperatura leva também à separação de grande parte dos compostos orgânicos voláteis, ficando misturados com vapor de água libertado durante o processo. A condensação deste vapor é realizada ao mesmo tempo que decorre o tratamento térmico, em condensadores (Karlsson e Triigiirdh, 1997). Este destilado tem a designação de aroma de maçã ou pera, e é encaminhado para os tanques de aroma onde será posteriormente sujeito a um controlo analítico, onde é determinado o pH e densidade do produto obtido.

f) Despectinização

O sumo agora sob a designação de “sumo desaromatizado” é sujeito a um tratamento enzimático que envolve a adição de enzimas amilolíticas e pectinolíticas. Este processo ocorre em tanques de despectinização, preparados para a eventual adição das soluções enzimáticas e, sob ordem do chefe de produção, de carvão ativado. A adição de carvão em pó é levada a cabo sob a necessidade de produção de lotes com cores mais claras, assentando na adsorção de compostos fenólicos por parte das partículas de carvão (Ma *et al.*, 2013). O *cocktail* enzimático adicionado ao sumo para este efeito inclui uma mistura de pectina metilesterases, pectina liases, endo-poligalacturonases, glucoamilases e proteases, todas elas preparadas para atuar no intervalo de temperaturas entre os 20 e os 55^oC. Estas enzimas atuam em conjunto sobre os polissacarídeos da fruta e são essenciais para que o sumo clarificado adquira as características organolépticas exigidas pelos clientes. Tratamentos enzimáticos pouco eficazes ou inadequados estão associados a uma série de problemas e irregularidades na qualidade do produto final, incluindo parâmetros como turbidez e cor fora dos limites de aceitabilidade (Alvarez *et al.*, 1996; Falguera e Ibarz, 2014).

O amido está associado à persistência de turbidez no sumo clarificado. A hidrólise incompleta das pectinas reduz consideravelmente o rendimento dos processos de clarificação, acelerando a colmatação das membranas de ultrafiltração e consequentemente, aumentando a turbidez (Alvarez *et al.*, 1996).

O sumo desaromatizado permanece nos tanques de despectinização durante cerca de uma hora. Este tempo pode eventualmente ser prolongado de acordo com as exigências da linha de produção.

g) Ultrafiltração

O sumo sujeito ao tratamento enzimático é clarificado por ultrafiltração de fluxo tangencial. Este processo força a passagem de aproximadamente 23,5 m³/h de sumo por membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com um *cutoff* de 100 kDa numa configuração contínua *feed-and-bleed*. (Yazdanshenas *et al.*, 2010).

A capacidade de retenção de alguns microrganismos, partículas coloidais e macromoléculas, aliada ao funcionamento em contínuo e com baixos custos de operação,

fazem da ultrafiltração a técnica de clarificação mais utilizada na indústria dos sumos de fruta (Onsekizoglu *et al.*, 2010; Falguera e Ibarz, 2014).

h) Concentração

O sumo filtrado é encaminhado de volta para os evaporadores, onde sofre um segundo tratamento térmico. A concentração até ao teor de sólidos solúveis final é feita em várias fases, sendo aplicadas temperaturas diferentes à medida que este teor aumenta.

O primeiro choque térmico ao qual o sumo é sujeito eleva o °Brix até valores que rondam 45 e geralmente exige a exposição a temperaturas que rondam os 100°C. A partir daí, a redução do teor de água até 70°Brix é efetuada de forma mais lenta, com temperaturas que não excedem os 45°C (Falguera e Ibarz, 2014; Karlsson e Triigiirdh, 1997).

i) Homogeneização

O sumo concentrado de maçã ou pera, o produto é trazido para um dos três tanques de homogeneização, junto da zona de embalamento.

Nesta fase do processo, certos parâmetros químicos são regularmente analisados à medida que os tanques são enchidos com o sumo recém-concentrado. Uma monitorização pelo laboratório de controlo de qualidade é efetuada a 25, 50 e 75% do volume total do tanque, sendo ainda possível realizar análises adicionais a pedido do chefe de linha. Os parâmetros sujeitos a avaliação incluem o teor de sólidos solúveis, acidez titulável, turbidez, cor, claridade e pH.

Esta constante monitorização permite o acerto dos vários parâmetros do sumo concentrado, de forma a ir de encontro às exigências dos vários clientes.

Após dado um lote por terminado, este pode ser imediatamente encaminhado para expedição ou ser transportado para os tanques de armazenamento refrigerado ou reservatórios exteriores.

j) Embalamento/Expedição

Os lotes de sumo concentrado finalizados são expedidos da unidade fabril por cisterna, flexitanque, combos ou bidons. Estes dois últimos meios de expedição

constituem o único ponto do processo, após a moagem, em que o sumo concentrado abandona o circuito fechado de tubagens. Por este motivo, a etapa de embalamento constitui o único ponto crítico de controlo no plano HACCP da linha de produção. Uma série de medidas de segurança são obrigatoriamente aplicadas nesta etapa do processo, e incluem o uso de vestuário apropriado pelos operadores de linha, assim como a desinfeção das mangueiras de enchimento com soluções de peróxido de hidrogénio.

1.2. A matéria-prima do processo – Maçã

As atividades levadas a cabo neste trabalho estão maioritariamente focadas na maçã e na produção de sumo concentrado de maçã. Como tal, grande parte da revisão bibliográfica será focada neste fruto e nas suas características bioquímicas capazes de influenciar a qualidade do concentrado.

A maçã é um dos frutos mais produzidos e consumidos a nível mundial, com uma produção total a rondar as 76,4 milhões de toneladas em 2012. Mais de 48% desta produção provém da China, com os Estados Unidos em segundo lugar, produzindo 7% desta quantidade (FAOSTAT, 2014). A figura 1 representa os dados estatísticos recolhidos pela FAO em relação à produção de maçã no ano de 2012.

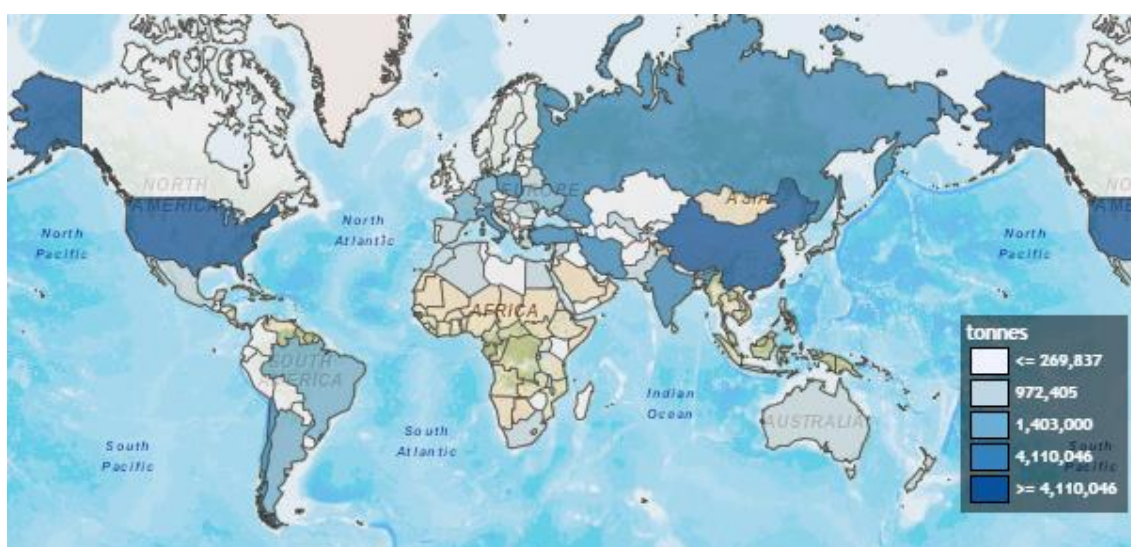


Figura 1 Toneladas de maçã produzida à escala global durante o ano de 2012. (FAOSTAT, 2014)

Em média, a maçã inteira madura é constituída por 89% de água, 14% hidratos de carbono, 0,5% lípidos e 0,3% proteínas na porção edível. (Sinha, 2006; Feliciano *et al.*, 2010) A presença de D-frutose contribui para aproximadamente metade dos açúcares totais presentes na maçã. Juntamente com a D-glucose e a sacarose, estes açúcares correspondem a 80% dos hidratos de carbono presentes na maçã, sendo os restantes 20% atribuídos ao amido. A composição nutricional deste fruto depende da variedade, local e condições de cultivo, bem como do estado de maturação (Feliciano *et al.*, 2010).

Apesar da maçã conter uma vasta variedade de ácidos orgânicos, são os ácidos D-málico e cítrico que mais contribuem para a acidez deste fruto. O conteúdo em fibra total da maçã ronda os 2% e 80% desta é insolúvel (Feliciano *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2006).

Para além do seu valor energético e conteúdo em fibra alimentar, a maçã contribui ainda de forma positiva para a alimentação humana com alto teor em compostos fenólicos, particularmente na casca.

As variedades de maçã que chegam às instalações da Induampe e são utilizadas para a produção de sumo concentrado variam muito com a sua origem e data de receção. A empresa não mantém registos das percentagens exatas de cada variedade de maçã que adquire, mas os critérios de aquisição de matéria-prima exigem uma composição de aproximadamente 50% Gala, 30% Golden, 10% Starking e $\leq 10\%$ Reineta.

1.4. Características do fruto – De que forma a composição da maçã influencia o seu processamento

De entre todos os fatores que exercem influência no dimensionamento de uma linha de fabrico de sumo concentrado de maçã, a composição da própria matéria-prima é predominante (Falguera e Ibarz., 2014). É com base no conhecimento das características bioquímicas da maçã que são desenvolvidas novas tecnologias e obtidos novos produtos para melhor tirar partido deste alimento. Este mesmo conhecimento tem de estar presente para se poder otimizar as tecnologias existentes e melhorar a qualidade dos produtos a que estas dão origem.

À semelhança de muitos outros alimentos, a composição da maçã é complexa, sendo difícil abordar o efeito que cada composto individual exerce sobre o produto e o processo. Desta forma, muitos destes compostos são agrupados em famílias, cuja relevância para a indústria da transformação de fruta é variada. Neste capítulo serão abordados alguns destes grupos de compostos cuja importância neste setor é significativa.

1.4.1. Açúcares e ácidos orgânicos

O teor em hidratos de carbono está sujeito a variações consideráveis entre variedades. Em geral, as variedades mais produzidas em Portugal têm teores relativamente elevados de açúcares totais, uma característica frequentemente associada a cultivos expostos a mais horas de sol. Simultaneamente, estas variedades têm um conteúdo em ácido málico substancialmente mais baixo (Feliciano *et al.*, 2010).

Para o fabrico de sumo concentrado de maçã e pera, as oscilações do teor de açúcar da fruta não são acentuadas o suficiente para influenciar significativamente o processo. O fabrico de concentrado acaba por normalizar o °Brix para valores que rondam os 70,0 a 70,5, os quais são aceites globalmente. (Falguera e Ibarz, 2014) No entanto, a quantidade de ácidos orgânicos e a acidez do sumo concentrado são parâmetros cujos limites de aceitação nem sempre são fáceis de atingir, em particular, com matéria-prima de baixa acidez (Endrizzi *et al.*, 2014; Harker, 2002).

1.4.2. Pectina e persistência de turbidez

Os polissacarídeos pécnicos são uma família de polissacarídeos estruturais que fazem parte da composição da lamela média e parede celular das células vegetais e que partilham uma série de características comuns (Willats *et al.*, 2006; Rildey *et al.*, 2001). Estes polissacarídeos são mais facilmente reconhecidos pela abundância de ácido galacturónico (GalA) na sua estrutura. Uma representação desta estrutura pode ser observada na figura 2 (Willats *et al.*, 2006).

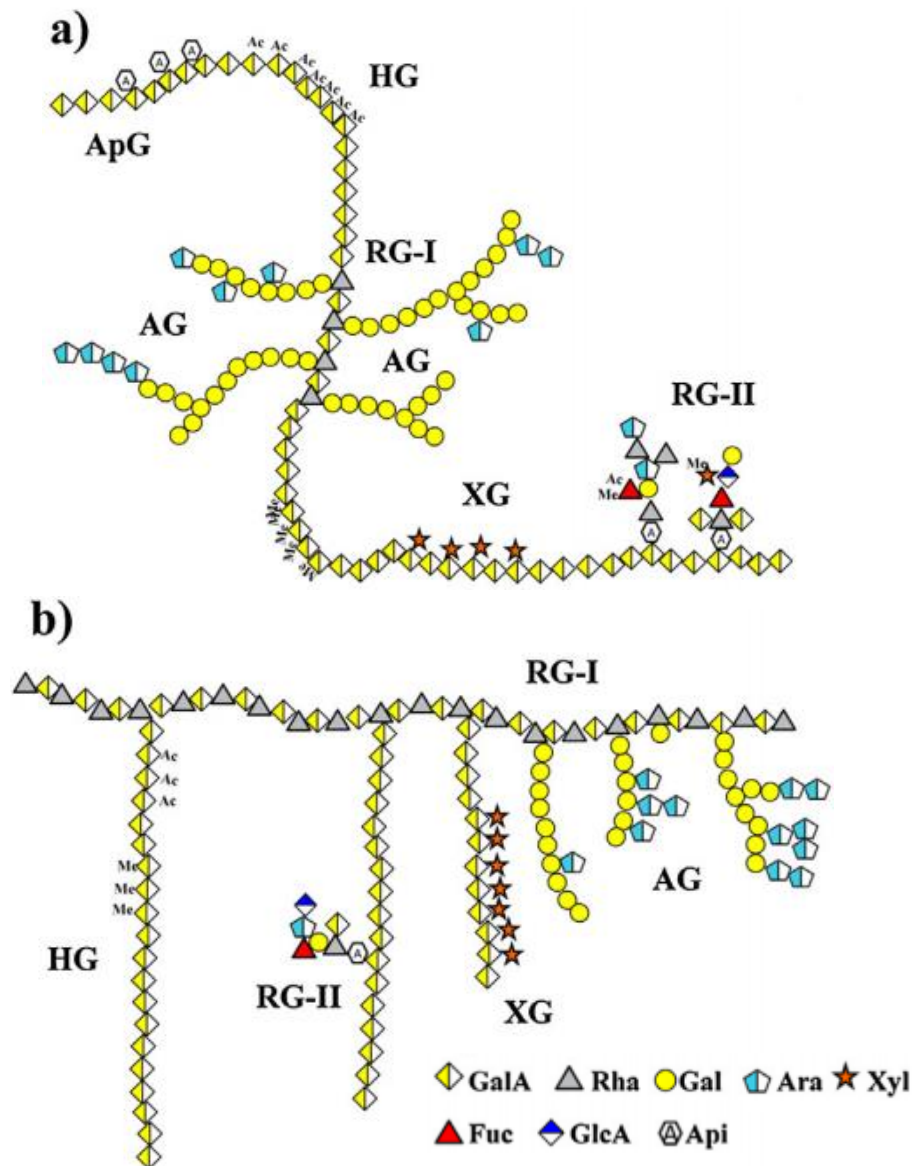


Figura 2 Representação dos principais domínios estruturais encontrados nos polissacarídeos pécnicos. O esquema **a)** mostra um modelo clássico da molécula, no qual a cadeia principal é constituída em grande parte por homogalacturonanas e ramnogalacturonanas do tipo I. O esquema **b)** mostra um modelo proposto por Vincken *et al.* em 2003, no qual as homogalacturonanas, ramnogalacturonanas do tipo II, xilogalacturonanas e arabinogalactanas aparecem como ramificações de uma cadeia principal de ramnogalacturonanas do tipo I. (adaptado de Ferreira *et al.*, 2015)

Apesar seu uso como aditivos alimentares, como agentes espessantes e estabilizantes, e importância como moléculas estruturais do reino vegetal, os polissacarídeos pécnicos são uma das principais fontes de problemas associados ao excesso de turbidez nos sumos concentrados de pera e maçã (Alvarez *et al.*, 1996; Falguera e Ibarz, 2014; Sinha, 2006; Pinelo *et al.*, 2010).

O conhecimento da sua estrutura e relevância nos sistemas vivos de que faz parte é fundamental para chegar a soluções para os problemas que esta causa na indústria do sumo concentrado.

A cadeia principal dos polissacarídeos pécnicos é constituída por resíduos de D-GalA unidos por ligações α -1,4, formando um polímero linear ao qual é dado o nome de homogalacturonana (HG). Com uma incidência muito dependente da origem vegetal, alguns destes resíduos apresentam grupos carboxilo metil-esterificados em C-6. Podem ainda mostrar O-acetilação em C-2 ou C-3, como representado na figura 3 (Willats *et al.*, 2006; Rilley *et al.*, 2001).

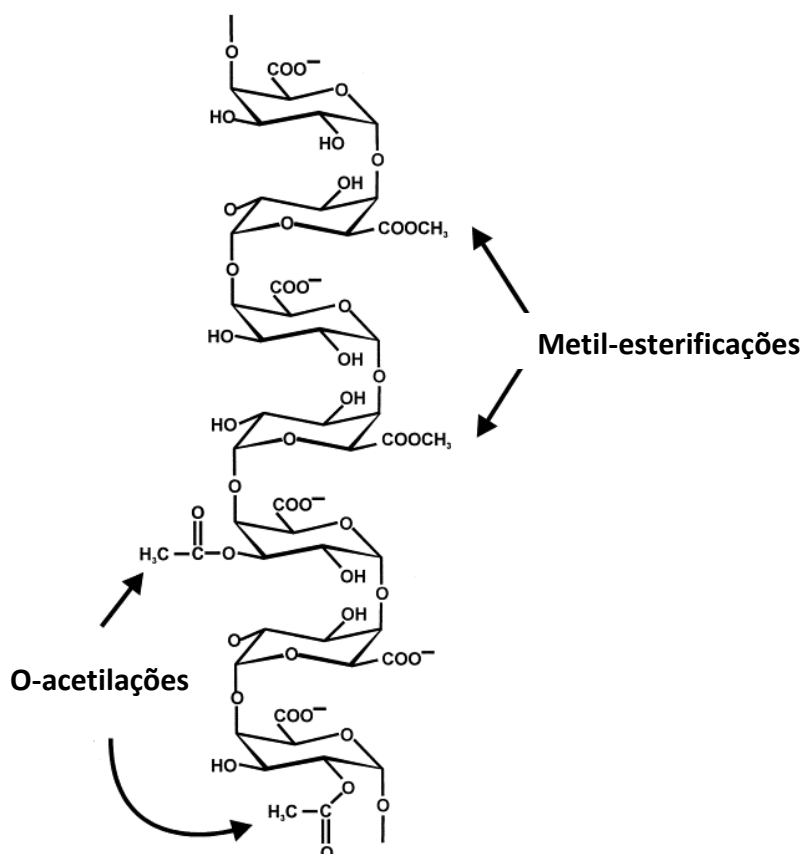


Figura 3 Representação dos locais de metil-esterificação e O-acetilação dos resíduos de ácido galacturônico de uma homogalacturonana (Rilley *et al.*, 2001)

Em tecidos vegetais reprodutivos, como é o caso da maçã e da pera, é frequente encontrar resíduos de GalA associados a açúcares como a D-xilose por ligações β -1,3. A estas moléculas é dado o nome de xilogalacturonanas (XG). À semelhança das HG, são encontradas metil-esterificações ao longo da cadeia linear de GalA, igualmente distribuídos pelos resíduos, quer estes estejam associados a D-xilose ou não (Willats *et al.*, 2006; Rilley *et al.*, 2001; Voragen *et al.* 2009). A ramnogalacturonana do tipo I (RG-I) é um polissacarídeo péctico ramificado cuja cadeia principal consiste na repetição do dissacarídeo $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow]$, até uma extensão de aproximadamente 100 unidades. Ligadas a cerca de 50% dos resíduos de ramnose encontram-se cadeias de galactanas, arabinogalactanas e arabinanas (Willats *et al.*, 2006; Rilley *et al.*, 2001). A ramnogalacturonana do tipo II (RG-II) apresenta uma série de cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos de GalA que compõem a sua cadeia principal. Esta, ao contrário do que o nome da molécula possa dar a entender, é formada apenas por GalA associado de forma idêntica à HG e que pode ou não estar metil-esterificado (Willats *et al.*, 2006; Rilley *et al.*, 2001; Voragen *et al.* 2009). Os polissacarídeos que seguem este padrão estrutural são também conhecidos como galacturonanas substituídas (Rilley *et al.*, 2001). As cadeias laterais que constituem as RG-II consistem em quatro oligossacarídeos distintos e cujos monómeros incluem açúcares pouco comuns, como a apiose, o ácido acérico, o ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico e o ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico. Uma esquematização da estrutura conhecida da RG-II está representada na figura 4.

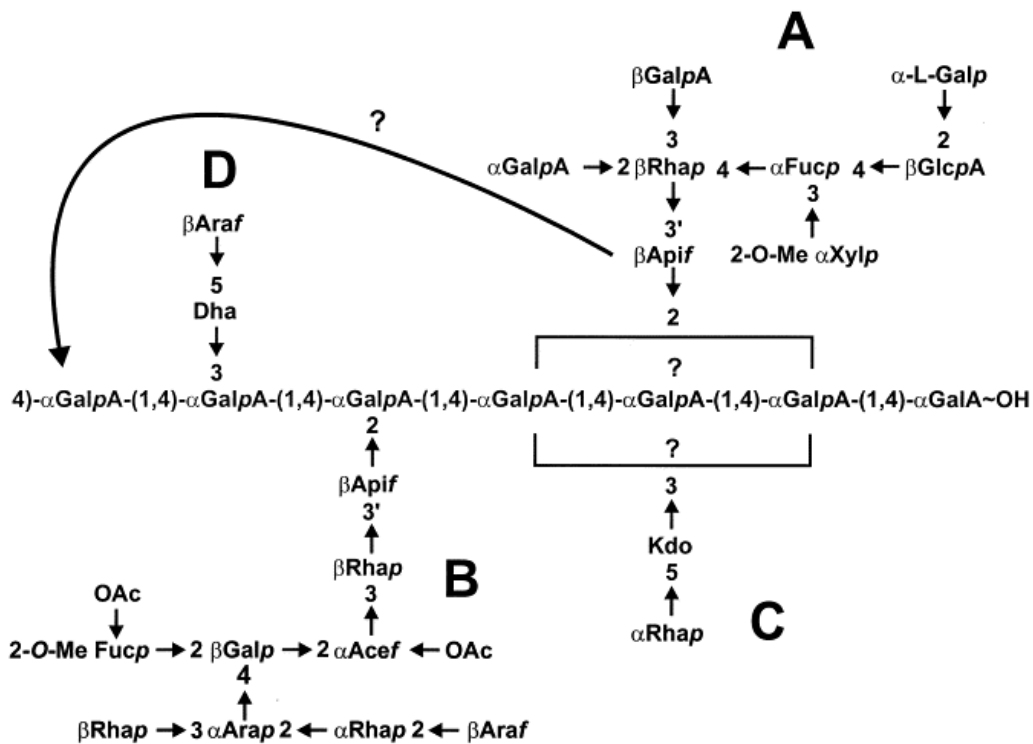


Figura 4 Demonstração da estrutura primária da ramnogalacturonana do tipo II (RG-II) com identificação das quatro cadeias laterais de oligossacarídeos. Enquanto que a estrutura das cadeias laterais é atualmente conhecida, não existem certezas quanto à posição relativa que estas assumem ao longo da cadeia principal de homogalacturonana. (Rilley *et al.*, 2001).

As estruturas acima detalhadas evidenciam as diversas formas que estes polissacarídeos assumem na natureza. Esta variedade estrutural, juntamente com as alterações a que estes polissacarídeos estão sujeitos ao longo do processo de maturação do fruto, levaram à criação de sistemas de classificação de substâncias pécnicas. A Sociedade Química Americana dividiu estas substâncias em quatro categorias: (Jayani *et al.*, 2005; Voragen *et al.*, 2009)

- 1) **Protopectina:** Presente no tecido vegetal intacto, em particular na parede celular da casca da maçã. A hidrólise parcial destas moléculas dá origem a pectina e ácidos pécnicos.
- 2) **Ácido pécnico/pectato:** Polímero solúvel de GalA com um grau de metil-esterificação desprezável.
- 3) **Ácido pectínico:** Polímero solúvel de GalA com um grau de metil-esterificação entre 0 e 75%.
- 4) **Pectina:** Material polimérico em que pelo menos 75% dos grupos carboxilo das unidades de GalA estão esterificadas com metanol.

Diversas fontes bibliográficas mencionam a presença de pectinas com baixo grau de metil-esterificação, e amido residual no sumo de maçã como as principais causas para o aparecimento de níveis inaceitáveis de turbidez (Alvarez *et al.*, 1998; Yazdanshenas *et al.*, 2010; Pinelo *et al.*, 2010; Endo, 1965).

Segundo Endo (1964), as moléculas de pectato, carregadas negativamente, mantêm-se em suspensão devido à repulsão que exercem entre si. Enquanto se encontram nesta configuração, a luz que incide sobre o sumo sofre uma dispersão que resulta na percepção visual de turbidez. Os ensaios analíticos efetuados ao sumo concentrado de maçã para deteção deste parâmetro tiram partido deste fenómeno e fornecem resultados em unidades de turbidez. NTU (nephelometric turbidity unit) e FNU (formazin nephelometric unit) são as duas unidades de turbidez mais utilizadas na indústria dos sumos de fruta (Pinelo *et al.*, 2010; Endo, 1965).

Os equipamentos nefelométricos dispõem de um ou mais detetores que se encontram desalinhados com uma fonte de radiação na gama dos infravermelhos, normalmente com ângulos de 45^o ou 90^o. A densidade das partículas em suspensão de uma determinada amostra é dada em função da radiação desviada pela mesma quando comparada com uma gama de padrões. O uso de equipamento espectrofotométrico na gama do visível é também por vezes usado para determinação da turbidez de uma dada amostra (Skoog *et al.*, 2007).

Uma outra forma destas moléculas contribuirá negativamente para o processo de clarificação do sumo é a capacidade gelificante que demonstram ter enquanto formadas por cadeias longas (Echavarria *et al.*, 2011).

Um gel de pectina é formado quando porções de HG, através de ligações cruzadas, formam redes cristalinas tridimensionais capazes de aprisionar água e solutos. A formação desta estrutura é fortemente influenciada pelas condições do meio em que se encontra, e pelas características da pectina envolvida (Willats *et al.*, 2006; Shaikh *et al.*, 2012; Rascón-Chu *et al.*, 2009).

Polissacarídeos pécticos com elevado grau de metil-esterificação (>50% dos resíduos de GalA) formam ligações cruzadas entre HG através de pontes de hidrogénio e forças hidrofóbicas entre os grupos metoxilo. Ambas as interações são promovidas por elevadas concentrações de açúcares e iões hidrogénio (pH baixo) (Willats *et al.*, 2006).

Porções de HG com baixo grau de metil-esterificação (<50% dos resíduos de GalA) têm uma mecânica de gelificação bastante diferente, na qual a presença de catiões divalentes desempenham um papel fundamental. O ião Ca²⁺ é aquele que mais

frequentemente participa na gelificação de HG pouco esterificada, ocorrendo uma quelatação intermolecular entre o ião e os grupos carboxilo livres. Os agregados macromoleculares formados por este meio assumem uma conformação denominada “caixa de ovos” (Willats *et al.*, 2006; Shaikh *et al.*, 2012; Rascón-Chu *et al.*, 2009). A distribuição dos iões de cálcio pelas moléculas de HG está representada na figura 5.

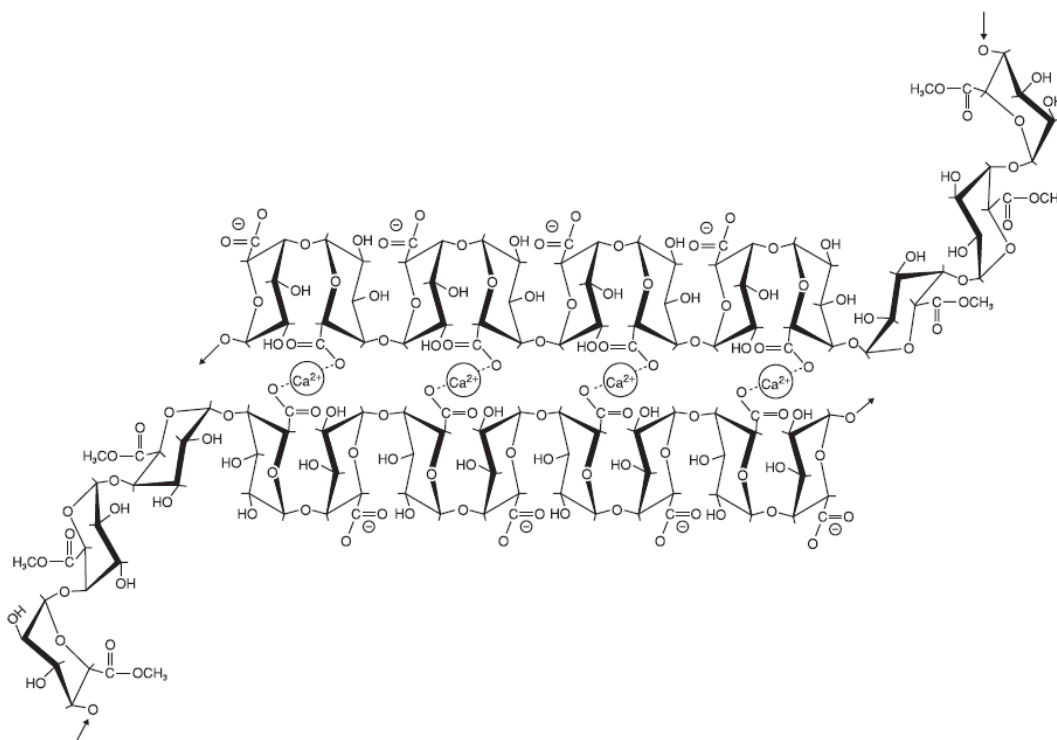


Figura 5 Modelo estrutural do complexo homogalacturonana-cálcio responsável pelo efeito gelificante da pectina na presença de cátions bivalentes. (Shaikh *et al.*, 2012)

Um exemplo da capacidade gelificante da pectina surge na ultrafiltração (UF). O acumular de polissacarídeos pécnicos com capacidade gelificante nos poros das membranas de UF acelera o seu entupimento de forma proporcional à sua concentração. A gelificação é ainda potenciada pelas condições do meio em que decorre. Meios ácidos e com teores de açúcar elevados promovem fenómenos de gelificação (Alvarez *et al.*, 1998).

Para combater este problema, a indústria dos sumos de fruta recorre a tratamentos enzimáticos, aplicando amilases e pectinases de origem microbiana, seguidos de uma etapa de filtração. A eficácia destes tratamentos é, na maioria das vezes, satisfatória (Alvarez *et al.*, 1996; Falguera e Ibarz, 2014; Sinha, 2006; Pinelo *et al.*, 2010).

1.5. Amadurecimento - Influência das modificações da matéria-prima no processo de produção de sumos concentrados de fruta

O amadurecimento da fruta e as modificações físicas e bioquímicas que lhe estão associadas têm uma enorme influência em praticamente todos os setores da indústria alimentar. Seja para consumo direto ou para qualquer tipo de processamento, as alterações a que um fruto está sujeito ao longo desta transformação influenciam a sua aceitabilidade, os parâmetros de processamento a que é sujeito e a qualidade final de um produto processado.

Estas transformações são iniciadas pelo etileno, uma hormona vegetal volátil essencial para o desenvolvimento dos frutos. Em resposta ao estímulo causado por esta molécula, são induzidas uma série de alterações físicas e químicas que eventualmente levam ao desenvolvimento da textura, cor, sabor e aroma desejados (Paliyath e Murr, 2006; Sinha, 2006). Com base no padrão de produção de etileno durante o amadurecimento, e na resposta à presença deste composto, os frutos são classificados como climatéricos ou não-climatéricos. Frutos climatéricos produzem grandes quantidades de etileno e sofrem uma redução considerável do seu tempo de maturação quando expostos a fontes externas deste mesmo composto. A maçã, tratando-se de um fruto climatérico está sujeita a este estímulo constante de produção de etileno e maturação acelerada (Paliyath e Murr, 2006; Sinha, 2006). Grande parte das unidades de fabrico opera de forma sazonal para conseguir tirar melhor partido do período em que a fruta se encontra nas condições ideais para ser processada. Ainda assim, a retenção da fruta em silos abertos, em particular durante as estações do ano mais quentes, leva a um amadurecimento acelerado que está associado a complicações na manutenção dos parâmetros de qualidade dos sumos concentrados de fruta (Sinha, 2006; Zielinski *et al.* 2014).

1.5.1. Degradação da parede celular

A degradação da parede celular é a principal causa para as alterações na textura dos frutos ao longo do amadurecimento. É causada por reações enzimáticas que atuam sobre os diversos polissacarídeos que compõem a parede celular e culminam no amolecimento do fruto. De entre estes polissacarídeos, a pectina, a celulose e a hemicelulose são os que mais se destacam como sendo fundamentais para a integridade

estrutural dos tecidos vegetais que compõem os frutos. Estes mesmos compostos exercem uma grande influência sobre a qualidade dos sumos de fruta clarificados, o que faz com que o estudo da sua evolução ao longo do amadurecimento seja de particular importância para esta indústria (Paliyath e Murr, 2006; Nunes *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2004).

Ao longo do amadurecimento, a celulose é degradada principalmente pela β -1,4-glucanase. A atuação desta enzima, em conjunto com galactosidases, leva à degradação das hemiceluloses, incluindo xiloglucanas, glucomananas e galactoglucomananas, moléculas também associadas a mudanças na textura de diversos frutos (Kalamaki *et al.* 2006; Ali *et al.*, 2004). Não sendo compostos apontados como causa para a persistência de turbidez nos sumos de fruta, as celulosas e hemicelulosas não deixam de ser relevantes nesta indústria. A despolimerização destas moléculas tem uma influência direta no rendimento de certas etapas do processo, em particular durante a prensagem, e é a principal causa para os baixos rendimentos de extração de sumo associados a fruta pouco amadurecida (Ali *et al.*, 2004; Paliyath e Murr, 2006).

Também consequência da maturação da fruta, a degradação dos polissacarídeos pécticos é um fator de grande importância nas mudanças de textura da matéria-prima e nos parâmetros processuais dos sumos clarificados.

O estado de maturação da maçã está relacionado com o aumento na atividade da poligalacturonase (PG), pectina metilesterase (PME) e de uma série de outras enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal. A figura 6

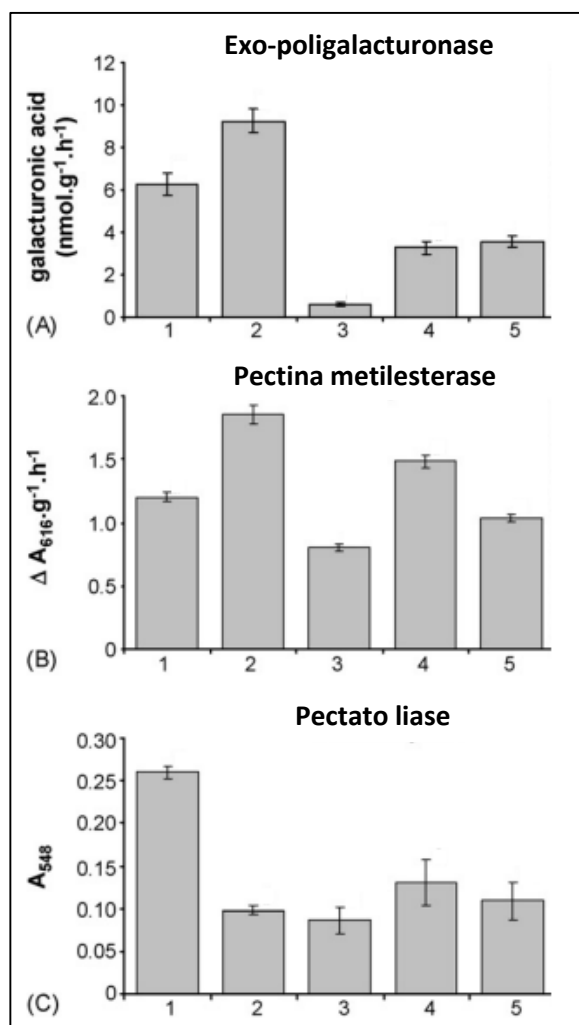


Figura 6 Modelos de atividade enzimática avaliados durante o crescimento e maturação de maçã da variedade “Mondial Gala”. Os diferentes estados de maturação estudados foram: 1) Formação do fruto; 2) Crescimento do fruto; 3) Fruto formado imaturo; 4) Fruto na altura da apanha; 5) Início de senescência. Foram utilizados métodos espectrofotométricos sensíveis à presença de açúcares redutores cuja origem está diretamente relacionada com a atividade da enzima (Goulao *et al.*, 2006).

mostra os padrões de atividade enzimática de algumas das pectinases. A distribuição das atividades máximas de cada enzima ao longo das diferentes fases de maturação do fruto sugere uma mecânica de atuação sequencial (Goulao *et al.*, 2006). A figura 7 demonstra que a atividade da PME é dominante numa primeira fase de degradação da parede celular. Independentemente da origem, a atividade máxima da PG é apenas exibida após o decréscimo acentuado da atividade da PME. (Nunes *et al.*, 2009)

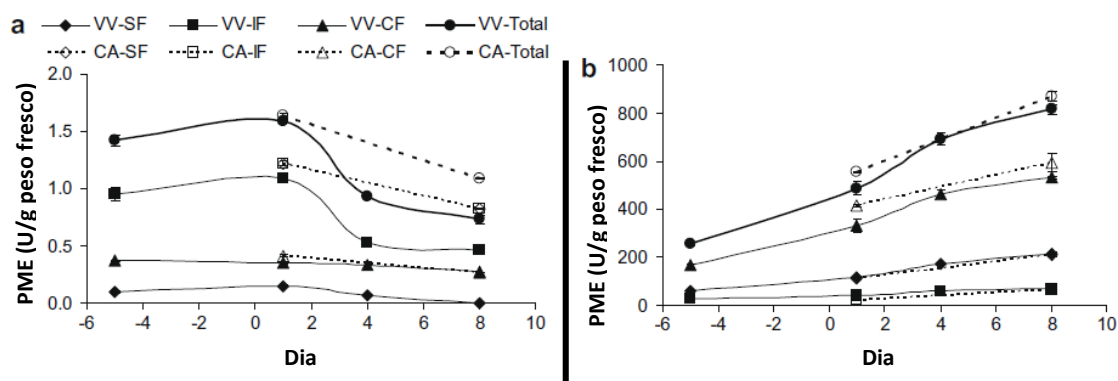


Figura 7 Evolução da atividade de pectina metil esterase e poligalacturonase na ameixa da variedade “Rainha Cláudia Verde” com origem em dois pomares (VV: Vila Viçosa; CA: Cano). As atividades foram quantificadas para as frações de enzima solúveis (SF) e para frações associadas à parede celular por ligações iónicas (IF) e ligações covalentes (CF). Adaptado a partir de Nunes *et al* (2009).

Kramer *et al* (1992) demonstrou que a inibição da expressão de genes envolvidos na biossíntese de etileno e de enzimas como a PG resultou num aumento da firmeza do tomate amadurecido. Giovannoni *et al.* (1989) introduziu o gene responsável pela expressão da PG em tomate rin (ripening inhibited). Este tomate foi modificado geneticamente de forma a não exibir muitos dos aspetos característicos do amadurecimento, incluindo a perda de firmeza. A introdução do gene da PG levou à produção da respetiva enzima, a qual provou estar ativa mas não foi suficiente para causar alterações significativas na textura do tomate (figura 8).

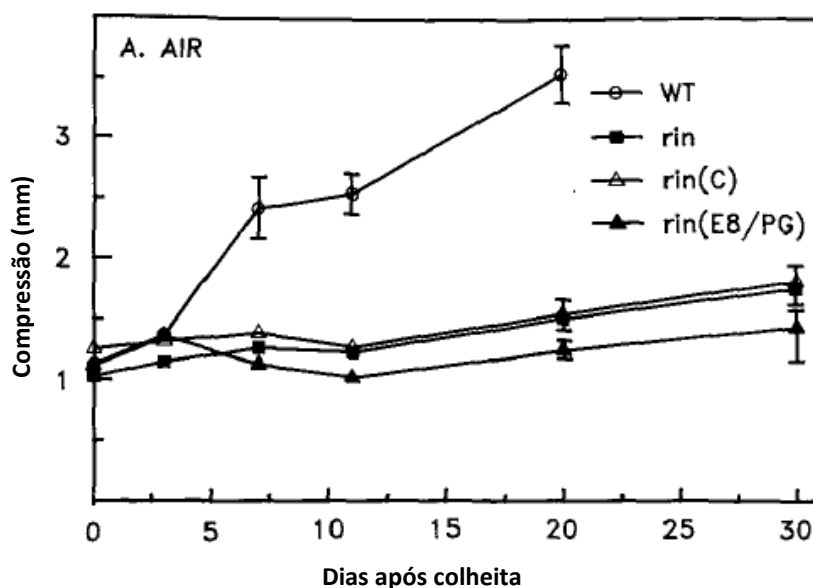


Figura 8 Evolução da compressibilidade do tomate selvagem (WT), das variantes modificadas geneticamente com maturação inibida (rin, rin(C)) e do tomate com maturação inibida e incorporação do gene da poligalacturonase (rin(E8/PG)) (adaptado de Giovannoni *et al* (1989)).

Os estudos apresentados demonstram que por detrás do fenómeno do amadurecimento estão envolvidas múltiplas enzimas que atuam de forma sistemática e sequencial. Mesmo quando considerando apenas as modificações da textura, apenas a degradação conjunta de todos os componentes da parede celular resulta no amolecimento habitual dos frutos.

1.5.2. Metabolismo dos ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos fazem também parte dos principais componentes dos frutos e estão sujeitos a variações consoante o tipo de fruto e o amadurecimento. Como tal, a quantidade de ácidos orgânicos é frequentemente usada como parâmetro de avaliação do estado de maturação. (Sinha, 2006; Paliyath e Murr, 2006). O ácido L-málico é o principal ácido orgânico da maçã, com teores que variam entre os 180 e 325mg/100g de porção edível após a apanha (Feliciano *et al.*, 2010).

Geralmente, a fruta em estado prematuro de maturação contém mais ácidos orgânicos. À medida que esta amadurece, os ácidos são convertidos em açúcares por via da gluconeogénese, ou servem de precursores à síntese de aminoácidos (Paliyath e Murr, 2006).

1.5.3. Degradação do amido e aumento do teor de açúcares

A degradação do amido durante o amadurecimento da maçã é um fenômeno atualmente bem estudado e à muito tempo que é usado como base para determinação das datas ideais para a colheita da fruta, juntamente com os teores de ácidos orgânicos e ensaios de textura (Paliyath e Murr, 2006; Brookfield *et al.*, 1997).

As enzimas amilolíticas presentes no tecido vegetal são as principais responsáveis por esta degradação. A ação conjunta de α -amilases, β -amilases e amiloglucosidases resulta na hidrólise das moléculas de amido e amilopectina, a partir da qual resultam mono e oligossacarídeos, responsáveis pelo aumento do conteúdo total de açúcares associado ao amadurecimento (Thammawong e Arakawa, 2010).

Brookfield *et al.* (1997) monitorizou a quantidade de amido ao longo da formação, amadurecimento e senescência de várias variedades de maçã. Os resultados obtidos para a maçã “Royal Gala” estão representados na figura 9.

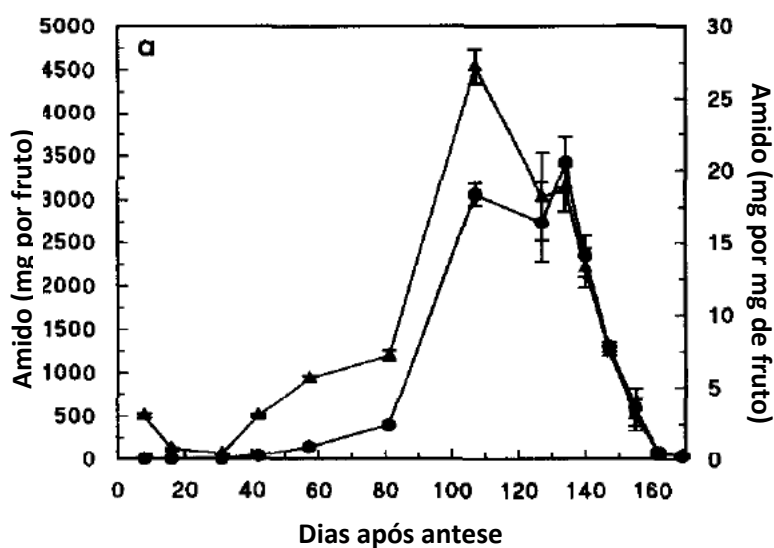


Figura 9 Quantidade de amido em macieiras da variedade Royal Gala ao longo da formação e amadurecimento dos frutos. Os resultados representados por ● corresponde à quantidade de amido por fruto (mg/fruto) e ▲ corresponde ao amido por grama de fruto (mg/g) (adaptado de Brookfield *et al.*, 1997).

O decréscimo nas concentrações de amido associado à maturação é evidente a partir do dia 130 após o início da formação do fruto. O aumento do teor de açúcares associado pode ser monitorizado de forma a avaliar a extensão do amadurecimento. São frequentemente utilizados refratômetros para este efeito (Thammawong e Arakawa, 2010).

1.6. Despectinização e Ultrafiltração – as atuais soluções para as dificuldades do processamento de sumo concentrado

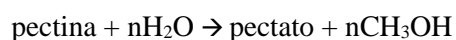
1.6.1. Despectinização

Como já foi abordado nos capítulos anteriores, as paredes celulares vegetais possuem uma grande variedade de polissacarídeos com estruturas complexas. Para que as alterações associadas ao amadurecimento sejam possíveis, é necessária a ação sequenciada e sinérgica de várias enzimas que expressam a sua atividade durante fases distintas deste processo (Nunes *et al.*, 2009).

As décadas de estudos dedicados ao conhecimento das interações entre os polissacarídeos das paredes celulares e das enzimas envolvidas na sua degradação durante a maturação permitiu à indústria alimentar aplicar este conhecimento no processamento de sumos de fruta. Desta forma, o uso de pectinases, amilases e celulases na degradação dos componentes da parede celular causadores de turbidez passou a ser a norma no fabrico de sumos clarificados (Falguera e Ibarz, 2014).

Para o exemplo concreto dos sumos concentrados de pera e maçã, as enzimas dominantes no tratamento enzimático efetuado são as pectinases e as amilases. O seu efeito combinado permite chegar a um sumo livre de amido e polissacarídeos pécnicos com cadeias longas, os compostos mais frequentemente associadas a complicações na clarificação e turbidez. Seguidamente estão detalhadas as principais características das pectinases utilizadas neste tipo de tratamentos.

- **Pectina metilesterase (PME)(EC 3.1.1.11):** Hidrolase que catalisa a desesterificação das ligações éster metílicas da cadeia de GalA da pectina, libertando pectato e metanol. A reação catalisada por esta hidrolase pode ser descrita da seguinte forma: (Jayani *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2004)



As moléculas resultantes ficam sujeitas à ação de poligalacturonases e pectina liases, que irão dar continuidade à degradação dos polissacarídeos pécnicos.

Desta forma, a PME é das primeiras enzimas a atuar no processo natural de amadurecimento do fruto, antecedendo a ação das restantes enzimas pectinolíticas. O modo de ação da PE está esquematizado na figura 10 (Ali *et al.*, 2004; Denès *et al.*, 2000; Jayani *et al.*, 2005).

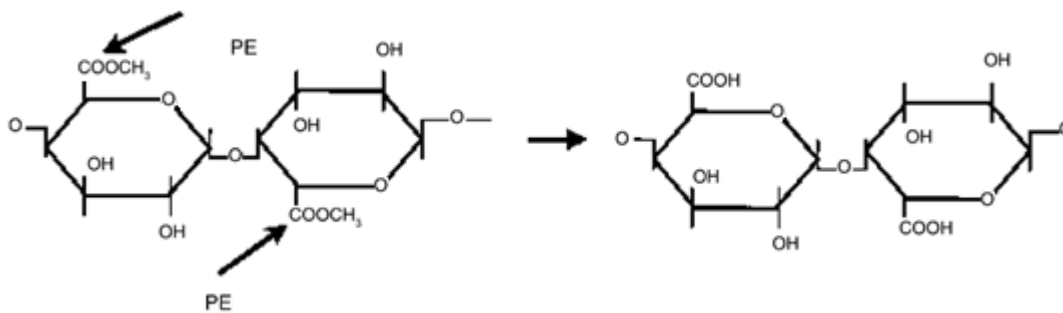


Figura 10 Representação do modo de ação da pectina metilesterase (PME) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécnicos. As setas mostram o local onde a enzima exerce a sua atividade sobre a substância pécnica (adaptado de Jayani *et al.*, 2005).

No fabrico de sumos concentrados e clarificados, a PME é maioritariamente utilizada numa fase inicial do processo, estando frequentemente incluída nos *cocktails* enzimáticos aplicados na fase de maceração. Esta enzima é sensível às temperaturas aplicadas nos processos térmicos envolvidos no fabrico de sumo de fruta concentrado. A sua ação fica assim limitada às etapas que antecedem a desaromatização da polpa, realçando a importância dos tempos de retenção após aplicação da enzima (Denès *et al.*, 2000). O incumprimento destes parâmetros pode levar a complicações em fases posteriores do processo que exigem a ação de outras enzimas, dependentes da desesterificação da cadeia de GalA. O uso de PME está também associado a maiores rendimentos de extração de sumo durante a moagem e prensagem da fruta (Zielinski *et al.* 2014; Jayani *et al.*, 2005; Denès *et al.*, 2000).

- **Pectina depolimerases:** As enzimas capazes de efetuar a despolimerização da pectina dividem-se, consoante o seu mecanismo de atuação, em duas categorias principais. As poligalacturonases (PG) são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 que unem os resíduos de GalA dos polissacarídeos pécnicos. Estas enzimas são ainda classificadas de acordo com o seu modo de ação, o qual pode ser aleatório ou terminal (Jayani *et al.*, 2005; Pinelo *et al.*, 2010). As endo-poligalacturonases (endo-PG)(EC 3.2.1.15), ao exercerem a sua função catalítica em qualquer parte da cadeia de pectato, são as enzimas que mais contribuem para o abatimento da estrutura celular, produzindo polissacarídeos

com massas moléculares significativamente menores, frequentemente sob a demonimação de oligogalacturonatos (Jayani *et al.*, 2005).

Por outro lado, as *exo*-poligalacturonases (*exo*-PG)(EC 3.2.1.67 e EC 3.2.1.82) hidrolisam a cadeia de pectato apenas a partir dos terminais, libertando GalA monomérico ou dimérico (Jayani *et al.*, 2005).

O modo de ação da PG está esquematizado na figura 11.

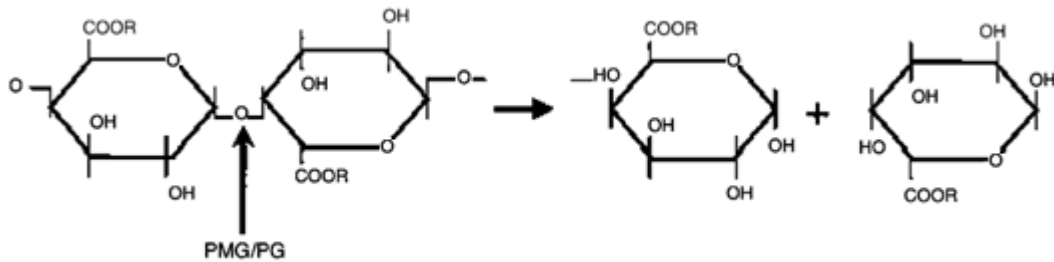


Figura 11 Representação do modo de ação da poligalacturonase (PG) e polimetilgalacturonase (PMG) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécicos. A PMG consegue atuar sobre o GalA metil esterificado, o que é representado na figura ao substituir o R por um grupo metil (CH₃). O mesmo não acontece com a PG, que apenas exerce a sua função catalítica em resíduos desesterificados (R corresponde a um H). As setas mostram o local onde as enzimas exercem a sua atividade sobre a substância pécica (adaptado de Jayani *et al.*, 2005).

Na clarificação de sumos de fruta, a PG exerce um papel fundamental na etapa de despectinização ao despolimerizar a cadeia de GalA e permitir que os fragmentos de HG sejam removidos pelas etapas subsequentes de filtração (Ortega *et al.* 2004; Pinelo *et al.*, 2010).

A degradação não-hidrolítica da pectina é levada a cabo pela pectina liase (PL)(EC 4.2.2.10), também conhecida como pectina transeliminase, dado o seu modo de ação. Esta *trans*-eliminação leva à quebra da ligação glicosídica no C-4 ao mesmo tempo que é removido um H do C-5, o que dá origem a um produto metilado e insaturado (Jayani *et al.*, 2005). Este processo pode ser visualizado na figura 12.

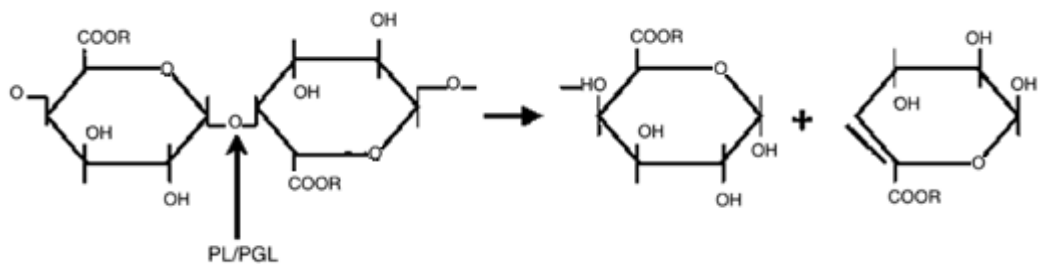


Figura 12 Representação do modo de ação da pectina liase (PL) na cadeia principal de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécticos. Quando a cadeia de poligalacturonato se encontra metil esterificada, a atividade catalítica é realizada pela poligalacturonase liase (PGL), situação em que R corresponde a H. As setas mostram o local onde as enzimas exercem a sua atividade sobre a substância péctica (adaptado de Jayani *et al.*, 2005).

São poucos os organismos do reino vegetal que contêm PL como parte do seu sistema enzimático endógeno. A sua produção para uso industrial está associada a bactérias e fungos responsáveis pela degradação de produtos alimentares e o apodrecimento da fruta amadurecida (Kalamaki *et al.* 2006; Jayani *et al.*, 2005).

A PL está frequentemente incluída nas etapas de despectinização dos sumos de fruta clarificados como parte integral das misturas enzimáticas aplicadas. A possibilidade de atuar sobre resíduos esterificados possibilita uma degradação completa das substâncias pécticas do sumo, mesmo quando a ação das PME não foi suficiente para desesterificar a totalidade dos resíduos de GalA. Estas enzimas são muito dependentes da concentração de cátions no meio reacional, com particular afinidade por iões Ca^{2+} . A presença de agentes quelantes no meio, como o EDTA, atua como forte inibidor à atividade enzimática da PL (Jayani *et al.*, 2005; Endo, 1965).

A cinética enzimática dos preparados utilizados na clarificação industrial dos sumos de fruta é bem conhecida. Ortega *et al.* (2004) estudou as propriedades cinéticas e parâmetros de inativação térmica de três marcas de pectinases comerciais. As temperaturas em que foram registadas atividades mais altas coincidem com aquelas tipicamente aplicadas na indústria para processos de despectinização do sumo de fruta (45-55°C), como pode ser visto na figura 13.

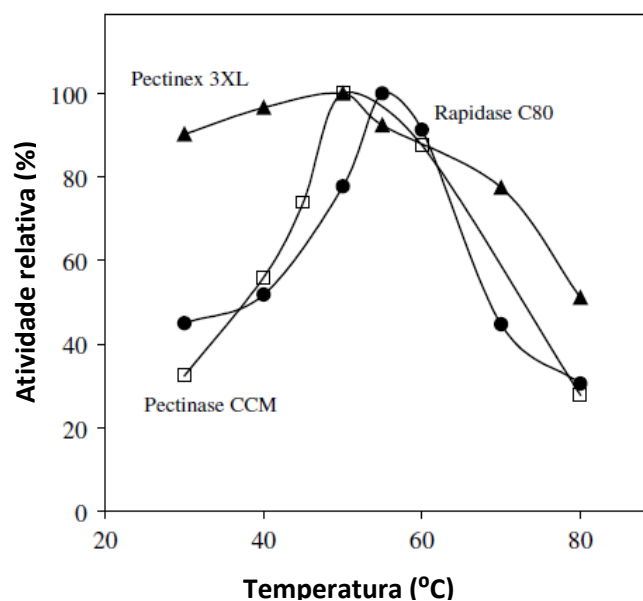


Figura 13 Efeito da temperatura nas atividades de três preparados enzimáticos de pectinase (adaptado de Ortega *et al.*, 2004).

No entanto, o mecanismo que leva à precipitação das substâncias pécnicas após atuação enzimática ainda não foi totalmente detalhado. Desde os estudos realizados por Endo (1964) que se associa a turbidez dos sumos de fruta às partículas mantidas em suspensão por repulsão das cargas negativas associadas aos fragmentos de pectina. Segundo Endo, a degradação enzimática expõe o núcleo proteico dos polissacarídeos pécnicos (detentor de carga positiva) a potenciais interações com as partículas hidrolisadas. Quando este fenómeno ocorre durante tempo suficiente, ocorre uma aglomeração das partículas pécnicas o que facilita a remoção das mesmas por processos de centrifugação ou filtração (Pinelo *et al.*, 2010; Endo, 1965). Este modelo é reforçado por estudos mais recentes levados a cabo por Siebert (2006) e Pinelo *et al* (2010), que dão ênfase às interações entre proteínas, compostos fenólicos e fragmentos hidrolisados de pectina.

As publicações mencionadas até agora demonstram que as enzimas utilizadas pela indústria alimentar na clarificação do sumo de fruta são essencialmente as mesmas que estão envolvidas nas modificações que ocorrem naturalmente no amadurecimento. Estas enzimas atuam de forma sequencial, fazendo com que a ação de algumas delas não se justifique em fases finais da maturação, como é o caso da PME. Isto abre a possibilidade de otimizar o tratamento enzimático de forma a retirar algumas das enzimas do processo caso a matéria-prima não beneficie da sua ação.

Implementar este tipo de modificação no processo requer um conhecimento dos padrões de maturação da fruta ao longo dos meses em que a fábrica se encontra em funcionamento, assim como a atividade enzimática de cada um dos biocatalizadores mais relevantes.

1.6.2. Ultrafiltração

A UF é a técnica de separação mais utilizada pela indústria dos sumos de fruta para complementar o tratamento enzimático, com vantagens que incluem uma elevada eficiência, reduzidos tempos de processamento e baixos requisitos de mão-de-obra (Yazdanshenas *et al.*, 2010; Echavarria *et al.*, 2011; Cassano *et al.*, 2003). A figura 14 representa um esquema de uma unidade de UF idêntica à que é utilizada na Indumape.

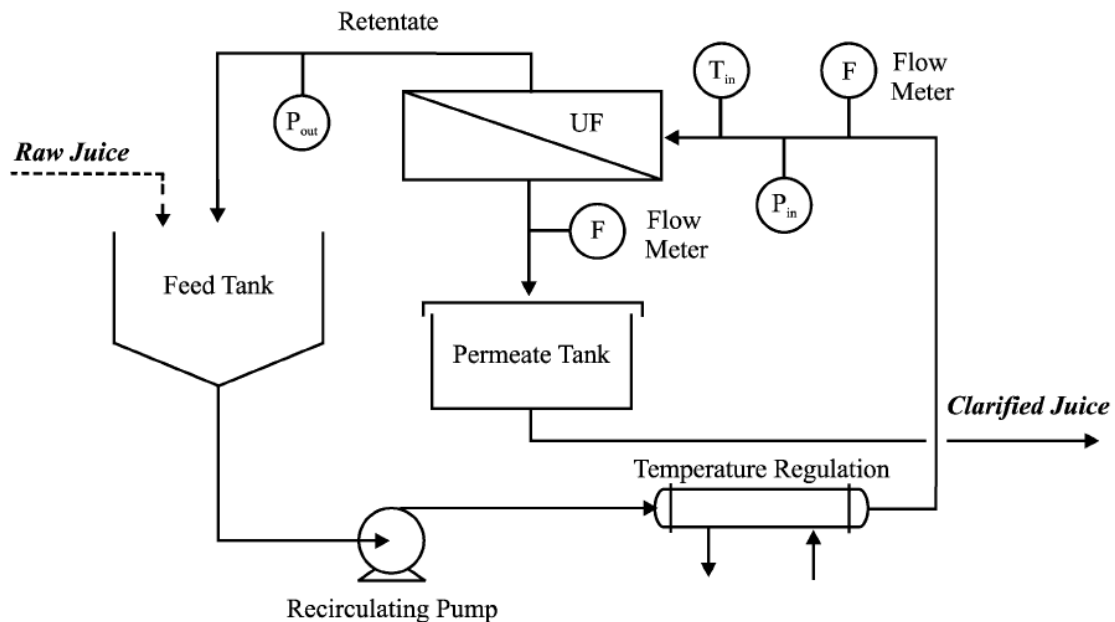


Figura 14 Diagrama esquemático da unidade de ultrafiltração usada na clarificação de sumo de maçã. (Yazdanshenas *et al.*, 2005)

O equipamento instalado na empresa bombeia cerca de 23,5 m³/h de sumo cru através de um módulo de filtração composto por 48 *bundles* tubulares, cada um destes com 19 tubos com 1,2 cm de diâmetro e 3 m de comprimento. O caudal aplicado pode variar consoante as características do sumo e as próprias necessidades da linha. As membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) que revestem estes tubos têm um *cutoff* molecular de 100 kDa (Yazdanshenas *et al.*, 2005, 2010; Bucher Unipektin, 2007). O leque de substâncias que podem ser filtradas por estas membranas está representado na figura 15.

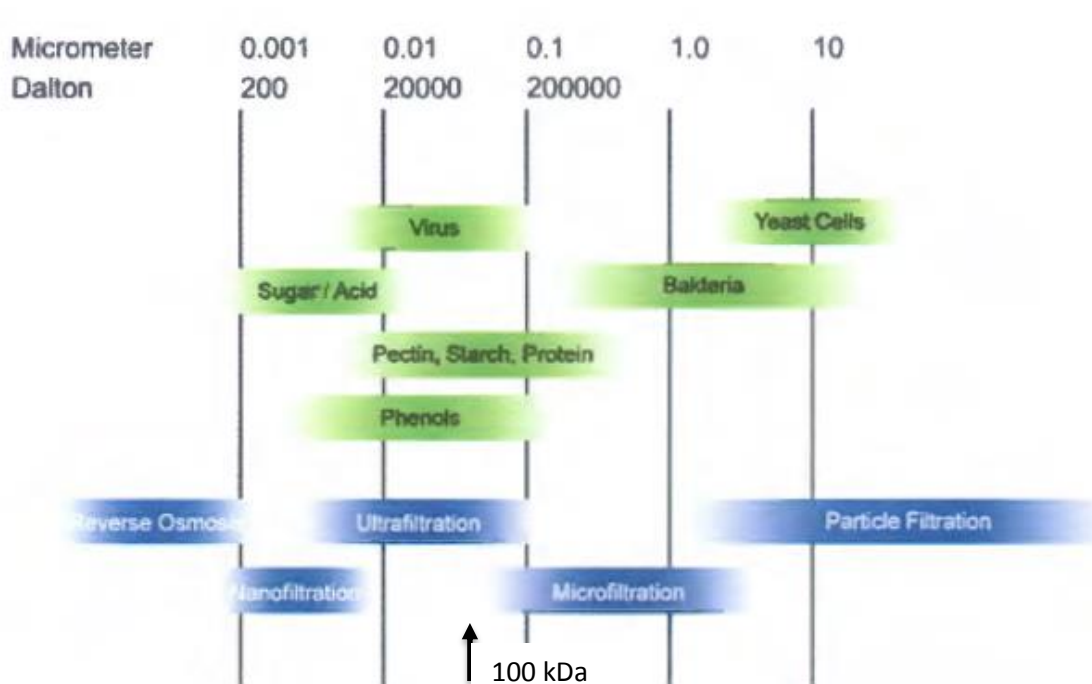


Figura 15 Representação do tamanho das partículas mais importantes nos processos de filtração e das técnicas mais adequadas para retenção das mesmas (adaptado de Bucher Unipektin, 2007).

O sumo cru circula perpendicularmente em relação ao plano da superfície das membranas (cross-flow). O caudal deve ser alto o suficiente para garantir um regime turbulento no interior dos tubos de filtração. O sumo filtrado é recolhido sob a designação de permeado, ou filtrado. O retentado refere-se à mistura que permanece no módulo e que é continuamente recirculada até à paragem e lavagem do equipamento (Yazdanshenas *et al.*, 2005).

Alguns sistemas de UF possuem uma bomba adicional entre o tanque de permeado e os módulos de filtração para a realização de uma retrolavagem (backwash) executada no final de cada ciclo de filtração. Esta bomba força o permeado de volta às membranas com uma pressão transmembranar (PTM) três vezes mais alta que a utilizada durante a filtração de forma a remover algum do resíduo acumulado na membrana e facilitando o processo de limpeza. O permeado utilizado na retrolavagem é descartado, associando assim uma perda de rendimento a esta prática. As unidades de UF atualmente utilizadas na clarificação de sumo deixaram de incluir a bomba para realização desta lavagem (Clever *et al.*, 2000; Bucher Unipektin, 2007).

Um processo de UF cuja eficácia e rendimento estão abaixo dos valores ótimos põe em causa a qualidade do produto final. De maneira a impedir que isto aconteça, o cumprimento das rotinas de lavagem dos módulos de UF tem de ser rigorosamente

cumprido (Yazdanshenas *et al*, 2005, 2010). Estas rotinas são repetidas a cada 12 horas de trabalho ou de cada vez que o processo tem de ser interrompido (Bucher Unipektin, 2007). Um exemplo desta segunda situação ocorre quando é processada toda a matéria-prima que chega à unidade fabril. Segue-se uma breve explicação do processo de lavagem do ultrafiltrador (Yazdanshenas *et al*, 2005; Bucher Unipektin, 2007).

- **Filtração:** Durante o normal funcionamento da unidade de UF, o tanque de alimentação (*Feed Tank*) é mantido a um volume constante por adição de sumo cru ao sistema e pela recirculação de retentato.
- **Concentração:** Dada a necessidade de interromper o processo, seja por cumprimento da duração máxima de trabalho em contínuo ou por depleção da matéria-prima, o caudal de alimentação de sumo cru é interrompido. O retentato continua a recircular e ocorre uma concentração progressiva do teor de sólidos no sistema.
- **Diafiltração (DF):** De forma a minimizar a perda de produtos, o retentato é diluído com água e a UF continua a funcionar. A água continua a ser adicionada até que o °Brix do permeado atinja um valor suficientemente baixo. Este limite de teor de sólidos solúveis é definido pela gestão da produção. O prolongamento da DF permite aumentar o rendimento da ultrafiltração, mas está associado a um maior consumo de água e energia.
- **Esvaziamento:** Quando a DF é terminada, cessa a introdução de água no circuito. A concentração de sólidos no retentato volta a subir até este ser removido do circuito.

Yazdanshenas *et al*. (2005), efetuou estudos sobre a etapa de DF do ciclo de funcionamento das unidades de UF usadas na clarificação dos sumos de maçã. O autor não abordou o impacto da DF na turbidez do sumo, mas demonstrou o que existe uma perda acentuada de caudal de filtração durante o decorrer desta etapa. Foi também realçada a importância da otimização da DF, incluindo os volumes de água a utilizar e a altura em que é dado início à mesma, minimizando perdas de caudal e eventuais prolongamentos desta etapa.

Apesar das publicações recentes conterem informação muito limitada sobre o impacto da DF no processo, existem técnicas empregues por operadores e fabricantes do

equipamento que permitem a redução da turbidez dos lotes de concentrado misturando ou diluindo o sumo resultante da DF (Bucher Unipektin, 2007).

O tratamento enzimático e a UF são duas etapas do processo que se complementam de igual forma. Para garantir a estabilidade da turbidez nos sumos concentrados de fruta, o bom funcionamento do aparelho de UF é de importância comparável à do tratamento enzimático, visto que é nesta etapa que decorre a remoção das partículas de amido e pectina. De forma semelhante, um tratamento enzimático incompleto reduz significativamente o rendimento da UF, como demonstrado por Echavarria *et al.* (2011), e representado na figura 17 (Onsekizoglu *et al.*, 2010; Echavarria *et al.*, 2011; Bucher Unipektin, 2007).

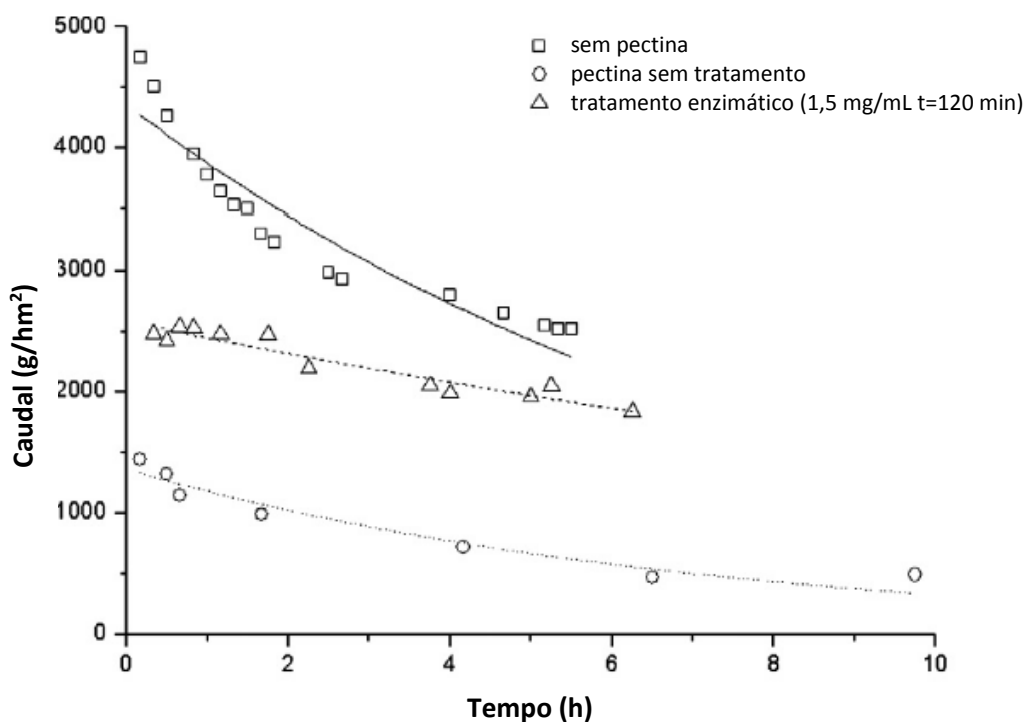


Figura 16 Caudal do permeado em função da duração do processo de ultrafiltração) com uma membrana cerâmica de 100 kDa a 50°C (Echavarria *et al.* 2010).

A diminuição do caudal de filtração em soluções com pectina leva à formação de géis pecticos na superfície interna da membrana. Este gradiente de concentração de soluto que é formado à superfície da membrana é muitas vezes designado como polarização da membrana. Juntamente com o *fouling* membranar, que envolve o entupimento dos poros por acumulação de partículas em suspensão, estes fenómenos continuam a ser obstáculos

importantes nos processos de separação por membranas (Echavarria *et al.*, 2010; Sablani *et al.*, 2001).

Os estudos apresentados evidenciam a importância da UF para a manutenção da qualidade do sumo concentrado. Apesar deste processo ser popular dentro do setor da indústria alimentar, e da sua otimização ao longo dos anos ter sido extensa, qualquer oportunidade de melhoria poderá resultar num aumento considerável da estabilidade do produto final. Uma monitorização rigorosa e contínua do processo e dos parâmetros do sumo clarificado pode levar à concretização desta melhoria.

1.7. O produto secundário do fabrico de sumo concentrado - aroma de maçã

A caracterização do perfil volátil da maçã por técnicas cromatográficas não é particularmente nova. O conteúdo científico até agora publicado já identificou mais de 300 compostos voláteis numa gama abrangente de diferentes origens e cultivares. A natureza destes compostos varia consideravelmente com as variedades e estados de maturação da fruta. Diferentes metodologias de deteção e métodos de preparação das amostras influenciam também a informação recolhida (Karlsson e Triigiirdh, 1997) (Dixon e Hewett, 2000).

Os ésteres formam a principal família de compostos presentes no perfil volátil da maçã, constituindo entre 78 a 92% do mesmo. Os álcoois são o segundo grupo em maior quantidade, com percentagens que variam entre 6 a 16%, seguindo-se os aldeídos que compõem cerca de 10% do total de compostos detetados. Outras substâncias são também detetadas de forma consistente, se bem que em quantidades menores. Estas incluem cetonas, éteres, hidrocarbonetos e compostos terpénicos. Consoante a variedade de maçã, estes elementos encontram-se em proporções variáveis (Dixon e Hewett, 2000; Aguilar-Rosas *et al.*, 2007).

Outro fator que influencia a importância quantitativa destes compostos é o estado de maturação do fruto. O funcionamento das vias metabólicas responsáveis pela biosíntese dos voláteis leva a que as concentrações destes compostos no fruto não permaneçam estáveis durante muito tempo.



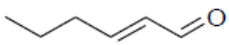

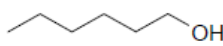
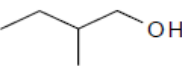
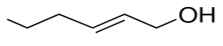
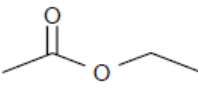
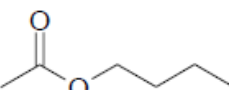
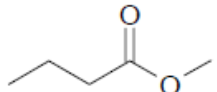
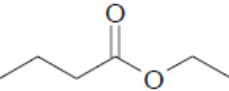
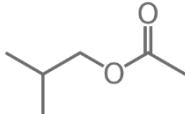
Mattheis *et al.* (1991 e 1995) e Fellman *et al.* (1995) observaram uma tendência para o aumento da quantidade de ésteres e álcoois em fruta amadurecida, acompanhado por um decréscimo na concentração de aldeídos. Estes autores utilizaram a metodologia de espaço de vapor dinâmico (DHS) para a extração dos componentes voláteis de maçãs “Bisbee Delicious” e “Rome”, seguida de uma análise por GC-MS. Vanoli *et al.* (1995) analisaram o conteúdo volátil de maçãs “Starkspur Golden” através dos mesmos procedimentos, e chegaram a conclusões semelhantes ao detetar elevadas concentrações de butanoatos e álcoois nas amostras sujeitas a maior tempo de maturação. Hern e Dorn (2003) utilizaram a microextração em fase sólida (SPME) para avaliar as modificações sazonais nas emissões de voláteis de maçãs “Golden Delicious” e “Maigold”, entre o início de junho até meio do mês setembro. Foi estabelecida uma forte relação entre a emissão de certos compostos e o estado de maturação do fruto, com aumentos significativos de produção de voláteis durante finais de junho e inícios de setembro. Este

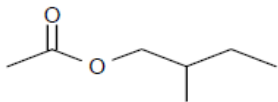
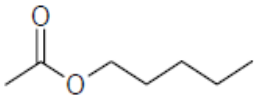
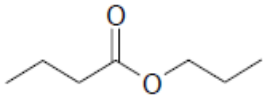
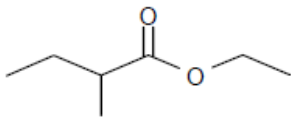
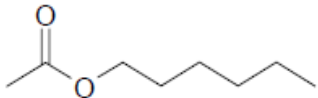
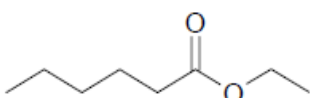
padrão temporal de emissão de compostos foi muito mais acentuado do que as variações associadas às diferentes variedades.

A redução na quantidade de aldeídos está associada à conversão destes a álcoois, por ação da álcool desidrogenase. Esta enzima apresenta uma maior afinidade por aldeídos com cadeias carbonadas longas e não ramificadas, o que naturalmente influencia o perfil volátil que se manifesta à medida que o fruto amadurece. De uma forma semelhante, a álcool acil-CoA transferase, enzima que realiza a esterificação de ácidos carboxílicos com consequente formação de ésteres, apresenta também atividades mais elevadas na presença de substratos não ramificados. Estas afinidades são uniformes entre variedades de maçã e até entre diferentes espécies vegetais (Dixon e Hewett, 2000). Nem todos os compostos voláteis detetados por estes estudos contribuem para as características organolépticas vulgarmente associadas à maçã. Têm vindo a ser identificados os compostos voláteis que efetivamente estão relacionados com o aroma característico do fruto, com base no seu limite de perceção sensorial (LPS). A deteção de um composto cuja concentração se situa acima do LPS tem uma elevada probabilidade de exercer influência sobre o aroma característico do fruto. Para uma dada variedade de maçã, um composto volátil só influencia as características sensoriais da mesma se a sua concentração estiver acima do LPS. A magnitude da contribuição de cada composto está diretamente relacionada com a sua concentração no fruto/extrato. O LPS pode ainda ser influenciado pela pressão de vapor a que o composto está sujeito, fazendo da temperatura do meio um fator importante, e pela sensibilidade e desempenho do painel sensorial sobre qual a análise incide (Belitz *et al.*, 2004; Dixon e Hewett, 2000).

A tabela 1 apresenta uma lista de alguns dos principais compostos voláteis da maçã aos quais são atribuídas as características sensoriais deste fruto.

Tabela 1 Listagem de alguns dos compostos voláteis relevantes ao aroma de maçã, com distinção da estrutura química, descritores sensoriais associados e limites de percepção sensorial. P/T: *Purge and Trap*; GC-FID: cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama; SPME: microextração em fase sólida; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa; SPE: extração em fase sólida (Dixon e Hewett, 2000; Su e Wiley, 1998; Aguilar-Rosas *et al.*, 2007; Young *et al.*, 1996).

Nome	Estrutura	Descrição sensorial	LPS (mL/L H ₂ O)	Referência e método de extração/deteção
Aldeídos				
Acetaldeído		verde, ácido	0,015	Dixon e Hewett (2000)
Hexanal		verde, ácido, maçã verde, terroso, herbáceo	0,0105	Su e Wiley (1998): P/T; GC-FID Dixon e Hewett (2000)
Trans-2-hexenal		verde, ácido, maçã verde, frutado, ameixa	0,017	Su e Wiley (1998): P/T; GC-FID; Dixon e Hewett (2000)
Álcoois				
Butanol		doce, alcoólico	0,5	Dixon e Hewett (2000)
Hexanol		terroso, herbáceo, desagradável	0,5	Dixon e Hewett (2000)
2-Metilbutanol		seco, palha, manteiga	0,25	Dixon e Hewett (2000)
Trans-2-hexenol		verde, frutado	-	Dixon e Hewett (2000)
Ésteres				
Acetato de etilo		frutado, ácido, ananás	0,005	Dixon e Hewett (2000) Aguilar-Rosas <i>et al.</i> (2007): SPME; GC-MS
Acetato de butilo		maçã vermelha, pera, vernizes cosméticos	0,066	Dixon e Hewett (2000) Young <i>et al.</i> (1996): SPE; GC-MS; olfatometria
Butanoato de metilo		frutado, maçã, ananás	-	Aguilar-Rosas <i>et al.</i> (2007): SPME; GC-MS
Butanoato de etilo		frutado, banana, característico de ésteres	0,001	Su e Wiley (1998): P/T; GC-FID; Aguilar-Rosas <i>et al.</i> (2007): SPME; GC-MS; Dixon e Hewett (2000)
Acetato de 2-metilpropilo		frutado, floral, frutos vermelhos	-	Su e Wiley (1998): P/T; GC-FID

Acetato de 2-metilbutilo		maçã, banana, solvente	0,005	Dixon e Hewett (2000) Young <i>et al</i> (1996): SPE; GC-MS; olfatometria
Acetato de pentilo		banana, maçã, frutoso, terroso	0,005	Dixon e Hewett (2000)
Butanoato de propilo		ácido, ananás, damasco	0,018	Su e Wiley (1998): P/T; GC-FID; Dixon e Hewett (2000)
Etil-2-metilbutirato		frutado, maçã, morango, verde, ameixa	0,0001	Su e Wiley (1998): P/T; GC-FID; Dixon e Hewett (2000)
Acetato de hexilo		maçã vermelha, doce, frutado, pera	0,002	Dixon e Hewett (2000); Aguilar-Rosas <i>et al.</i> (2007): SPME; GC-MS; Young <i>et al.</i> (1996): SPE; GC-MS; olfatometria
Hexanoato de etilo		frutado, doce, maçã, ananás	0,001	Dixon e Hewett (2000)

Grande parte destes compostos são extremamente suscetíveis a transformações durante o processamento dos sumos concentrados. Às temperaturas a que os tratamentos enzimáticos e concentradores necessitam de operar (entre 45 a 100°C), os voláteis ficam sujeitos a oxidações potenciadas pelas altas temperaturas. Estas condições também potenciam a ocorrência de reações de Maillard e consequente formação de voláteis cujas características organoléticas são indesejadas. (Karlsson e Triigiirdh, 1997).

O impacto que estas alterações químicas têm sobre as características dos sumos processados é muito acentuado. Shimoda (2002) simulou o tratamento térmico a que os sumos de maçã processados são sujeitos e avaliou a qualidade sensorial destes, comparando-os a sumos sem qualquer tratamento térmico. A classificação atribuída a parâmetros sensoriais positivos, como a frescura, o frutado e o vegetal foi mais baixa para os sumos sujeitos a tratamentos térmicos mais intensos. Parâmetros como o sabor a queimado, por outro lado, foram mais facilmente identificados nestes sumos.

Mais acentuada ainda do que a transformação dos voláteis, a perda física destes compostos é também uma consequência do fabrico de sumo concentrado (Karlsson e Triigiirdh, 1997).

Atualmente, a inclusão de um sistema de reaproveitamento dos compostos voláteis nas unidades fabris de sumos concentrados é muito comum. Ainda baseados no processo originalmente desenhado por Milleville e Eskew em 1944, os sistemas de recuperação por destilação continuam a ser os mais utilizados. A técnica implica o uso de tanques de evaporação *flash*, que geram variações súbitas de pressão de forma a conseguir o rendimento de extração máximo sem ter de elevar a temperatura acima dos 90°C. Os compostos voláteis são então recuperados por destilação, não estando completamente salvaguardados da possível influência da temperatura na sua composição (Falguera e Ibarz, 2014; Karlsson e Triigiirdh, 1997).

A deteção de voláteis associados a características sensoriais positivas numa dada mistura aromática extraída durante o fabrico de concentrado poderá servir como marca de qualidade da mesma. Abre-se assim a possibilidade de atribuir valor acrescentado a um produto cujos compostos ativos passarão a estar evidenciados. Um controlo regular da constituição do aroma vai também contribuir para a padronização do processo, ao melhorar o sistema de controlo de qualidade deste produto. Para este mesmo fim, a Indumape pretende realizar a instalação de um sistema de GC-FID durante o decorrer deste trabalho.

O uso de cromatografia em fase gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama é comum na identificação de compostos orgânicos no setor alimentar, visto tratar-se de um setor em que as limitações da técnica raramente comprometem a obtenção de resultados (Su e Wiley, 1998; Belitz *et al.* 2007).

O FID é um dos tipos de detetores mais utilizados para complementar a cromatografia em fase gasosa. Neste sistema de deteção, os efluentes da coluna (onde foi realizada a cromatografia) são encaminhados para uma chama de ar-hidrogénio. À temperatura desta chama, a pirólise dos compostos orgânicos liberta partículas portadoras de cargas, nomeadamente iões e eletrões. A deteção envolve monitorizar a corrente produzida por estas partículas. Halogéneos e grupos funcionais como o carbonilo, hidróxilo e amina, resultam na libertação de menos iões na presença da chama, acusando a sua presença. Gases não combustíveis e gases nobres não são registados pelo detetor, o que faz com que amostras contaminadas com água e óxidos de enxofre possam ser analisadas. Acrescentando a isto, o FID exhibe uma sensibilidade elevada, pouco ruído, e um intervalo de resposta linear que permite a deteção de um espectro de concentrações abrangente. A sua robustez e facilidade de utilização faz com que seja ideal para o uso frequente no controlo analítico do processo (Belitz *et al.* 2007; Skoog *et al.*, 2007).

O estudo do conteúdo volátil dos condensados produzidos na Indumape incidiu sobre 5 compostos- alvo, largamente mencionados na literatura como característicos do aroma a maçã. Estão incluídos o trans-2-hexenal, etil 2-metilbutirato, hexanal, butanol e acetato de etilo. Estes dois últimos compostos estão associados a características organolépticas desagradáveis, sendo a sua baixa concentração valorizada em alguns produtos alimentares (Dixon e Hewett, 2000; Su e Wiley, 1998; Aguilar-Rosas *et al.*, 2007; Young *et al.*, 1996).

1.7.1 Extração dos compostos voláteis do aroma de maçã por SPME

Uma análise do perfil volátil de um composto envolve sempre uma fase de extração dos compostos de interesse, e uma fase de separação, identificação e/ou separação dos mesmos. No contexto do trabalho desenvolvido na Indumape, o sistema GC-FID será utilizado para proceder à separação e identificação dos voláteis. O sucesso desta análise, contudo, depende em grande parte do uso de técnicas de extração e pré-concentração dos analitos que seja adequada e eficaz (Augusto *et al.*, 2003).

A microextração em fase sólida (SPME) faz parte de um conjunto de métodos compatíveis com a recolha de analitos a partir do espaço de vapor de uma dada amostra. As amostragens de espaço de vapor dinâmico (DHS) e estático (SHS) partilham naturalmente esta característica, e são frequentemente utilizadas na quantificação de compostos voláteis e semi-voláteis detetáveis pelo sistema olfativo (Augusto *et al.*, 2003). No entanto, a SPME apresenta uma série de vantagens que a distinguem das técnicas alternativas e fizeram com que seja o método mais utilizado não só na extração de contaminantes das águas – a finalidade para o qual foi desenvolvido – mas também na deteção de voláteis de produtos alimentares (Augusto *et al.* 2003; Pillonel *et al.*, 2002)

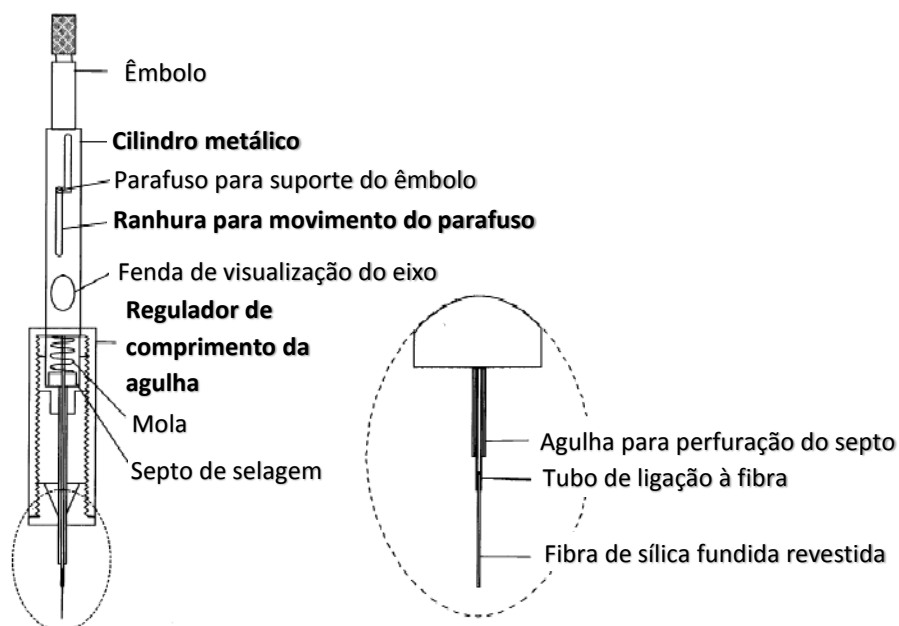


Figura 17 Representação esquemática da primeira seringa de SPME lançado no mercado pela Supelco (Lord e Pawliszyn, 2000).

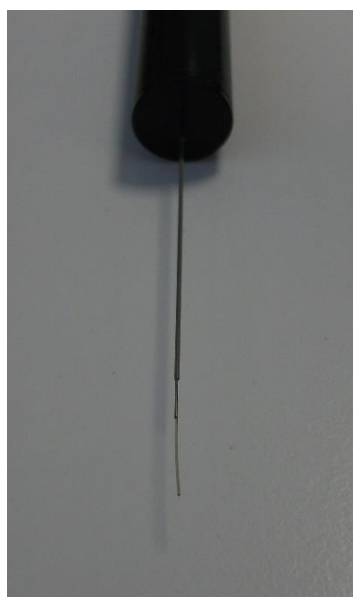


Figura 18 Detalhe do suporte e fibra de SPME exposta.

Numa extração por SPME, os analitos são aprisionados no revestimento de um suporte sólido de sílica fundida. A consequente acumulação dos compostos promove a concentração até níveis detetáveis pelo equipamento posteriormente usado para este efeito. O formato desta fibra não se limita ao revestimento de um suporte de sílica como no exemplo apresentado. Algumas configurações alternativas colocam o revestimento na

superfície interna do recipiente de extração, ou em partículas em suspensão na solução que se pretende analisar (Lord e Pawliszyn, 2000).

A seleção de compostos poliméricos que constituem este revestimento é um fator chave na obtenção de resultados reproduzíveis. O tipo e quantidade de compostos extraídos, bem como os limites de detecção e gamas de linearidade, dependem da espessura e das características físicas e químicas do revestimento utilizado. Polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), divinilbenzeno (DVB), carbowax (CW), carboxen (CAR) ou combinações destes são os principais constituintes das fibras de SPME disponíveis comercialmente. A distinção entre as diferentes fibras implica variações na polaridade, capacidade de retenção e tipo de ligação que imobiliza a fase estacionária. (Kataoka et al., 2000; Pillonel *et al.*, 2002). Os revestimentos de PDMS apresentam baixa polaridade e, com espessuras na ordem dos 100µm, a capacidade de retenção ideal para uma eficaz extração dos compostos orgânicos voláteis. Moléculas de maior polaridade, incluindo aldeídos e ácidos, apresentam maior afinidade por revestimentos polares, como o PA. Os revestimentos de DVB e CAR suportados por uma fibra de PDMS (DVB/CAR/PDMS) conseguem efetuar a extração de uma elevada gama de analitos, justificando o seu uso frequente em estudos de identificação de perfis voláteis. (Kataoka et al., 2000; Popp e Paschke, 1997; Torrens *et al.*, 2004)

Os revestimentos das fibras de SPME demonstram coeficientes de difusão distintos, um parâmetro que exerce influência na migração dos analitos para a superfície ou para o interior dos mesmos. Revestimentos líquidos, como o PDMS, têm coeficientes de difusão elevados, levando à ocorrência de partição total entre a amostra e o revestimento e a uma extração por absorção. Com exceção do PDMS e PA, os restantes revestimentos mencionados têm coeficientes de difusão mais baixos. Nestes casos, os analitos são retidos à superfície, numa extração por adsorção. (Pawliszyn, 2000; Popp e Paschke, 1997; Torrens et al., 2004)

2. Objetivos do trabalho de estágio

O delineamento dos objetivos do trabalho de estágio foi feito com base em problemas e oportunidades de melhoria apresentadas pela Indumape à Universidade de Aveiro. Desta forma, os principais objetivos foram:

- **Desenvolvimento de estratégias para minimizar turbidez elevada do sumo de maçã**

A frequência de não conformidades associadas à turbidez levou a uma análise da matéria-prima e da sua transformação. Espera-se com esta análise encontrar uma relação entre a composição e estado de maturação da matéria-prima com a turbidez do produto final, bem como identificar pontos críticos no processo responsáveis pelo aumento deste parâmetro.

- **Identificação e quantificação de compostos voláteis nos condensados de aroma de maçã. Instalação de um sistema GC-FID para realização das análises.**

No âmbito do projeto ProfitApple, financiado pelo programa do QREN, a Indumape adquiriu um sistema GC-FID. Esta aquisição teve como propósito a implementação de um método para quantificação de compostos voláteis nos condensados de aroma de maçã, permitindo assim melhorar o controlo de qualidade do processo e atribuir valor acrescentado ao produto final. Ao longo do trabalho de estágio foi acompanhada a instalação do sistema e implementado um método capaz de quantificar os voláteis de interesse.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostragem

3.1.1. Matéria-prima do processo: Maçã

As maçãs usadas no controlo dos parâmetros de maturação foram recolhidas durante a etapa da moagem, após a primeira aspensão na passadeira. Este ponto de recolha permitiu recolher as maçãs imediatamente antes destas serem processadas, eliminando a influência que uma maturação nos silos poderia ter na comparação entre estado da matéria-prima e qualidade do produto final. Aproximadamente 1 kg de fruta escolhida de forma aleatória foi transportada em sacos de plástico até ao laboratório, onde a maçã era imediatamente transformada em sumo para se proceder às análises. As variedades de maçã recolhida foram idênticas às habitualmente recebidas pela fábrica, 50% Gala, 30% Golden, 10% Starking e $\leq 10\%$ Reineta. Cada amostra pode estar sujeita a oscilações nestas percentagens, dependendo das características da fruta que chega à unidade fabril.

A recolha foi efetuada no início da produção de cada lote de sumo de maçã, resultando numa recolha bissemanal, ou trissemanal, conforme o funcionamento da linha de produção, entre outubro de 2014 e fevereiro de 2015. Durante as semanas de produção de pera não foi efetuada recolha.

3.1.2. Sumo resultante da ultrafiltração

As amostras de sumo filtrado foram recolhidas a partir do tanque de permeado que se encontra acoplado ao sistema de ultrafiltração. Foi utilizado um recipiente de plástico para este efeito e a turbidez das amostras foi medida de imediato, enquanto o sumo ainda se encontrava quente (aproximadamente 50°C)

3.1.3. Sumo concentrado de maçã

As análises à turbidez do sumo concentrado de maçã mencionadas neste trabalho incidiram sobre lotes terminados de concentrado, recolhido a partir dos tanques de homogeneização assim que o departamento de produção o solicitava. Aproximadamente 100 mL de amostra foram trazidos até ao laboratório em recipientes de plástico por cada

lote de concentrado finalizado. As medições do teor de sólidos solúveis foram feitas diretamente a partir deste concentrado, enquanto os outros ensaios necessitaram de diluições.

3.1.4. Retentato

As amostras de retentato foram obtidas a partir do tanque de alimentação do ultrafiltrador, nos instantes antes e depois da DF, durante a produção do dia 29 de maio de 2015. Foram usados bidons de plástico com capacidade de 5 litros para o transporte do retentato até ao laboratório.

3.1.5. Aroma de maçã

As amostras de condensado em *stock* foram recolhidas a partir do tanque de condensado de maçã, situado no armazém refrigerado da unidade fabril. De acordo com os protocolos da fábrica, o condensado é armazenado a uma temperatura de 4^oC. A recolha foi efetuada com recurso a recipientes de plástico com tampa de rosca e armazenado a 4^oC até a análise ser possível. Antes de esta análise decorrer, o aroma aguarda fora da refrigeração até atingir a temperatura ambiente, simulando o estado em que este produto se encontra quando é sujeito às análises de rotina no laboratório.

Os condensados de maçã acabados de produzir foram recolhidos no mesmo tipo de copo que o aroma de *stock*, a partir da amostra que é levada ao laboratório por membros do departamento de produção. É armazenado a 4^oC até ser necessário para os ensaios cromatográficos.

3.2. Monitorização da turbidez do sumo e controlo dos parâmetros de maturação da maçã

3.2.1. Controlo da turbidez do sumo concentrado de maçã

Uma das primeiras etapas no delineamento de estratégias para reduzir a turbidez do sumo concentrado passou por tentar perceber as razões pelo qual este parâmetro é elevado. Esse estudo exigiu o acompanhamento das análises de rotina da empresa, em particular, a monitorização da medição da turbidez.

Durante a época de campanha (de outubro a dezembro) ocorreu uma participação ativa nas atividades de controlo de qualidade dos produtos da Indumape.

A medição do teor de sólidos solúveis, habitualmente representado pelo °Brix, é o primeiro passo na análise da turbidez do sumo concentrado de acordo com os procedimentos da empresa. Estes métodos foram baseados nas orientações da IFU (*International Federation of Fruit-Juice Producers*), segundo a referência IFUREC07: *Recommendations for Turbidity Measurements*. O sumo concentrado sofreu uma diluição até 11,5 °Brix e é sobre este sumo diluído que é efetuada a medição da turbidez. Foi utilizado um refratómetro automático Reichert AR6 calibrado com água destilada para todas as medições do °brix.



Figura 19 Espalhamento da amostra de sumo concentrado no poço do refratómetro para medição do °brix

A turbidez foi medida com recurso a um turbidímetro Hanch 2100 AN, calibrado com um kit de soluções de formazina com valores de NTU entre <0,1 e 7500.

Na figura 19 é possível observar a medição da turbidez de uma amostra de sumo concentrado sujeito à diluição de 11,5 brix.

Os resultados foram compilados e acrescentados aos registos da Indumape e esta base de dados permitiu traçar um perfil da turbidez ao longo do ano e ter uma aproximação de como os valores médios oscilam ao longo deste período. Dado tratar-se de um controlo idêntico ao efetuado regularmente pelas análises de controlo de qualidade da empresa, não foram efetuadas réplicas.



Figura 20 Introdução da célula de vidro com amostra no turbidímetro

3.2.2. Monitorização da turbidez do sumo resultante da ultrafiltração

A necessidade de um controlo da turbidez do sumo sem as interferências da mistura de lotes levou à monitorização da turbidez a partir de uma etapa intermédia do processo, a ultrafiltração. Este controlo foi efetuado com uma medição direta por nefelometria do permeado da ultrafiltração, no turbidímetro Hanch 2100 AN. Foram retiradas amostras a cada 60 minutos durante um período de 12 horas, o que corresponde a um ciclo completo de ultrafiltração. Apesar de não existirem evidências de que a adição de carvão ativado na etapa de tratamento enzimático possa ter influência na turbidez, a monitorização foi feita sobre sumo nunca exposto a este material (Bucher Unipektin, 2007).

3.2.3. Controlo dos parâmetros de maturação da fruta

Sendo a maçã uma matéria-prima perecível, e estando esta instabilidade associada a enzimas e moléculas que influenciam diretamente a qualidade do sumo concentrado, é de interesse observar a relação entre o estado de maturação da fruta e as características do produto final. O controlo destas características é naturalmente uma obrigação para a Indumape, mas o estado em que a matéria-prima que é processada se encontra passa muitas vezes despercebido. Isto leva a que não seja feita uma associação rigorosa entre o estado do material que entra com o estado do material que sai da linha de fabrico. Neste trabalho foi implementada uma metodologia simples e de fácil implementação nas rotinas de análise do laboratório para controlar dois dos mais importantes parâmetros de maturação da fruta, o teor de sólidos solúveis e a acidez titulável.

As maçãs transportadas até ao laboratório são cortadas de forma longitudinal, do talo até ao cálice. É aproveitado cerca de um quarto de cada maçã recolhida. Esta porção é transformada em polpa com auxílio de um liquidificador de cozinha. O resto das maçãs não aproveitadas são devolvidas à linha de produção ao serem reintroduzidas na passadeira da moagem, onde foram recolhidas.



Figura 22 Cortes longitudinais da maçã antes da liquefação.

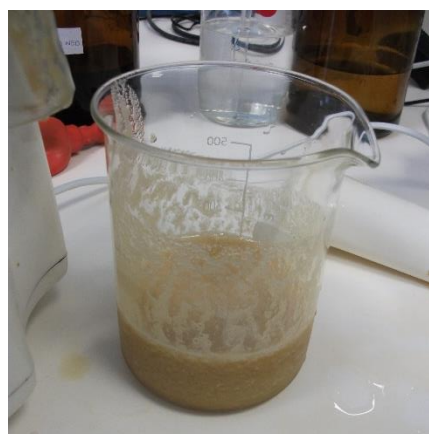


Figura 21 Polpa de maçã usada nos ensaios de estado de maturação.

A polpa extraída foi sujeita a uma análise do teor de sólidos solúveis totais e da acidez titulável. A acidez foi medida através do mesmo método que a empresa usa para as suas análises internas da fruta fresca. Quarenta gramas de sumo espremido foram titulados com uma solução de NaOH 0,1 M até pH 8,1, indicado por potenciómetro (Thermo Orion 3 Star) e o resultado foi expresso em miliequivalentes de ácido málico

por 100 g de polpa. O teor de sólidos solúveis totais foi obtido a partir do índice de refração do sumo, medido por um refratômetro automático Reichert AR6 e expresso em °brix. As medições destes parâmetros foram efetuadas em triplicado e os resultados apresentados resultam da média desses três valores. Este controlo foi realizado ao longo dos meses de campanha e até finais de Fevereiro. A Indumape manteve um volume elevado de produção mesmo após o final de Dezembro, frequentemente estabelecido como o final da campanha. Um prolongamento do estudo dos parâmetros de maturação permitiu dar uma ideia do estado de conservação em que esta fruta pós-campanha se encontrava.

3.2.4. Estratégias para diminuir o impacto da diafiltração na qualidade do sumo. Ensaios de precipitação e centrifugação.

Durante o decorrer deste projeto, foram discutidas uma série de hipóteses para processos alternativos à DF. Utilizando os recursos disponíveis no laboratório da Indumape, foi testada a capacidade de separação dos sólidos presentes no retentato.

Foram recolhidas duas amostras de retentato sem exposição a carvão ativado. Uma amostra foi retirada antes da realização da DF, enquanto que a outra foi sujeita a este processo. O °brix de cada amostra foi medido antes dos ensaios com recurso ao refratômetro automático Reichert AR6, para confirmação das fases de UF em que foram recolhidas. De seguida, parte do retentato foi colocado em provetas de plástico de 500 ml, e uma outra parte foi sujeita a uma centrifugação a 4185 g durante 10 minutos.

3.3. Quantificação dos compostos voláteis em condensados de aroma de maçã

3.3.1 Extração por SPME

As amostras de concentrado de maçã foram recolhidas e analisadas à medida que a produção solicitava análises de rotina a lotes recém-fabricados. Foram também recolhidas 3 amostras de condensado diretamente do tanque onde este é mantido em *stock* até expedição. Estas amostras sofreram uma diluição de 1:10 antes do procedimento de extração dos compostos voláteis. As diluições aplicadas nas amostras de condensado analisado estão discriminadas na tabela 2.

Tabela 2 Detalhes da preparação e origem das amostras de aroma de maçã utilizadas nos ensaios cromatográficos. A Indumape dispõe apenas de um tanque de armazenamento refrigerado dedicado ao aroma de maçã. Desta forma, os aromas de *stock* foram recolhidos a partir da mesma reserva.

Identificação das amostras	Diluição usada	Origem	Data de recolha
AT1	1:10	<i>Stock</i> armazenado	7 abril
AT2	1:10	<i>Stock</i> armazenado	12 abril
AF1	1:10	Aroma recém-produzido	18 abril
AT3	1:10	<i>Stock</i> armazenado	4 maio
AF2	1:10	Aroma recém-produzido	8 maio
AF3	1:10	Aroma recém-produzido	14 maio

As amostras de aroma diluídas foram mantidas a 4^oC até ao início da extração, de forma a simular as condições de armazenamento na câmara frigorífica da empresa.

A extração dos compostos voláteis decorreu em frascos de vidro transparente de 7 mL, com um volume total de amostra de 3mL. 2,98 mL de água destilada, 20 µL de aroma diluído e 0,6 g de NaCl foram misturados nos frascos. O NaCl foi colocado em primeiro lugar, com o auxílio de uma balança Shimadzu UX620H (figura 23), seguido da água e, por último lugar, a amostra.



Figura 23 Preparação do frasco para extração de compostos voláteis.

A adição de NaCl é comum na preparação de amostras para extração de compostos voláteis, promovendo o fenómeno de *salting out*. Certos compostos orgânicos são suficientemente polares para terem uma solubilidade em água apreciável, dificultando assim a sua extração a partir do meio aquoso. A solubilização de sais inorgânicos na mistura, tal como o cloreto de sódio, reduz a solubilidade dos compostos orgânicos e consequentemente promove a separação dos mesmos. A quantidade de sal usada nas extrações é, desta forma, um fator determinante na reprodutibilidade do método (Pawliszyn, 2000). Os frascos foram selados com septos de silicone e imersos num banho de água mantido a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sob 600 rpm de agitação. A fibra de SPME (DVB/Carboxen/PDMS) foi então exposta ao espaço de vapor da amostra durante 30 minutos, a uma altura de aproximadamente 5 mm da superfície da amostra. (Pillonel *et al.*, 2002). A temperatura foi monitorizada manualmente e com o auxílio de um termómetro. Limitações de tempo e equipamento no laboratório exigiram o uso de volumes pequenos de água para o controlo da temperatura do frasco, o que dificultou a estabilização. O calor em excesso foi compensado com o uso de um pano humedecido com água fria. A configuração do sistema de extração dos voláteis pode ser vista na figura 24.

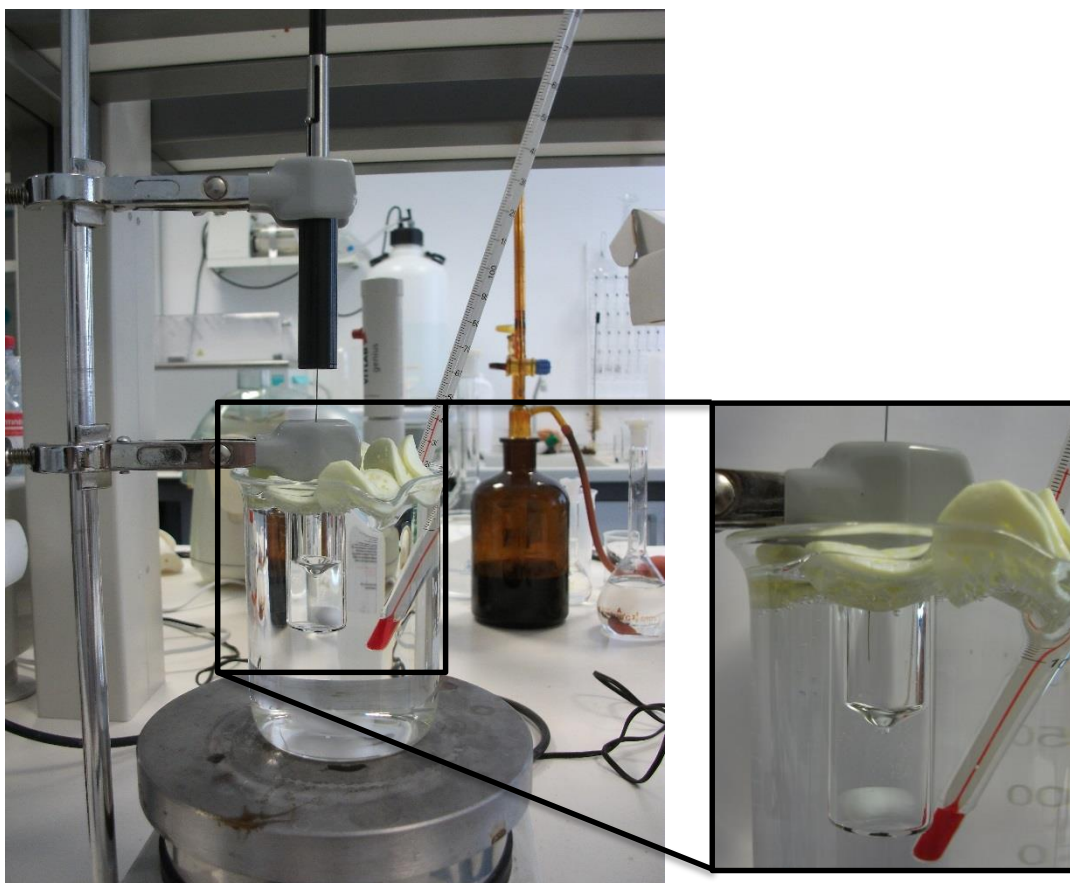


Figura 24 Sistema utilizado na extração dos compostos voláteis da maçã por SPME.

A temperatura do banho usado para aquecer o espaço de vapor foi controlada com manipulação do termostato da placa de agitação e monitorização constante com auxílio de um termómetro. A agitação foi mantida a 600 rpm ao longo de toda a extração. Foi mantida uma distância de aproximadamente 0,5cm entre a fibra e a interface amostra/espaco de vapor ao longo de todas as extrações realizadas.

Decorrido o período de extração, a fibra é recolhida e o suporte é retirado do frasco para se proceder à identificação dos compostos por cromatografia. Foram feitos ensaios triplicados a todas as amostras de aroma analisadas.

3.3.2. Análise dos compostos voláteis por GC-FID

A fibra de SPME foi introduzida no injetor do sistema GC Agilent 7820A durante 3 minutos. O injetor foi equipado com um liner de 0,75 mm de diâmetro interno e septos pré-furados Thermogreen da Supelco. Trabalhou-se em modo splitless, com o injetor a 250^oC, um caudal de purga de 40 mL/min ao fim de 2 minutos e uma pressão de 14 psi. Foi utilizada uma coluna Agilent HP-5 com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme. O sistema GC e o terminal instalado para a operação do mesmo estão representados na figura 25.

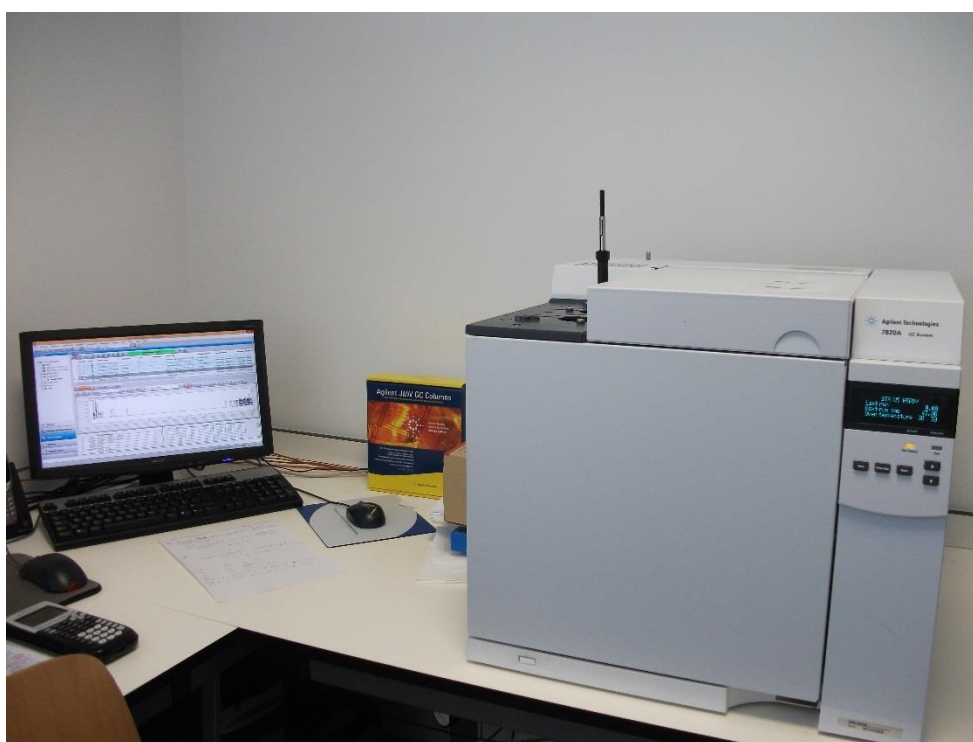


Figura 25 Sistema GC-FID e terminal de controlo do equipamento durante o condicionamento da fibra de SPME

Foram testados dois programas de temperatura durante a realização do trabalho de implementação da técnica analítica.

O primeiro programa de temperatura estabelecia uma temperatura inicial do forno de 35^oC mantida durante 5 minutos. Seguiu-se um aumento desta temperatura a uma taxa de 2^oC por minuto, até aos 80^oC, e 20^oC por minuto a partir desse ponto, atingindo uma temperatura máxima de 220^oC, mantida durante 1 minuto. Foi utilizado hélio como gás de transporte, a uma pressão constante de 14 psi. O tempo total de cada ensaio foi de 35

minutos. O detetor de ionização por chama foi mantido a 250⁰C, e a chama foi alimentada por 400 ml/min de ar purificado e 30ml/min de hidrogénio.

Antes da extração de um novo composto para a fibra de SPME, foram realizados ensaios em branco, nos quais a fibra foi introduzida no cromatógrafo sem exposição prévia ao analito. A presença de quantidades vestigiais de voláteis na fibra era então corrigida com um condicionamento segundo as especificações do fabricante. Para a fibra de Carboxen/DVB/PDMS, o condicionamento exigia uma exposição de 1h a 270⁰C dentro do liner.

Numa tentativa de melhorar a resolução dos resultados obtidos, foi testado um segundo programa de temperatura, no qual a temperatura inicial foi reduzida para 30⁰C, com 10 min de retenção. Este programa foi utilizado em todos os ensaios que sucederam à análise do aroma AF1, bem como na obtenção das curvas de calibração do butanol, etil 2-metilbutirato e acetato de etilo.

A quantificação dos voláteis do aroma foi calibrada recorrendo a uma gama de padrões externos de cada um dos compostos de interesse. Os cinco compostos selecionados para quantificação incluem o trans-2-hexenal (98%, p.e. 146⁰C), etil 2-metilbutirato (99%, p.e. 115⁰C), hexanal (98%, p.e. 119-124⁰C), butanol (99,9%, p.e. 117,4⁰C) e acetato de etilo (99,8%, p.e. 77,1⁰C). Todos os reagentes mencionados foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich. Numa fase inicial dos ensaios cromatográficos, os padrões de cada um destes compostos foram diluídos com base nas concentrações utilizadas pelo grupo de investigação de Aveiro. 20 µL destas soluções foram introduzidos nos frascos com 2,98 mL de água destilada e 0,6 g de NaCl, de forma semelhante à extração das amostras de aroma e serviram de base para a identificação dos tempos de retenção dos voláteis de interesse. A elaboração de curvas de calibração para cada composto foi iniciada assim que estes ficou concluída a etapa de identificação. Para se chegar a uma gama de concentrações de padrões compatível com o intervalo de concentrações dos compostos voláteis dos condensados, fizeram-se novas diluições. As concentrações selecionadas para a elaboração das curvas de calibração estão listadas na tabela 3:

Tabela 3 Concentrações das diluições preparadas a partir dos padrões comerciais de trans-2-hexenal, hexanal, etil 2-metilbutirato, butanol e acetato de etilo.

Nome do composto	Concentrações das soluções mãe (mg/L)		Concentrações na reta de calibração (µg/L)						
Trans-2-hexenal	0,208	2	6,7	6,9	27,7	69,3	104	138,7	208
Hexanal	0,02	1,2	20		60		200		
Etil 2-metilbutirato	2	20	66,7				133		
Butanol	15		100		190		500		
Acetato de etilo	$2,25 \times 10^{-4}$		150				1500		

3.3.3. Implementação de procedimentos de manutenção do equipamento de GC-FID

De forma a promover e simplificar a reprodutibilidade dos resultados, assim como a vida útil do equipamento, foi estabelecida uma rotina de manutenção do sistema de cromatografia em fase gasosa.

A integridade do septo do injetor, bem como do liner e do o-ring a que este está acoplado, foi verificada semanalmente. A substituição do septo e limpeza do liner são levadas a cabo sempre que necessário face à inspeção. A limpeza do liner e inspeção dos componentes do injetor estão representados nas figuras 26 e 27:

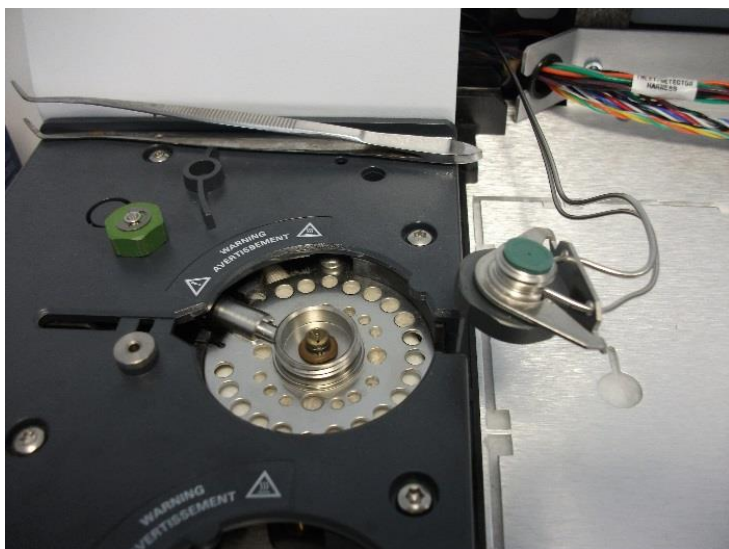


Figura 26 Injetor do equipamento GC-FID desmontado para a verificação da integridade dos seus componentes



Figura 27 Remoção, com auxílio de um fragmento de coluna, de resíduos de septo que ficaram retidos no liner após utilização repetida do sistema GC-FID.

O uso de garrafas de gás de pequena capacidade significa que é também necessário prestar atenção à pressão dos gases nestas garrafas. Em particular, a pressão da garrafa de ar purificado foi verificada semanalmente, dado o elevado consumo deste gás associado ao método praticado. De acordo com as recomendações do fabricante, as pressões das garrafas de gás deverão ser as seguintes:

Tabela 4 Pressões nas fontes dos gases de alimentação do cromatógrafo

Gas	Pressão (psi)
Hélio	400
Hidrogénio	400
Ar	550
Azoto	400

Se os barómetros das válvulas associadas às garrafas demonstrarem níveis abaixo das pressões recomendadas, será necessário proceder à troca dos gases correspondentes.

3.4. Guia rápido para utilização do *software* OpenLAB Chromatography Data System nas análises de controlo de qualidade dos condensados de maçã

Foi construído um guia de forma a servir como base de trabalho na análise aos compostos voláteis do aroma de maçã recorrendo ao *software* OpenLAB Chromatography Data System da Agilent Technologies e ao sistema GC-FID instalado no laboratório da Indumape. O guia foca-se principalmente no *software* e assume a utilização do método de extração de voláteis por SPME, previamente descrito na dissertação. O guia encontra-se disponível para consulta em anexo.

4. Resultados e Discussão

4.1 Turbidez e parâmetros de maturação

4.1.1. Evolução da turbidez do sumo concentrado ao longo do ano

A monitorização da turbidez do sumo concentrado de maçã permitiu, juntamente com o registo do controlo de qualidade da Indumape, traçar o perfil anual da turbidez do sumo concentrado de maçã produzido na fábrica.

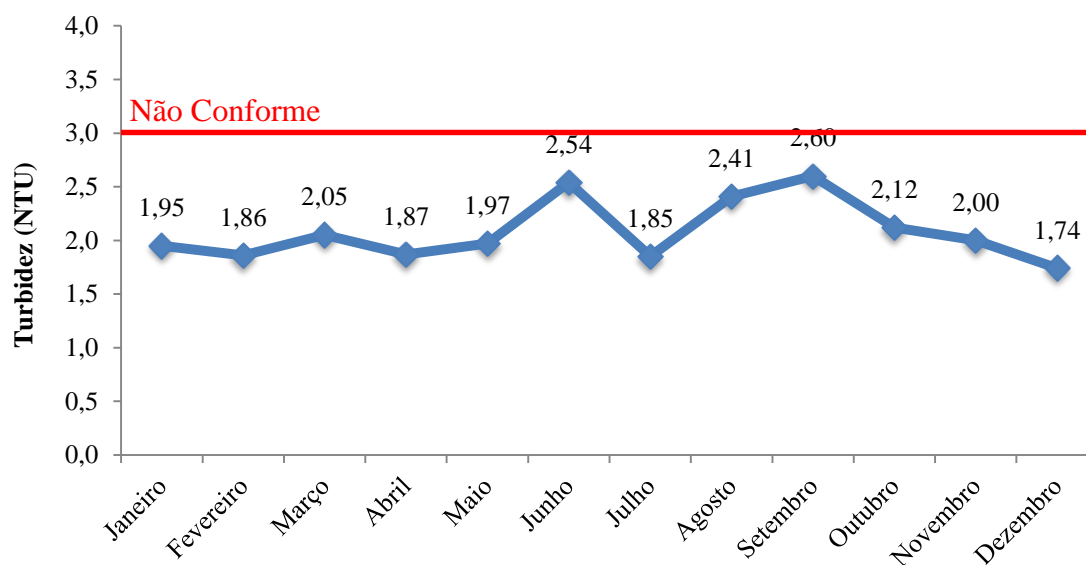


Figura 28 Registos da média mensal da turbidez do sumo concentrado de maçã produzido em 2014. A linha a vermelho corresponde ao limite de não-conformidade para o parâmetro de turbidez atribuído ao sumo concentrado de maçã.

A figura 28 mostra uma subida da turbidez associada aos meses de verão e arranque de campanha. Esta subida nunca chega a atingir valores acima de 3 NTU, o que até 2014 ainda não tinha ocorrido na empresa. Na tabela 5 está representada a coleção de resultados utilizados na elaboração do gráfico da figura 28.

Tabela 5 Compilação dos registos de turbidez do sumo concentrado de maçã produzido durante o ano de 2014 na Induampe, adaptado a partir dos registos de controlo de qualidade da empresa, aos quais foi acrescentada uma contagem do número de lotes não-conformes (n NC) produzidos a cada mês.

Média	1,95	1,86	2,05	1,87	1,97	2,54	1,85	2,41	2,60	2,12	2,00	1,99	
n NC			3			2		1	1	1	2		
Turbidez (NTU)											2,05		
										2,09	1,03		
										2,06	3,07		
										1,97	2,45		
										1,93	1,79		
										2,17	1,89		
			1,56		1,82					2,09	1,89		
			1,73		1,63					1,70	1,92		
			1,59		2,28					1,67	1,62		
			1,65		2,41					1,84	2,19		
			1,78		2,14					1,77	2,80		
			1,71	3,14	1,41					1,88	2,03		
		2,37	1,56	1,49	1,42					2,48	1,99		
		1,89	1,86	2,95	2,00					2,07	1,17		
		1,68	2,97	3,00	1,76					2,72	1,88		
		2,73	1,81	1,36	2,13				2,5	2,40	1,89		
		1,44	1,92	1,44	1,4		1,68		2,64	2,02	1,78		
		1,58	2,25	3,31	1,55		2,42		2,15	3,11	3,02		
		2,42	2,13	1,69	2,38	1,67	1,8		1,35	2,30	1,96	1,92	
		1,98	2,04	1,30	1,94	1,26	1,98		3,34	2,48	2,01	1,86	
		1,97	1,73	1,43	2,33	2,8	3,67	1,78	2,03	2,42	1,55	1,85	2,25
		1,43	1,47	1,44	1,30	2,14	3,67	1,92	2,88	3,21	2,98	1,98	1,73
		Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro

Uma consulta dos registos individuais da turbidez de cada lote revela que, independentemente da descida da turbidez média, foram produzidos 10 lotes não-conformes, o que equivale a 8,3% dos 121 lotes totais produzidos em 2014.

4.1.2. Turbidez do sumo filtrado

A monitorização em contínuo da turbidez do sumo filtrado está representada na figura 29, onde é demonstrado que à medida que o processo de UF decorre, este parâmetro sofre um aumento na ordem dos 0,03 NTU/hora. Aproximadamente quatro horas antes do final do ciclo de UF, ocorre um acréscimo significativo desta taxa. A turbidez atinge um valor máximo no instante em que o processo é finalizado para lavagem do sistema.

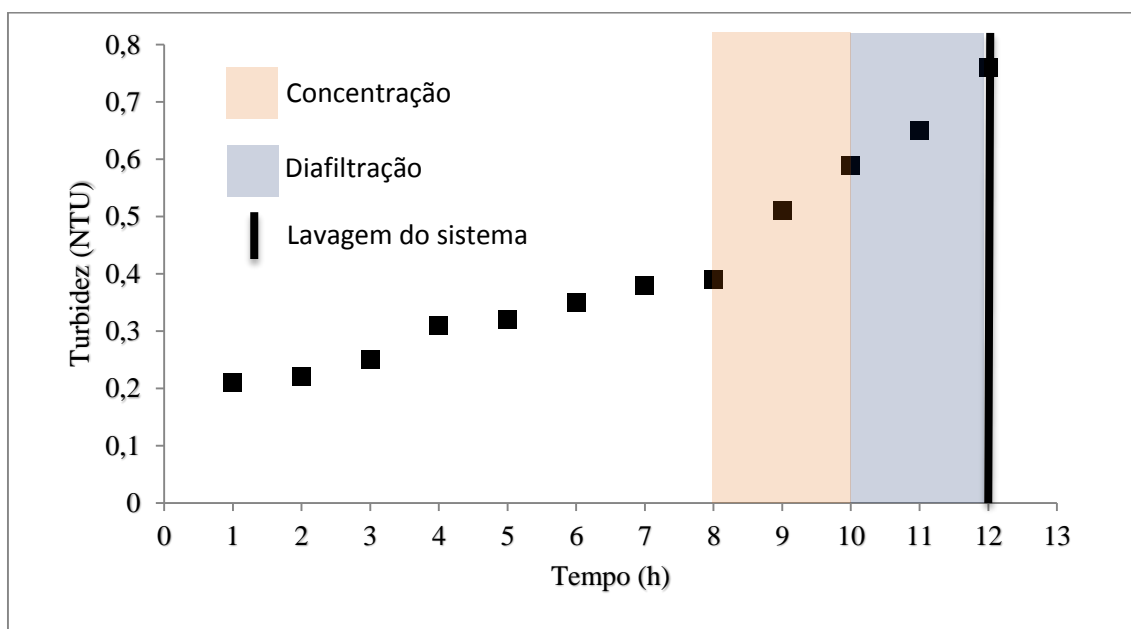


Figura 29 Turbidez, em NTU, do permeado resultante da ultrafiltração do sumo de maçã, ao longo de 12 horas de funcionamento em contínuo do aparelho.

Após 8 a 9 horas de funcionamento em contínuo, o caudal de sumo cru é cortado e ocorre um aumento da concentração de partículas sólidas dentro do sistema (Yazdanshenas *et al.*, 2010). Este fenómeno é acompanhado por um aumento considerável da turbidez no permeado. A composição do sumo dentro do sistema, e a estrutura das próprias membranas podem ser atribuídos como causas para este aumento. Como demonstrado na figura 15, as membranas empregues na ultrafiltração não são completamente impermeáveis a toda a gama de polissacarídeos pécnicos, o que significa que parte destes consegue estar presente no permeado e contribuir para a turbidez

característica do sumo. Durante a fase final da ultrafiltração, o aumento da concentração de partículas sólidas no sumo em circulação vai acelerar os fenómenos de *fouling* e polarização das membranas (Sablani *et al.*, 2001; Echavarria *et al.* 2010). A acumulação de solutos na superfície e poros das membranas está associada a ambos estes fenómenos e traz como principais consequências uma diminuição do caudal de permeado e um aumento significativo da pressão aplicada ao fluido em circulação por parte do equipamento. O aumento da pressão aliado ao gradiente de concentração de soluto que se forma à superfície das membranas potencia a transferência de partículas sólidas através dos poros e dá origem a permeados significativamente mais ricos em polissacarídeos pécnicos e, conseqüentemente, mais turvos (Sablani *et al.*, 2001; Echavarria *et al.* 2010; Yazdanshenas *et al.*, 2010).

A duração de um ciclo de UF varia de acordo com as exigências da produção, mas deverá sempre contribuir para um aumento da turbidez, tendo em conta que a DF e lavagem têm sempre de ocorrer, independentemente da duração da UF. Filtrações que sejam interrompidas antes de completarem as 12 horas de trabalho máximo produzem volumes elevados de sumo turvo e, conseqüentemente, podem dar origem a lotes cuja turbidez é significativamente mais alta. Estas interrupções são, na maioria das vezes, causadas por esgotamento ou mudança de matéria-prima e podem servir de explicação para o aparecimento de picos de turbidez no sumo produzido em meses de baixa atividade. Na figura 30, a média mensal de turbidez ao longo do ano de 2014 é comparada com o volume de produção, representado em números de lotes finais produzidos. 2014 foi o único ano com registos disponibilizados e no qual a produção de sumo concentrado de maçã foi largamente superior ao de pera rocha. Segundo o departamento de produção, foram fabricados 10 lotes de sumo concentrado de pera entre setembro a dezembro de 2014, contra os 49 de maçã. Considerou-se assim que no ano de 2014, o número de lotes de sumo de maçã produzido correspondia a uma aproximação razoável da atividade da empresa.

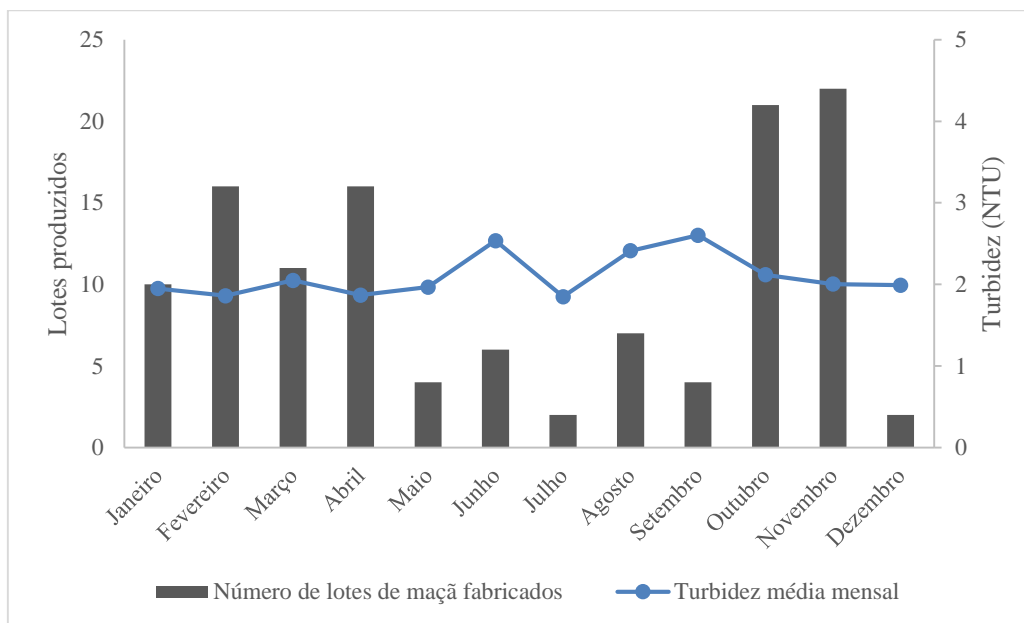


Figura 30 Número de lotes finais de sumo concentrado de maçã produzidos em cada mês e média mensal da turbidez, em NTU, destes mesmos lotes, durante o ano de 2014.

A figura 30 evidencia uma subida nas médias de turbidez em meses com baixa produção de maçã. Consultando a tabela 5, retira-se que 4 dos 10 lotes não-conformes produzidos em 2014 foram processados entre junho e setembro, altura em que a Indumape produziu apenas um total de 19 lotes de concentrado de maçã. Isto indica que 40% das não conformidades associadas à turbidez surgiram num espaço de tempo em que foi produzido apenas cerca de 16% da produção total anual.

Os dados suportam a alegação de que as quebras de produção durante os meses de escassa matéria-prima levam à abundância de sumo turvo por meio das interrupções do sistema de ultrafiltração e consequente repetição das sequências de DF e lavagem.

Sempre que possível, o departamento de produção realiza misturas de lotes, ou reprocessamento de concentrado com elevada turbidez, de forma a minimizar os problemas associados a este parâmetro. As misturas são feitas com adição de produto em *stock* a sumo recém-concentrado no qual a turbidez se encontra acima do aceitável. O reprocesso envolve a diluição e recirculação do sumo concentrado não-conforme através do ultrafiltrador, removendo o excesso de partículas responsáveis pela turbidez. Este processo traz elevados custos económicos e requer tempo e logística que a produção nem sempre tem à disposição.

Com base na informação recolhida sobre a UF e o seu impacto na turbidez do sumo, é possível extrapolar as implicações deste processo e afirmar que elevados volumes de produção durante a campanha podem impossibilitar o acerto de turbidez de lotes finais,

ao drenar o tempo e recursos necessários para esta ação. Consequência disto seria o aumento da turbidez do sumo produzido em anos de produção excepcionalmente elevada. Os dados disponibilizados pela empresa não permitem tirar conclusões em relação a esta afirmação, e a monitorização da turbidez realizada durante o trabalho de estágio não deu indícios deste efeito. Um estudo futuro sobre a turbidez e os volumes de produção dos anos anteriores irá permitir confirmar a existência desta relação de causalidade e levar a um melhor entendimento dos fatores que exercem influência sobre a turbidez do sumo.

4.1.3. Controlo dos parâmetros de maturação da maçã

Na figura 31 está representada a evolução dos parâmetros de maturação da fruta que chegou à Indumape durante o período de campanha.

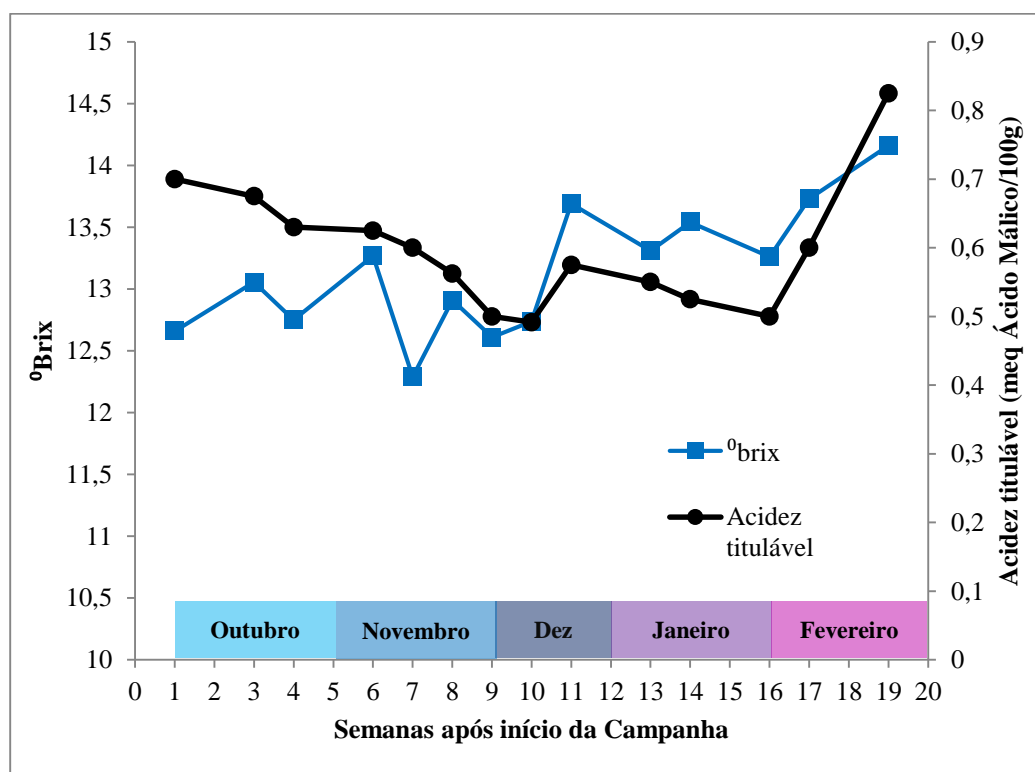


Figura 31 Evolução do °brix e acidez titulável da maçã recebida na Indumape durante os meses de Outubro, Novembro e Dezembro de 2014 e Janeiro e Fevereiro de 2015.

A evolução dos parâmetros de maturação da fruta durante o período de campanha da Indumape (outubro a dezembro) foi caracterizada por uma diminuição notável da acidez titulável e um aumento tendencial do teor de sólidos solúveis. Estas variações

coincidem com as tendências esperadas para fruta progressivamente mais madura, na qual os ácidos orgânicos são convertidos em açúcares e aminoácidos, e a ação de pectinases e amilases despolimeriza as cadeias longas de polissacarídeos. A partir do final de dezembro, deixou de se verificar esta tendência, em particular com os ácidos orgânicos. Uma série de explicações são apresentadas como justificção para os resultados obtidos. A fruta que chegou à fábrica a partir desta altura pode ter sido armazenada em refrigeração numa altura precoce da sua maturação, o que permitiu que esta mantivesse as suas características iniciais durante mais tempo. É também possível que as variedades de fruta que chegaram à Indumape durante os primeiros meses de 2015 tenham sido substancialmente diferentes daquelas que foram adquiridas durante a campanha. A empresa tem vindo à procura de fruta com maior acidez para tentar atingir as exigências impostas pelos clientes em relação a este parâmetro. Independentemente do ano em que estas medições foram feitas, o teor de sólidos solúveis registados estiveram sempre acima dos 12 °Brix, valor associado por Endrizzi *et al.* (2014) a maçã excepcionalmente doce ou em estado de maturação relativamente avançado. Durante os três meses de campanha, os registos de acidez, expressos em miliequivalentes de ácido málico por 100 g de amostra, sofreram uma redução de aproximadamente 0,3 unidades. Estes valores são comparáveis aos obtidos por Sturm e Stampar (1999), que monitorizaram a quantidade de ácido málico em maçã ao longo de um período de 4 meses. Nos últimos três meses de controlo, as amostras analisadas sofreram uma redução na concentração de ácido málico entre 0,3 a 0,5 g/100g. Este decréscimo foi também acompanhado por um aumento na concentração de mono e dissacarídeos, e conseqüentemente uma subida do teor de sólidos solúveis.

A evidente maturação da fruta ao longo da campanha mostra que as características da matéria-prima não se mantêm constantes ao longo do ano. Estas alterações são causadas por pectinases e as amilases, enzimas que têm uma relação direta com o processo de fabrico de sumo, sendo elas próprias aplicadas nos tratamentos enzimáticos.

Os resultados tornam evidente a possibilidade de ajustar o processo às condições da fruta que chega à fábrica, nomeadamente, efetuar uma redução na quantidade de soluções enzimáticas utilizadas. À medida que os parâmetros de maturação revelam a chegada de matéria-prima mais amadurecida, esta redução poderia trazer benefícios económicos sem comprometer a qualidade final do produto. As enzimas de moagem seriam o principal alvo deste ajuste, visto que são maioritariamente compostas por PME, a enzima que atua na fase mais precoce do amadurecimento da maçã. Um rigoroso controlo do efeito da limitação da enzima de moagem tem de anteceder a implementação

de qualquer modificação no processo, a decorrer de preferência fora da época de campanha, enquanto a fábrica estiver a produzir um número relativamente pequeno de matéria-prima.

Os dados recolhidos não permitiram detetar qualquer relação entre os parâmetros de maturação da maçã durante a campanha e a turbidez dos lotes produzidos nesta mesma altura.

4.1.5. Ensaios de precipitação e centrifugação.

Decorridos os 10 minutos de centrifugação, as amostras de retentato foram inspecionadas. A separação conseguida sob as condições de centrifugação mencionadas é visível na figura 32.



Figura 32 Separação das diferentes fases do retentato pré (tubo da esquerda) e pós-diafiltração (tubo da direita) sujeito a uma centrifugação a 4185g durante 10 minutos.

A separação em ambas as amostras foi visível e praticamente idêntica. A amostra pós-DF aparenta ter uma separação maior apesar do seu teor de sólidos mais acentuado (18 °brix vs. 10 °brix associados à amostra pré-DF). Esta diferença pode ter sido causado por uma agitação ligeira do tubo, visto que a centrifugação foi relativamente ligeira. A separação conseguida por sedimentação do retentato ao fim de 6 horas foi praticamente nula, como pode ser visto na figura 33.

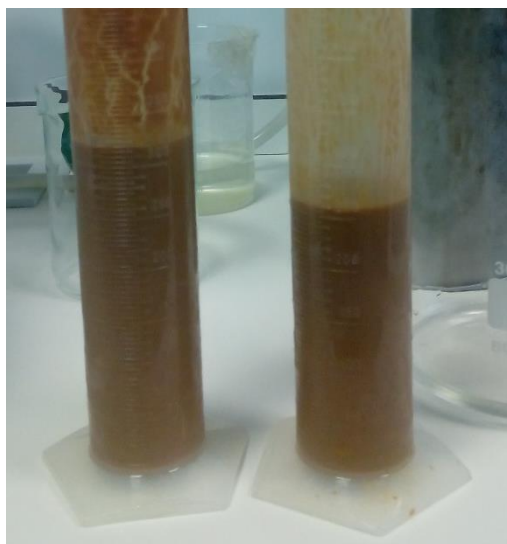


Figura 33 Separação do retentato por sedimentação ao fim de 6 horas

Estes ensaios preliminares, apesar de simples, provam que se consegue obter uma separação visível das diferentes fases do retentato sujeitando-o a uma força centrífuga relativamente pequena. Os resultados sugerem a possibilidade de que uma modificação na linha de produção, com introdução de um sistema que permita a separação física dos compostos do retentato poderá eficazmente remover os sólidos de dentro do sistema de ultrafiltração sem se recorrer à tradicional DF.

Ao longo do trabalho de estágio, assim que foi detetada a influência dos processos de filtração na turbidez do sumo concentrado, foram discutidas algumas propostas de adaptação da UF para obtenção de um produto com melhores características. A instalação de um pré-filtro foi uma das primeiras soluções. Este acessório permitiria a retenção do carvão ativado, evitando a circulação deste dentro do equipamento de UF. Algumas das vantagens que esta modificação traria incluem as seguintes.

- **Redução da taxa de colmatação dos filtros da UF.** As membranas do sistema de UF, com um *cutoff* de 100kDa, têm a capacidade de reter grande parte dos sólidos presentes no sumo pré-concentrado (Bucher Unipektin, 2007). O carvão ativado adicionado durante a etapa de despectinização encontra-se entre os compostos que são recirculados dentro do sistema. Isto faz com que sejam também culpados por parte da colmatação que ocorre durante a filtração. A instalação de um pré-filtro capaz de reter o carvão iria atrasar o processo de colmatação e permitir um funcionamento em contínuo do equipamento durante mais tempo, sujeitando o sumo filtrado a um menor número de ciclos de DF.

- **Produção de retentato livre de carvão ativado.** Qualquer tentativa de reaproveitamento da matéria orgânica do retentato por parte da empresa depara-se com a difícil tarefa de separar o carvão ativado dos restantes sólidos em suspensão.

Apesar destas vantagens, a instalação de um pré-filtro no circuito de produção depara-se também com uma série de dificuldades que acabariam por determinar o abandono desta ideia.

- **Redução do tempo de exposição ao carvão.** Durante o processamento do sumo concentrado, a Indumape utiliza o carvão para o aprisionamento de substâncias responsáveis pelo escurecimento do sumo. A instalação do pré-filtro iria reduzir o tempo de exposição entre o sumo e o carvão, podendo levar a uma degradação do parâmetro da cor e tornando o investimento desinteressante para a empresa.
- **Aumento da duração do processo de UF.** A instalação do filtro levaria a uma redução do caudal de enchimento do tanque de alimentação da UF, uma demora que, em processos contínuos, poderia atrasar significativamente a capacidade de produção da empresa.
- **Dificuldades de implementação no circuito.** O circuito do sumo entre os tanques de reação enzimática e o ultrafiltrador é totalmente fechado e a instalação de uma barreira, cujos filtros teriam de ser trocados com frequência, apresentaria dificuldades técnicas que, embora não sejam abordadas neste trabalho, foram consideradas, numa fase precoce, suficientemente acentuadas para levar à desistência desta ideia.

A segunda proposta, apresentada após a realização dos ensaios de separação do retentato, envolvia a separação dos sólidos do retentato por métodos físicos, como a sedimentação ou centrifugação. Esta estratégia pretendia atingir objetivos semelhantes à instalação do pré-filtro com o benefício acrescentado de possibilitar uma melhoria significativa na turbidez do sumo concentrado produzido.

- **Permitir o reaproveitamento dos sólidos em suspensão do retentato.** A separação por meios físicos iria possibilitar a fácil recolha da fase sólida do retentato.
- **Reduzir a necessidade de aplicação de ciclos de DF e lavagem da ultrafiltração.** O estudo da turbidez do permeado no decorrer da etapa de

ultrafiltração mostrou o impacto que as etapas de concentração e DF associadas aos ciclos de lavagem têm na qualidade do sumo resultante. A separação física dos sólidos do retentato, realizada na mesma altura que seria iniciado um ciclo de lavagem, iria permitir a remoção da maior porção de sólidos que circula dentro do ultrafiltrador sem a adição de água ou circulação de sumo com brix elevado. Isto iria adiar a necessidade de interromper o processo para proceder a uma lavagem do sistema e reduzir a quantidade de sumo que é fabricado sobre condições de DF (sumo com turbidez elevada).

Os resultados obtidos e consequentes sugestões de melhoria do processo sugerem que uma análise dos custos associados à implementação de um equipamento de centrifugação do retentato será o próximo passo a tomar na procura de um melhoramento para o parâmetro de turbidez do sumo concentrado. As dificuldades tecnológicas desta alteração não foram avaliadas neste trabalho mas a construção modular dos sistemas de UF em uso tornam possível este tipo de modificações (Bucher Unipektin, 2007). Mostrando-se possível a concretização da adaptação, será também necessário quantificar o impacto deste novo método de separação de sólidos na qualidade do sumo filtrado e no sumo concentrado, por monitorização da turbidez ao longo da ultrafiltração e na preparação dos lotes finais.

4.2. Identificação e quantificação dos compostos voláteis no aroma de maçã

Na tabela 6 estão representados os compostos voláteis cuja identificação foi conseguida recorrendo ao método cromatográfico implementado na Indumape ao longo deste trabalho. A mudança de programa de temperatura que passou a ser implementada em todas as amostras cuja análise foi efetuada depois da AF1 levou a uma alteração nos tempos de retenção observados.

Esta modificação nas temperaturas do método foi solicitada pela dificuldade em separar alguns dos compostos mais voláteis da amostra, nomeadamente, o etil 2-metilbutirato, o acetato de etilo e o butanol. Temperaturas elevadas levam a uma eluição rápida destes compostos, aumentando a definição dos picos, mas aumentam a probabilidade destes ficarem sobrepostos. Ao diminuir a temperatura da coluna durante uma corrida, a eluição ocorre mais devagar, diminuindo a definição dos picos, mas permitindo uma melhor separação dos compostos (Su e Wiley, 1998).

Tabela 6 Tempos de retenção médios de cada um dos compostos identificados a partir da análise no sistema GC-FID, sob dois programas de temperatura diferentes. Programa 1: T inicial: 35^oC durante 5 minutos, rampa até aos 220^oC. Programa 2: T inicial 30^oC durante 10 minutos, rampa até aos 220. Não se conseguiu obter uma separação aceitável para os compostos cujos tempos de retenção não estão mencionados.

	Nome do composto	Tempo de retenção aproximado (min)	Amostras de aroma analisadas		
Programa 1	Trans-2-hexenal	6,302	AT1	AT2	AF1
	Hexanal	4,300			
	Etil 2-metilbutirato	1,130			
	Butanol	N/A			
	Acetato de etilo	N/A			
Programa 2	Trans-2-hexenal	8,002	AT3	AF2	AF3
	Hexanal	5,226			
	Etil 2-metilbutirato	1,163			
	Butanol	2,143			
	Acetato de etilo	N/A			

Nas figuras 34, 35, 36, 37 e 38 estão representados alguns dos cromatogramas obtidos a partir da análise dos padrões dos compostos voláteis. Estes foram utilizados na identificação e elaboração das curvas de calibração para cada um dos compostos.

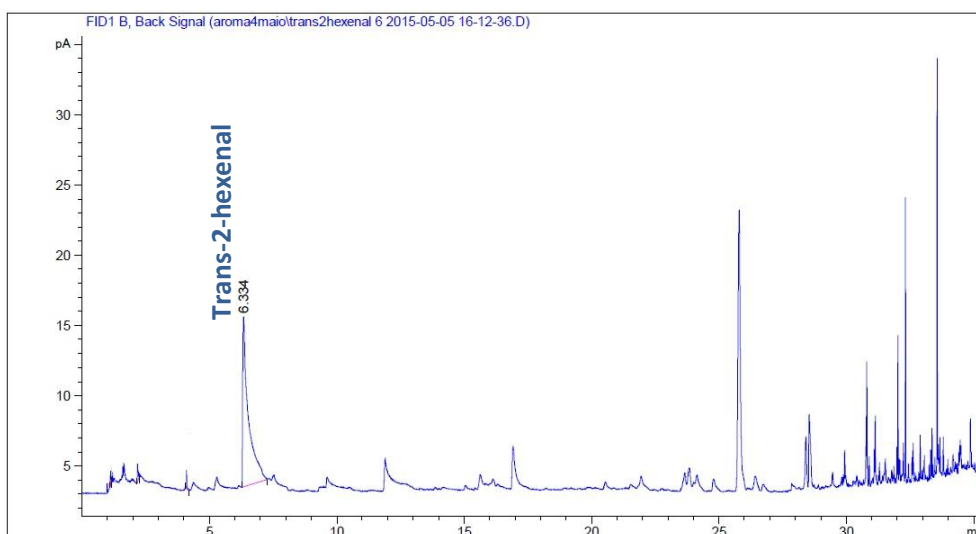


Figura 34 Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de **trans-2-hexenal** 0,208 mg/L

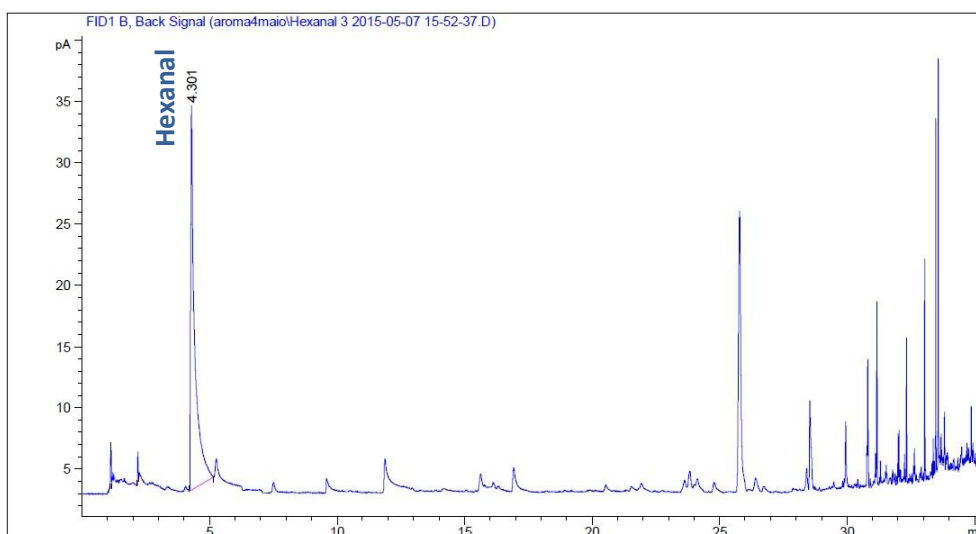


Figura 35 Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de **hexanal** 0,2 mg/L

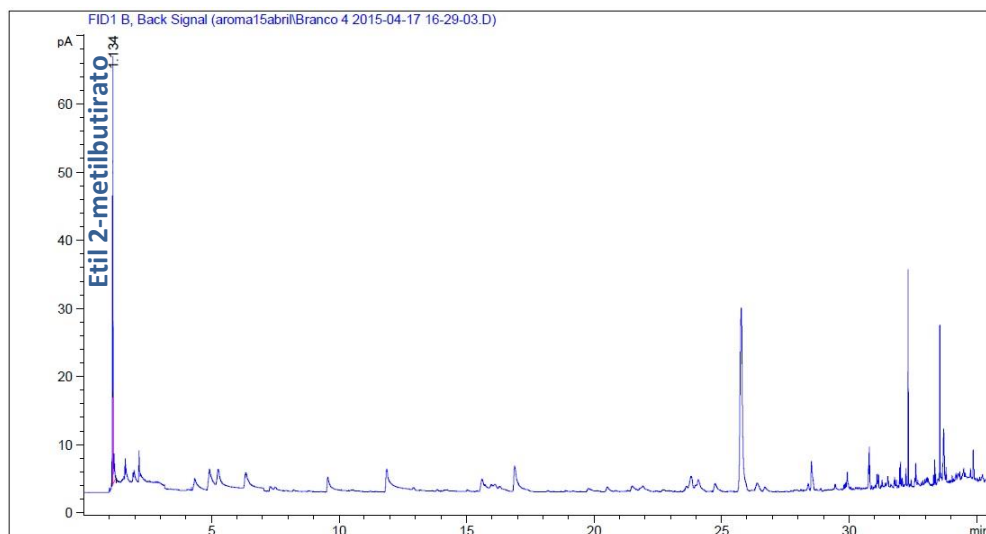


Figura 37 Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de **etil 2-metilbutirato** 0,2 mg/L

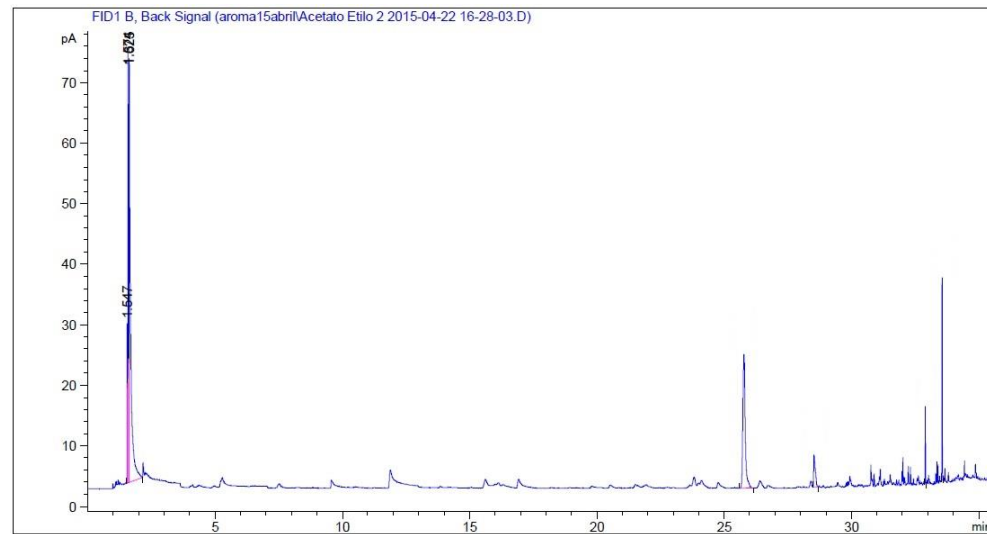


Figura 38 Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de **acetato de etilo** 0,225 µg/L onde não foi possível a obtenção de um pico único

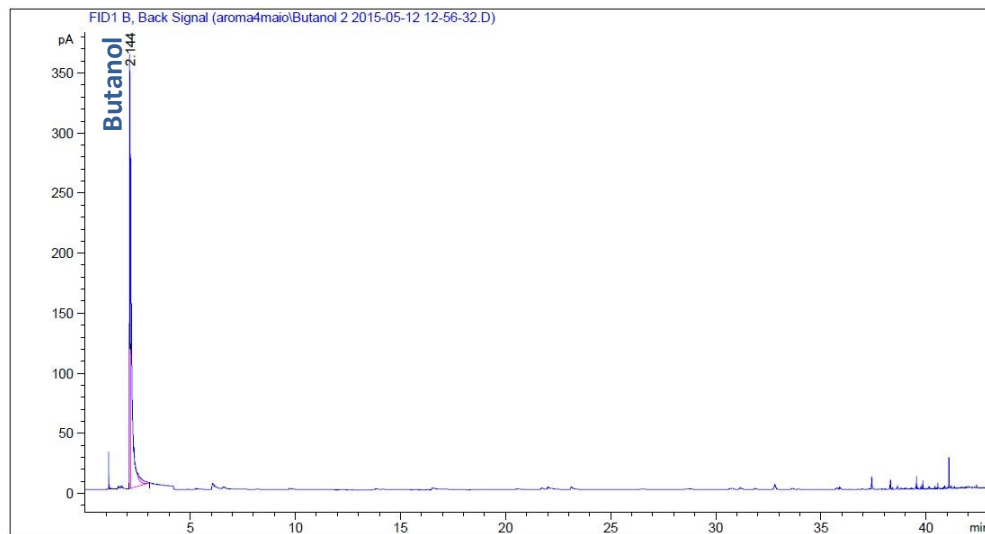


Figura 36 Cromatograma obtido a partir da análise do padrão de **butanol** 15 mg/L

A figura 39 mostra um cromatograma obtidos uma amostra de condensado analisado segundo o programa de temperatura definitivo (programa 2). Por comparação com os tempos de retenção dos padrões, foi efetuada a identificação dos picos correspondentes aos compostos de interesse.

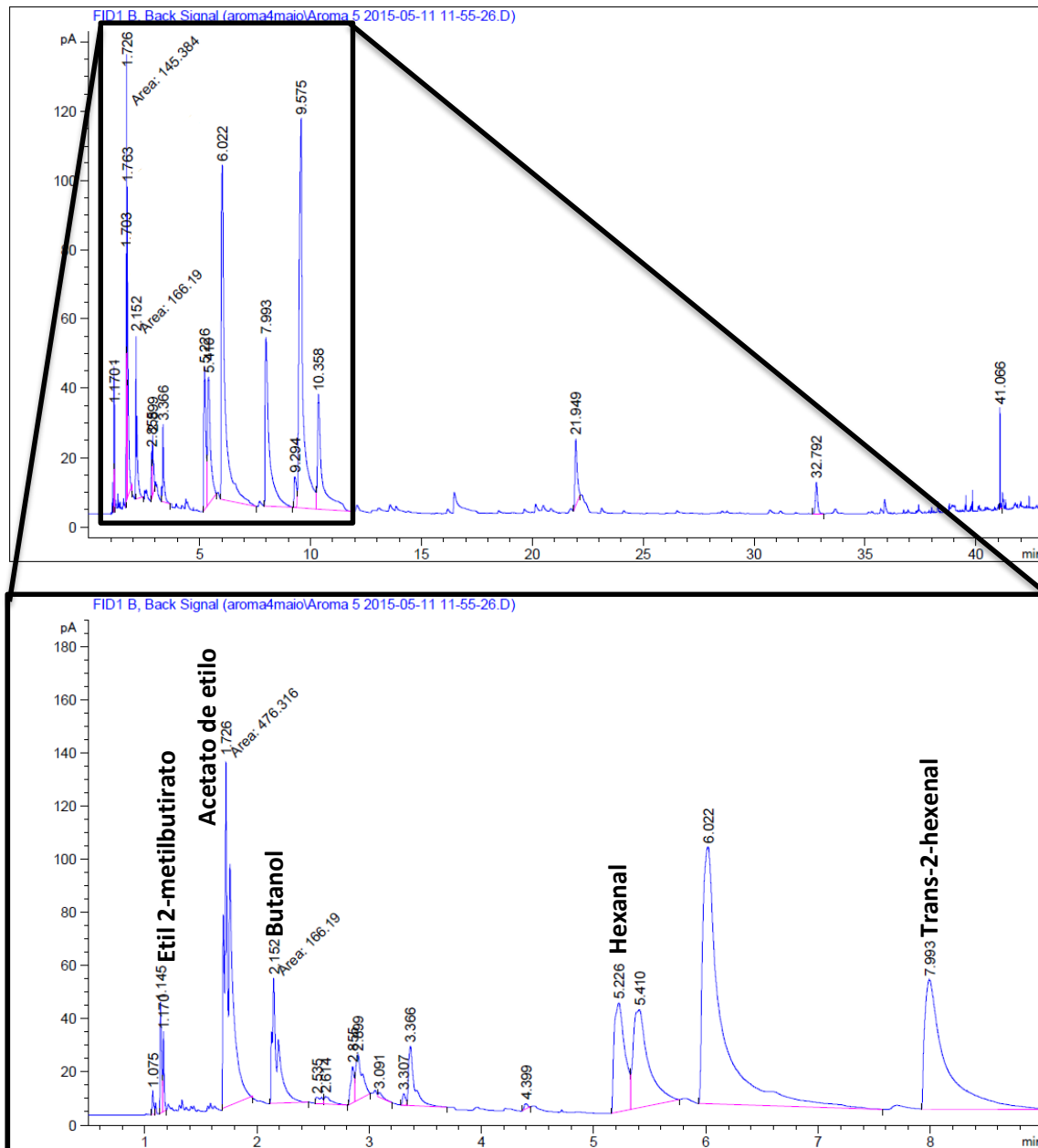


Figura 39 Cromatograma associado à amostra de aroma AT3 (analisado segundo o programa de temperatura 2), com destaque para o intervalo onde foram detetados os picos dos compostos de interesse. (0,5 a 9 minutos)

É possível observar através do cromatograma fornecido que a separação não foi totalmente bem-sucedida para a grande maioria dos compostos analisados. O trans-2-hexenal foi o único composto que, independentemente do programa de temperatura, foi facilmente separado e não mostrou picos sobrepostos. O trans-2-hexenal é um composto volátil frequentemente analisado na indústria alimentar, não só pela sua contribuição no perfil sensorial de muitos produtos vegetais, mas também pela fácil separação que se consegue obter por cromatografia em fase gasosa (Baldwin *et al.*, 1998). Os resultados obtidos dão ênfase à facilidade de extração deste composto e sugerem uma volatilidade muito distinta entre o trans-2-hexenal e os restantes voláteis quantificados.

Os restantes compostos foram mais difíceis de separar com os métodos e equipamentos empregues. Enquanto a mudança de programa de temperatura permitiu uma melhor separação do etil 2-metilbutirato, composto com menor tempo de retenção, esta não promoveu o mesmo efeito nos restantes voláteis. Ainda assim, os picos relativos ao hexanal e ao butanol foram facilmente identificados nos padrões, o que permitiu a sua quantificação nos condensados de aroma. O acetato de etilo foi o único composto que em nenhuma configuração experimentada foi separado com sucesso. Os cromatogramas dos padrões deste composto mostraram a mesma sobreposição de picos que se verificou nos condensados, o que impossibilitou a identificação exata do tempo de retenção do composto e, conseqüentemente, a sua quantificação. Isto sugere uma possível contaminação do próprio padrão, a qual não passa despercebida ao detetor do GC-FID dada a elevada volatilidade do acetato de etilo (Su e Wiley, 1998).

Os resultados da quantificação dos compostos voláteis nas amostras de condensado analisadas estão representados na tabela 7 e nas figuras 40, 41, 42, 43, 44 e 45 sob a forma de gráfico. A tabela 8 representa uma compilação dos resultados utilizados como principal referência, fornecidos pela Universidade de Aveiro.

Tabela 7 Concentração dos compostos voláteis de interesse nas amostras de condensado de aroma sujeitas a análise cromatográfica.

Amostra	Concentração na amostra ($\mu\text{g/L}$)			
	trans-2-hexenal	hexanal	etil 2-metilbutirato	butanol
AT1	$1,86 \times 10^5 \pm 0,07$	$5,31 \times 10^4 \pm 0,77$	$5,33 \times 10^4 \pm 1,62$	$3,01 \times 10^5 \pm 0,31$
AT2	$1,75 \times 10^5 \pm 0,08$	$5,16 \times 10^4 \pm 1,07$	$2,10 \times 10^4 \pm 1,59$	$2,58 \times 10^5 \pm 0,36$
AT3	$1,57 \times 10^5 \pm 0,10$	$6,35 \times 10^4 \pm 0,94$	$7,12 \times 10^4 \pm 1,99$	$5,11 \times 10^5 \pm 0,38$
AF1	$1,23 \times 10^5 \pm 0,18$	$2,89 \times 10^4 \pm 1,39$	$1,79 \times 10^5 \pm 0,57$	$6,29 \times 10^5 \pm 0,85$
AF2	$1,66 \times 10^5 \pm 0,14$	$6,18 \times 10^4 \pm 1,11$	$1,07 \times 10^5 \pm 0,46$	$4,76 \times 10^5 \pm 0,84$
AF3	$1,51 \times 10^5 \pm 0,13$	$3,75 \times 10^4 \pm 0,90$	$9,87 \times 10^4 \pm 0,37$	$4,28 \times 10^5 \pm 0,26$

Tabela 8 Concentração dos compostos voláteis de interesse nas amostras de condensado de aroma analisadas pela Universidade de Aveiro.

Amostra	Concentração na amostra ($\mu\text{g/L}$)			
	trans-2-hexenal	hexanal	etil 2-metilbutirato	butanol
Jan 14	$8,57 \times 10^4$	$3,04 \times 10^4$	$3,12 \times 10^3$	$1,56 \times 10^6$
Set 14	$8,19 \times 10^4$	$3,09 \times 10^4$	$2,60 \times 10^3$	$9,13 \times 10^5$
Out 14	$1,59 \times 10^5$	$3,03 \times 10^4$	$1,18 \times 10^4$	$1,17 \times 10^6$
Nov 14	$1,51 \times 10^5$	$3,70 \times 10^4$	$4,90 \times 10^3$	$1,26 \times 10^6$

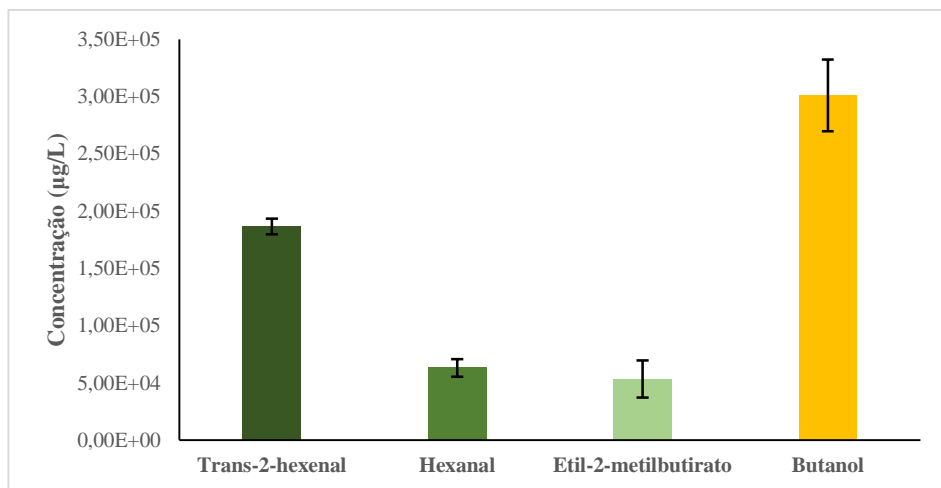


Figura 41 Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma de tanque 1 (AT1)

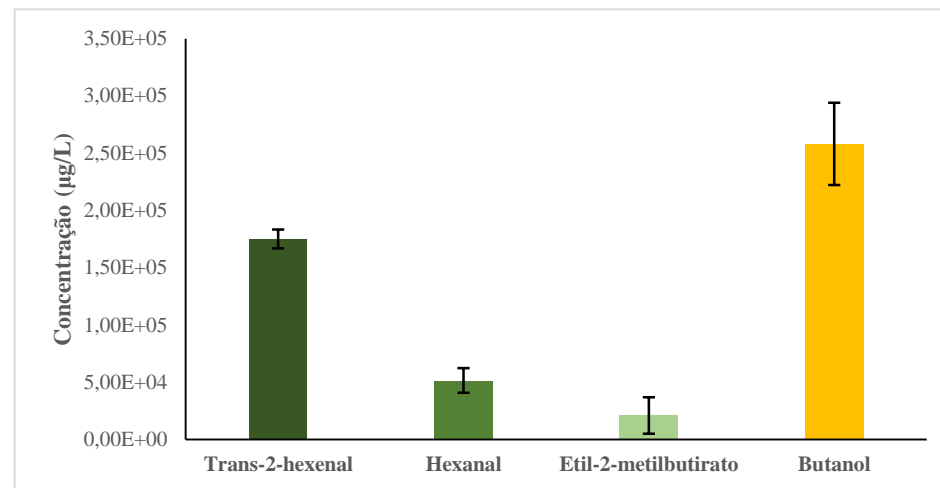


Figura 42 Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma de tanque 2 (AT2)

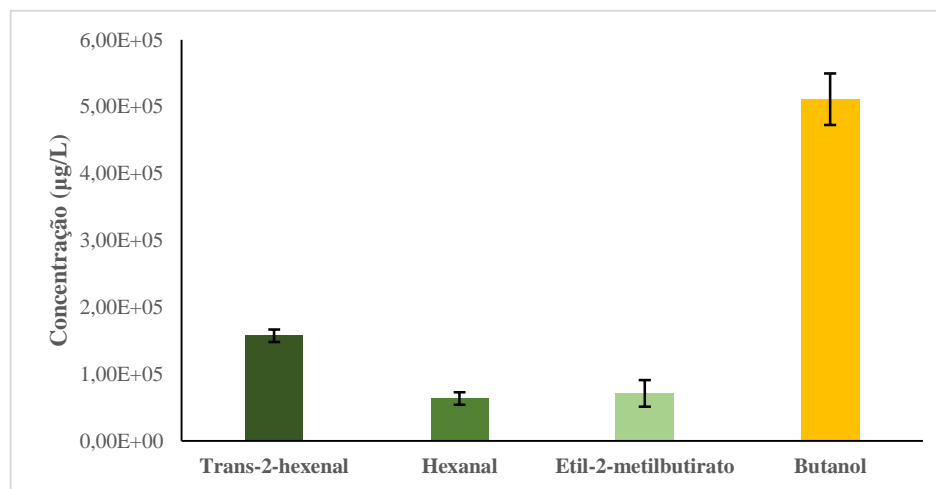


Figura 40 Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma de tanque 3 (AT3)

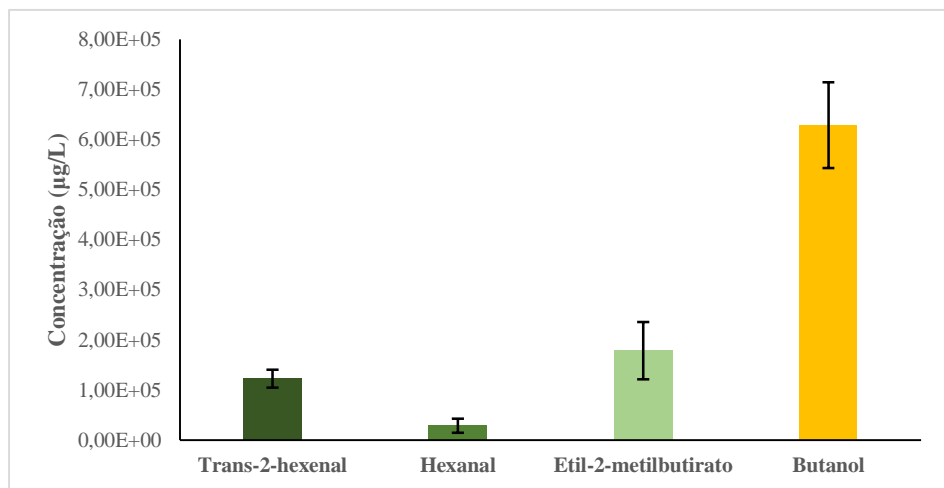


Figura 43 Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma fresco 1 (AF1)

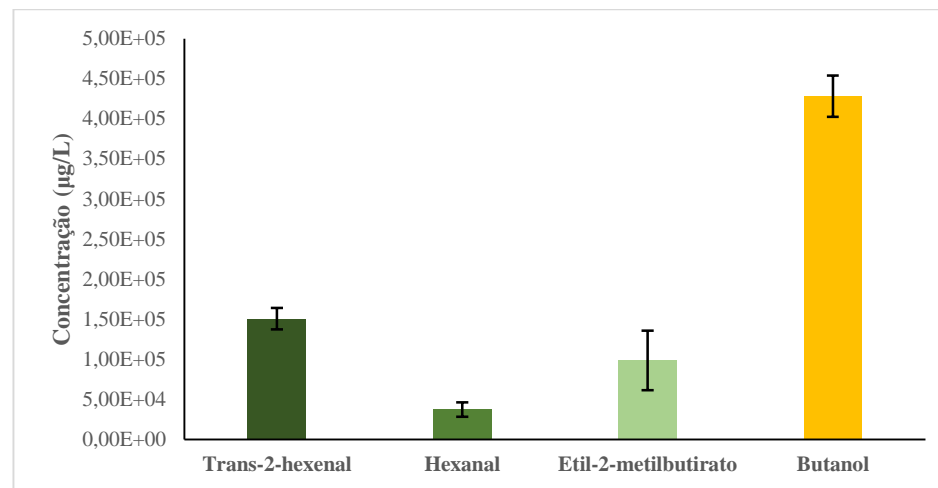


Figura 44 Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma fresco 3 (AF3)

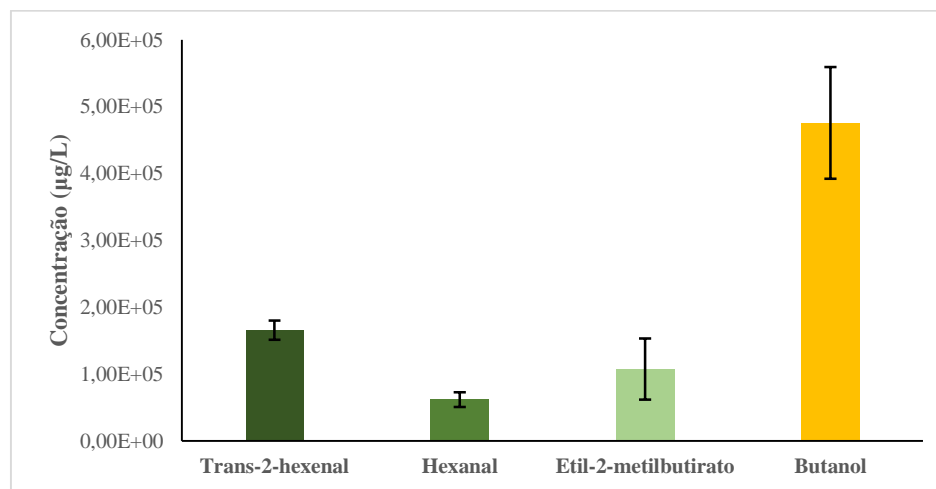


Figura 45 Concentrações dos compostos voláteis de interesse na amostra aroma fresco 2 (AF2)

A baixa volatilidade do trans-2-hexenal provou favorecer a separação deste composto e facilitar a obtenção de resultados concordantes. As concentrações entre as diferentes amostras de condensado com a mesma origem (aromas de stock 1, 2 e 3) tiveram variações mínimas e foram comparáveis às concentrações obtidas pela investigação levada a cabo pela Universidade de Aveiro. As concentrações de hexenal, para quase todas as amostras analisadas, ficaram acima dos valores de referência. Em duas das amostras de condensado recém-extraído (AF1 e AF3), observou-se uma concentração mais baixa de hexenal. Estas amostras constituíram a exceção num conjunto de resultados cuja variação foi pouco acentuada. Os desvios verificados podem ser atribuídos a dificuldades no processo de extração, em particular ao controlo de temperatura, fator que prejudicou a reprodutibilidade dos ensaios. A fibra DVB/Carboxen/PDMS, com uma gama abrangente de compatibilidade de analitos, não chega a atingir as afinidades que outras fibras disponíveis comercialmente conseguem para os compostos em estudo. A extração por adsorção, que ocorre como consequência da utilização deste revestimento, tem como possível desvantagem a saturação da superfície de contacto disponível. Esta limitação intrínseca da própria estrutura do polímero de revestimento leva a relações não-lineares entre as concentrações dos analitos na amostra e a quantidade extraída. O tempo necessário para atingir o equilíbrio de concentração de analitos entre a amostra e a fase de extração pode desta forma sofrer um aumento e levar a extrações incompletas. (Pawliszyn, 2000; Yu et al., 2008) A dificuldade de separação do composto dentro da coluna pode também ter levado a erros na atribuição de áreas. Estes mesmos fatores são válidos na explicação dos resultados obtidos para o butanol. Os ensaios na Indumape mostram que este continua a ser o composto volátil em maior concentração no aroma de maçã, mas as concentrações afastam-se significativamente daquelas obtidas pelos investigadores em Aveiro. A concentração de etil 2-metilbutirato demonstrou estar várias ordens de grandeza acima dos valores usados como referência, independentemente da origem do condensado. Vrhovsek *et al.*, (2014) listaram e quantificaram os compostos orgânicos voláteis extraídos da polpa de várias variedades de maçã e demonstrou que, com uma concentração de 5,53 µg/kg, o etil 2-metilbutirato é um dos voláteis presentes em menor quantidade. Um maior número de ensaios sobre diferentes condições de separação poderá ajudar a chegar a uma explicação sobre a discrepância dos resultados obtidos na quantificação do etil 2-metilbutirato.

Não houve diferenças significativas nas concentrações de trans-2-hexenal e hexenal entre os aromas em *stock* e os aromas frescos. Existe, no entanto, um considerável

aumento na concentração de etil 2-metilbutirato, e um acréscimo ligeiro na concentração de butanol neste último tipo de aroma. Dada a volatilidade destes compostos, não é inesperada a maior abundância em amostras recém-produzidas. Será importante, no entanto, a realização de um maior número de ensaios, e otimização adicional do método antes de se poder tirar conclusões definitivas sobre a evolução destas concentrações ao longo do armazenamento.

A maioria das referências literárias que efetuou análises por meios semelhantes a produtos de maçã, focou o estudo nos voláteis do sumo ou do próprio fruto. Su e Wiley, (1998), efetuaram uma extração de voláteis do sumo de maçã sem processamento térmico por *Purge and Trap*, seguida de uma separação e quantificação por GC-FID. Como seria de esperar para uma amostra não sujeita à concentração que ocorre com o condensado de aroma, as concentrações foram mais baixas. Resultados de 0,08 mg/L de etil 2-metilbutirato, 0,5 mg/L de hexanal e 1,25 de trans-2-hexenal mostram concentrações relativas não muito distantes das obtidas, com a exceção do etil 2-metilbutirato, que mais uma vez se destaca por ter concentrações muito inferiores às dos outros compostos.

Foi também calculado o índice de aroma para cada composto detetado em cada uma das amostras de condensado sujeitas a análise. Este valor foi obtido a partir da razão entre a concentração dos voláteis, em mg/L, e o LPS associado a cada composto (listado na tabela 1), em ml/L de água (Dixon e Hewett, 2000; Rocha *et al.*, 2004). Nas figuras 46 e 47 estão representados os índices de aroma das amostras AT1 e AF1, respetivamente.

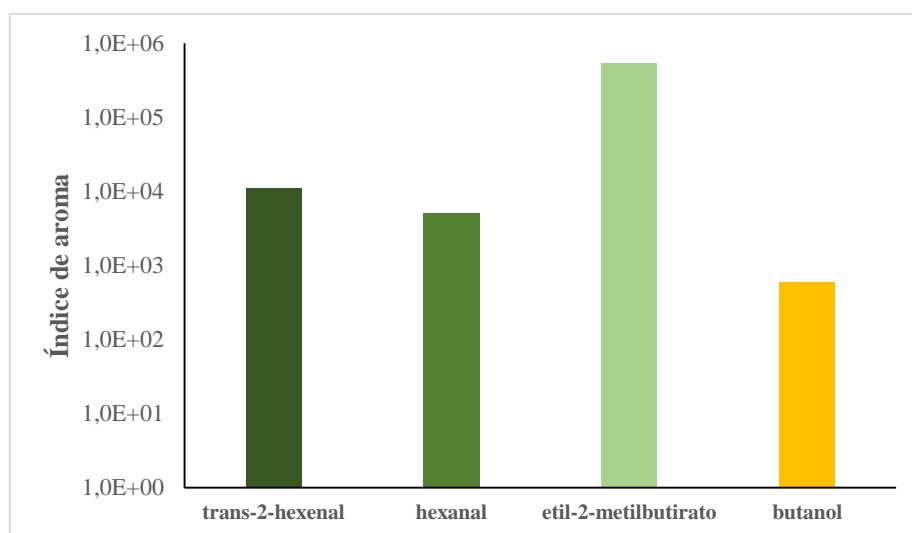


Figura 46 Índice de aroma da amostra AT1 para os compostos voláteis quantificados

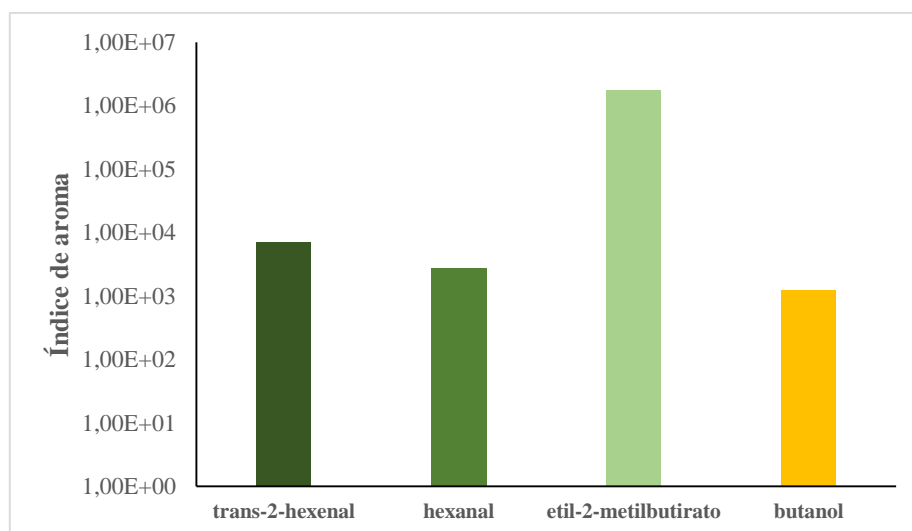


Figura 47 Índice de aroma da amostra AF1 para os compostos voláteis quantificados

O índice de aroma permite, com base em valores da literatura, determinar a relevância de cada composto volátil nas concentrações detetadas. É possível observar que, devido ao baixo LPS do etil 2-metilbutirato, as diferenças na concentração neste composto não afetam a sua relevância na contribuição para o aroma do condensado, face aos outros compostos voláteis estudados.

Os resultados demonstram que o método implementado até agora é capaz de quantificar eficazmente parte dos compostos voláteis do aroma de maçã. No entanto, existe espaço para melhoria na deteção dos compostos quantificáveis, e será necessário proceder a mais alterações no método para se conseguir detetar a gama completa de voláteis de interesse. A co-eluição de compostos é um dos problemas mais comuns em separações por cromatografia em fase gasosa, e nos ensaios efetuados foi apontada como causa para a má separação de alguns dos compostos voláteis analisados. O uso de colunas revestidas por diferentes fases poderá minimizar o problema. Os ensaios de quantificação de compostos voláteis efetuados por autores como Plotto, (1998) e Su e Wiley (1998) recorreram a colunas com elevada polaridade, especializadas na deteção destes compostos. Desta forma, é recomendada a aquisição de uma coluna capilar DB-FFAP da Agilent Technologies para futuros testes de otimização do método de quantificação de voláteis. Esta coluna vai de encontro às especificações vistas na literatura e está disponível a partir do fornecedor habitual da Indumape, o que poderá facilitar a sua compra e instalação.

Uma das limitações associadas à etapa de extração por SPME foi o controlo da temperatura do espaço de vapor. Este foi efetuado sem recurso a um termómetro de

contacto capaz de regular a temperatura da placa de agitação, o que levou a uma regulação manual, utilizando um termómetro de uso geral. Esta prática impôs potenciais limitações na reprodutibilidade do método e deverá ser abandonada assim que a aquisição de uma placa de agitação com controlador eletrónico de temperatura for possível. A eventual escolha de uma nova fibra de SPME deverá considerar as características dos compostos de interesse. As fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) com um revestimento de 100 µm são utilizadas por uma série de autores para a extração de compostos voláteis de baixo peso molecular. O uso de um polímero líquido evita também potenciais limitações associadas à quebra de linearidade entre quantidades extraídas e concentrações de analito na amostra. (Pawliszyn, 2000; Torrens et al., 2004; Yu et al., 2008)

Finalizada a implementação do método, um passo importante para melhorar o controlo sobre o processo de fabrico dos condensados de aroma terá de incluir uma comparação entre as características dos condensados acabados de produzir e as características da matéria-prima que lhe deu origem. Os resultados obtidos neste trabalho revelam diferenças na composição volátil entre o aroma fresco e o aroma armazenado. A monitorização regular do perfil volátil irá permitir saber se é apenas o tempo de armazenamento que leva a estas modificações, ou se de facto o estado da matéria-prima exerce influência.

5. Conclusão

O estudo aprofundado do processo de fabrico do sumo concentrado de maçã, juntamente com a monitorização de vários parâmetros de qualidade do produto, permitiram identificar a diafiltração como um condicionante da turbidez do sumo. O aumento da turbidez do permeado resultante da paragem e ciclos de lavagem da ultrafiltração foi dado como explicação para as oscilações anuais da turbidez da maçã. Foi apresentada uma adaptação ao processo atual que visa reduzir o impacto da ultrafiltração no aumento da turbidez do sumo. Uma centrifugação do retentato provou ser eficaz na separação dos sólidos em suspensão e a sua adaptação ao processo de ultrafiltração, como alternativa à DF, poderia evitar o aumento da concentração de sólidos no sistema e o consequente aumento de turbidez do permeado.

O controlo dos parâmetros de maturação da maçã ao longo da campanha demonstrou que, durante a campanha, a Indumape trabalha com matéria-prima progressivamente mais madura. Enquanto que não foi observada nenhuma relação entre a turbidez do sumo concentrado e as características da matéria-prima, os resultados apontam para a possibilidade de adaptar o processo enzimático às características da maçã, podendo ser implementada uma redução da quantidade de enzima de moagem (pectina metilesterase) nos meses em que a fruta recebida é mais madura. Um estudo da atividade enzimática das pectinases da maçã ao longo da campanha conjugado com o controlo dos parâmetros de maturação seria o próximo passo na exploração desta atividade.

A implementação do equipamento de GC-FID para quantificação de compostos voláteis extraídos por SPME foi bem-sucedida. Os métodos aplicados conseguiram quantificar quatro dos cinco compostos de interesse, entre os quais está o trans-2-hexenal, cujo conhecimento da sua concentração é valorizado pela empresa e pelos seus clientes. O método tem ainda muitas possibilidades de otimização que poderão ser exploradas em futuros trabalhos, incluindo o uso de diferentes tipos de revestimento durante a extração por SPME e o uso de uma coluna de GC com maior afinidade pelos analitos de interesse.

6. Bibliografia

- Aguilar-Rosas, S. F.; Ballinas-Casarrubias, M. L.; Nevarez-Moorillon, G. V.; Martin-Belloso, O.; Ortega-Rivas, E.** Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering*, **2007**, 83, 41-46
- Ali, Z. M.; Chin, L.; Lazan, H.** A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications. *Plant Science*, **2004**, 167, 317–327
- Alvarez, S.; Alvarez, R.; Riera, F. A.; Coca, J.** Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Physicochemical and Engineering Aspects*, **1998**, 138, 377-382.
- Augusto, F.; Lopes, A. L.; Zini, C. A.** Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22(3), 160-169
- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Einstein, M. A.; Malundo, T. M. M.; Carr, B. T.; Shewfelt, R. L.; Tandon, K. S.** Relationship between Sensory and Instrumental Analysis for Tomato Flavor. *Journal of American Society for Horticultural Science*, **1998**, 123(5), 906-915
- Belitz, H.D.; Grosch, W.; Schieberle, P.** *Food Chemistry*. Springer Verlag, **2004**, Capítulo 5.
- Brookfield, P.; Murphy, P.; Harker, R.; Elspeth MacRae, E.** Starch degradation and starch pattern indices; interpretation and relationship to maturity. *Postharvest Biology and Technology*, **1997**, 11, 23-30
- Bucher Unipektin Flavy Ultrastar UF Operating Manual.** Versão 2E, **2007**
- Cassano, A.; Jiao, B.; Drioli, E.** Production of concentrated kiwifruit juice by integrated membrane process. *Food Research International*, **2004**, 37, 139-148
- Clever, M.; Jordt, F.; Knauf, R.; Rübiger, N.; Rübibusch, M.; Hilker-Scheibel, R.** Process water production from river water by ultrafiltration and reverse osmosis. *Desalination*, **2000**, 131, 325-336.
- Denès, J. M.; Baron, A.; Drilleau, J. F.** Purification, properties and heat inactivation of pectin methylesterase from apple (cv Golden Delicious). *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, **2000**, 80, 1503-1509
- Dixon, J.; Hewett, E. W.** Factors affecting apple aroma/flavor volatile concentration: A Review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, **2000**, 28:3, 155-173
- Douglas A. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.** *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Brooks/Cole, **2007**, Capítulos 26, 27 e 34
- Echavarria, A.; Pagán, J; Ibarz, A.** Effect of previous enzymatic recirculation treatment through a tubular ceramic membrane on ultrafiltration of model solution and apple juice. *Journal of Food Engineering*, **2011**, 102, 334-339
- Endo, A.** Studies on Pectolytic Enzymes of Molds Part XV Effects of pH and Some Chemical Agents on the Clarification of Apple Juice. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1965**, 29:3, 222-233
- Endrizzi, I.; Torri, L.; Corollaro, M. L.; Dematte, M. L.; Aprea, E.; Charles, M.; Biasioli, F.; Gasperi, F.** A conjoint study on apple acceptability: Sensory characteristics and nutritional information. *Food Quality and Preference*, **2014**, 40, 39-48
- Falguera, V.; Ibarz, A.** Squeezing Fruits in the Second Decade of the Twenty-First Century: The Current Situation of the Juice Industry. *In: Falguera, V.; Ibarz, A. (Ed.), Juice*

- FAOSTAT**. Crop production quantities by country. [online] Available at faostat3.fao.org/browse [Accessed at 19th December 2014]
- Ferreira, S. S.; Passos, C. P.; Madureira, P.; Vilanova, M.; Coimbra, M. A.** Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, **2015**, 132, 378-396
- Feliciano, R. P.; Antunes, C.; Ramos, A.; Serra, A. T.; Figueira, M. E.; Catarina, M. M.; Duarte, A. B.; Carvalho, D.; Bronze, A. R.** Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Funcional Foods*, **2010**, 2, 35-45
- Goulao, L. F.; Santos, J.; Sousa, I.; Oliveira, C. M.** Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during .growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology*, **2007**, 43, 307-318
- Harker, F. R.; Marsh, K. B.; Young, H.; Murray, S. H.; Gunson, F.A.; Walker, S. B.** Sensory interpretation of instrumental measurements 2: sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **2002**, 24, 241–250
- Hern, A.; Dorn, S.** Monitoring seasonal variation in apple fruit volatile emissions in situ using solid-phase microextraction. *Phytochem Anal.*, **2003**, 14, 232-240.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R.** Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, **2005**, 40, 2931–2944
- Kalamaki, M. S.; Stoforos, N. G.; Taoukis P. S.** Pectic Enzymes in Tomatoes. *In: Hui, Y. H. Food Biochemistry and Food Processing*. Blackwell Publishing, **2006**, Capítulo 12
- Karlsson, H. O. E.; Gun Triigiirdh, G.** Aroma Recovery During Beverage Processing, *Journal of Food Engineering*, **1997**, 34, 159- 178
- Ma, Y.; Gao, N.; Chu, W.; Li, C.** Removal of phenol by powdered activated carbon adsorption. *Frontiers of Environmental Science e Engineering*, **2013**, 7(2), 158-165
- Márquez, M.** Product Innovation: Current Trends in Fruit Juice Production to Meet Market Demands. *In: Falguera, V.; Ibarz, A. (Ed.), Juice Processing: Quality, Safety and Value-Added Opportunities*, CRC Press, **2014**, Capítulo 2
- Mattheis, J.P.; Buchanan, D.A.; Fellman, J.K.** Volatile compound production by Bisbee Delicious apples after sequential atmosphere storage. *J. Agric. Food. Chem.*, **1995**, 43, 194-199
- Mattheis, J.P.; Fellman, J.K.; Chen, P.M.; Paterson, M.E.** Changes in espaço de vapor volatiles during physiological development of Bisbee Delicious apple fruit. *J. Agric. Food. Chem.*, **1991**, 39, 1902-1906
- Nunes, C.; Santos, C.; Pinto, G.; Silva S.; Lopes-da-Silva, J. A.; Saraiva, J. A.; Coimbra, M. A.** Effects of ripening on microstructure and texture of “Ameixa d’Elvas” candied plums. *Food Chemistry*, **2009**, 115, 1094-1101
- Onsekizoglu, P.; Savas Bahceci, K.; Jale Acar, M.** Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment. *Journal of Membrane Science*, **2010**, 352, 160–165

- Ortega, N.; Diego, S.; Perez-Mateos, M.; Busto, M. D.** Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, **2004**, *88*, 209-217
- Paliyath, G.; Murr, D. P.** Biochemistry of Fruits. In: Hui, Y. H. *Food Biochemistry and Food Processing*. Blackwell Publishing, **2006**, Capítulo 21
- Pawliszyn, J.; Lord, H.** Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, **2000**, *885*, 153-163
- Pawliszyn, J.** Theory of Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, **2000**, *38*, 270-278
- Pillonel, L.; Bosset, J. O.; Tabacchi, R.** Rapid Preconcentration and Enrichment Techniques for the Analysis of Food Volatile - A Review. *LWT - Food Science and Technology*, **2002**, *35*, 1-14
- Pinelo, M.; Zeuner, B.; Meyer, A. S.** Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioprocess Technology*, **2010**, *88*, 259-265
- Plotto, A.** Instrumental and Sensory Analysis of 'Gala Apple' (*Malus Domestica*, Borkh) Aroma. Tese de doutoramento em Fisiologia Vegetal. Oregon State University Corvallis, Oregon, United States. p. 41
- Popp, P.; Paschke, A.** Solid Phase Microextraction of Volatile Organic Compounds Using Carboxen-Polydimethylsiloxane Fibers. *Chromatographia*, **1997**, *46*, 419-424
- Rascón-Chu, A.; Martínez-López, A. L.; Carvajal-Millán, E.; León-Renova, N. E. P.; Márquez-Renova, J. A.; Romo-Chacón, A.** Pectin from low quality "Golden Delicious" apples: Composition and gelling capability. *Food Chemistry*, **2009**, *116*, 101-103
- Ridley, B. L.; O'Neill, M. A.; Mohnen, D.** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, **2001**, *57*, 929-967
- Rocha, S. M.; Rodrigues, F.; Coutinho, P.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A.** Volatile composition of Baga red wine Assessment of the identification of the would-be impact odourants. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, *513*, 257-262
- Shaikh, R. P.; Pillay, V; Choonara, Y. E.; du Toit, L. C.; Ndesendo, V. M. K.; , Kumar, P.; Khan, R. A.** The application of a crosslinked pectin-based wafer matrix for gradual buccal drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **2012**, *100B*, 1029-1043
- Shalini, R.; Gupta, D. K.** Utilization of pomace from apple processing industries: a review, *Journal of Food Science and Technology*, **2010**, *47*(4), 365-371
- Siebert, K. J.** Haze formation in beverages. *LWT - Food Science and Technology*, **2006**, *39*, 987-994
- Sinha, N. K.** Apples. In: Hui, Y. H. (Ed.) *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Iowa: Blackwell Publishing, 265-278, **2006**, Capítulo 16
- Su, S. K.; Wiley, R. C.** Changes in Apple Juice Flavor Compounds During Processing. *Journal of Food Science*, **1998**, *63*(4), 688-691
- Thammawong, M.; Arakawa, O.** Starch to Sugar Conversion in "Tsugaru" Apples under Ethylene and 1-Methylcyclopropene Treatments. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **2010**, *12*, 617-626

- Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S.** Volatile Compounds of Red and White Wines by Headspace–Solid-Phase Microextraction Using Different Fibers. 2004, *Journal of Chromatographic Science*, **2004**, 42
- Vanoli, M.; Visai, C.; Rizzolo, A.** The influence of harvest date on the volatile composition of “Starkspur Golden” apples. *Postharvest Biology and Technology*, **1995**, 6, 225-234.
- Voragen, A. G. J.; Coenen, G.; Verhoef, R. P.; Schols, H. A.** Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.*, **2009**, 20, 263–275
- Willatsa, W. G. T.; Knox, P.; Mikkelsen, J. D.** Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science e Technology*, **2006**, 17, 97-104
- Wu, J.; Gao, H.; Zhao, L.; Liao, X.; Chen, F.; Wang, Z.; Hu, X.** Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, **2006**, 103, 88-93
- Yazdanshenas, M.; Tabatabaenezhad, A. R.; Roostaazad, R.; Khoshfetrat B.** Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. *Separation and Purification Technology*, **2005**, 47, 52-27
- Yazdanshenas, M.; Tabatabaee-Nezhad, S.; Soltanieh, M.; Roostaazad, R.; Koshfetrat, A. B.** Contribution of fouling and gel polarization during ultrafiltration of raw apple juice at industrial scale. *Desalination*, **2010**, 258, 194-200
- Young, H.; Gilbert, J. M.; Murray, S. H.; Ball, R. D.** Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1996**, 71, 329-336.
- Yu, A.; Sun, B.; Tian, D.; Qu, W.** Analysis of volatile compounds in traditional smoke-cured bacon (CSCB) with different fiber coatings using SPME. *Food Chemistry*, **2008**, 110, 233-238
- Zielinski, A. A. F.; Alberti, A.; Braga, C. M.; Silva K. M.; Canteri M. H. G.; Mafra L. I., Granato, D.; Nogueira, A.; Wosiacki, G.** Effect of mash maceration and ripening stage of apples on phenolic compounds and antioxidant power of cloudy juices: A study using chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*, **2014**, 57, 223-229

7. Anexos

I. Fluxograma do processo

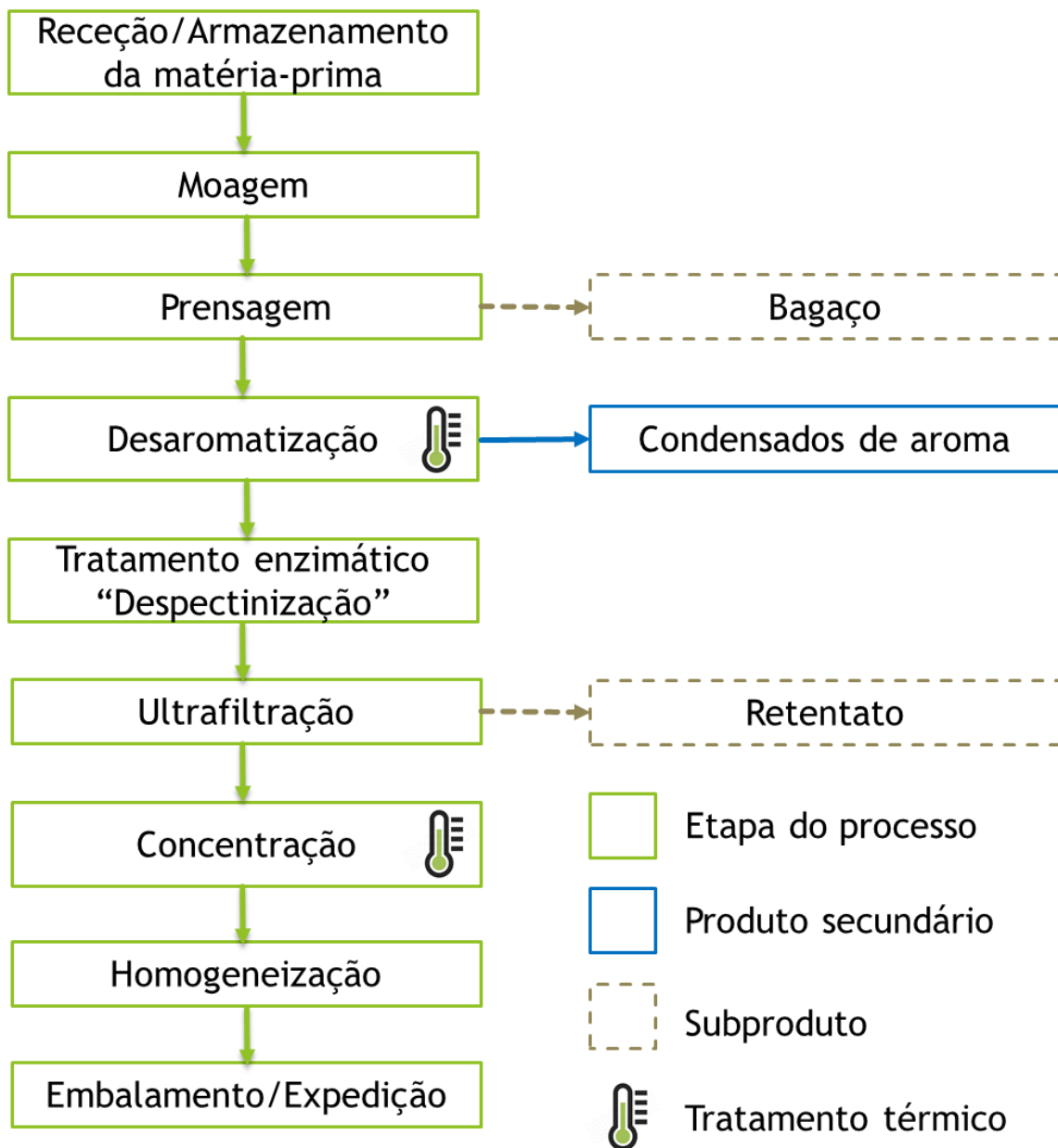


Figura 48 Processo de produção de sumos concentrados de maçã e pera. Adaptado a partir dos documentos fornecidos pelo departamento de qualidade da Indumape e de Falguera e Ibarz, 2014.

II. Guia rápido para utilização do software OpenLAB Chromatography Data System nas análises de controlo de qualidade dos condensados de maçã

Procedimentos de arranque do GC-FID

- 1) Verificar a pressão dos gases nas válvulas reguladores de pressão (diretamente ligadas à garrafa no caso do hélio, ar purificado e azoto; associado à válvula de segurança no caso do hidrogénio) se encontra dentro dos níveis aceitáveis de aproximadamente 5bar.
- 2) Abrir as válvulas dos gases de transporte e alimentação do detetor.
- 3) Ligar o GC e aguardar o aparecimento da mensagem “Power on successful”.
- 4) Carregar o método a partir do software (deverá ocorrer automaticamente com a abertura do mesmo)

Procedimentos de encerramento do GC-FID

- 1) Esperar pelo final da corrida em curso
- 2) Baixar a temperatura do detetor e injetor para $\leq 100^{\circ}\text{C}$ utilizando o Painel de Controlo Virtual da Agilent (ver figuras 28 a 30)
- 3) Desligar o GC.
- 4) Fechar as válvulas dos gases de transporte e alimentação do detetor.

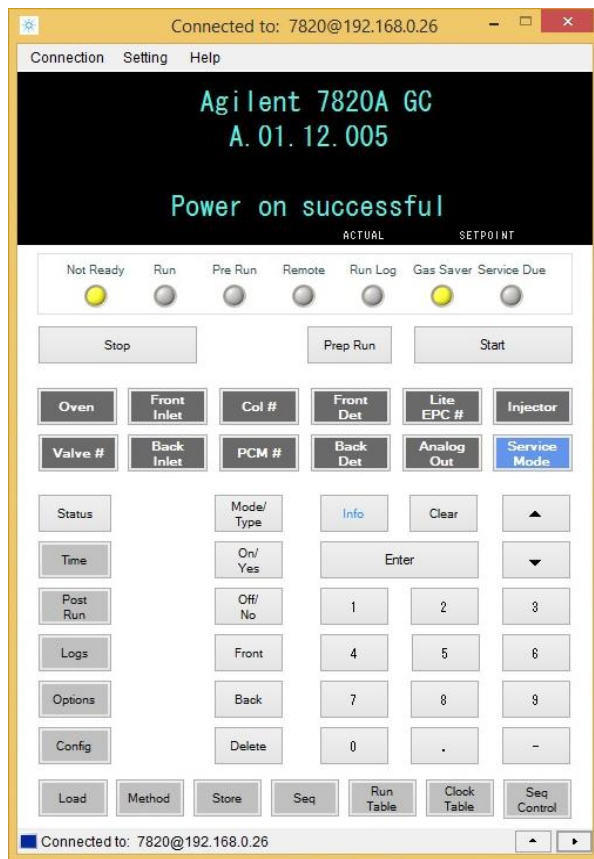


Figura 49 Painel de controlo virtual do sistema Agilent 7820A GC após ligação do aparelho.

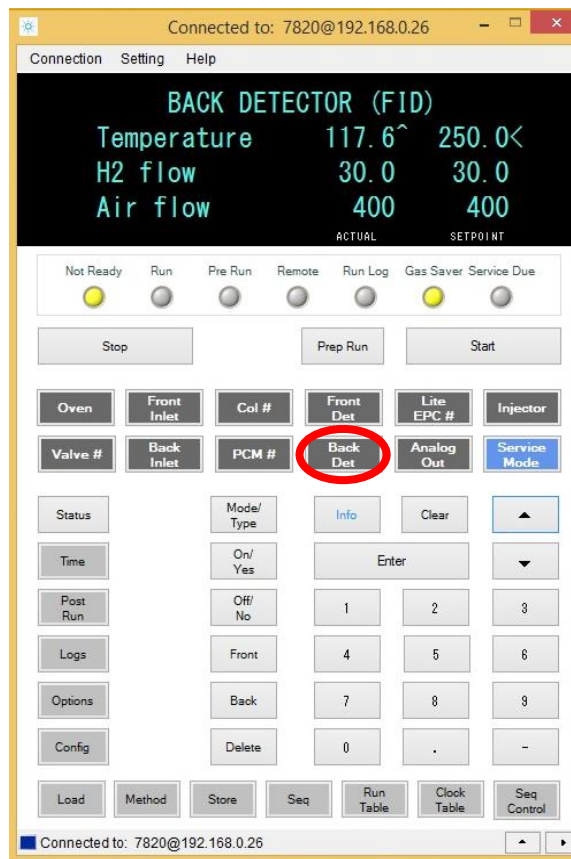


Figura 50 Painel de controlo virtual do sistema Agilent 7820A GC no modo de configuração das definições do detetor.

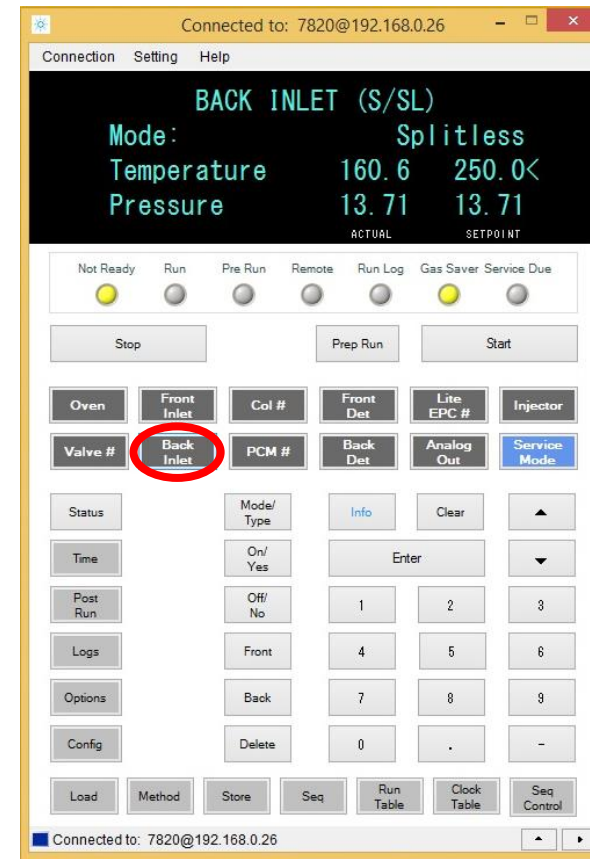


Figura 51 Painel de controlo virtual do sistema Agilent 7820A GC no modo de configuração das definições do injetor.

Iniciar um ensaio com um método já estabelecido

- 1) Selecionar o método “**compostos volateis2**” a partir da lista de métodos guardados. Esta lista aparece no lado esquerdo do ecrã, no modo de seleção de método e controlo da corrida/ensaio (*Method and Run Control*), normalmente já selecionado após arranque do programa.

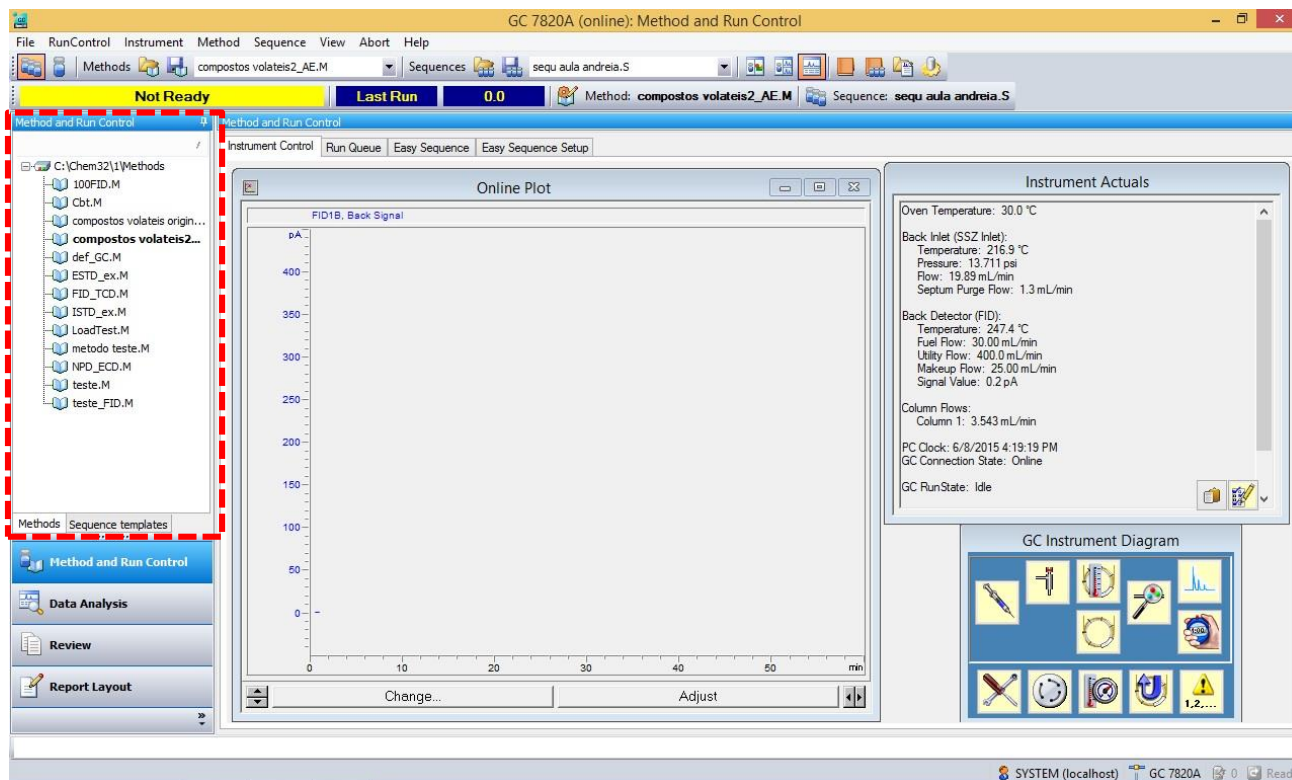


Figura 52 Modo de *Method and Run Control*, com destaque para listagem de métodos gravados no sistema.

- 2) Abrir o menu *RunControl* e selecionar *Sample Info...*

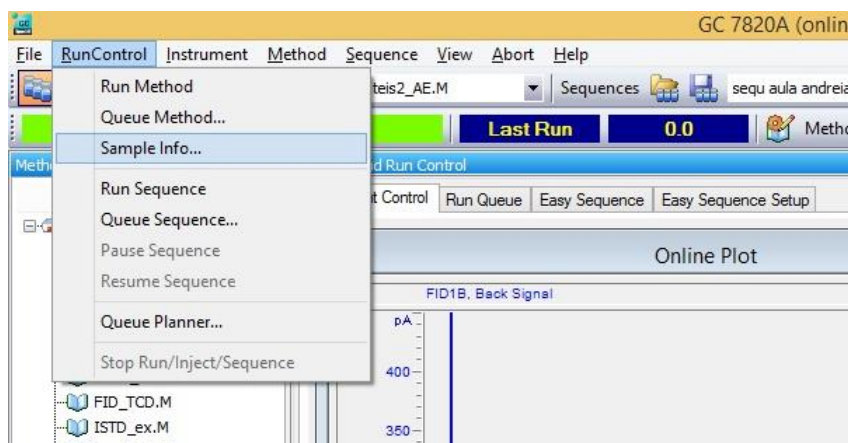


Figura 53 Seleção do menu de para edição de informações relativas à amostra sujeita a análise a partir da barra de menus principal, no modo “*Method and Run Control*”

- 3) Editar os parâmetros de identificação da amostra mais relevantes. De forma a melhor integrar os resultados nos registos de ambos os departamentos de qualidade e produção, é recomendado que a amostra seja identificada com o lote de produção que lhe foi atribuído.

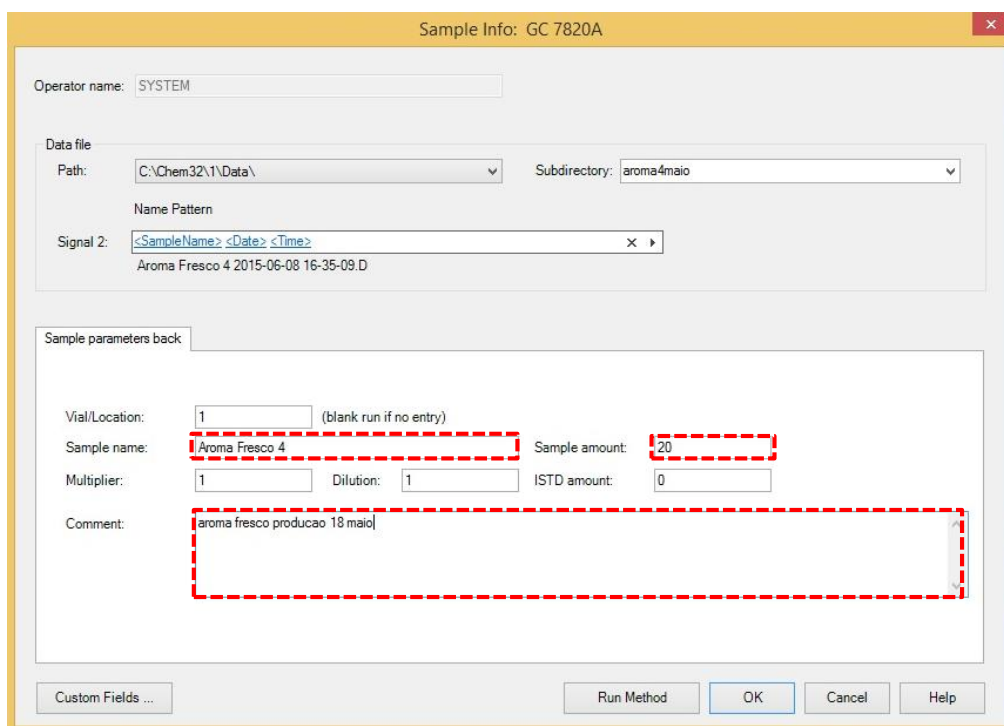


Figura 54 Menu de edição das informações da amostra, com destaque para alguns dos parâmetros cuja edição é recomendada para uma mais fácil organização e tratamento de resultados.

- 4) Assim que o instrumento esteja nas condições exigidas pelo método, dar início à corrida pressionando o botão **START** no cromatógrafo, ou no botão **Run Method** dentro do menu de edição das informações da amostra (**Sample Info**). A barra de estado do equipamento, localizada acima da janela de seleção de métodos irá mostrar a mensagem “**Ready**” sobre um fundo verde quando este se encontrar pronto para realizar o ensaio.

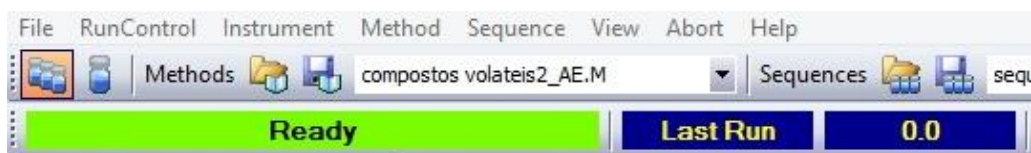


Figura 55 Barra de estado do equipamento depois de carregado o método e atingidas as temperaturas indicadas.

Assim que o ensaio estiver concluído, é aberto um relatório com o cromatograma obtido, uma listagem dos picos integrados de acordo com as definições do método, e a concentração dos compostos associados a picos calibrados.

Tratamento de dados: Definição de parâmetros de integração e integração manual

- 1) Abrir o modo de análise de dados (*Data Analysis*) no menu do canto inferior esquerdo do ecrã.

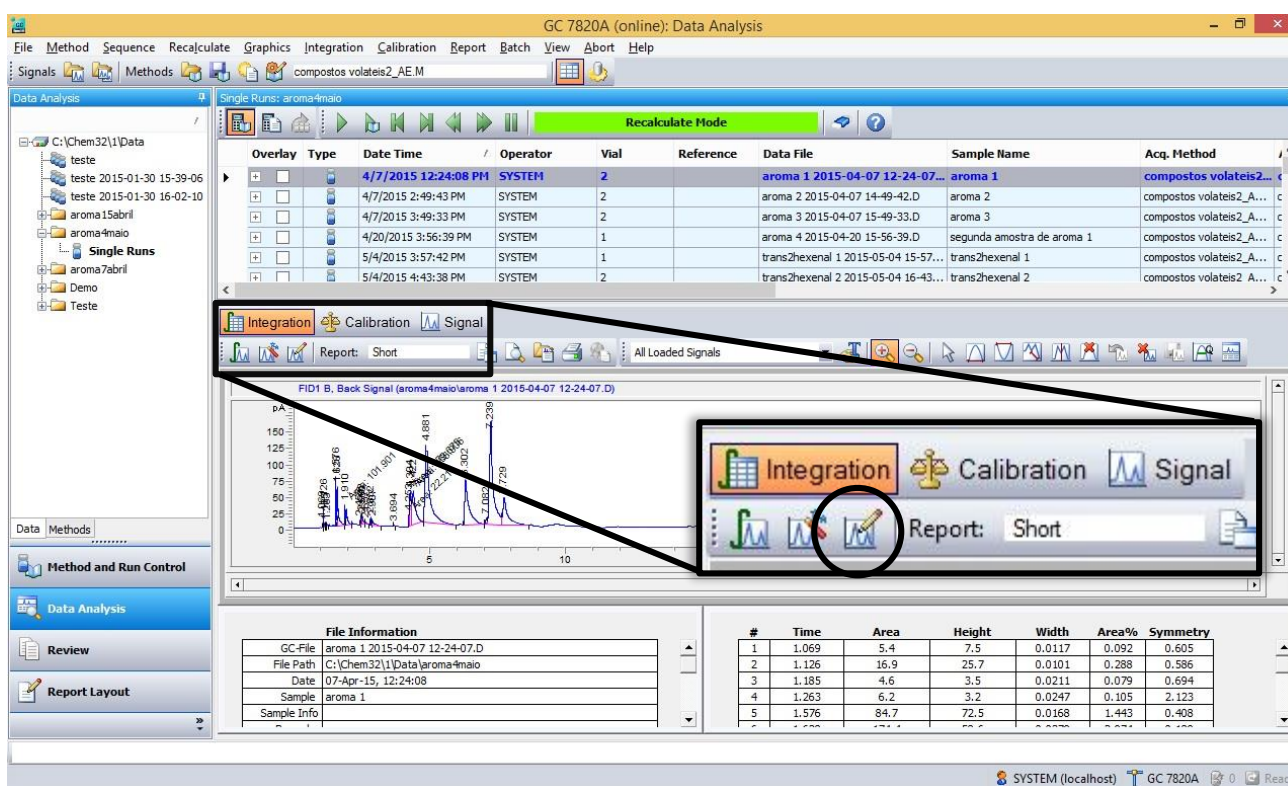


Figura 56 Modo de *Data Analysis* com destaque para o botão de edição de eventos/parâmetros de integração *Edit Integration Events*.

- 2) Selecionar o cromatograma cujos parâmetros de integração se pretendem editar e carregar no botão *Edit Integration Events* como demonstrado na figura 35.

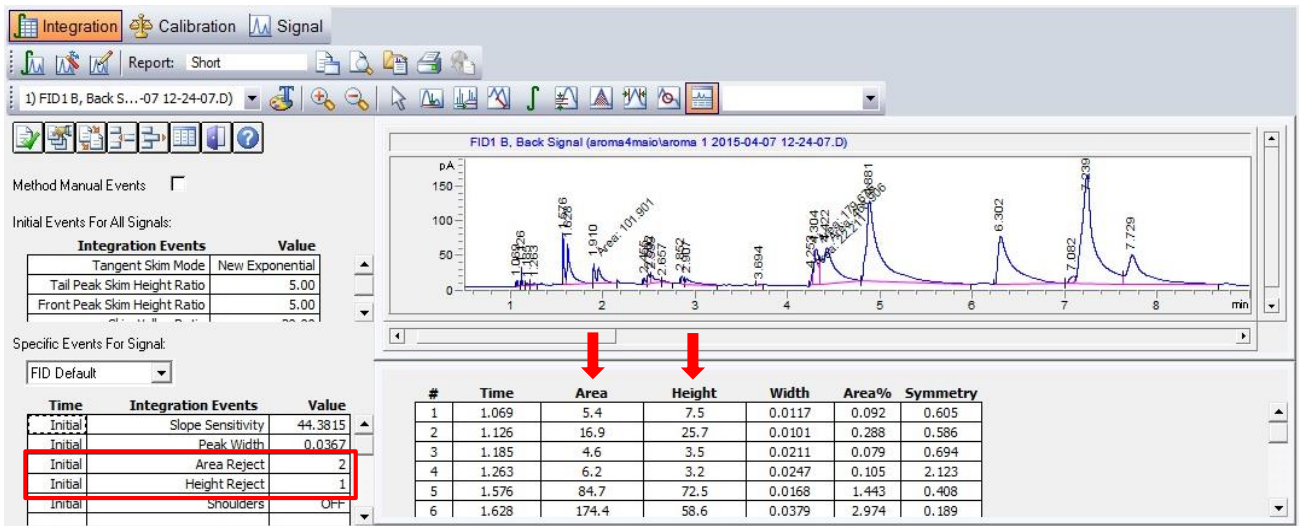


Figura 57 Menu de edição de parâmetros de integração, com destaque para a seleção por rejeição de área ou altura.

3) Efetuar a rejeição de picos em função da área e/ou altura, de acordo com os destaques da figura 36. Nesta interface, é possível editar os parâmetros de integração de todos os sinais ou apenas para a seleção atual. Excluindo ensaios para otimização do método, é aconselhado editar apenas parâmetros específicos ao sinal que se está tratar.

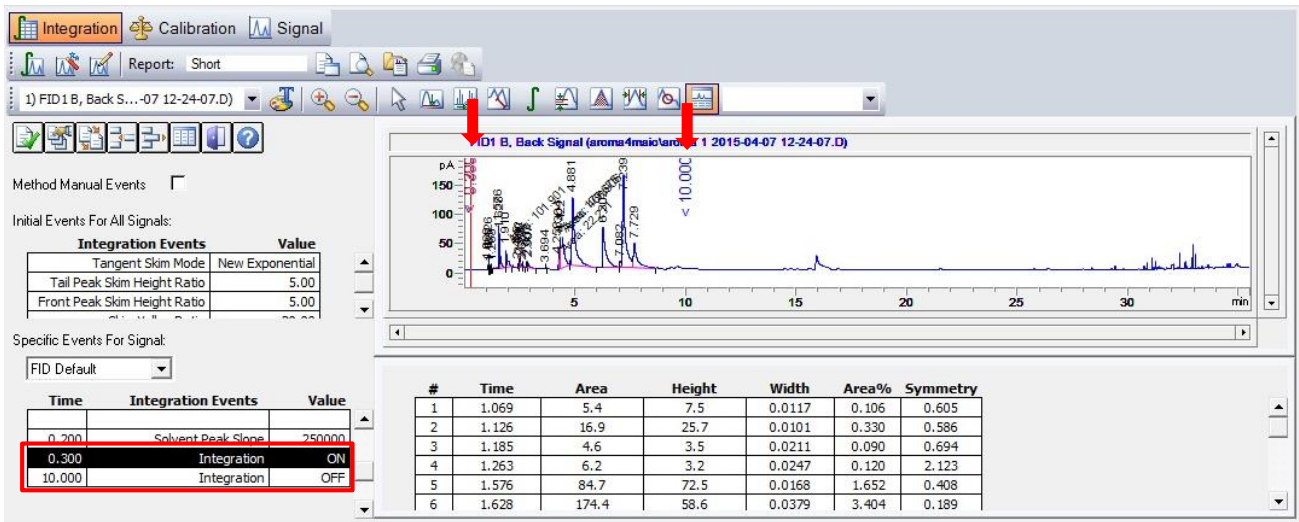



Figura 58 Adição de novos eventos de integração para rejeição de picos em função do tempo de retenção

4) Utilizar o comando  para acrescentar novas linhas à tabela de eventos de integração.



- 5) Para efetuar uma exclusão por tempos de retenção, selecionar uma das novas linhas da tabela, escolher o evento “**Integration**” e definir os tempos de forma a construir um intervalo de exclusão/inclusão.
- 6) Utilizar o comando  para guardar as edições efetuadas e sair do menu de edição de parâmetros de integração.
- 7) É ainda possível efetuar a integração manual dos picos do cromatograma utilizando a barra de ferramentas de integração manual, destacada na figura X. Estes comandos poderão auxiliar na integração de picos sobrepostos quando não se consegue uma melhor separação por modificação do método.



Figura 59 Ferramentas de integração manual

Importante: A integração manual de um pico substitui as áreas atribuídas automaticamente, mas continua condicionada pelas definições do menu de edição de parâmetros de integração (*Edit Integration Events*). Exemplo: Não é possível integrar um pico manualmente se este se encontrar dentro de uma intervalo de tempo em que a integração foi excluída.

Tratamento de dados: Construção de curvas de calibração

- 1) Abrir o modo de análise de dados (*Data Analysis*) no menu do canto inferior esquerdo do ecrã. Selecionar as opções de calibração (*Calibration*) clicando no ícone com o respetivo nome. 

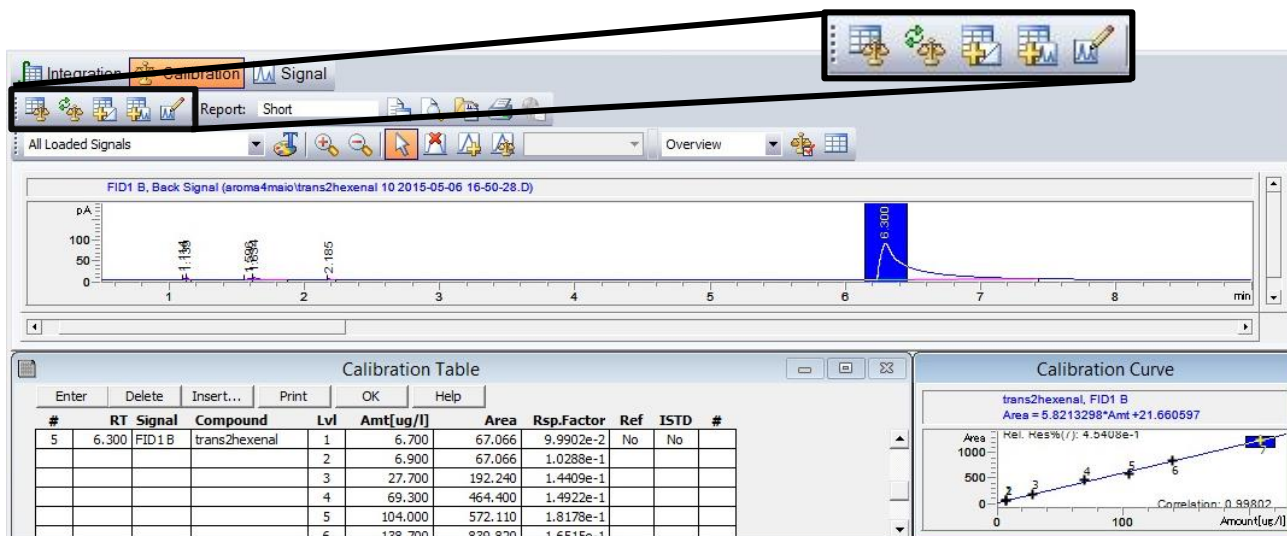


Figura 60 Menu de opções de calibração, com destaque para os comandos mais relevantes na elaboração de curvas de calibração.

- 2) Selecionar o cromatograma a utilizar para criar o primeiro ponto da curva de calibração. É recomendado começar pelo cromatograma correspondente à amostra de concentração mais baixa.

Importante: Certificar que os picos do composto de interesse estão devidamente integrados, ou estes não serão considerados na atribuição de pontos para a curva de calibração

- 3) Utilizar o comando (*Add peaks from current chromatogram*) para adicionar todos os picos integrados à tabela de calibração (*Calibration Table*). Nesta tabela, os picos podem ser excluídos, identificados e associados à concentração das amostras que lhes deram origem.
- 4) Selecionar o cromatograma a utilizar como próximo ponto para a curva de calibração.
- 5) Utilizar o comando (*Add levels from current chromatogram*) para criar um novo nível de concentração para os compostos na tabela, a partir do cromatograma selecionado. Se forem reconhecidos picos com tempos de retenção coincidentes, estes serão automaticamente identificados e adicionados à curva do respetivo composto.

Tratamento de dados: Edição das especificações do relatório e apresentação de resultados

Após a obtenção de curvas de calibração, as concentrações dos compostos calibrados passarão a ser emitidas nos relatórios gerados pelo programa. Estes são reproduzidos no final de cada ensaio mas podem também ser recriados no modo **Data Analysis**.



- 1) No modo **Data Analysis**, utilizar o comando  **Specify Report**, localizado na barra de ferramentas dos menus de integração ou calibração. Aqui é possível editar as opções de visualização dos cromatogramas presentes nos relatórios, mudar o nome do documento gravado, imprimir o relatório, etc.



Figura 61 Parte da barra de ferramentas do menu de calibração com destaque para os comandos de edição e emissão de relatório.

- 2) Utilizar o comando  (**Identify peaks, calculate and preview results**) para criar um novo relatório associado ao cromatograma selecionado, incluindo os cálculos das concentrações dos compostos presentes.

Importante: Os relatórios gerados pelo comando **Identify peaks, calculate and preview results**, irão substituir qualquer relatório anterior (incluindo o relatório gerado após a corrida) se a opção **Unique PFD file name** estiver selecionada no menu **Specify Report**. Para criar vários documentos é necessário remover a seleção mencionada e dar o nome pretendido ao documento neste mesmo menu.

Criação de um novo método e edição de parâmetros de um método existente

Tendo em conta que as especificações dos métodos utilizados para a obtenção dos resultados apresentados já se encontram descritos no capítulo 2.3.2., esta parte do

guia irá apenas encaminhar o utilizador para a interface onde é possível fazer a edição de parâmetros. Os menus referidos são apresentados pela ordem sequencial do comando “*Edit Entire Method...*”.

- 1) No modo *Method and Run Control* seleccionar o menu *Method* e de seguida *Edit Entire Method...* tal como indicado na figura X.

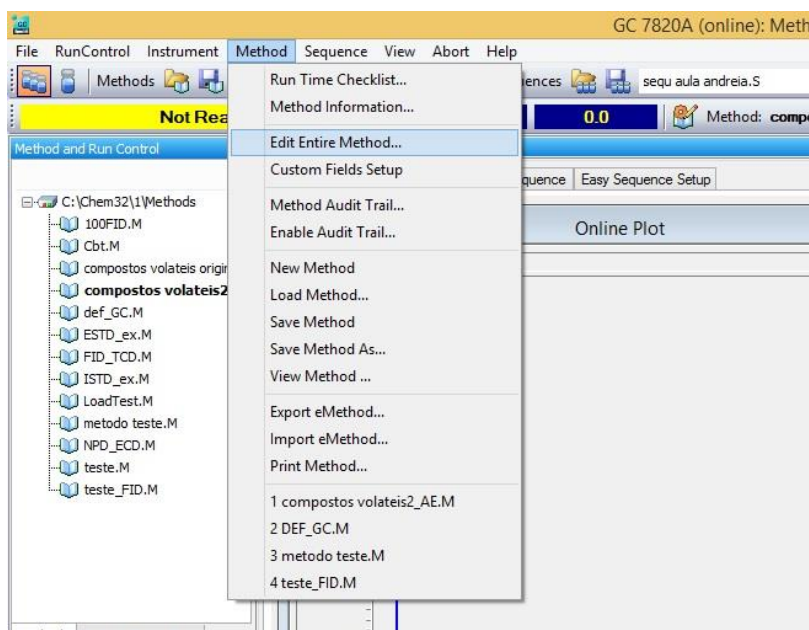


Figura 62 Menu de opções do método, no modo *Method and Run Control*

- 2) (Opcional) Acrescentar informação relevante para descrever o novo método. Particularmente útil para descrever as diferenças entre dois métodos semelhantes.
- 3) Confirmar o tipo e posição do injetor. Para o método atualmente utilizado, o injetor é manual e está localizado na abertura de trás (*Back*).
- 4) No menu *Setup Method* é possível fazer a edição de cada um dos parâmetros associados aos diferentes componentes do sistema GC-FID. Os parâmetros mais relevantes estão destacados na figura X.

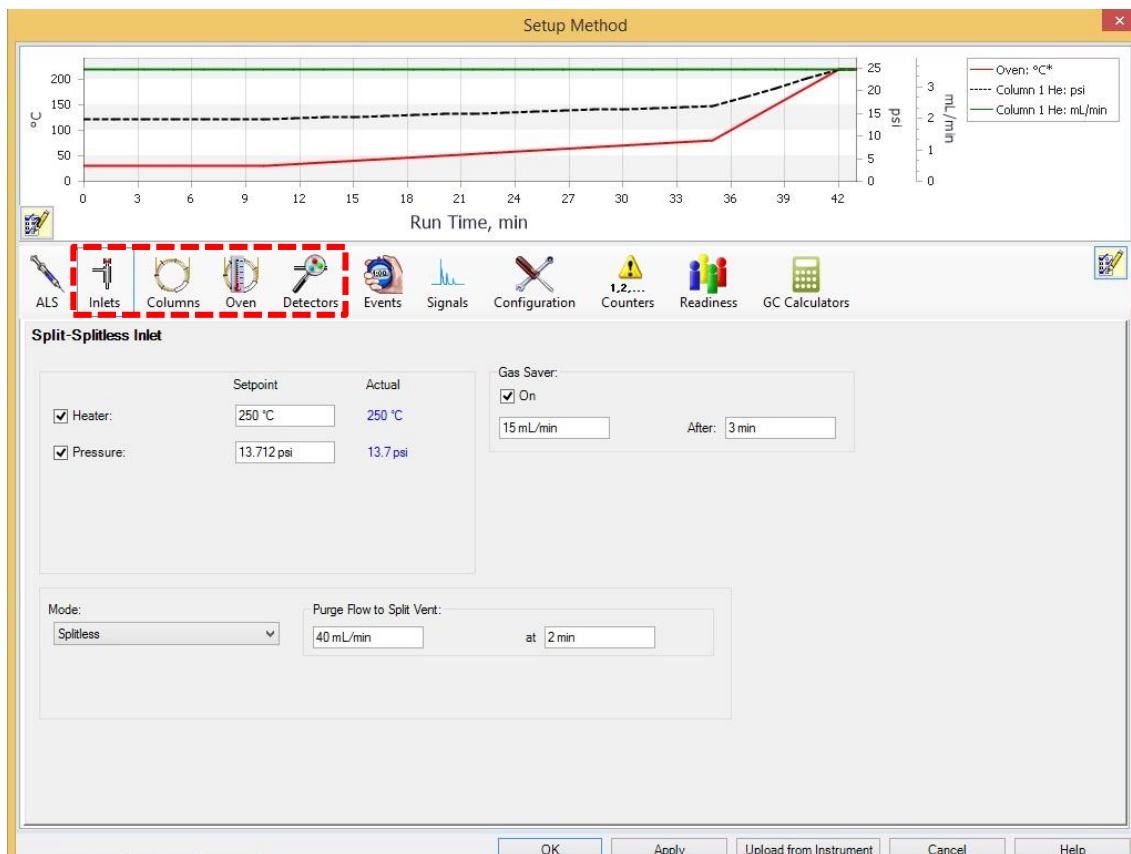


Figura 63 Menu de configuração do método *Method Setup*, com destaque para os parâmetros mais importantes no ajuste ou criação de um novo método

- 5) Configurar as definições do **Injetor** na secção *Inlets*. A temperatura, pressão e modo de operação, bem como o caudal e timing de purga podem ser configurados neste menu.
- 6) Configurar as definições da **Coluna** na secção *Columns*. Aqui é possível definir a pressão ou o caudal de gás de transporte na coluna. É possível também aceder à base de dados de colunas da Agilent, no caso de ser efetuada uma troca, e automaticamente definir alguns dos parâmetros mais indicados para o equipamento escolhido.
- 7) Para configurar o **programa de temperatura** do forno, a secção *Oven* dispõe de uma tabela onde podem ser definidos os tempos de espera e taxas de variação de temperatura. O gráfico na parte de cima da janela mostra um gráfico com o plano de temperatura atual.

- 8) Configurar as definições do **Detetor** na seção **Detector**. A temperatura, bem como os caudais de gases de alimentação e *makeup* podem ser definidos nesta secção.

- 9) Pressionar **OK** quando finalizadas as alterações.

III. Cromatogramas obtidos ao longo do trabalho de estágio para as amostras de condensado de aroma de maçã

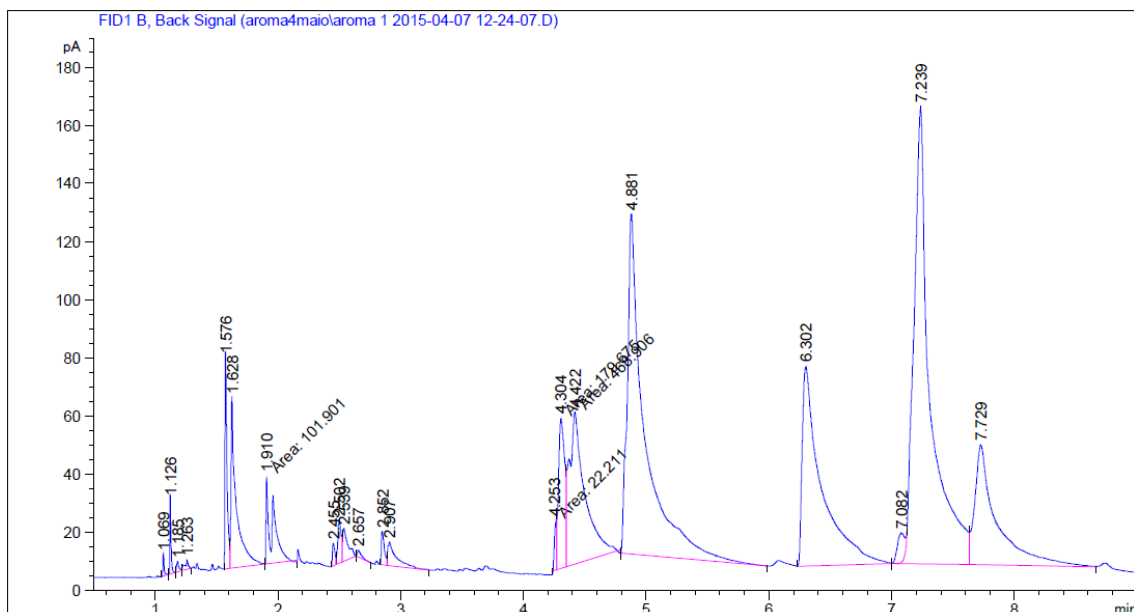


Figura I Cromatograma associado à amostra AT1, programa 1.

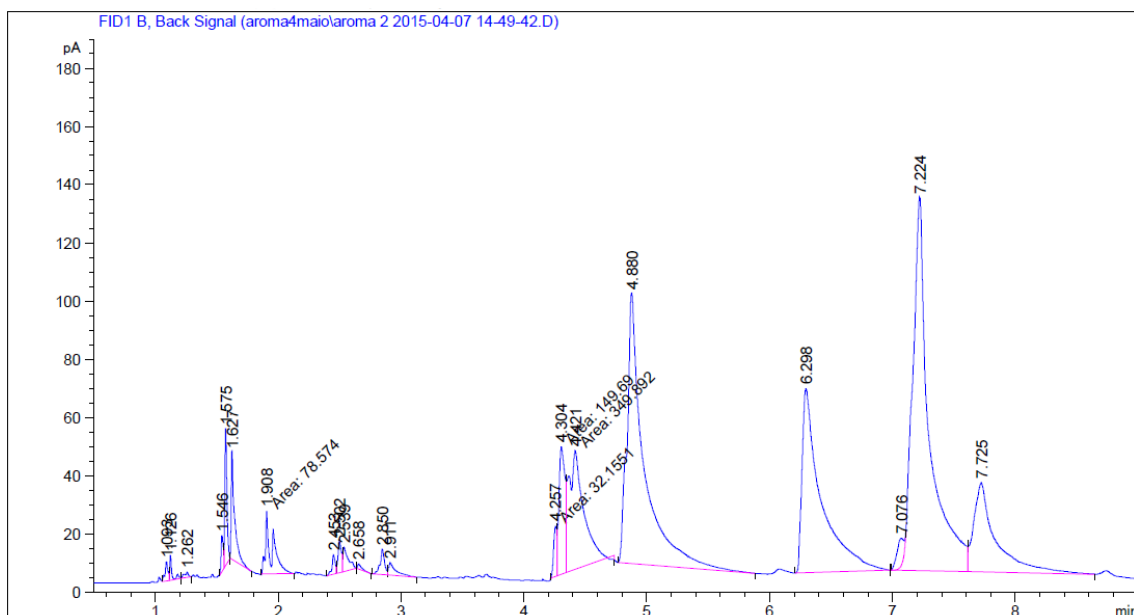


Figura II Cromatograma associado à amostra AT2, programa 1.

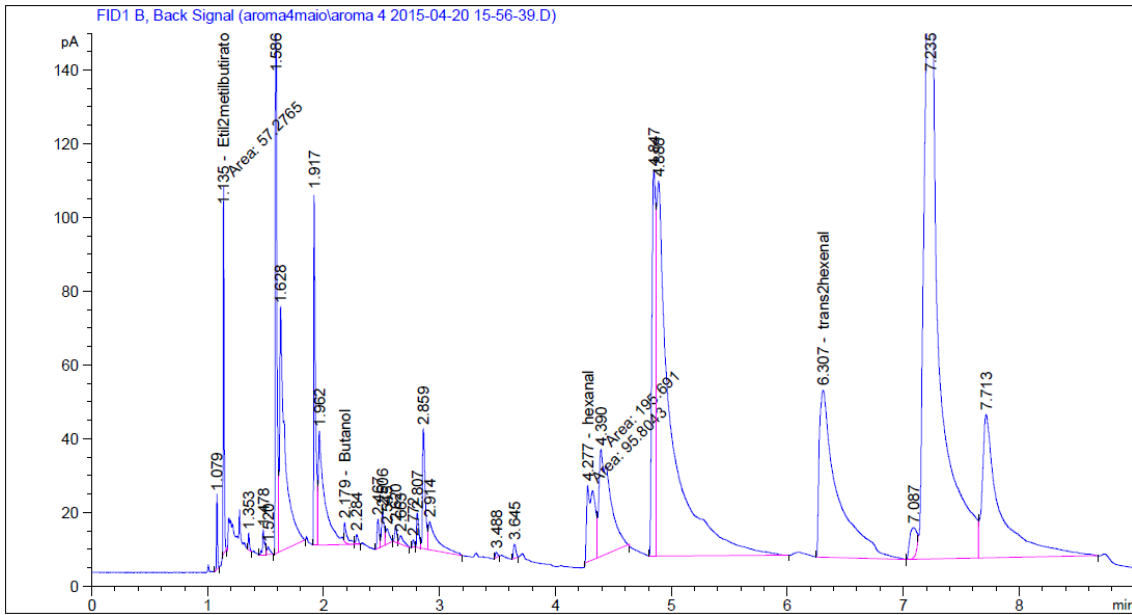


Figura III Cromatograma associado à amostra AF1, programa 1.

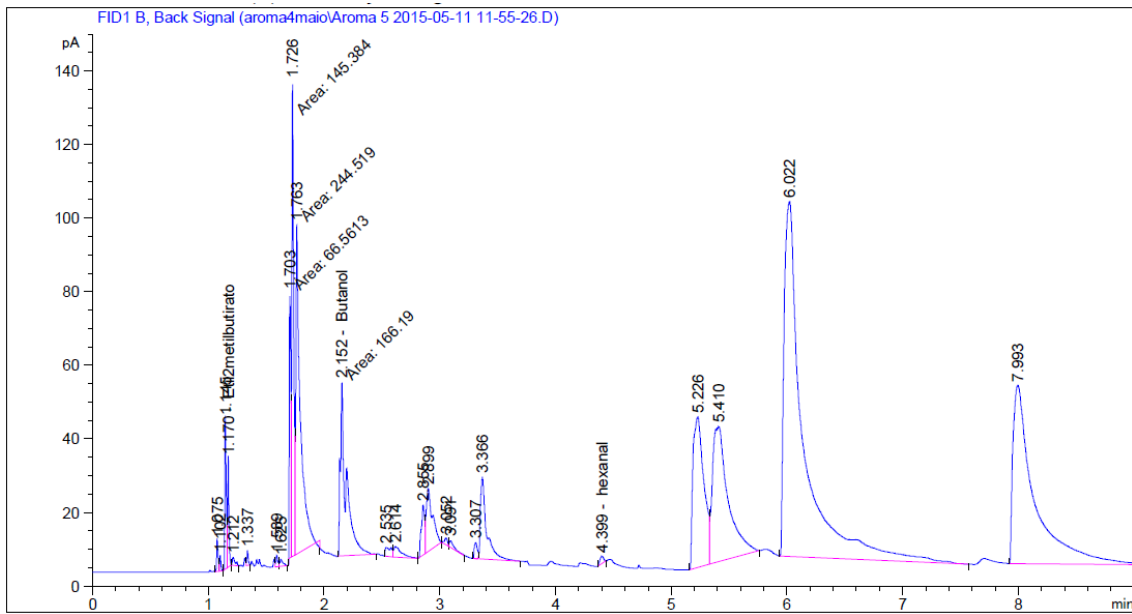


Figura IV Cromatograma associado à amostra AT3, programa 2

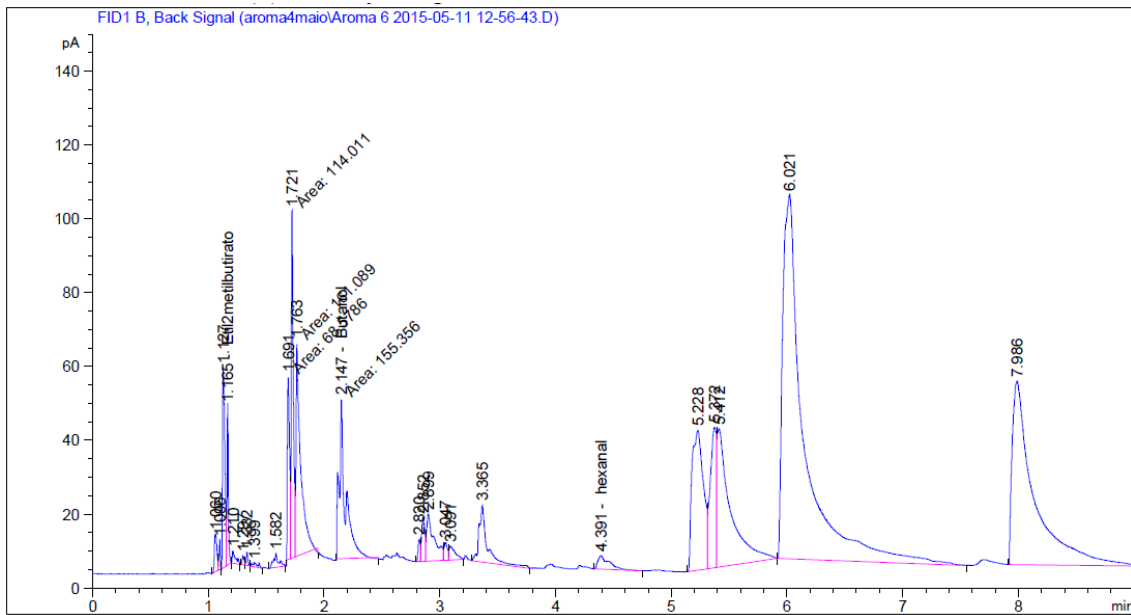


Figura V Cromatograma associada à amostra AF2, programa 2.

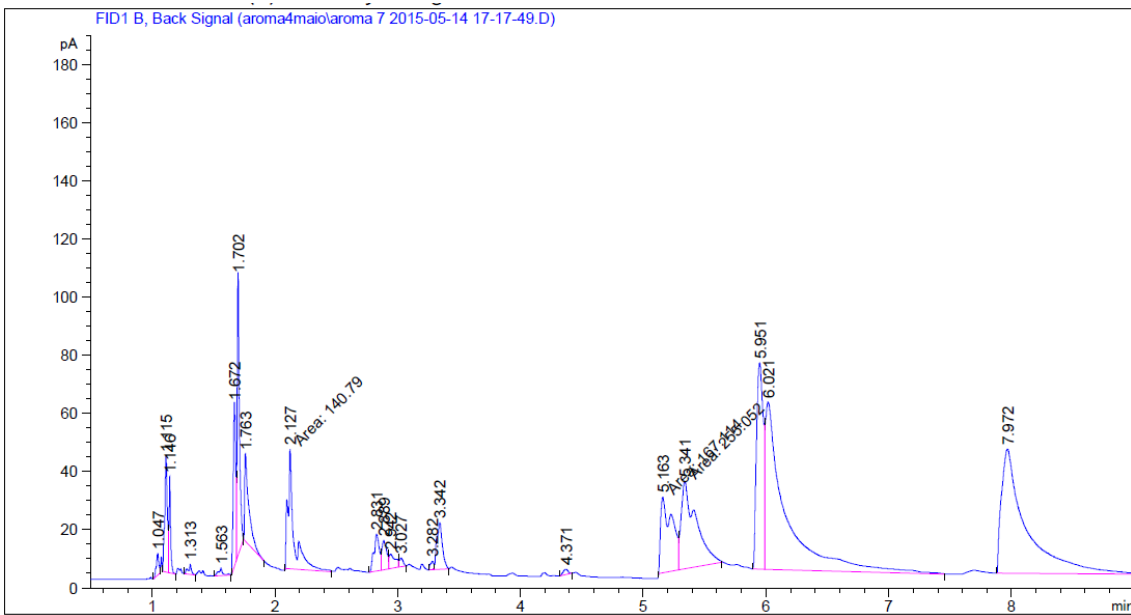


Figura VI Cromatograma associado à amostra AF3, programa 2.

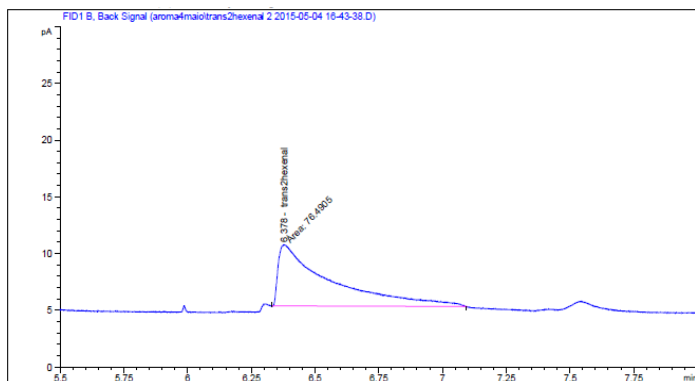


Figura VII Padrão de trans-2-hexenal 6,7 µg/L

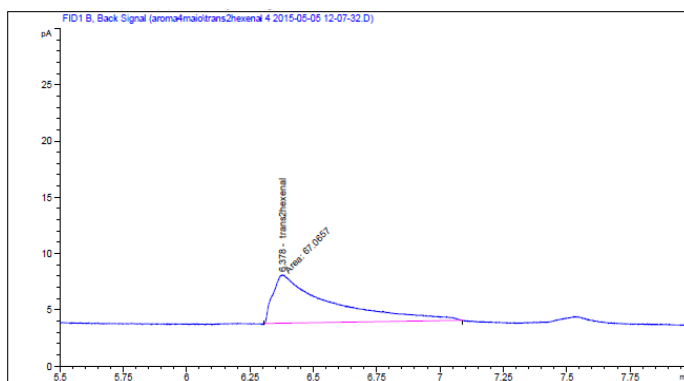


Figura VIII Padrão de trans-2-hexenal 6,9 µg/L

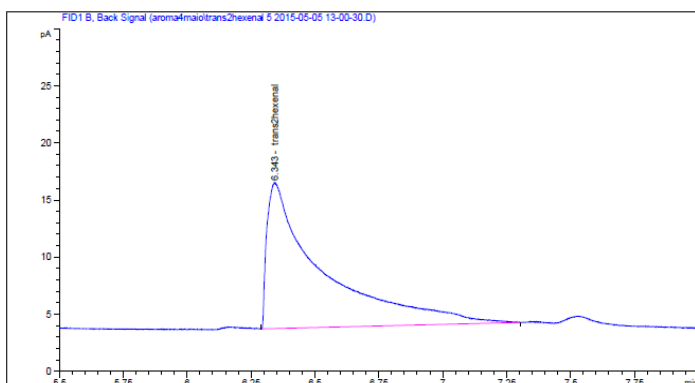


Figura IX Padrão de trans-2-hexenal 27,7 µg/L

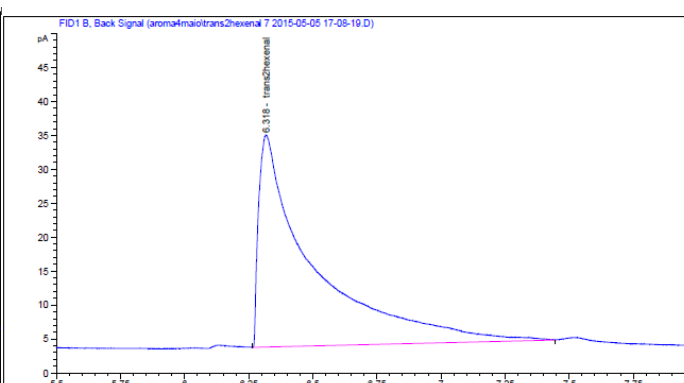


Figura X Padrão de trans-2-hexenal 69,3 µg/L

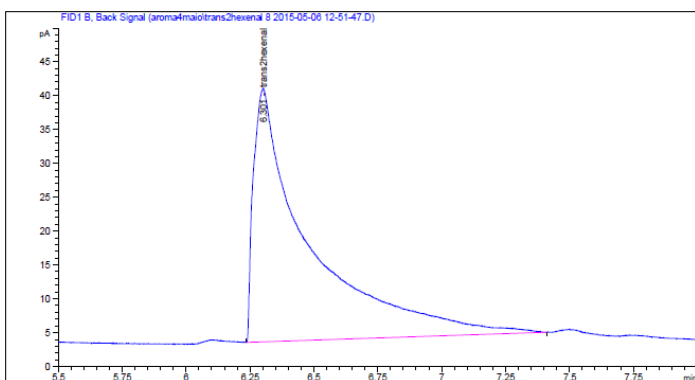


Figura XI Padrão de trans-2-hexenal 104 µg/L

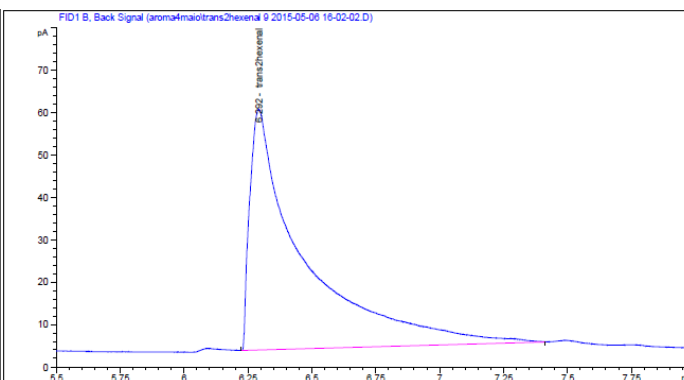


Figura XII Padrão de trans-2-hexenal 138,7

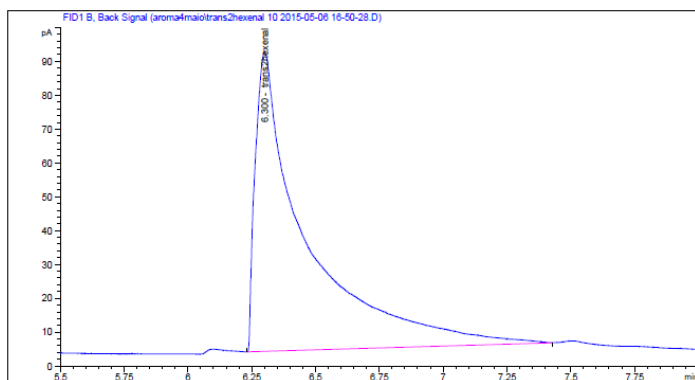


Figura XIII Padrão de trans-2-hexenal 208 µg/L

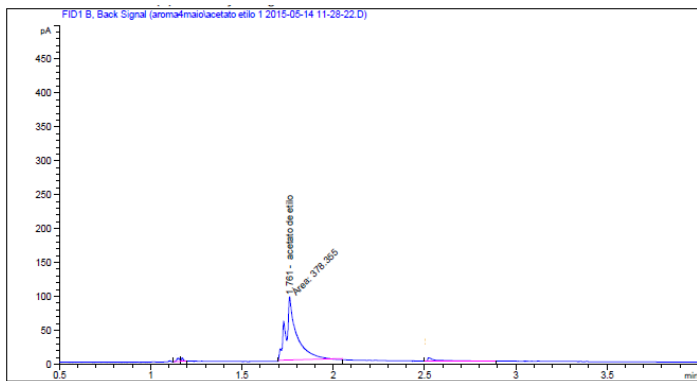


Figura XIV Padrão de acetato de etilo 150 µg/L

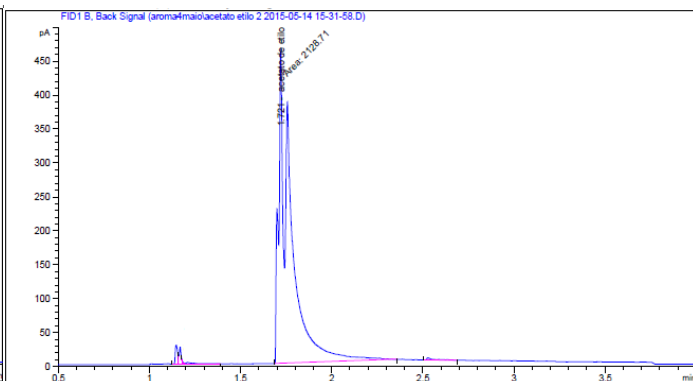


Figura XV Padrão de acetato de etilo 1500 µg/L

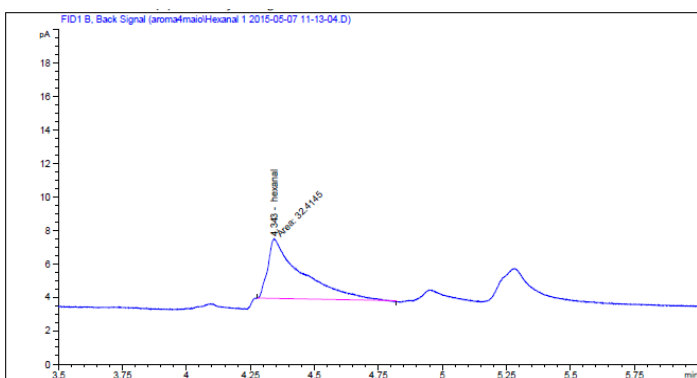


Figura XVI Padrão de hexanal 20 µg/L

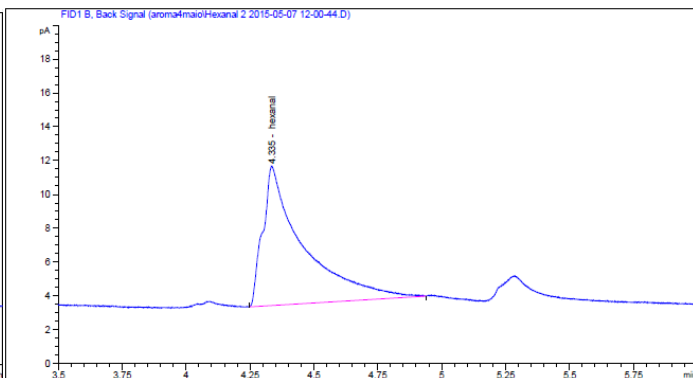


Figura XVII Padrão de hexanal 60 µg/L

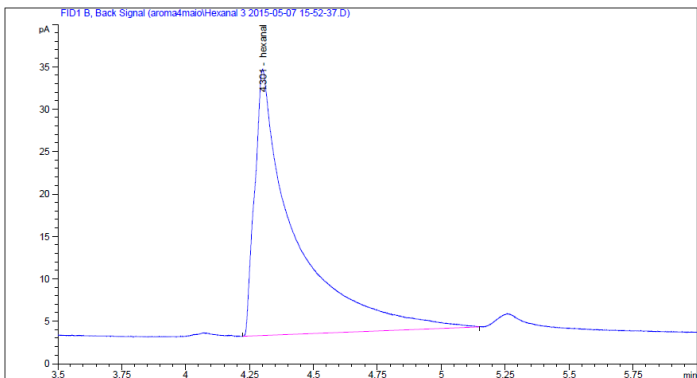


Figura XVIII Padrão de hexanal 200 µg/L

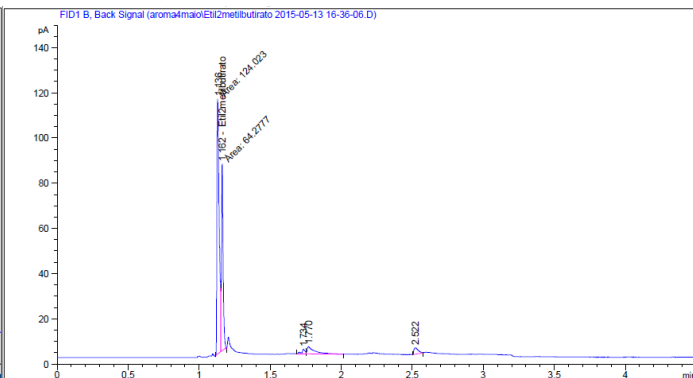


Figura XIX Padrão de etil 2-metilbutirato 133 µg/L

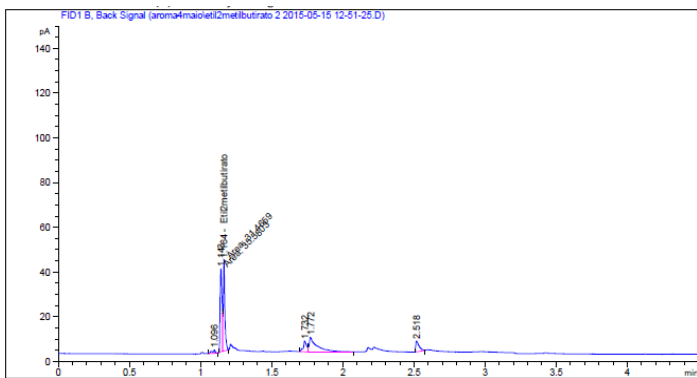


Figura XX Padrão de etil 2-metilbutirato 66,7 µg/L

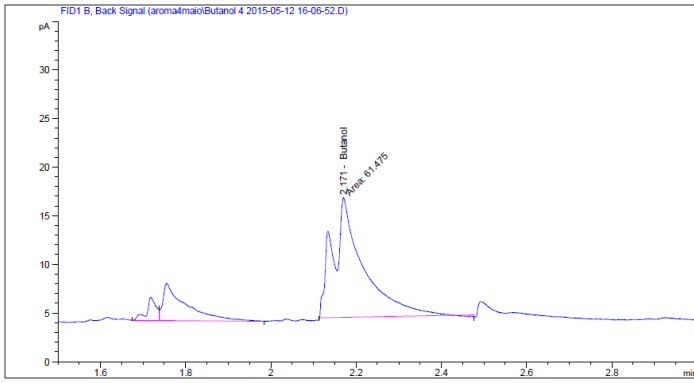


Figura XXI Padrão de butanol 100 µg/L

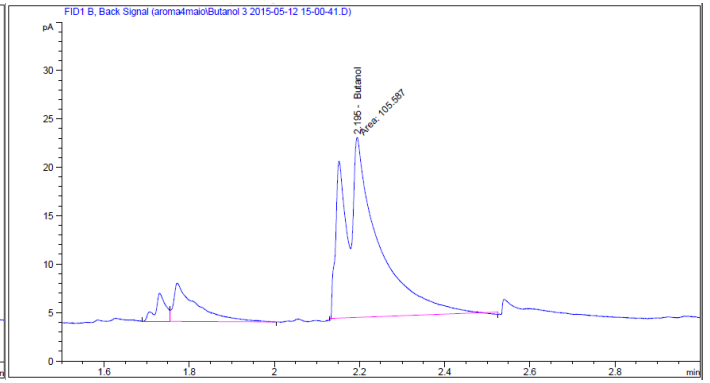


Figura XXII Padrão de butanol 190µg/L

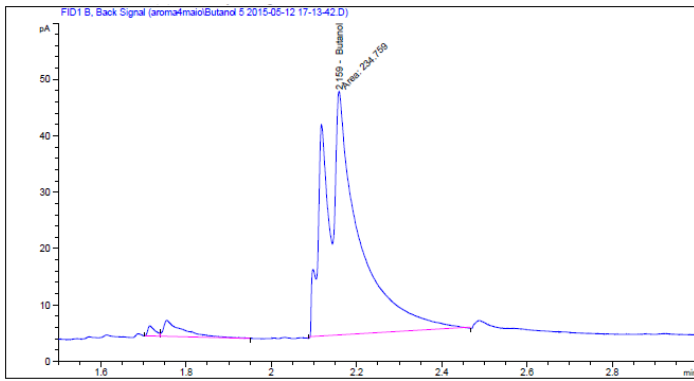


Figura XXIII Padrão de butanol 500µg/L