



**Ana Cláudia Abreu
Neves Paixão**

**Otimização da produção de sumos concentrados:
análise da turbidez do sumo de maçã e dos compostos
voláteis do aroma de pera**



**Ana Cláudia Abreu
Neves Paixão**

**Otimização da produção de sumos concentrados:
análise da turbidez do sumo de maçã e dos compostos
voláteis do aroma de pera**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, com especialização em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho, Bolseira de Pós-Doutoramento, e do Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor associado com agregação, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos pelo incansável apoio durante mais estes dois anos de vida académica.

o júri

presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

orientador

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

arguente

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

agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutora Elisabete Coelho e Professor Doutor Manuel António Coimbra, por toda a orientação prestada, disponibilidade e auxílio dedicado, quer à distância como presencialmente, durante a execução deste trabalho.

Ao Engenheiro Oswaldo Trabulo, pela oportunidade proporcionada para a realização do estágio na Indumape e pela disponibilidade e apoio prestados durante o seu decorrer.

À Engenheira Andreia Lopes, por todo o conhecimento transmitido e apoio dados ao longo do estágio, assim como pela companhia e amizade.

A todos os restantes membros da Indumape, que também contribuíram para o meu crescimento na empresa. Obrigado pelo conhecimento, paciência, simpatia e por todos os momentos agradáveis que me proporcionaram.

A todos os meus amigos por terem participado em mais esta etapa da minha vida e que sempre acreditaram em mim, apoiando-me e incentivando-me diariamente na conclusão deste percurso.

E por fim, mas não menos importante, aos meus pais, irmãos, sobrinha, cunhadas, primo e restantes familiares por toda a dedicação, força e ânimo dados durante todo o meu percurso académico, contribuindo para chegar hoje onde cheguei.

palavras-chave

Sumo concentrado de maçã, turbidez, pectina metilesterase, poligalacturonase, condensado de aroma de pera, acetato de butilo, acetato de hexilo.

resumo

A Indumape, Industrialização de Fruta S.A. é uma empresa sediada em Pombal, considerada o maior transformador de fruta para a produção de sumos concentrados, essencialmente de maçã e pera Rocha. O fabrico destes sumos tem vindo a ganhar popularidade por constituírem um produto com um mínimo grau de processamento e que mantém as características originais da fruta utilizada. No entanto, um dos principais problemas inerentes a este tipo de indústria é a turbidez elevada devido à presença de partículas em suspensão, por insolubilização de fragmentos de amido e pectina. A recuperação dos compostos de aroma durante a produção de concentrados é também motivo de interesse. Desta forma, a dissertação de Mestrado em ambiente empresarial na Indumape teve como objetivo estudar a influência na turbidez do sumo concentrado da atividade das enzimas pectina metilesterase e poligalacturonase das maçãs em diferentes alturas do ano e quantificar compostos voláteis do condensado de aroma de pera com o objetivo de melhorar o controlo de qualidade efetuado sobre este produto. A determinação da atividade da enzima pectina metilesterase foi efetuada pela quantificação do metanol libertado pela reação do pó de acetona, contendo a enzima extraída das maçãs, com a pectina, pela técnica de microextração em fase sólida em espaço de cabeça acoplada à cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (HS-SPME/GC-FID). A atividade da enzima poligalacturonase foi determinada com base no método de viscosimetria. Ambas as enzimas apresentaram maior atividade em maçãs processadas muito depois da colheita. No entanto, verificou-se um aumento de turbidez nos sumos concentrados de maçã produzidos com frutos processados mais tardiamente, provavelmente devido a uma maior atividade enzimática, que levou a uma maior extensão da hidrólise das pectinas. A quantificação de compostos voláteis do condensado de aroma de pera foi efetuada no sistema HS-SPME/GC-FID. Várias amostras de condensado recém-produzido foram sujeitas à quantificação de dois compostos de interesse, o acetato de butilo e o acetato de hexilo. A quantificação destes compostos voláteis foi implementada na empresa e a gama de concentrações para os dois compostos de interesse foi de 3,52 g/L a 13,6 g/L para o acetato de butilo e de 0,520 g/L a 1,22 g/L para o acetato de hexilo. Mensalmente, verificaram-se variações em ambos os compostos analisados, nomeadamente nos meses de novembro, dezembro e janeiro, provavelmente devido ao estado de maturação em que as peras se encontravam. Por sua vez, verificou-se também que, apesar do acetato de butilo estar em maior concentração do que o acetato de hexilo, este último foi o que apresentou maior índice de aroma, podendo ser um dos compostos que mais contribui para o odor a pera no aroma produzido na Indumape.

keywords

Apple juice concentrate, turbidity, pectinmethylesterase, polygalacturonase, pear aroma, butylacetate, hexylacetate

abstract

Indumape – Industrialização de Fruta, S.A. is a company placed in Pombal, considered the largest fruit transformer to produce concentrate juices, including apple and pear of Rocha variety. Fruit juice concentrates with minimum degree of processing, retaining the original characteristics of the fruit, are highly valorized. Juice turbidity is the major technological problem in juice concentrate industry, caused by the suspension particles of degraded starch and pectin origin. This industry is also a producer of fruit aroma aqueous solutions resultant from the evaporation during juice concentrate production. These aroma compounds arise from several families of volatiles. Thus, with this work it is intended to understand how the activity of the enzymes pectinmethylesterase and polygalacturonase from apples processed along the year influence juice concentrate turbidity. Also, it aims to quantify the technologically relevant pear volatile compounds, allowing to improve the quality control applied to this product. The determination of pectinmethylesterase activity was accomplished by quantification of methanol released when the apple's acetone powder, which contains the enzymes, was in contact with pectin, using headspace solid phase microextraction technique coupled to gas chromatography with flame ionization detector (HS-SPME/GC-FID). The activity of polygalacturonase was determined by viscosimetry. Both enzymes' activity was higher when apples were processed later. However, there was an increase in concentrate apple juice turbidity when produced with apples processed later, probably due to the higher enzymatic activity, leading to a higher extend of pectin hydrolysis. The quantification of pear volatiles was performed by HS-SPME/GC-FID, two compounds of interest were selected, butyl acetate and hexyl acetate. The methodology for quantification of these two pear volatile compounds was implemented at the company, allowing a range of concentrations from 3.52 g/L to 13.6 g/L for butyl acetate and 0.520 g/L to 1.22 g/L for hexyl acetate. Monthly, it was observed some variations in both compounds analyzed, namely in the months of November, December, and January, probably due to differences in pear maturation state. It was also verified that although butyl acetate had higher concentration than hexyl acetate, the last one was the compound that had the highest aroma index, so it may be one of the compounds that contribute most to pear odor in the aroma produced at Indumape.

Índice

Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Abreviaturas	xiii
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1. Apresentação da empresa Indumape – Industrialização de Fruta, S.A.....	3
1.2. Etapas do processo de produção de sumo concentrado de maçã e de pera	3
1.3. Matérias-primas utilizadas na produção de sumos concentrados de maçã e pera	7
1.3.1. Características importantes da maçã e da pera na Indústria de sumos concentrados: Polissacarídeos pécnicos	9
1.4. Os polissacarídeos pécnicos e sua influência na turbidez do sumo concentrado	12
1.5. O estado de maturação da maçã e sua influência na turbidez do sumo concentrado	14
1.6. Enzimas de clarificação: pectinases e amilases	15
1.6.1. Pectina metilesterase (PME) e Poligalacturonase (PG).....	18
1.7. O produto secundário resultante da produção de sumo concentrado de pera.....	19
1.7.1. Biossíntese de compostos voláteis.....	20
1.7.2. Caracterização do condensado de aroma de pera: compostos de interesse	21
1.7.3. Extração, identificação e quantificação de compostos voláteis do condensado de aroma de pera por SPME e GC-FID	25
1.8. Objetivos.....	27
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	29
2.1. Amostragem.....	31
2.1.1. Maçãs.....	31
2.1.2. Condensado de Aroma de Pera.....	31
2.2. Análise da atividade enzimática da pectina metilesterase por SPME e GC-FID	31
2.2.1. Preparação do pó de acetona de maçã	31
2.2.2. Descrição da metodologia SPME	32
2.2.3. Separação, identificação e quantificação do metanol por GC-FID, resultante da reação entre a pectina e a enzima	33
2.3. Análise da atividade enzimática da poligalacturonase com base no método de viscosimetria	34
2.4. Identificação e quantificação dos compostos voláteis do condensado de aroma de pera por HS-SPME/GC-FID	35

2.4.1. Descrição da metodologia SPME	35
2.4.2. Separação, identificação e quantificação dos compostos voláteis do condensado de aroma de pera por GC-FID	37
2.4.3. Análise Sensorial dos condensados de aroma de pera	38
2.5. Análise estatística	38
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	39
3.1. Análise da atividade da enzima pectina metilesterase: identificação e quantificação do metanol libertado após reação da pectina com os diferentes pós de acetona.....	41
3.2. Análise da atividade da enzima poligalacturonase com base no método viscosimétrico	47
3.3. Identificação e quantificação dos compostos voláteis no aroma de pera	50
Capítulo 4 – Conclusão e Perspetivas Futuras.....	59
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas.....	63
Capítulo 6 – Anexos.....	71
6.1 Anexo I: Fluxograma de Produção de sumo concentrado de maçã e pera, aplicado na Indumape – Industrialização de Fruta, S.A.....	73
6.2 Anexo II: Cromatogramas das diferentes amostras de condensado de aroma de pera analisadas ao longo do trabalho de estágio	74
6.3 Anexo III: Cromatogramas das soluções PME 1 (S44) e PME 3 (S15) analisadas em diferentes tempos de extração	78
6.4 Anexo IV: Curvas de Calibração dos padrões externos utilizados na deteção da atividade da pectina metilesterase e na caracterização do condensado de aroma de pera	81

Índice de Figuras

Figura 1 – Ilustração da estrutura química da estrutura primária dos polissacarídeos pécticos ²⁹	10
Figura 2 - Estrutura química da Homogalacturonana (Adaptado de ²⁸).	11
Figura 3 - Estrutura da pectina (Adaptado de ³¹).	13
Figura 4 - Modo de ação das pectinases. A seta indica o local onde cada uma das pectinases atua sobre as substâncias pécticas (Adaptado de ³).	17
Figura 5 - Reação de desmetilesterificação da cadeia de homogalaturonana da pectina catalisada pela PME ⁵²	18
Figura 6 - Reação de hidrólise das ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ do ácido poligalacturónico por parte da poligalacturonase ⁴⁹	19
Figura 7 - Via metabólica da produção de acetato de butilo (Adaptado de ⁶⁰).	24
Figura 8 - Via metabólica da produção de acetato de hexilo (Adaptado de ^{60, 61}).	24
Figura 9 - Via metabólica da produção de (E,Z)-2,4-decadienoato de etilo (Adaptado de ⁵⁷).	24
Figura 10 - Preparação do pó de acetona de maçã.	32
Figura 11 - Cromatograma obtido da análise do padrão metanol (7910 mg/L).	42
Figura 12 - Cromatograma obtido após análise da solução de pectina com o pó de acetona da semana 44 (T1).	43
Figura 13 - Cromatograma obtido após análise da solução de pectina com o pó de acetona da semana 4 (T1).	43
Figura 14 - Cromatograma obtido após análise da solução de pectina com o pó de acetona da semana 15 (T1).	44
Figura 15 - Concentração de metanol libertado ao longo do tempo de extração ($\mu\text{mol MeOH}/\text{min}$).	46
Figura 16 - Expressão da atividade de enzima poligalacturonase numa solução pectato 3% e sua relação com a turbidez dos lotes de sumo concentrado de maçã produzidos durante as mesmas semanas de onde se obteve os pós de acetona.	49
Figura 17 - Cromatograma obtido da análise do padrão acetato de butilo (14,08 mg/L).	52
Figura 18 - Cromatograma obtido da análise do padrão acetato de hexilo (3,48 mg/L).	52
Figura 19 - Cromatograma associado à amostra de condensado de aroma de pera AFDez.53	

Figura 20 - Concentração do acetato de butilo e do acetato de hexilo nas diferentes amostras de condensado de aroma de pera analisadas mensalmente.....	55
Figura 21 - Índice de aroma do acetato de butilo e de hexilo nas diferentes amostras de condensados de aroma de pera analisadas mensalmente.....	57
Figura 22 - Comparação das concentrações com os índices de aroma do acetato de butilo e do acetato de hexilo.	57
Figura 23 - Processo de Produção de sumo concentrado de maçã e de pera (Adaptado dos documentos fornecidos pelo Departamento de Qualidade da Indumape).	73
Figura 24 - Cromatograma associado à amostra AFOut.	74
Figura 25 - Cromatograma associado à amostra AFNov.	74
Figura 26 - Cromatograma associado à amostra AFDez.	75
Figura 27 - Cromatograma associado à amostra AFJan.	75
Figura 28 - Cromatograma associado à amostra AFFev.	76
Figura 29 - Cromatograma associado à amostra AFMar.	76
Figura 30 - Cromatograma associado à amostra AFAbr.	77
Figura 31 - Cromatograma associado à amostra AFMai.	77
Figura 32 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 1 (5 min).	78
Figura 33 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 1 (15 min).	78
Figura 34 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 1 (30 min).	79
Figura 35 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 3 (5 min).	79
Figura 36 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 3 (15 min).	80
Figura 37 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 3 (30 min).	80
Figura 38 - Curva de calibração do metanol.	81
Figura 39 - Curva de calibração do acetato de butilo.	81
Figura 40 - Curva de calibração do acetato de hexilo.	82

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição de um sumo de maçã a 11,2°Brix e a 70°Brix (valores aproximados) ²⁵	8
Tabela 2 – Principais compostos voláteis que caracterizam o aroma de pera ^{55, 57, 63, 64} . LPS – limite de percepção sensorial.....	22
Tabela 3 - Condensados de aroma de pera recolhidos ao longo de cada mês.	36
Tabela 4 - Diferentes condições testadas durante o processo de otimização da metodologia.	41
Tabela 5 - Concentração de metanol libertado durante a reação da solução de pectina 3,5 mg/mL com os diferentes pós de acetona.....	44
Tabela 6 - Resultados dos ensaios de otimização para a determinação do tempo de escoamento de diferentes soluções de pectato.....	47
Tabela 7 – Resultado dos ensaios de otimização para a determinação da redução da viscosidade da solução pectato 3% para diferentes quantidades de pó de acetona.	47
Tabela 8 - Resultados da ação dos diferentes pós de acetona na solução de pectato.	48
Tabela 9 - Compostos voláteis do condensado de aroma de pera identificados por GC-MS.	51
Tabela 10 - Concentrações dos compostos voláteis de interesse nas diferentes amostras de condensado de aroma de pera sujeitas a análise cromatográfica.....	54
Tabela 11 – Resultados da análise sensorial realizada às diferentes amostras de condensado de aroma de pera frescos analisados.....	58

Abreviaturas

- AG – Arabinogalactanas
- Ara – Arabinose
- °Brix – Unidade do teor de sólidos solúveis totais
- Dha – ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico
- Gal – Galactose
- GalA – Ácido galacturónico
- GC-FID – Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama
- HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Point*
- HG – Homogalacturonanas
- HS-SPME – Microextração em fase sólida em espaço de cabeça
- Kdo – ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico
- LOX – Via das lipoxigenases
- NTU – Unidade Nefelométrica de Turbidez
- PE - Pectinaesterase
- PG – Poligalacturonase
- PL – Pectina liase
- PME – Pectina metilesterase
- PTFE – Politetrafluoretileno
- PVDF – Fluoreto de polivinilideno
- Rha – Ramnose
- RG-I – Ramnogalacturonanas do tipo I
- RG-II – Ramnogalacturonanas do tipo II
- UF – Ultrafiltração
- XG – Xilogalacturonana

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Apresentação da empresa Indumape – Industrialização de Fruta, S.A.

A Indumape – Industrialização de Fruta, S.A., é uma empresa do setor alimentar e que se encontra localizada no Parque Industrial Manuel da Mota, no concelho de Pombal. Esta empresa foi fundada em 1997, mas só iniciou a sua atividade no ano 2007. Nos dias de hoje, é considerada o maior transformador de fruta portuguesa, com recolha a nível nacional, exportando cerca de 90% da sua produção para países dentro e fora da União Europeia, sendo as empresas alemãs, espanholas e inglesas os maiores clientes. O foco desta empresa passa pela produção de sumos concentrados, nomeadamente de maçã e pera rocha, e mais recentemente de uva branca. Para além dos concentrados de fruta, produzem também os aromas respetivos às frutas utilizadas, sendo que estes produtos são destinados à indústria de sumos, néctares, vinagres e sidras, tanto a nível nacional como internacional.

1.2. Etapas do processo de produção de sumo concentrado de maçã e de pera

A Indumape, como foi referido anteriormente, é uma empresa que tem como principal objetivo a produção de sumos concentrado de fruta. Este processo produtivo, otimizado para a produção de concentrado de maçã e de pera, passa por 5 fases principais: moagem e prensagem, recuperação do aroma, clarificação, ultrafiltração e concentração¹. Resumidamente, o concentrado de maçã e de pera é obtido a partir de fruta fresca, madura mas não podre, que é previamente lavada e selecionada antes de ser processada. As maçãs e as peras são trituradas e esmagadas para delas se extrair o sumo, procedendo-se depois à clarificação do mesmo, na qual a pectina é hidrolisada em polímeros de menor dimensão de modo a que fiquem solúveis e não em suspensão evitando que o produto final fique turvo. Seguidamente, o sumo é filtrado para que fique claro e límpido. Por fim, o concentrado do sumo de fruta a 70°Brix resultante do processo de concentração é imediatamente arrefecido e posteriormente armazenado em frio¹. De seguida, apresentam-se todas as etapas detalhadas do processo de produção utilizado para a produção de concentrado de maçã e pera.

A produção dos sumos concentrados inicia-se quando a matéria-prima chega à indústria, normalmente por camião. Habitualmente, a fruta não fica mais do que 48h exposta e armazenada nos silos. Há que ter em consideração que, tendo em conta o processo de produção utilizado, é quase impossível saber qual a origem da matéria-prima após esta etapa e que variedade de maçã ou pera deu origem ao produto final obtido.

Seguidamente, a matéria-prima é retirada dos silos e é transportada através de um sistema de canais de água subterrâneo até uma passadeira. Aqui a fruta sofre uma lavagem com o auxílio de injetores de água montados na passadeira e, também por aspersão, é aplicado peróxido de hidrogénio, um agente antimicrobiano^{2, 3}. Há que ter em conta que a água utilizada nesta fase do processo, proveniente da rede ou do concentrador, é continuamente reciclada, sendo renovada periodicamente de forma a contribuir o mínimo possível para o aumento da carga microbiana na fruta. Por fim, a fruta é novamente inspecionada enquanto circula pela passadeira, com o intuito de separar a que não esteja em condições aceitáveis para processamento, ou de remover qualquer tipo de objeto estranho que possa danificar os equipamentos ou comprometer a qualidade do produto final.

Após a lavagem da fruta, esta cai para dentro do equipamento de moagem (moinho), para sofrer uma trituração por ação mecânica de lâminas rotativas, até a matéria-prima ser reduzida ao estado de polpa. A moagem é uma etapa fundamental tendo em conta que serve, nomeadamente, para aumentar o rendimento de extração do sumo durante a prensagem. É também nesta fase que são aplicadas enzimas de maceração, essencialmente pectina metilesterase, com a função de facilitar a prensagem, aumentando o rendimento de extração do sumo. Por fim, a polpa de fruta obtida é mantida durante aproximadamente 45 minutos dentro dos tanques de polpa, para evitar a sobrecarga das prensas e permitir uma completa atuação da enzima adicionada.

Segue-se a fase de prensagem, onde a polpa anteriormente obtida é continuamente espremida e lavada, de modo a extrair a maior quantidade de sumo possível^{2, 3}. É durante esta fase que também é gerada uma quantidade elevada de subproduto, designado por bagaço de maçã ou pera. Este subproduto é expelido devido à rotação das prensas e conduzido para um local de armazenamento adequado, fora da zona de produção, para depois ser transportado para clientes que o utilizam para alimentação animal direta. Já o sumo extraído é temporariamente armazenado nos tanques de sumo cru.

A desaromatização constitui o primeiro tratamento térmico a que o sumo de fruta, designado nesta fase por sumo cru, é sujeito. Este processo ocorre agora dentro do evaporador para que o sumo seja submetido a uma temperatura de 90 a 120°C, até adquirir 20°Brix. O facto deste sumo cru ser sujeito a temperaturas elevadas, faz com que ocorra uma volatilização de grande parte dos compostos orgânicos voláteis, sendo arrastados pelo vapor de água libertado durante o processo^{3, 4}. A condensação ocorre simultaneamente ao

tratamento térmico, ainda dentro do concentrador, mas já no bloco de condensadores. O produto que aqui se obtém designa-se por condensado de aroma de maçã ou pera e é, conseqüentemente, enviado para os tanques de armazenamento de aroma. Após o armazenamento, este é sujeito a análises físico-químicas que consistem na leitura da temperatura, pH, massa volúmica, teor de álcool e análise sensorial. De seguida, ocorre a fase de clarificação que consiste num tratamento enzimático a que o sumo desaromatizado é sujeito, envolvendo a adição de enzimas amilolíticas e pectinolíticas⁵⁻⁸, para que se dê a degradação do amido e da pectina existente no sumo, respetivamente. Este processo ocorre em tanques específicos, preparados para a eventual adição das enzimas ou de carvão ativado. A adição de carvão ativado tem como principal função tornar o concentrado mais claro, caso assim seja necessário^{9, 10}. Em relação às enzimas, estas encontram-se num *cocktail* enzimático e têm igualmente como objetivo a clarificação do sumo por diminuição da turbidez. Este *cocktail* é essencialmente constituído por uma mistura de pectina metilesterases, pectina liases, poligalacturonases, α -amilases e amiloglucosidases, tendo todas temperaturas ótimas entre os 20 e os 55°C. Estas enzimas atuam em conjunto sobre os principais polissacarídeos presentes na fruta, de modo a que o sumo clarificado adquira as características organoléticas exigidas pelos clientes. Este passo é crucial, pois uma baixa eficiência dos tratamentos enzimáticos dão origem a problemas na turbidez e na cor do sumo^{5, 8}. Assim, a presença de elevadas quantidades de polissacarídeos, nomeadamente amido e pectina, devido a uma hidrólise incompleta, dá origem a um aumento da turbidez do sumo clarificado. A turbidez é, desta forma, caracterizada pela presença de partículas que permanecem em suspensão^{6, 7} e é indicada em termos de unidades de turbidez (NTU – Nephelometric Turbidity Unit). Segundo especificações da Indumape, os valores de turbidez para o sumo concentrado de maçã e pera devem ser inferiores a 3 NTU e 5 NTU, respetivamente. Para além disso, elevadas quantidades de pectina pode levar à rápida colmatação das membranas de ultrafiltração, bloqueando os poros destas^{8, 11}. Para este processo o sumo desaromatizado foi concentrado a 20°Brix, permanecendo nos tanques durante cerca de uma hora, a uma temperatura de 50 – 55°C^{3, 12, 13}.

O sumo anteriormente sujeito ao tratamento enzimático é agora filtrado, por ultrafiltração de fluxo tangencial³. Durante este processo ocorre a passagem do sumo através de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Esta técnica é comumente utilizada na indústria de sumos de fruta, devido ao funcionamento em contínuo e baixos custos de

produção e à elevada eficiência, no que diz respeito à capacidade de retenção de alguns microrganismos, partículas coloidais e macromoléculas^{8, 11, 14}. Daqui se obtém o sumo filtrado que é posteriormente armazenado. No entanto, a ultrafiltração é acompanhada por um processo de diafiltração, a qual pode também contribuir para a ocorrência de problemas graves de turbidez. A diafiltração consiste assim na adição de água de forma contínua para que o sumo até então obtido possa ser diluído, enquanto o produto filtrado é removido^{11, 15}. Esta água é adicionada até que o teor de sólidos solúveis do filtrado atinja valores suficientemente baixos previamente estabelecidos ($\approx 6^\circ\text{Brix}$), com o objetivo de ter um máximo de rendimento do próprio processo de ultrafiltração. Embora este processo na presença de baixas concentrações de macromoléculas (ex: pectina) maximize o fluxo, o volume total de produto para diafiltrar é elevado, o que aumenta o tempo de processo¹¹. Quer isto dizer que o tempo adequado de adição de água é um parâmetro crucial para atingir uma duração mais curta da diafiltração e também uma concentração desejável do filtrado ($10\text{-}18^\circ\text{Brix}$)^{11, 16}. Deste modo, caso haja a retenção de um grande número de partículas ou macromoléculas nas membranas e conseqüentemente a sua introdução no filtrado a turbidez do concentrado obtido pode aumentar, para valores superiores aos estabelecidos^{11, 17}.

Por sua vez, o sumo filtrado é encaminhado de volta para os evaporadores onde sofre um segundo tratamento térmico^{2, 3}. A concentração até ao valor final do teor em sólidos solúveis (70°Brix) é realizada em várias fases, sendo aplicadas várias temperaturas à medida que este teor aumenta. O sumo é sujeito a um primeiro choque térmico com temperaturas que rondam os 100°C e que permitem elevar os sólidos solúveis até aproximadamente 45°Brix . A partir daqui a redução do teor de água até 70°Brix é efetuada lentamente, a temperaturas que não ultrapassam os 45°C .

Por fim, ocorre o processo de homogeneização, onde produto até então obtido é transportado através de tubagens para um dos tanques de armazenamento de homogeneização existentes. É durante esta fase que a maioria das análises físico-químicas são realizadas, sendo que os parâmetros avaliados incluem o teor de sólidos solúveis ($^\circ\text{Brix}$), turbidez (NTU), cor, claridade, pH e acidez por titulação. Para além destas, também são efetuadas análises adicionais no laboratório de controlo da qualidade, tais como a medição da turbidez do sumo filtrado na UF e do concentrado que se encontra na tubagem. É necessário realizar esta constante monitorização, tendo em conta que permite acertar os vários parâmetros do sumo concentrado, de modo a ir ao encontro das exigências dos

diversos clientes. Para finalizar, quando um lote se dá por terminado, este pode ser imediatamente encaminhado para a expedição ou pode ser enviado para os tanques de armazenamento refrigerado ou reservatórios exteriores. Nesta fase, são recolhidas amostras finais para posteriores análises físico-químicas e microbiológicas.

Concluindo, e como referido anteriormente, os lotes de sumo concentrado finalizados são armazenados em tanques de armazenamento refrigerados ou são expedidos da unidade fabril. O sumo concentrado produzido pode ser expedido por cisterna de 25 toneladas, bidons de 270 kg e combos de 1.000 kg. No entanto, a fase de embalamento em bidons ou combos, constitui um ponto crítico de controlo no plano HACCP da linha de produção, uma vez que é a única situação em que o concentrado abandona o circuito fechado das tubagens.

1.3. Matérias-primas utilizadas na produção de sumos concentrados de maçã e pera

A maçã, designada cientificamente por *Malus domestica*, é um fruto climatérico, cultivado principalmente nas regiões temperadas do mundo³. É proveniente da macieira e pertence à família das *Rosaceae*. A maçã apresenta uma composição variada, mas equilibrada devido aos valores de açúcar e acidez equilibrados, tendo assim um sabor agradável que geralmente é bem apreciado pelos consumidores. É uma fruta constituída maioritariamente por água ($\approx 85\%$)^{3, 18}, sendo que as restantes percentagens se dividem pela quantidade de hidratos de carbono, proteínas, lípidos, minerais, os quais se encontram dissolvidos e vitaminas, nomeadamente vitaminas do complexo B^{3, 18}. É ainda muito rica em fibra (6,2%)¹⁹, o que corresponde aos níveis elevados de polissacarídeos pécticos, dos quais se destaca a pectina (1-1,5%)²⁰, contendo também celulose, hemiceluloses e lenhinas^{3, 18}. As fibras solúveis, nomeadamente as pectinas, em conjunto com o amido (1%)²¹, são quem constitui um maior problema a nível da produção de sumos concentrados e clarificados^{5, 13, 22}. No entanto, há que ter em conta que os componentes da maçã podem sofrer alterações consoante o local de cultivo, a variedade, as condições climatéricas, mas maioritariamente com o estado de maturação do fruto¹⁸.

A maçã é um dos frutos mais consumidos e produzidos, tanto a nível nacional, como internacional¹⁸. Relativamente a Portugal, de acordo com o Instituto Nacional de Estatística, no período de 2013-2014, uma média de 29,3 kg de maçã *per capita* foram consumidos, evidenciando o consumo crescente desta fruta no nosso país e, conseqüentemente, a sua importância na dieta dos portugueses²³.

A maçã, para além de ser consumida como fruto, pode ser também utilizada para a produção de sumos. Segundo o Codex Alimentarius²⁴, um sumo de fruta pode definir-se como um produto não fermentado, mas fermentável, destinado ao consumo direto e que pode ser obtido por um processo mecânico de esmagamento ou de prensagem de frutas²⁴. O sumo pode apresentar-se clarificado ou sob a forma de concentrado, podendo ser posteriormente reconstituído adicionando água, mantendo sempre a qualidade e as características do sumo, independentemente do tipo de processamento a que é sujeito³. A composição de um sumo de maçã diluído (11,2°Brix) ou concentrado (70°Brix) encontra-se na tabela abaixo (Tabela 1)²⁵.

Tabela 1 – Composição de um sumo de maçã a 11,2°Brix e a 70°Brix (valores aproximados)²⁵.

Componentes	Sumo a 11,2°Brix	Sumo a 70°Brix
	Concentração (g por 100 g)	
Água	89,1	14,3
Proteínas	0,1	0,63
Gordura total	0,1	0,63
Total HC expressos em monossacarídeos	10,0	62,5
Mono+dissacarídeos	9,9	61,8
Fibra alimentar	0,2	1,25
Amido	0	0
Ácidos orgânicos	0,40	2,5
Ácidos gordos	0,1	0,63
Saturados	0	0
Monoinsaturados	0	0
Polinsaturados	0,1	0,63
Ácido linoleico	0,1	0,63
Cinzas	0,2	1,25
Vitaminas do complexo B (mg)	0,020	0,125
Vitamina C (mg)	40	250

O processo de concentração é uma das principais operações realizadas na indústria de sumos de fruta, onde o teor de sólidos solúveis do sumo é aumentado de 10-18°Brix para 65-75°Brix, por remoção da água por evaporação¹⁶. Esta redução do volume de líquido irá diminuir os custos de transporte, armazenamento e embalagem. Por conseguinte, os

concentrados são bioquimicamente estáveis, pois apresentam maior resistência à deterioração microbiana e química do que os sumos originais, como resultado da redução da atividade de água, tendo um tempo de vida de armazenamento mais longo^{4, 16}. No entanto, o concentrado de maçã produzido tem vindo a demonstrar alguns problemas a nível de turbidez, pelo facto de ainda não existir um ajuste no que diz respeito à adição de enzimas durante este processo, tendo em conta as características da matéria-prima utilizada^{3, 13}.

À semelhança da maçã, a pera é outra fruta muito consumida por todo o mundo pela sua fragância original, aroma subtil, doçura e crocância²⁶. Pertence à família das *Rosaceae* e o género mais comum é a *Pyrus communis* L.^{3, 27} sendo a pera rocha a mais representativa em Portugal, representando 75% dos pomares de pereiras a nível nacional²⁷. Relativamente à composição da pera, a frutose é o seu principal açúcar e contém mais sorbitol do que glucose ou sacarose. Geralmente, os sólidos solúveis da pera encontram-se entre 8,4 e 11,2°Brix e o ácido predominante é o cítrico^{3, 26}. Para além disso, tal como a maçã, é muito rica em água (≈84%), fibra e micronutrientes.

Em relação ao consumo de pera em Portugal, de acordo com o Instituto Nacional de Estatística, no período de 2013-2014, uma média de 9,5 kg de pera *per capita* foram consumidos, sendo a seguir a maçã e à laranja o fruto cada vez mais consumido no nosso país, o que mostra a sua importância na dieta dos portugueses²³.

1.3.1 Características importantes da maçã e da pera na Indústria de sumos concentrados: Polissacarídeos pécticos

A parede celular vegetal é uma estrutura macromolecular complexa que envolve e protege a célula, sendo uma característica distintiva para a sua sobrevivência²⁸. A parede primária caracteriza-se por ter uma maior quantidade de pectina do que celulose em comparação com a parede secundária. Assim, a maior fração de polissacarídeos não celulósicos da parede primária são os polissacarídeos pécticos, que por sua vez têm um papel importante na determinação da robustez e flexibilidade dos tecidos. Portanto, os polissacarídeos pécticos são uma família de polissacarídeos estruturais, constituintes da lamela média e da parede celular de células vegetais. Estes polissacarídeos representam um grupo complexo de polissacarídeos que têm como cadeia principal resíduos de ácido galacturónico (GalA), unidos por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ ^{28, 29}. Os polissacarídeos pécticos incluem vários fragmentos de regiões ramificadas e lineares, covalentemente ligadas, sendo que as

classes estruturais destes polissacarídeos incluem homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) que incluem as cadeias de arabinogalactanas (AG) e arabinanas, ramnogalacturonanas tipo II (RG-II), xilogalacturonanas (XG) e apiogalacturonanas (ApG) (Figura 1)²⁸⁻³⁰.

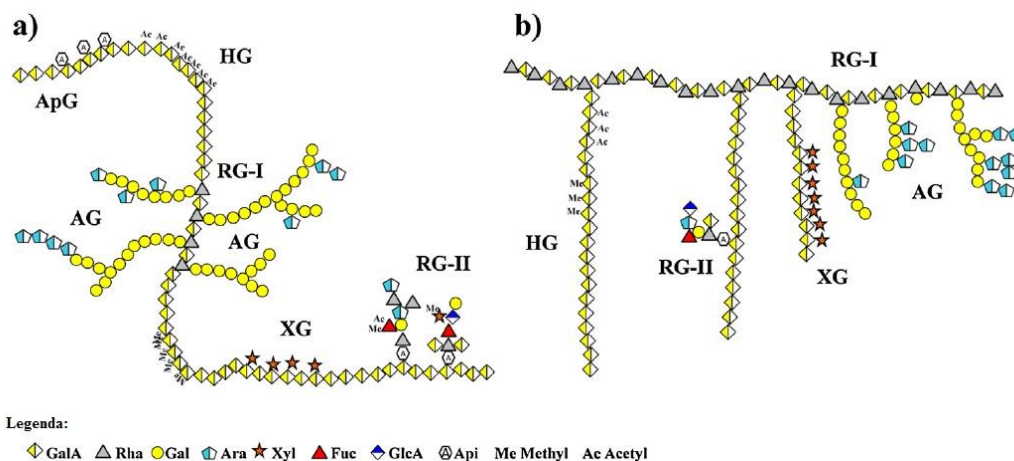


Figura 1 – Ilustração da estrutura química da estrutura primária dos polissacarídeos pécicos²⁹.

- Modelo clássico da molécula, sendo a cadeia principal constituída em grande parte por HG e RG-I.
- Modelo cuja cadeia principal é composta por RG-I e contém ramificações de HG, RG-II, XG e AG.

A HG é um polímero linear constituído por resíduos de D-ácido galacturónico (GalA) unidos por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ (Figura 2) e que pode ser responsável por mais de 60% das pectinas existentes na parede celular das plantas^{28, 31}. Os resíduos constituintes das HG podem ser metilesterificados no grupo carboxílico em C6 ou acetilados em O-2 e O-3 (Figura 2 a)).

No entanto, os resíduos de GalA não metilados em C6 encontram-se carregados negativamente e podem interagir ionicamente com o Ca^{2+} para formar um gel estável com outras moléculas pécicas. Isto pode verificar-se na Figura 2 (b) (complexo HG- Ca^{2+}). Este modelo, designado por modelo caixa de ovo, descreve o acondicionamento entre HG e o Ca^{2+} , induzindo a gelificação, que representa 70% do gel pécico na parede celular das plantas²⁸.

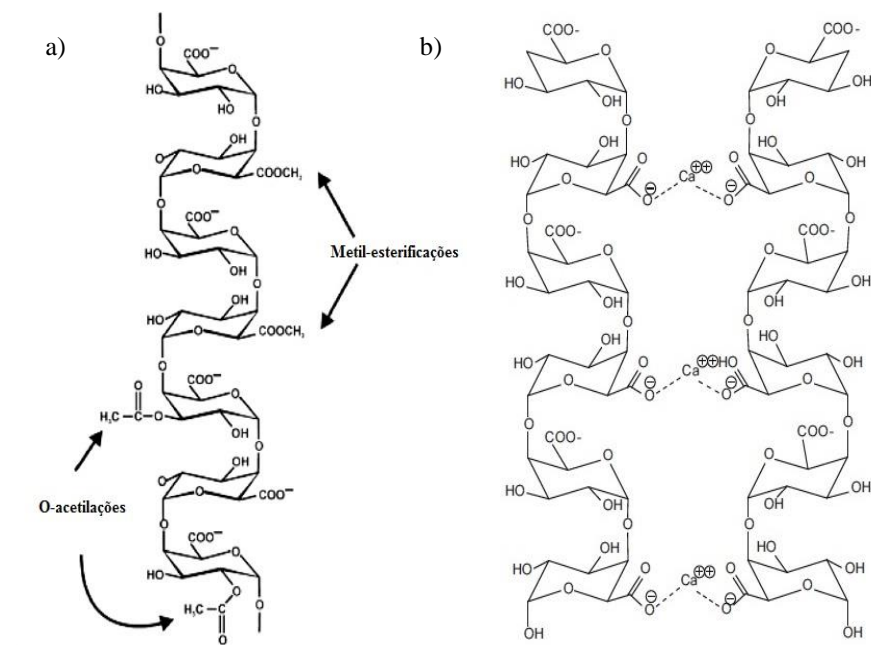


Figura 2 - Estrutura química da Homogalacturonana (Adaptado de ²⁸).

- Representação dos locais de metil-esterificação e *O*-acetilação dos resíduos de GalA.
- Representação do modelo caixa de ovos: reticulação polimérica (*crosslinking*) do cálcio em polissacarídeos de HG.

A RGI é constituída, na cadeia principal, por unidades repetidas de $(\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow n)$, que podem estar ramificadas em *O*-4 nos resíduos de ramnose (Rha), com cadeias laterais constituídas por resíduos de galactose (Gal) e/ou arabinose (Ara)^{28, 29, 31}. As RGII são descritas como sendo um heteropolissacarídeo complexo responsável por 10% das pectinas^{28, 29, 31, 32}. É ainda constituída por cadeias de, pelo menos, 8 resíduos de $\alpha\text{-D-GalpA}$, em ligação $(1\rightarrow 4)$, onde estão diretamente ligadas quatro cadeias de oligossacarídeos contendo resíduos de açúcares raros (2-*O*-metilfucose, 2-*O*-metilxilose, apiose, ácido acérico, DHA e KDO). As moléculas de xilogalacturonanas (XG) e de apiogalacturonanas (ApG) são constituídas por uma cadeia principal de resíduos de GalA ligados em $\alpha 1\rightarrow 4$, substituídos em *O*-2 ou *O*-3 por resíduos de D-xilose e apiose respetivamente, em ligação $\beta 1\rightarrow 3$ ^{28, 29}. Por fim, as moléculas de arabinogalactanas (AG) têm uma estrutura molecular complexa e de difícil caracterização, pois formam várias cadeias laterais ligadas às unidades de ramnose das ramnogalacturonanas. As AG podem ser também divididas em AG do tipo I que são pouco ramificadas com cadeias principais de $(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-galactose}$ ramificadas com arabinanas e do tipo II, que são altamente ramificadas, constituídas por cadeias principais de $(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galactose}$ ramificadas com cadeias de $(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-galactanas}$ ²⁹ e de arabinanas.

Entre os polissacarídeos existentes, as pectinas são os mais complexos do ponto de vista da organização estrutural e atividade funcional. Sendo componentes das células vegetais, executam várias funções biológicas em diferentes períodos de crescimento e desenvolvimento das plantas, devido à complexidade da sua estrutura^{28, 31, 33}, destacando-se a morfogénese, defesa, adesão célula-célula, estrutura da parede, expansão das células, porosidade da parede, ligação de iões, fatores de crescimento e enzimas, crescimento do tubo de pólen, hidratação da semente, queda de folhas, desenvolvimento de frutos^{31, 34}. Para além disso, devido à fácil gelificação a pectina tem sido amplamente utilizada na indústria alimentar, farmacêutica e de cosméticos^{31, 33}. Apesar deste tipo de polissacarídeos serem utilizados por apresentarem diversas vantagens, não só a nível alimentar, mas também de saúde^{29, 31, 33, 35}, podem constituir um fator negativo na produção de concentrados de fruta, nomeadamente de maçã, devido ao excesso de turbidez que lhes é associado²², por estas conterem elevadas quantidades de pectina (1 a 1,5%)^{20, 34, 36, 37}. Contudo, isto só se verifica caso os polissacarídeos não se encontrem hidrolisados e se forem insolúveis a 70°Brix. Para a resolução deste problema, neste caso associado à indústria de sumos concentrados, é essencial ter conhecimento sobre a sua estrutura no momento do processamento tecnológico. Dependendo da estrutura dos polissacarídeos pécticos, há diferentes enzimas que podem atuar. No caso de os grupos carboxílicos da pectina se encontrarem esterificados, a pectina metilesterase terá de atuar primeiro para que as pectinases, como as poligalacturonases, consigam clivar a cadeia principal³⁸.

1.4. Os polissacarídeos pécticos e sua influência na turbidez do sumo concentrado

Como já tem vindo a ser referido, a pectina é um dos principais componentes estruturais da parede celular da planta^{28, 30, 31, 34, 36, 37, 39}. Este polissacarídeo é composto por uma cadeia principal de unidades de ácido D-galacturónico, unidas por ligações α -1,4^{30, 31, 34, 36, 37} (Figura 3). O ácido galacturónico compreende assim aproximadamente 70% da estrutura da pectina³¹. No entanto, a incorporação de resíduos de açúcares simples, tais como a ramnose, a arabinose, a galactose e a xilose na constituição deste polissacarídeo, vai permitir a formação de cadeias laterais e a ramificação de estruturas. Relativamente aos grupos carboxílicos do ácido galacturónico, estes podem encontrar-se parcialmente esterificados por grupos metilo e parcialmente ou completamente neutralizados por iões de sódio, potássio ou amónio.

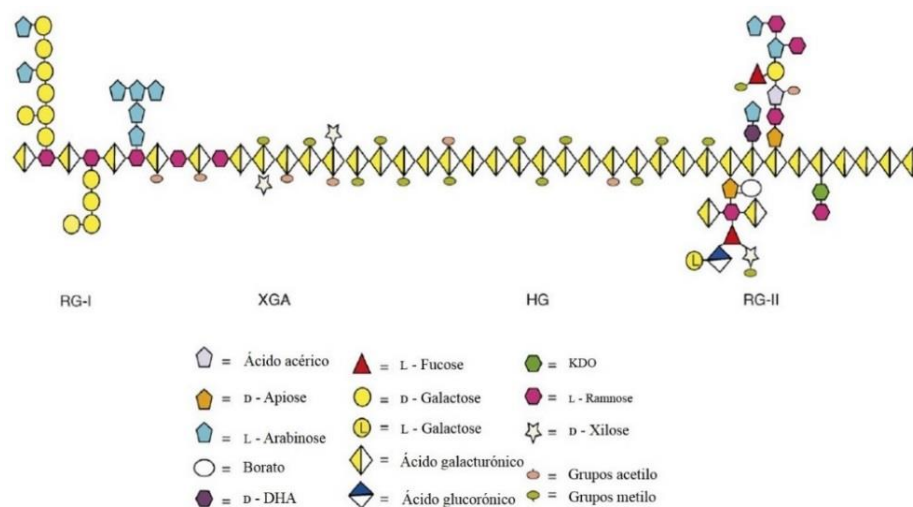


Figura 3 - Estrutura da pectina (Adaptado de ³¹).

Na indústria alimentar a pectina é conhecida principalmente como um agente gelificante e é amplamente utilizada na produção de compotas e geleias e sumos de fruta³⁶. No entanto, como tem vindo a ser referido, na produção de sumos esta fácil gelificação pode causar problemas a nível da turbidez, quando a pectina não hidrolisada está presente em grandes quantidades. Assim, a turbidez existente num sumo é caracterizada pela presença de partículas que permanecem em suspensão^{6,7}. Como a parede celular dos frutos é constituída essencialmente por celulose, hemiceluloses, pectinas e proteínas, das quais algumas hemiceluloses (nomeadamente xiloglucanas), pectinas e proteínas (ligadas a arabinogalactanas) incorporam o sumo obtido durante a prensagem da matéria-prima, proporciona-se a formação de uma nebulosidade, a qual se designa por turbidez do sumo^{3,6,7,40}. Esta estreita relação entre a estrutura e a função, tem vindo a motivar a investigação para que haja uma melhor compreensão da estrutura dos polissacarídeos, nomeadamente da pectina, com o eventual objetivo de perceber de que modo a pectina influencia a turbidez nos sumos. Como também a adaptação do processo usando diferentes enzimas pectinolíticas em função da estrutura da pectina e outros polissacarídeos pécnicos.

1.5. O estado de maturação da maçã e sua influência na turbidez do sumo concentrado

A maturação é um dos fatores determinantes para a qualidade da fruta e, conseqüentemente para a do sumo produzido a partir desta^{38,41}. Assim, é um fator importante no que diz respeito à firmeza do fruto, pois a diminuição desta facilita a infecção patogénica e, por sua vez, aumenta a probabilidade de ocorrer decomposição, reduzindo o prazo de validade e a qualidade do fruto. Para além disso apresenta também um papel importante na indústria de sumos de fruta, influenciando tanto a dose como o tempo de atuação das enzimas. Isto pode ser justificado pelo facto do processo de amadurecimento estar diretamente relacionado com as diversas alterações bioquímicas que podem ocorrer sobre o amido e os polissacarídeos pécticos da fruta.

A matéria-prima quando é rececionada pode encontrar-se em diversos estados de maturação, dependendo da altura em que foi colhida. No início da produção intensiva de concentrado de maçã (fase de campanha), as maçãs podem encontrar-se num estado de maturação mais baixo, portanto pouco maduras e, conseqüentemente, a pectina constituinte esterificada e não hidrolisada. Um indicador do estado de maturação comercial e organolético da fruta é o rácio açúcar/ácido^{2, 3}. Para a maçã, este rácio deve encontrar-se entre 10-18 (°Brix/% w/w ácido), sendo que o ideal é ≈ 15 ². No início do processo de amadurecimento, portanto quando a fruta se encontra ainda pouco madura, o rácio açúcar/ácido é baixo (10) devido à baixa concentração de açúcar e à elevada concentração de ácido. Durante o decorrer do processo de amadurecimento, os ácidos presentes na fruta vão-se degradando e, conseqüentemente, o teor de açúcar aumentando, assim como o rácio que atinge um valor superior.

Relativamente aos componentes da parede celular e da lamela média das maçãs, durante o amadurecimento sofrem variações estruturais significativas, alterando assim a textura e firmeza do fruto^{38, 42}. Nesta fase, os polissacarídeos pécticos passam por um processo de desesterificação e de despolimerização, o que contribui de forma significativa para o amolecimento do tecido. Isto leva a que a atividade de algumas enzimas, como a pectina metilesterase, poligalacturonase, pectato liase e β -galactosidase, aumente ao longo do processo, sendo que a PG e a PME são as duas principais enzimas que atuam sobre a pectina da parede celular. A PME é importante no amadurecimento da maçã pois é responsável pela desesterificação dos grupos éster metílico da pectina, permitindo a ação de outras enzimas

como a PG^{38, 43}. Já esta última é responsável pela despolimerização da pectina. Considera-se então que todo este processo de maturação é determinante na diminuição do teor de polissacarídeos na maçã. Da mesma forma, o rendimento do sumo é determinado pelo grau de maturação, sendo expresso essencialmente pelo amolecimento das paredes celulares⁴². Por sua vez, a solubilidade dos polissacarídeos pécticos da fruta também constitui um fator importante no desenvolvimento de turbidez de um sumo concentrado. Durante o amadurecimento, como acima referido, as enzimas PME e PG atuam sobre os resíduos de ácido galacturónico da cadeia principal da pectina. Contudo, quando a fruta ainda se encontra pouco madura, a expressão da atividade destas enzimas intrínsecas ao fruto é menor, contribuindo para a presença de polissacarídeos pécticos ainda muito polimerizados e ramificados³⁸. Por outro lado, as enzimas comerciais normalmente utilizadas na fase de clarificação não contêm enzimas capazes de hidrolisar as cadeias laterais. Deste modo, os constituintes destas cadeias permanecerão no sumo concentrado, contribuindo também para os valores elevados de turbidez.

Assim, a turbidez medida em NTU do sumo concentrado produzido, no início da campanha será sempre mais alta e, conseqüentemente indesejável, pelo facto das maçãs se encontrarem num estado de maturação mais baixo e com um maior teor de polissacarídeos pécticos na sua constituição.

1.6. Enzimas de clarificação: pectinases e amilases

Como descrito no capítulo inicial, os sumos de fruta concentrados são clarificados durante o seu processamento, a fim de evitar esta turbidez indesejável, nebulosidade e sedimentos nos produtos finais obtidos⁶. A nível da indústria de sumos concentrados, esta clarificação envolve o uso de enzimas durante a fase de despectinização, tais como as pectinases e amilases ou a adição de gelatina, sílica e/ou bentonite como agentes clarificantes, para realizar a degradação de pectina e amido e subsequente precipitação físico-química de sedimentos e componentes ativos de nebulosidade^{6, 7}, tais como proteínas e polifenóis⁴⁴. Assim, a resolução do problema de turbidez elevada existente nos sumos concentrados provocada pela presença de polissacarídeos passa pela adição de enzimas pectinolíticas e amilolíticas.

As enzimas amilolíticas presentes no tecido vegetal são responsáveis pela degradação do amido em unidades mais pequenas e que podem contribuir de igual forma para a turvação por se agregarem entre si ou através da formação de complexos proteína-amido⁷. Os exemplos de enzimas usadas para este efeito são nomeadamente as amilases (α e β) e as amiloglucosidases, que se distinguem pela estrutura e pela função que desempenham⁴⁵. Estas enzimas podem dividir-se em dois grupos, as *endo*-amilases e as *exo*-amilases. A α -amilase, considerada uma *endo*-amilase, é responsável pela clivagem das ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ no meio da cadeia da molécula de amido^{45, 46}. Desta hidrólise rápida da amilose no interior da cadeia, resultam maioritariamente dois açúcares, maltose e maltotriose. As *exo*-amilases correspondem à β -amilase e às amiloglucosidases, estas últimas também designadas por glucoamilases. No entanto, enquanto a β -amilase só é responsável pela clivagem das ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ do terminal da cadeia, as amiloglucosidases atuam também sobre as ligações $\alpha 1 \rightarrow 6$. Por sua vez, as *exo*-amilases, através da hidrólise lenta dos oligossacarídeos obtidos inicialmente pela ação da α -amilase, originam glucose.

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo de enzimas que degradam polissacarídeos pécnicos e que se podem dividir por diversas classes^{5, 36, 47-49}. As classes mais importantes de enzimas pectinolíticas utilizadas no tratamento de concentrado de maçã e pera são as pectinaesterases, *endo* e *exo* poligalacturonases e pectinaliases. Estas enzimas são usadas para aumentar o rendimento durante a obtenção de sumo na fase de moagem/prensagem e são também utilizadas para regular o grau de nebulosidade/turbidez, clarificando o sumo. As pectinaesterases são responsáveis pela desesterificação de um grupo metoxilo da estrutura da pectina dando-se a formação de ácido pécnico, as poligalacturonases pela hidrólise das ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ que unem os resíduos de GalA dos polissacarídeos pécnicos e as pectinaliases pela β -eliminação entre resíduos de ácido galacturónico esterificados (transeliminação - clivagem *trans*)^{5, 22, 50}. Na Figura 4 pode-se verificar o modo de ação de algumas destas enzimas³.

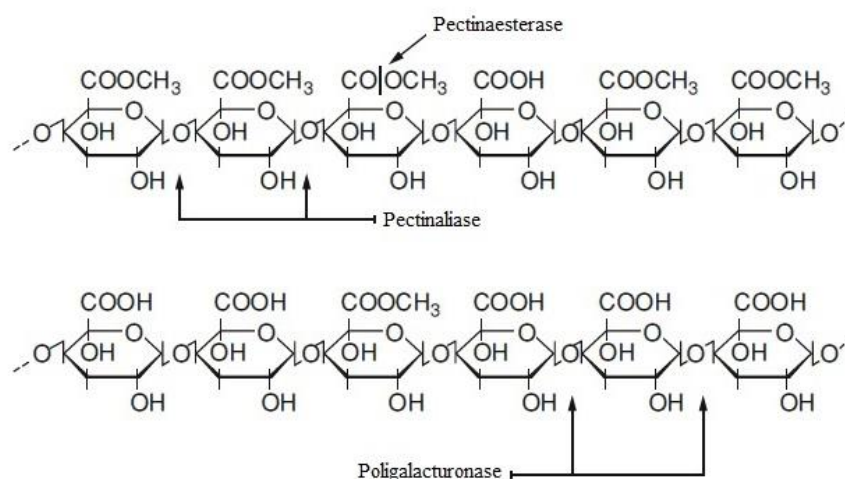


Figura 4 - Modo de ação das pectinases. A seta indica o local onde cada uma das pectinases atua sobre as substâncias pécicas (Adaptado de ³).

De modo a comprovar a eficiência destas enzimas, num estudo de Sorrivás *et al.*⁷ verificaram que ambas as enzimas tiveram um efeito positivo no que diz respeito à eliminação das substâncias responsáveis pela turbidez existente no sumo de maçã, visto que houve uma redução significativa dos teores de amido para níveis não detetáveis pelo teste do iodo e um aumento da mobilidade (potencial zeta) de partículas no sumo, devido à hidrólise da pectina. Noutro estudo de Schnurer *et al.*⁵¹ sugerem que os tratamentos com enzimas amilolíticas e pectinolíticas são adequados para prevenir a formação de aglomerados em sumos de maçã.

No entanto, tendo em conta que ambas parecem ter efeitos positivos na clarificação do sumo, é difícil recomendar qualquer uma destas enzimas como ideais para a prevenção da formação de aglomerados. Há que ter em conta a existência de alguns condicionantes, como o tipo de matéria-prima utilizada para a produção dos sumos concentrados e, conseqüentemente, a quantidade exata de enzimas comerciais a adicionar para que o processo de clarificação se dê com sucesso. Para avaliar a eficiência do tratamento enzimático, são realizados os testes do amido com a utilização de iodo e o da pectina com a utilização de etanol, para verificar a degradação de amido e pectina, respetivamente. No entanto, são métodos que não permitem aferir com grande rigor a extensão da hidrólise enzimática, sendo necessário a implementação de outro tipo de metodologias mais precisas no controlo da turbidez. Por outro lado, e como referido anteriormente, estas enzimas podem não ser capazes de hidrolisar totalmente as cadeias laterais dos polissacarídeos pécicos, resultando na permanência destas no sumo e contribuindo também para os valores elevados

de turbidez. Por fim, embora neste processo de clarificação se utilizem estas enzimas específicas e depois ocorra um processo de ultrafiltração, os polissacarídeos que tenham tamanho menor que os poros da membrana passam à mesma para o sumo, justificando também o aumento de fibras no concentrado e, conseqüentemente a turbidez.

1.6.1. Pectina metilesterase (PME) e Poligalacturonase (PG)

A pectina metilesterase é uma das enzimas chave no contexto de processamento de frutas e vegetais e é produzida por plantas, fungos e bactérias patogênicas^{47, 52}. Por um lado, a PME presente na planta (endógena) pode afetar positiva ou negativamente a qualidade estrutural dos alimentos de origem vegetal, a nível da estabilidade, viscosidade e textura. Por outro lado, juntamente com outras pectinases, a PME funciona como um auxílio ao processamento exógeno⁵². A importância do uso da pectina metilesterase a nível industrial tem vindo a ser reconhecido ao longo do tempo⁴⁷. A PME é uma enzima com origem microbiana ou vegetal e que catalisa a hidrólise específica da ligação do éster metílico em C6 dos resíduos de GalA na cadeia linear de HG da pectina, alterando assim o grau e o padrão de esterificação do grupo metilo^{43, 47, 52}. Ocorre assim uma reação de desmetilesterificação de unidades de GalA da pectina, gerando grupos carboxilo livres e libertando metanol (Figura 5).

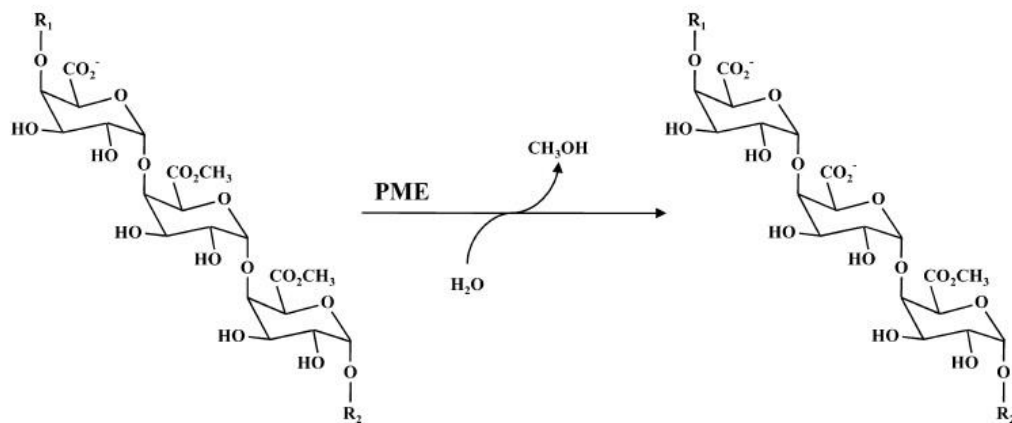


Figura 5 - Reação de desmetilesterificação da cadeia de homogalaturonana da pectina catalisada pela PME⁵². R1/R2 – Fragmento inicial e terminal do polímero de pectina.

A poligalacturonase é outra enzima importante no processamento de frutas e vegetais e que se divide em dois tipos, as *endo* e as *exo* poligalacturonases. Como referido anteriormente, esta enzima é responsável por catalisar a hidrólise das ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ existentes no ácido poligalacturónico^{5, 22, 50} (Figura 6). Enquanto que a *endo*-PG hidrolisa de forma aleatória as ligações glicosídicas do ácido péctico, a *exo*-PG fá-lo de uma forma sequencial. Para que esta enzima atue, a PME tem de atuar antes visto que o substrato da PG é o produto obtido da reação entre a PME e a pectina³. Na figura abaixo está representada a reação que ocorre entre o ácido poligalacturónico e a enzima poligalacturonase e o produto resultante.

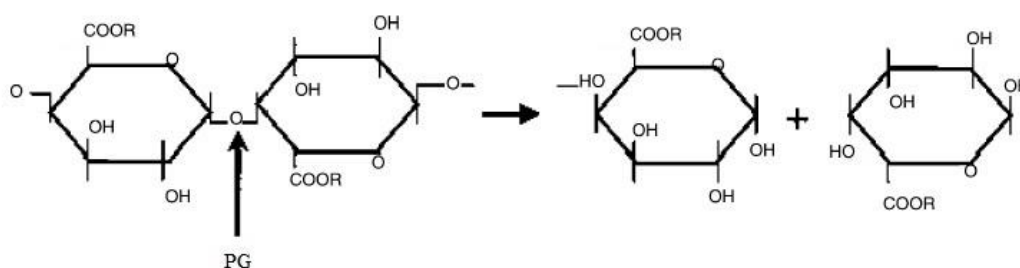


Figura 6 - Reação de hidrólise das ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ do ácido poligalacturónico por parte da poligalacturonase⁴⁹.
R - H

A ação de reduzir a turbidez pelas pectinases funciona, principalmente, através da desestabilização eletrostática das partículas de pectina em suspensão, carregadas negativamente^{6, 7}. As partículas de pectina que causam a turbidez do sumo são retidas em suspensão como resultado da repulsão de cargas entre as partículas. Após a hidrólise enzimática da pectina, o centro ativo da enzima, o qual está carregado positivamente, é exposto a reagir com a pectina carregada negativamente^{6, 7, 53, 54}. Uma vez que isto ocorre numa extensão significativa, dá-se a aglomeração de partículas. Por sua vez, estas podem ser removidas por filtração do sumo.

1.7. O produto secundário resultante da produção de sumo concentrado de pera

Tal como já foi referido sobre a maçã, também a pera é muito utilizada para a produção de sumos, quer concentrados ou diluídos. Para além do sumo concentrado, faz também parte deste processo a produção de um produto secundário, o aroma de pera. Como foi referido no capítulo inicial, este é obtido durante a fase de desaromatização, após sujeição do sumo cru a elevadas temperaturas no evaporador e condensador. As elevadas temperaturas vão fazer com que se dê a libertação dos compostos voláteis que caracterizam, neste caso, o aroma de

pera. As frutas produzem uma variedade de compostos voláteis que caracterizam os seus aromas característicos, contribuindo para o seu sabor e cheiro, afetando assim a qualidade sensorial dos produtos frescos e processados^{3, 55, 56}. Estes compostos correspondem essencialmente a ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas e terpenos. Ainda assim, o grupo éster é o mais representativo, representando 60 a 98% dos voláteis produzidos por este tipo de frutas²⁷. Os álcoois constituem o segundo grupo dominante, correspondendo entre 1,5 a 14% dos compostos voláteis característicos do aroma de pera⁵⁷. As restantes percentagens são distribuídas pelos outros tipos de compostos. Na pera, o acetato de hexilo, o (*cis, trans*)-2,4-decadienoato de etilo, o acetato de butilo e o α -farneseno, são os que mais contribuem para o seu aroma^{27, 58}. Contudo, a concentração destes compostos voláteis é geralmente baixa e pode ser afetada por uma série de fatores genéticos, agronómicos (variedade, condições climáticas, maturação) e tecnológicos (colheita, tratamentos pós-colheita, armazenamento e condições de processamento)^{3, 55, 56}.

1.7.1. Biossíntese de compostos voláteis

Antes do processo de amadurecimento da fruta, ocorre um aumento da síntese proteica e mudanças na atividade enzimática⁵⁷. Estes processos conduzem a uma acumulação de metabolitos e substratos, tais como ácidos gordos e aminoácidos (precursores primários) para a produção de compostos voláteis. Como estes se podem dividir em classes químicas (ésteres, álcoois, acetonas, entre outros), existem várias vias envolvidas na sua biossíntese. Os compostos voláteis importantes para o aroma são biossintetizados a partir de aminoácidos, hidratos de carbono e ácidos gordos^{55, 59-61}.

As reações envolvidas na síntese de compostos voláteis a partir de ácidos gordos são maioritariamente a α -oxidação, a β -oxidação e a via da lipoxigenase (LOX)^{55, 60-62}. Os compostos voláteis presentes na fruta intacta são formados através da via biossintética β -oxidação, no entanto quando os tecidos dos frutos já se encontram deteriorados, os compostos voláteis também são formados através da via das LOX. Os compostos daqui resultantes são maioritariamente ésteres, aldeídos e álcoois, responsáveis pelos aromas frescos. Contudo, tem-se verificado que o aumento da disponibilidade de ácidos gordos, juntamente com uma maior permeabilidade da membrana, durante o amadurecimento dos frutos pode permitir que a via das lipoxigenases se torne também ativa em tecidos intactos, funcionando como uma alternativa à β -oxidação. Os aminoácidos, (ex: alanina, valina,

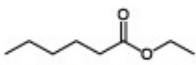
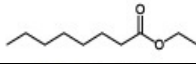
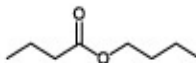
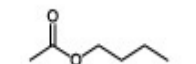
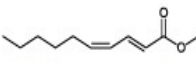
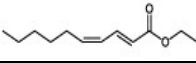
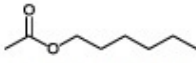
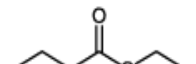
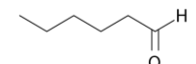
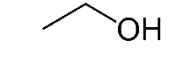
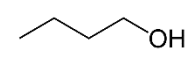
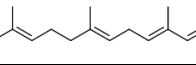
leucina, isoleucina, fenilalanina e ácido aspártico) também estão envolvidos na biossíntese de aromas agindo como precursores diretos^{55, 60, 61}. Estes podem ser submetidos a uma desaminação inicial ou transaminação, levando à formação do correspondente α -ceto-ácido. Posteriormente ocorre uma descarboxilação, seguida de reações de oxidação/redução e/ou esterificações, dando assim origem a aldeídos, ácidos, álcoois e ésteres. Mais especificamente, a leucina, isoleucina e valina podem ser precursores de compostos voláteis como o 3-metil-butanol, que por sua vez em reações de esterificação dão origem a ésteres característicos do aroma dos frutos. A metionina pode também ser um precursor de compostos voláteis contendo enxofre, tais como dimetildissulfeto e tioésteres e a alanina pode servir como um precursor para ésteres etílicos voláteis.

1.7.2. Caracterização do condensado de aroma de pera: compostos de interesse

Os compostos voláteis constituem um fator responsável pela qualidade sensorial dos produtos frescos e processados. Assim, a indústria de transformação de frutas e da produção dos seus derivados, tal como o sumo concentrado e o aroma, requer procedimentos analíticos que permitam a caracterização dos respetivos perfis voláteis. Tal é necessário, pois uma análise rápida dos componentes do aroma pode melhorar a padronização da qualidade do produto e proporcionar uma relação entre os conteúdos sensoriais e voláteis. Assim, relativamente aos compostos de interesse do aroma de pera e que, portanto, o caracterizam, como acima referido, são os ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas e terpenos^{3, 55, 56}.

Na Tabela 2 pode-se verificar alguns desses compostos, bem como as estruturas respetivas, concentrações, limite de perceção sensorial e descritor de aroma^{55, 57, 63, 64}. Através do rácio entre a concentração e o limite de perceção sensorial, é possível calcular o índice de aroma que permite identificar entre os diferentes compostos, quais os que são efetivamente mais representativos do aroma a pera.

Tabela 2 – Principais compostos voláteis que caracterizam o aroma de pera^{55, 57, 63, 64}. LPS – limite de percepção sensorial.

Famílias/Compostos	Estrutura	Concentração (µg/L)	LPS (µg/L)	Descritor de aroma
Ésteres				
Hexanoato de etilo		3	1	Pera, frutado, verde,
Octanoato de etilo		92	15	Floral, frutado
Butanoato de butilo		100	-	Pera
Acetato de butilo		326,9	66	Pera, frutado
(E,Z)-2,4-Decadienoato de metilo		442,3	-	Floral, pera, frutado
(E,Z)-2,4- Decadienoato de etilo		2079,6	100	Pera, verde, frutado
Acetato de hexilo		2755,6	2	Pera, frutado, verde
Butanoato de etilo		-	1	Frutado
Aldeídos				
Hexanal		20	5	Frutado, verde
Álcoois				
Etanol		67,7	-	Álcool
Butanol		-	-	Metálico, medicinal
Terpenos				
α-Farneseno		126,2	-	-

Atualmente, mais de 300 compostos voláteis já foram identificados na pera^{55, 57}, mas os ésteres decadienoato de metilo e etilo e o acetato de hexilo e butilo são dos que a melhor caracterizam⁶³. No entanto, outros ésteres voláteis, como por exemplo, o acetato de 2-metilpropilo, butanoato de etilo, acetato de pentilo e hexanoato de etilo têm também como descritor de aroma a pera. Além disso, o hexanal e o butanoato de 3-metilbutilo-2-metilo são também identificados como compostos voláteis importantes na pera⁵⁵. Num estudo de Riu Amattel *et al.*⁵⁶, cujo um dos objetivos foi identificar os compostos que caracterizam o aroma de pera por HS-SPME, foram detetados em todas as amostras de pera usadas, o acetato de

hexilo e o 2,4-decadienoato de etilo⁵⁶. Para além destes compostos também foram detetados alguns álcoois (feniletanol e dodecanol) e aldeídos (2-hexanal, nonanal e 2-octenal)⁶⁵, o hexanal, o cinamaldeído, o decadienoato de metilo, o α -farneseno⁶⁶ e o acetato de butilo⁶³. Contudo, nestes três últimos estudos^{63, 65, 66}, os principais responsáveis pelo odor agradável a pera foram os ésteres etílicos de ácido 2,4-decadienoico, o α -farneseno e o acetato de butilo.

Assim, tendo em conta os compostos que têm vindo a ser identificados ao longo dos anos^{27, 55-57, 63-66} e o respetivo índice de aroma, o acetato de hexilo e de butilo, o (*E,Z*)-2,4-decadienoato de etilo e o α -farneseno são os que se identificam na maioria dos casos como descritores de aroma de pera, constituindo assim alguns dos compostos voláteis mais importantes a nível comercial. Podem ser classificados como positivos para o aroma por apresentarem, nomeadamente, odor frutado. Para este trabalho foram selecionados apenas três destes voláteis para sua identificação e quantificação, o acetato de butilo, o acetato de hexilo e o (*E,Z*)-2,4-decadienoato de etilo. Assim, relativamente à biossíntese destes ésteres, a sua formação é comum, pois têm como precursores ácidos gordos. No caso específico do acetato de butilo, pensa-se que é normalmente sintetizado através da reação de esterificação do ácido acético com o butanol, levada a cabo pela enzima álcool acil-CoA transferase^{60, 67} (Figura 7). Estes compostos são naturalmente sintetizados na própria pera. Contudo, este éster também pode ser sintetizado na presença de catalisadores inorgânicos adequados, a temperaturas elevadas (esterificação de Fischer)^{68, 69}. Relativamente à via de formação do acetato de hexilo, esta inicia-se na oxidação do ácido linolénico pela via das lipoxigenases, dando origem ao hexanal^{60, 61}. Por sua vez, o hexanal por reação com a álcool desidrogenase dá origem ao hexanol. Por fim, este por reação com o acetil-CoA, proveniente da β -oxidação de ácidos gordos, origina o acetato de hexilo com libertação de CoASH (Figura 8). Por fim, no caso específico do (*E,Z*)-2,4-decadienoato de etilo pensa-se que este composto volátil deriva da β -oxidação de ácido linoleico⁵⁷. Posteriormente, o ácido gordo ativado pela acil-CoA reage com o etanol, dando origem a este composto volátil (Figura 9).

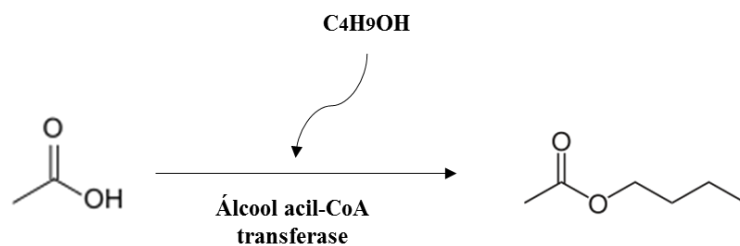


Figura 7 - Via metabólica da produção de acetato de butilo (Adaptado de ⁶⁰).

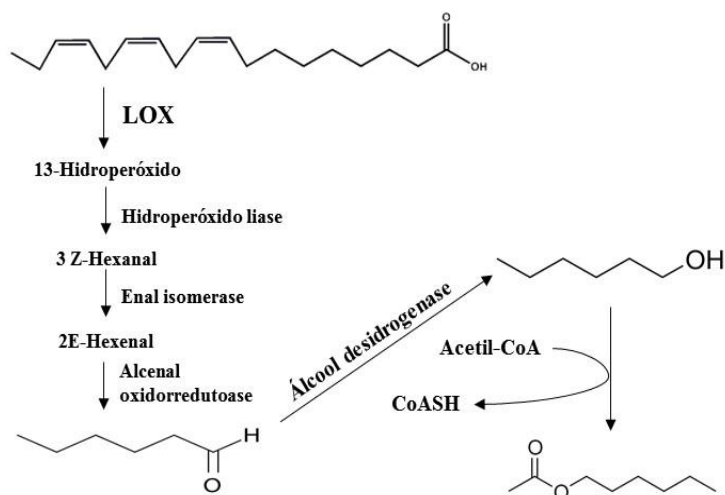


Figura 8 - Via metabólica da produção de acetato de hexilo (Adaptado de ^{60,61}).

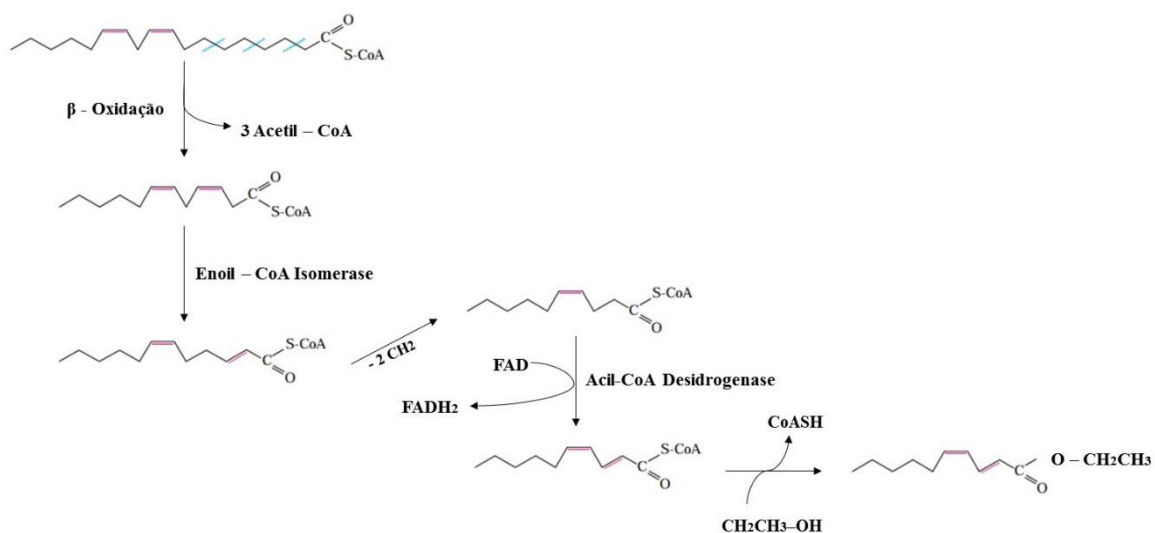


Figura 9 - Via metabólica da produção de (E,Z)-2,4-decadienoato de etilo (Adaptado de ⁵⁷).

Por outro lado, também os compostos descritores de aromas negativos, tais como o etanol e o butanol, são importantes a nível comercial, pois a sua identificação contribui igualmente para a avaliação da qualidade do produto. Estes são provenientes de processos fermentativos realizados por microrganismos, onde ocorre a fermentação de açúcares, nomeadamente glucose.

1.7.3. Extração, identificação e quantificação de compostos voláteis do condensado de aroma de pera por SPME e GC-FID

A análise do perfil volátil de um dado aroma envolve uma fase inicial de extração dos compostos orgânicos que o caracterizam e uma fase de identificação e quantificação dos mesmos. Para este trabalho, o acetato de butilo e de hexilo e o (*E,Z*)-2,4-decadienoato de etilo serão extraídos, identificados e quantificados com recurso à técnica de microextração em fase sólida em espaço de cabeça acoplada à cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (HS-SPME/GC-FID) disponível na Indumape.

A extração de compostos voláteis do aroma por SPME é uma técnica mais recente e que tem vindo a ser cada vez mais utilizada para estudar os aromas de diversas frutas⁵⁷. A microextração em fase sólida (SPME), criada por Pawliszyn em 1989, é um método muito simples e eficiente e que não implica o uso de solventes durante a preparação da amostra, reduzindo os custos e melhorando os limites de deteção⁷⁰⁻⁷². A SPME tem sido amplamente utilizada em diferentes campos da química analítica, sendo especialmente aplicado na análise ambiental e de alimentos. Todos os passos de extração líquido-líquido convencional tal como a extração, concentração e a transferência para o cromatógrafo são integrados num único passo e um dispositivo, o que simplifica consideravelmente o procedimento de preparação da amostra. Este passo de preparação da amostra é essencial para a análise, pois influencia bastante a viabilidade e a precisão do resultado, assim como o tempo e o custo da análise. A técnica de SPME pode ser combinada com GC, HPLC, eletroforese capilar e espectrometria de massa pois constitui uma combinação entre uma preparação simples e eficiente da amostra e a deteção versátil e sensível. Assim, a microextração em fase sólida envolve a adsorção de analitos, numa fibra de sílica fundida que está revestida com fases estacionárias adequadas, e posterior dessorção, imediatamente antes da análise cromatográfica. Os analitos alvo podem ser adsorvidos sobre a fibra por imersão na amostra

ou expondo-o ao espaço de cabeça da amostra, onde as interferências da matriz podem ser reduzidas drasticamente^{56, 70}.

Como foi referido anteriormente, a técnica de microextração em fase sólida pode ser combinada com cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama (FID)⁷⁰. Esta combinação é comum na identificação de compostos voláteis no setor alimentar, pois trata-se de um setor onde as limitações da técnica raramente comprometem a obtenção de resultados. O FID é um dos tipos de detetores mais utilizados para complementar a cromatografia em fase gasosa. Deste modo, em GC-FID, as amostras são introduzidas no injetor com o auxílio de uma seringa. Por sua vez, a amostra é arrastada pela fase móvel (gás de arraste) ao longo da coluna cromatográfica. De seguida, por aplicação de um programa com diferentes temperaturas, os vários compostos da mistura são separados e identificados.

1.8. Objetivos

Durante este trabalho de estágio, tendo em conta os problemas e propostas de melhoria apresentadas à Universidade de Aveiro pela Indumape, os principais objetivos foram a análise da expressão da atividade enzimática da pectina metilesterase por libertação de metanol com recurso à técnica HS-SPME/GC-FID e da poligalacturonase tendo por base o método de viscosimetria. Para além disso, pretendeu-se também relacionar a atividade de ambas as enzimas com o desenvolvimento de turbidez no sumo concentrado de maçã, das maçãs rececionadas ao longo dos meses para o processamento. Por outro lado, foi também objetivo deste trabalho, identificar e quantificar alguns dos compostos voláteis de interesse presentes no condensado de aroma de pera, utilizando o método HS-SPME/GC-FID.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1. Amostragem

2.1.1. Maçãs

Ao longo do decorrer do estágio, entre outubro de 2015 e abril de 2016, foram recolhidas semanalmente maçãs de diferentes variedades (Royal Gala, Golden e Starking), correspondentes ao início da produção de cada lote de sumo concentrado de maçã. Posteriormente, as maçãs do início (outubro), meio (janeiro) e fim (abril) da campanha da Indumape, foram utilizadas para a preparação do pó de acetona para a análise da atividade enzimática da pectina metilesterase e da poligalacturonase.

2.1.2. Condensado de Aroma de Pera

Para a caracterização do aroma de pera, foram recolhidas várias amostras de condensado de aroma fresco por mês, com o intuito de identificar e quantificar alguns dos compostos voláteis neles presentes. Esta recolha foi efetuada no fim de cada lote de aroma produzido, para frascos de plástico com tampa de rosca, a partir da amostra que é levada para o laboratório para análise físico-química. Posteriormente foram armazenados a 4°C até a análise por cromatografia em fase gasosa ser possível.

2.2. Análise da atividade enzimática da pectina metilesterase por SPME e GC-FID

2.2.1. Preparação do pó de acetona de maçã

O pó de acetona de maçã corresponde a um extrato seco que se obtém adicionando acetona gelada à polpa obtida após trituração das maçãs. Aqui ocorre uma reação de precipitação das proteínas existentes na maçã, pela diminuição da sua solubilidade devido à adição de um composto gelado^{73, 74}. Como a constante dielétrica da acetona é menor do que a da água, a interação proteína-proteína irá prevalecer promovendo a sua precipitação e formando um sólido. Para além disso, a temperatura a que se encontram os solventes orgânicos utilizados influencia a precipitação das proteínas, pois no caso de se utilizarem solventes a temperaturas altas, estes irão promover a desnaturação das mesmas através do rompimento das ligações por pontes de hidrogénio. Por outro lado, quando utilizados solventes que se encontram a temperaturas baixas, como o caso da acetona gelada, irão promover a precipitação das proteínas existentes na solução. Desta forma, o extrato obtido irá representar as enzimas existentes nas maçãs, nomeadamente a pectina metilesterase e a poligalacturonase.

Assim, para a preparação deste pó de acetona, foram trituradas cerca de 200 g de maçãs correspondentes a diferentes alturas da campanha, juntamente com 100 mL de acetona gelada. Seguidamente, a solução foi filtrada recorrendo à filtração a vácuo e sujeita a lavagens sucessivas com acetona gelada até se obter um extrato branco. Por fim, este extrato foi seco na *hotte* e moído com o auxílio de um moinho de café, para ficar com a textura de um pó e mais facilmente se misturar com a solução de pectina. Abaixo encontra-se um esquema com todo o método de preparação deste pó de acetona (Figura 10).

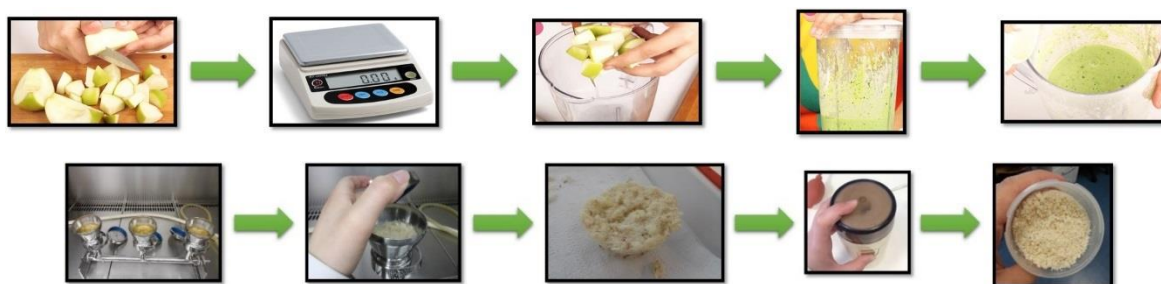


Figura 10 - Preparação do pó de acetona de maçã.

2.2.2. Descrição da metodologia SPME

Normalmente, a atividade da enzima pectina metilesterase é determinada por titulação com adição de NaOH, onde são contabilizados os grupos carboxilo libertados por minuto^{75, 76}. Neste caso, a análise da atividade da PME, foi realizada com recurso à técnica de HS-SPME/GC-FID com o objetivo de identificar e quantificar o metanol libertado durante a reação desta enzima com uma solução padrão de pectina. Inicialmente foi traçado o perfil volátil tanto da solução de pectina, como do pó de acetona de igual concentração individualmente, e da combinação de ambos de forma a simular a reação que ocorre na própria fruta.

Para a realização destes ensaios, foi preparada uma solução de pectina com concentração de 3,5 mg/mL. Para a preparação desta solução foram pesadas 0,105 g de pectina com grau de esterificação 67-71% (*Pectin*, pract ACROS-Organics), e adicionados 30 mL de solução NaCl 0,117 M, a pH 7 e 25°C. A solução de NaCl a pH 7 é utilizada na preparação da solução de pectina com o intuito de promover a catálise ideal por parte da PME, visto que esta tem atividade ótima em meio alcalino^{77, 78}. A 15 mL desta solução, foram adicionadas 0,1 g de cada um dos pós de acetona, correspondentes à matéria-prima rececionada ao longo dos vários meses de processamento e, possivelmente, em diferentes

estados de maturação. Para a extração do metanol libertado foram preparadas soluções em *vials* de vidro transparente de 7 mL, com um volume total de amostra de 3 mL. De seguida, os *vials* foram selados com septos de silicone/PTFE e respetiva tampa e imersos num banho-maria a $40\pm 2^\circ\text{C}$, sob 600 rpm de agitação, utilizando uma placa de aquecimento e agitação Heidolph Mr 3001. Nesta fase, a fibra de SPME (DVB/Carboxen/PDMS) foi exposta dentro do *vial* durante 30 minutos, a uma distância de cerca de 0,5 cm da superfície da amostra⁷⁹. A temperatura do banho foi regulada manualmente e com o auxílio de um termómetro, o que dificultou a estabilização, constituindo assim uma limitação do método. Decorridos os 30 minutos de extração, a fibra de SPME foi recolhida do *vial* para posteriormente se proceder à identificação do composto por GC-FID. Para além disso, foram também realizados ensaios onde se aumentou o tempo de reação para 30 min + 30 min de extração, de forma a quantificar o metanol máximo libertado durante a reação enzima-substrato, tendo em conta o estado de maturação das maçãs usadas para preparar os 3 pós de acetona utilizados. Estes ensaios foram realizados em triplicado. De forma a contabilizar a libertação de metanol em função do tempo e a respetiva atividade enzimática da PME, foram preparados vários *vials* com as mesmas condições, mas tempos de extração menores: 5 min e 15 min, e posteriormente realizado o ensaio cromatográfico de cada um. Estes ensaios foram realizados em duplicado.

2.2.3. Separação, identificação e quantificação do metanol por GC-FID, resultante da reação entre a pectina e a enzima

Após extração dos compostos voláteis para a fibra de SPME, esta foi introduzida e exposta no injetor do equipamento GC Agilent 7820A durante 3 minutos. O injetor do equipamento está equipado com um *liner* de 0,75 mm de diâmetro interno e septos pré furados Thermogreen da Supelco. Durante este método, trabalhou-se em modo *splitless*, com o injetor a 250°C , um caudal de purga de 15 mL/min ao fim de 2 minutos e uma pressão de 13,71 Psi. Para além disso, foi utilizada uma coluna Agilent HP-5 (5% polaridade) com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro internos e 0,25 μm de espessura de filme. Para a quantificação do metanol libertado, foi utilizado um programa que tinha uma temperatura inicial do forno de 25°C durante 5 minutos. Seguiu-se um aumento desta temperatura a uma taxa de 5°C por minuto, até aos 65°C e de 40°C por minuto a partir desse ponto, atingindo uma temperatura máxima de 220°C , mantida durante 1 minuto. O gás de arraste utilizado foi

o hélio, a uma pressão constante de 13,71 psi. Por outro lado, o detetor de ionização por chama foi mantido a 250°C e a chama foi alimentada por 400 mL/min de ar purificado e 30 mL de hidrogénio. O tempo total de cada ensaio realizado foi de \approx 18 minutos. Há ainda que ter em conta que à medida que se analisavam as diferentes soluções de pectina preparadas com os diferentes pós de acetona, foram realizados ensaios em branco, nos quais a fibra foi introduzida no cromatógrafo sem exposição prévia ao analito. Caso a fibra seja nova, é realizado um condicionamento tendo em conta as especificações do fabricante. Neste caso, para a fibra de DVB/Carboxen/PDMS, o condicionamento exigia uma exposição de 1h a 270°C no injetor.

Como tem vindo a ser referido, o composto a quantificar nas amostras preparadas foi o metanol, composto volátil libertado durante a reação da pectina com a enzima pectina metilesterase. Desta forma, a sua quantificação foi calculada recorrendo ao padrão externo correspondente (99,8%, p.e. 64,7°C), adquirido na *Sigma-Aldrich*. Inicialmente, para chegar a uma gama de concentrações do padrão compatível com o intervalo de concentrações do mesmo nas diferentes amostras de solução de pectina com pó de acetona, este foi sujeito a diferentes diluições com concentrações entre 396 mg/L e 39550 mg/L. Posteriormente, 20 μ L destas diferentes soluções foram introduzidos nos *vials* com 2,98 mL de água destilada e 0,6 g de NaCl, de forma semelhante à extração das amostras. Este processo serviu também para a identificação do tempo de retenção do metanol. Para finalizar, foi elaborada a respetiva curva de calibração.

2.3. Análise da atividade enzimática da poligalacturonase com base no método de viscosimetria

A atividade da poligalacturonase é comumente determinada com recurso ao método de espectrofotometria^{80, 81}. No entanto, para esta análise da atividade enzimática da poligalacturonase nas maçãs recolhidas em diferentes alturas da campanha, foi aplicado o método viscosimétrico⁸². Este método permite verificar a redução de viscosidade de uma solução controlo, neste caso que não contém enzima, para uma solução que contém enzima. Para tal, foram cronometrados os tempos de escoamento de cada uma das soluções com igual concentração, numa pipeta volumétrica. Estes ensaios foram realizados em triplicado e o valor final obtido corresponde à média \pm desvio padrão dos valores que se foram obtendo.

Inicialmente, de forma a otimizar a medição da atividade enzimática da poligalacturonase, foram preparadas soluções controlo de pectato (*Polygalacturonic acid*, $\geq 90\%$, *enzymatic*) com diferentes concentrações (0,5%, 1% e 3%). Para tal, foram pesadas 0,5, 1 e 3 g de pectato respetivamente diluídos em 100 mL de água destilada. Para que a solução se dissolvesse completamente, foi mantida sob agitação a 25°C e feito um ajuste de pH até 5,5 com NaOH 1M. De seguida, cada uma destas soluções foi pipetada com uma pipeta volumétrica de 20 mL e o tempo de escoamento foi cronometrado. Numa fase seguinte, com base na solução controlo que apresentava o maior tempo de escoamento e, por sua vez, a máxima viscosidade, foram adicionadas a essa solução diferentes quantidades de enzima, correspondente ao pó de acetona de maçã (2g, 1g, 0,5g e 0,1g), para testar com qual das quantidades se verificava uma maior redução do tempo de escoamento e, conseqüentemente, da viscosidade. Terminados estes ensaios de otimização, à solução controlo de pectato 3% foi adicionada 1g dos diferentes pós de acetona, correspondentes às maçãs recolhidas em diferentes alturas da campanha. Após 15 min de reação enzima-substrato e cerca de 2h de filtração da mistura, foram contabilizados os tempos de escoamento e, conseqüentemente, analisada a expressão da enzima poligalacturonase em função da altura da campanha em que a matéria-prima foi utilizada.

2.4. Identificação e quantificação dos compostos voláteis do condensado de aroma de pera por HS-SPME/GC-FID

2.4.1. Descrição da metodologia SPME

Para a identificação e quantificação dos compostos voláteis presentes no condensado de aroma de pera foi utilizada a técnica de SPME igualmente descrita no ponto 2.2.2. Inicialmente foi traçado o perfil volátil do condensado de aroma de pera por SPME, utilizando um programa de temperatura pré-estabelecido. As amostras de condensado de aroma de pera utilizadas foram recolhidas à medida que eram produzidos lotes de concentrado de pera e, conseqüentemente, de condensado de aroma de pera. Todas estas amostras foram sujeitas a uma diluição de 1:10 para que se pudessem extrair melhor os compostos voláteis do aroma. Há ainda que ter em conta que as amostras de aroma recolhidas foram mantidas a 4°C até ao início da extração, de modo a simular as condições de armazenamento aplicadas na Indumape. As amostras de condensados recolhidos encontram-

se na Tabela 3 abaixo. As datas de recolha identificadas correspondem aos aromas analisados, tendo sido analisado 1 por mês.

Tabela 3 - Condensados de aroma de pera recolhidos ao longo de cada mês.

Condensados de Aroma de Pera Frescos		
Identificação	Data de recolha	Diluição usada
AFOut	26-10-2015	1:10
AFNov	18-11-2015	
AFDez	17-12-2015	
AFJan	07-01-2016	
AFFev	11-02-2016	
AFMar	03-03-2016	
AFAbr	07-04-2016	
AFMai	06-05-2016	

Para a extração dos compostos voláteis do condensado de aroma de pera, foram igualmente preparadas soluções em *vials* de vidro transparente de 7 mL, com um volume total de amostra de 3 mL. A estes 3 mL, 2,98 mL de água destilada e 20 µL de aroma diluído, adicionaram-se também 0,6 g de NaCl. Há que ter em conta que estas quantidades foram iguais para todos os ensaios realizados aos condensados de aroma de pera e que a ordem de adição foi a seguinte, em primeiro lugar o NaCl, seguida da água destilada e, por fim, a amostra previamente diluída. A adição de sal durante a preparação de amostras para a extração de compostos voláteis é comum e tem como objetivo promover o *salting out*^{71, 83}. Este fenómeno, por adição de sais inorgânicos, neste caso o cloreto de sódio, aumenta a força iónica da solução, melhorando a eficácia da extração dos compostos voláteis e sua separação. Isto deve-se à diminuição da solubilidade dos compostos orgânicos existentes na amostra e que, conseqüentemente, aumenta a quantidade de analitos no espaço de cabeça. Para a pesagem do sal, recorreu-se a uma balança Shimadzu UX620H. De seguida, os *vials* foram selados com septos de silicone/PTFE e respetiva tampa e imersos num banho termostaticado a 40±2°C, sob 600 rpm de agitação. Nesta fase, a fibra de SPME (DVB/Carboxen/PDMS) foi exposta dentro do *vial* durante 30 minutos, a uma distância de cerca de 0,5 cm da superfície da amostra. A utilização deste tipo de fibra deve-se ao facto de esta ser uma fibra mista, tendo uma maior capacidade de retenção de analitos com diferentes características (polares, apolares, de baixo peso molecular), promovendo assim uma melhor extração dos compostos voláteis do condensado de aroma de pera⁸⁴. Decorridos os 30 minutos de

extração, a fibra de SPME foi recolhida do *vial* para posteriormente se proceder à identificação dos compostos por GC-FID. Todos os ensaios com as diferentes amostras de condensado de aroma de pera foram realizados em duplicado.

2.4.2. Separação, identificação e quantificação dos compostos voláteis do condensado de aroma de pera por GC-FID

Após extração dos compostos voláteis para a fibra de SPME, esta foi introduzida e exposta no injetor do equipamento durante 3 minutos para dessorção dos compostos voláteis, em modo *splitless*, com o injetor a 250°C, um caudal de purga de 40 mL/min ao fim de 2 minutos e uma pressão de 13,71 psi. Para a caracterização do condensado de aroma de pera foi utilizado um método pré-estabelecido para o aroma de maçã, que tinha uma temperatura inicial do forno de 30°C, mantida durante 5 minutos. Seguiu-se um aumento desta temperatura a uma taxa de 2°C por minuto, até aos 80°C e de 20°C por minuto a partir desse ponto, atingindo uma temperatura máxima de 220°C, mantida durante 1 minuto. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a uma pressão constante de 13,71 psi. Por outro lado, o detetor de ionização por chama foi mantido a 250°C e a chama foi alimentada por 400 mL/min de ar purificado e 30 mL de hidrogénio. O tempo total de cada ensaio realizado foi de 43 minutos. É ainda de notar que 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.

Os compostos de interesse selecionados para este aroma foram o acetato de hexilo (99%, p.e. 168°C – 170°C), o acetato de butilo (99,7%, p.e. 124°C – 126°C) e o (*E,Z*)-2,4-decadienoato de etilo (97%, p.e. 70°C – 72°C), todos considerados descritores de aroma de pera positivos. Estes reagentes foram adquiridos na *Sigma-Aldrich*. Desta forma, a quantificação destes compostos voláteis foi calibrada recorrendo aos padrões externos correspondentes a cada um destes compostos de interesse. Inicialmente, para chegar a uma gama de concentrações dos padrões compatível com o intervalo de concentrações dos mesmos nos diferentes aromas de pera, estes foram sujeitos a diferentes diluições. Posteriormente, 20 µL destas soluções foram introduzidos nos *vials* com 2,98 mL de água destilada e 0,6 g de NaCl, de forma semelhante à extração das amostras dos condensados de aroma considerados. Este processo serviu também para a identificação dos tempos de retenção dos compostos voláteis de interesse. Para finalizar, foram elaboradas as respetivas

curvas de calibração para cada composto de interesse e quantificada a concentração de cada um deles nas diferentes amostras de condensado de aroma analisadas. Assim, para o acetato de butilo foram utilizados 8 pontos correspondentes a 8 diluições com concentrações entre 2,03 mg/L e 14,08 mg/L a partir de uma solução mãe com concentração de 17,60 mg/L, enquanto que para o acetato de hexilo foram utilizados 7 pontos para a construção da curva de calibração, com concentrações entre 0,09 mg/L e 3,48 mg/L, a partir de uma solução mãe com 17,40 mg/L.

2.4.3. Análise Sensorial dos condensados de aroma de pera

A par com as análises de cromatografia em fase gasosa às diferentes amostras de condensados de aroma de pera, foi também realizada a respectiva análise sensorial. Para esta análise, cada amostra de aroma foi sujeita a uma prova por parte de um elemento da produção e do responsável da qualidade do laboratório da Indumape, no momento da recolha do condensado de aroma fresco. A classificação deste quanto ao sabor e odor foi efetuada numa escala hedónica de 1 a 5, sendo que 1 significa muito pouco intenso/frutado e 5 muito intenso/frutado.

2.5. Análise estatística

A significância estatística entre as concentrações dos dois compostos de interesse nos diferentes condensados de aroma de pera analisados mensalmente e entre os respetivos índices de aroma, foi determinada através do teste ANOVA (*one-way*). As diferenças das concentrações e dos índices de aroma entre os meses analisados para cada composto foram determinadas através do teste de Tukey. Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Ambos os testes foram realizados recorrendo ao *software Graphpad Prism 5*.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1. Análise da atividade da enzima pectina metilesterase: identificação e quantificação do metanol libertado após reação da pectina com os diferentes pós de acetona

Inicialmente, foram realizados diversos ensaios com o intuito de otimizar este método para a detecção da atividade desta enzima, que é comumente determinada através da titulação de uma solução de pectina, com uma solução de NaOH, por contabilização dos grupos carboxilo livres após desesterificação e libertação do metanol^{75, 76}. A PME atua sobre a pectina, libertando-se metanol. Deste modo, pretendeu-se através da cromatografia em fase gasosa quantificar o metanol libertado em função da expressão enzimática dos diferentes pós de acetona das maçãs processadas ao longo da campanha, com o aumento do tempo decorrido após a sua colheita. Para os ensaios de otimização foram testadas várias condições, tais como a variação do programa de temperatura, da concentração de solução de pectina usada, da quantidade de pó de acetona a adicionar e a utilização de NaCl ou não durante o processo de extração. Para além disso também foram testados três tempos de reação, com intervalo de 30 minutos entre cada um.

Tabela 4 - Diferentes condições testadas durante o processo de otimização da metodologia.

Programas de temperatura	Concentrações de solução de pectina (mg/mL)	Quantidades de pó de acetona (g)	Adição de NaCl		Tempos de reação (min)	Tempo de extração (min)
			S	N		
1. ti 50°C durante 10 min ---> 5°C/min até aos 65°C ---> 20°C/min até aos 185°C --> 35°C até aos 220°C + 1 min nos 220°C	3,5	0,5	x		T0 = 0	30
2. ti 30°C ---> 2°C/min até 65°C ---> 35°C/min até 220°C + 1 min nos 220°C	3,5 7,0	0,5	x	x	T0 = 0	
3. ti 30°C durante 5 min ---> 5°C/min até aos 65°C ---> 40°C/min até aos 220°C + 1 min nos 220°C	3,5	0,5	x		T0 = 0	
4. ti 25°C ---> 2°C/min até aos 65°C --> 35°C/min até aos 220°C + 1 min nos 220°C	2,5	0,5	x		T0 = 0	
5. ti 25°C durante 5 min ---> 5°C/min até aos 65°C ---> 40°C/min até aos 220°C + 1 min nos 220°C	1,5 2,5 3,5	0,1 0,5	x	x	T0 = 0 T1 = 30 T2 = 60	

Desta otimização da metodologia, concluiu-se que o melhor programa de temperatura a usar é o 5 e que a solução de pectina mais adequada é a de 3,5 mg/mL com a adição de 0,1 g de cada um dos pós de acetona, sem NaCl. Quanto ao tempo de reação, daqui concluiu-se

que após T1 já não ocorre liberação de metanol visto que deixa de existir um aumento significativo da concentração deste composto em cada uma destas soluções comparando com os resultados obtidos em T0. Assim, para a implementação da metodologia o T1 é o mais adequado. Além disso, verificou-se também que como após 30 min de reação (T0) já tinha ocorrido a liberação da maior parte do metanol, fez também parte da metodologia utilizar tempos de extração menores de modo a calcular a atividade da enzima PME.

A figura abaixo (Figura 11) representa o cromatograma do padrão externo do metanol, para o qual também foi construída uma curva de calibração, de modo a quantificar este composto.

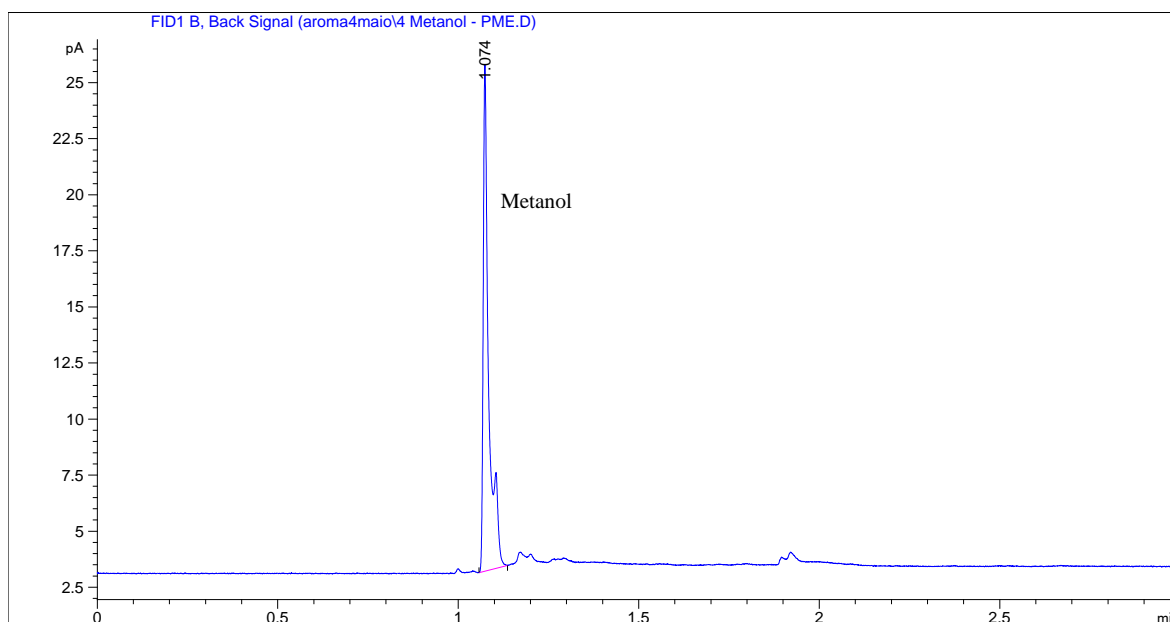


Figura 11 - Cromatograma obtido da análise do padrão metanol (7910 mg/L).

As figuras que se seguem correspondem aos cromatogramas obtidos através da análise da reação entre a solução de pectina 3,5 mg/mL e os três pós de acetona utilizados, correspondentes a 3 fases distintas de maturação das maçãs, após 30 min de reação, seguida de 30 min de HS-SPME. Por comparação com o tempo de retenção médio do metanol (1,083 min) foi efetuada a identificação do pico correspondente a este composto.

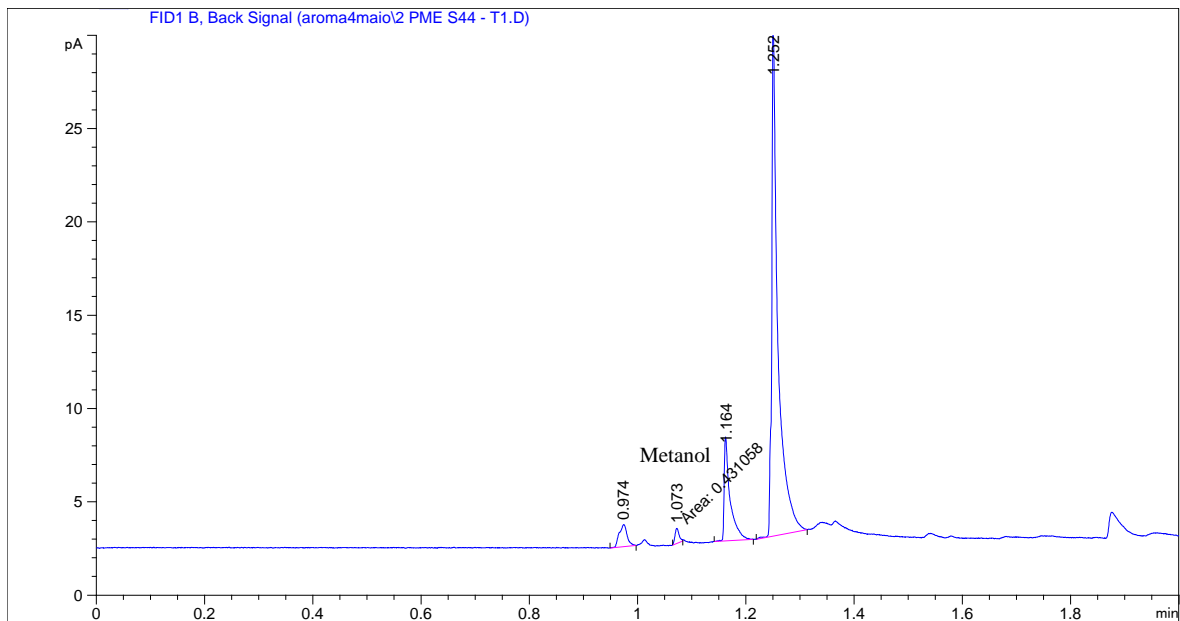


Figura 12 - Cromatograma obtido após análise da solução de pectina com o pó de acetona da semana 44 (T1).

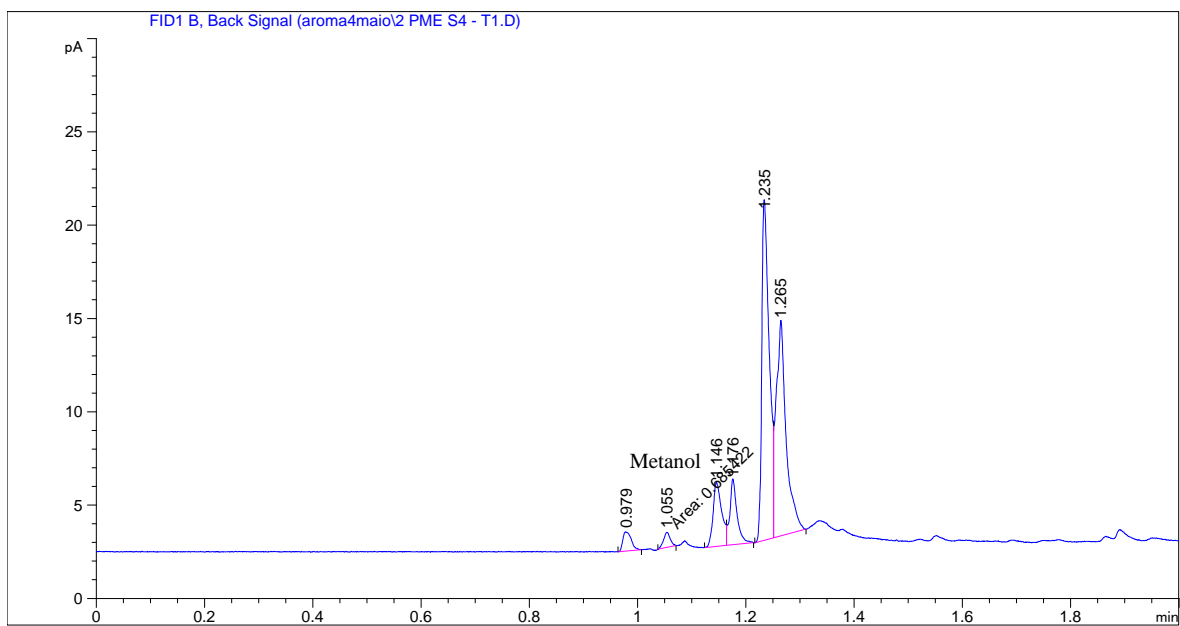


Figura 13 - Cromatograma obtido após análise da solução de pectina com o pó de acetona da semana 4 (T1).

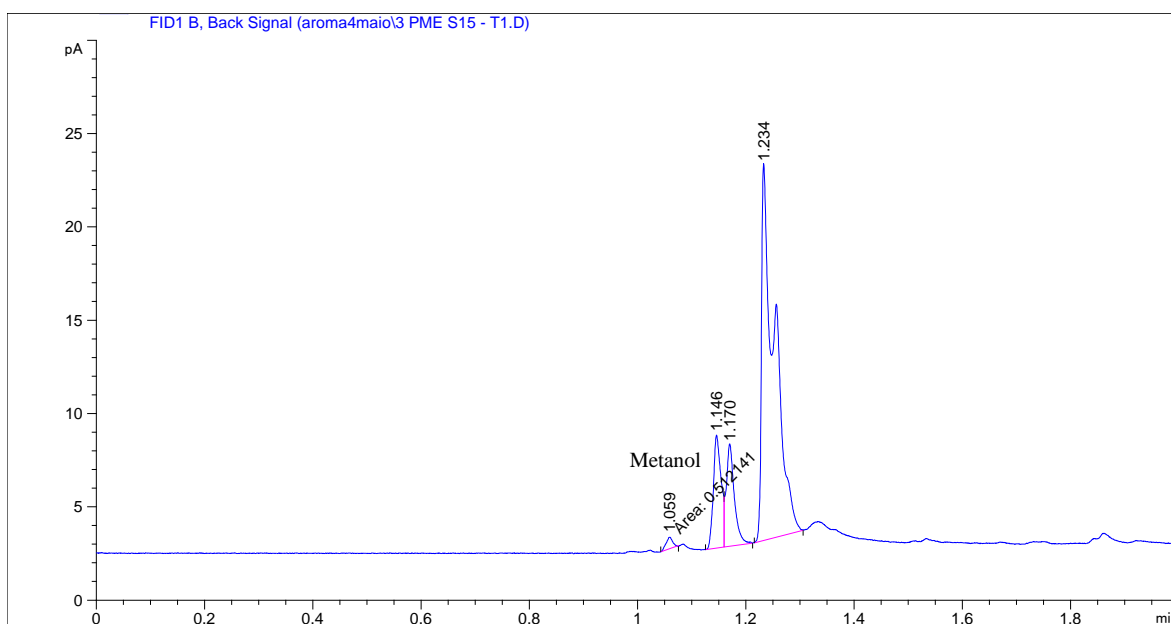


Figura 14 - Cromatograma obtido após análise da solução de pectina com o pó de acetona da semana 15 (T1).

Após a fase de identificação, foi quantificado o metanol libertado durante a reação pectina-pectina metilesterase, em função do tipo de pó de acetona adicionado e do tempo de reação T1 = 30 min de reação. Os resultados obtidos encontram-se na tabela abaixo (Tabela 5) e as amostras analisadas são designadas por PME 1, 2 e 3, correspondendo à solução pectina 3,5 mg/mL com o pó de acetona das semanas 44 (Out), 4 (Jan) e 15 (Abr), respetivamente.

Tabela 5 - Concentração de metanol libertado durante a reação da solução de pectina 3,5 mg/mL com os diferentes pós de acetona.

Concentração de metanol libertado	
Amostra analisada	MeOH (mg/L)
	T1 (30 min reação)
PME 1	106,1 ± 11,4
PME 2	118,9 ± 18,0
PME 3	143,6 ± 23,3

Embora não tenham sido realizados ensaios físico-químicos do estado de maturação das maçãs utilizadas para a produção dos diferentes pós de acetona, é possível que as maçãs processadas ao longo do tempo vão aumentando o seu estado de maturação desde a altura que são colhidas até ao final do período máximo de armazenamento. Verificou-se que à medida que se vai utilizando pó de acetona correspondente a maçãs com maior tempo decorrido após a colheita, a quantidade de metanol libertada tem tendência a aumentar, confirmando que quanto maior o tempo decorrido após a colheita, maior a atividade da PME. A explicação para este facto pode também dever-se ao facto da PME estar perante as suas condições ótimas de atuação. O pH da fruta constitui um fator essencial para a atividade das enzimas, sendo que a pectina metilesterase tem atividade ótima a pH neutro (pH = 7)^{77, 85}. No caso da maçã, aquando o amadurecimento o pH tende a diminuir, por conseguinte, como a enzima PME apresenta maior atividade em meio alcalino, espera-se que participe ativamente no início do amadurecimento do fruto, até porque é responsável pela desesterificação dos polissacarídeos pécticos, sendo fundamental neste processo de amolecimento dos tecidos. Logo a sua atividade é maior à medida que o estado de maturação da maçã vai aumentando^{77, 86, 87}. Assim, existindo uma maior atividade da PME, vai permitir a atuação da PG de seguida, despolimerizando as moléculas de pectato resultantes da ação da primeira. Por conseguinte, a turbidez resultante do sumo concentrado será menor quando produzido com maçãs mais maduras. Estes resultados vieram comprovar o obtido num estudo de Goulão *et al.*⁷⁷, onde analisaram também a expressão da atividade da pectina metilesterase através do método espectrofotométrico durante o crescimento e amadurecimento da maçãs. Concluíram que à medida que as maçãs se vão desenvolvendo e amadurecendo, a atividade da PME vai aumentando. Além disso, é ainda de referir que o método HS-SPME/GC-FID implementado para a deteção deste composto é de igual forma eficiente na análise da expressão da atividade da PME, tal como os outros métodos aplicados.

De forma a confirmar os resultados obtidos anteriormente, determinou-se efetivamente a atividade desta enzima, sendo que uma unidade de PME (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 micromole de metanol libertado por minuto, tendo por base os diferentes tempos de extração e os pós de acetona do início e fim da campanha (Figura 15).

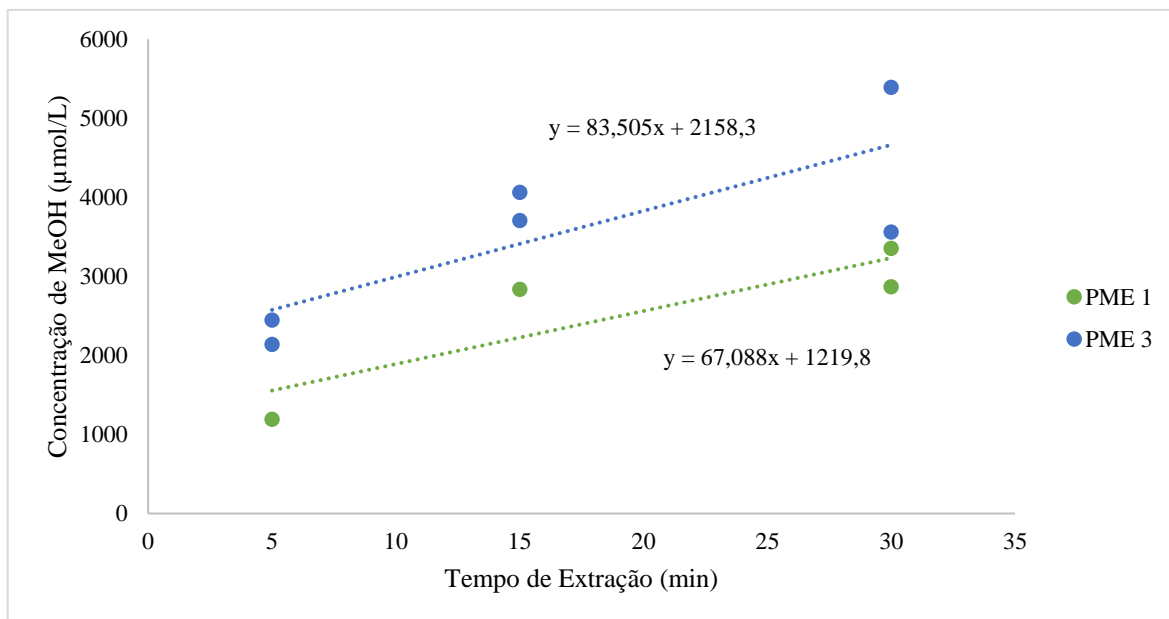


Figura 15 - Concentração de metanol libertado ao longo do tempo de extração (µmol MeOH/min).

Verificou-se que para ambas as enzimas a concentração de metanol foi aumentando à medida que o tempo de extração também aumentou. Contudo, a enzima proveniente de maçãs colhidas há mais tempo (PME 3), apresentou maior atividade enzimática para 0,1 g (83,505 µmol MeOH/min) do que a PME 1 (67,088 µmol MeOH/min) proveniente de maçãs com menor tempo decorrido após colheita, confirmando os resultados obtidos nos ensaios anteriormente realizados. Assim, são necessárias 670,9 U/g e 835,1 U/g de PME 1 e 3, respetivamente, para gerar 1 µmol MeOH/min.

Contudo, de forma a contabilizar melhor a atividade da PME, deveriam realizar-se mais ensaios para outros tempos de extração.

3.2. Análise da atividade da enzima poligalacturonase com base no método viscosimétrico

Numa fase preliminar, como referido no capítulo anterior, foram realizados ensaios de otimização para a determinação da atividade da enzima poligalacturonase na maçã em diferentes estados de maturação. Como resultados desta otimização verificou-se qual a solução controlo de pectato com maior viscosidade (3% m/v) e que com a adição de 1 grama de pó de acetona nesta solução se verificou a maior redução de viscosidade e, portanto, maior atividade da enzima poligalacturonase (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6 - Resultados dos ensaios de otimização para a determinação do tempo de escoamento de diferentes soluções de pectato.

Solução Controlo - Pectato	Número Solução	Ensaio	Massa (g)	Volume H ₂ O (mL)	Concentração (% m/v)	Tempo (s)	Média ± Desvio Padrão
Solução Controlo - Pectato	1	1	0,5	100	0,5%	43,49	43,86 ± 0,33
		2				44,10	
		3				44,00	
	2	1	1		1,0%	50,54	50,20 ± 0,65
		2				50,61	
		3				49,45	
	3	1	3		3,0%	87,22	87,49 ± 0,44
		2				88,00	
		3				87,24	

Tabela 7 – Resultado dos ensaios de otimização para a determinação da redução da viscosidade da solução pectato 3% para diferentes quantidades de pó de acetona.

Solução Pectato + Pó de acetona	Solução Pectato Usada	g Pó de acetona	Ensaio	Tempos (s)	Média ± Desvio Padrão
Solução Pectato + Pó de acetona	3 % (3 g em 100 mL)	0,1	1	77,56	78,15 ± 0,96
			2	77,63	
			3	79,26	
		0,5	1	77,39	77,24 ± 0,51
			2	76,73	
			3	77,74	
		1	1	77,30	76,49 ± 0,77
			2	76,42	
			3	75,76	
		2	1	83,20	83,17 ± 0,63
			2	83,78	
			3	82,53	

É de notar que usando uma maior quantidade de pó de acetona (2 g), a redução de viscosidade deveria ser maior (tempo de escoamento menor), no entanto não foi o que se verificou. Isto pode ser justificado pelo facto de o tempo total de filtração aplicado para todas as amostras (2 h) não ter sido suficiente para a enzima atuar e reduzir a viscosidade, devido à própria espessura da solução.

Após otimização do método, foram realizados ensaios com os pós de acetona relativos ao início da campanha (Semana 44), meio (Semana 4) e fim (Semana 15). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da ação dos diferentes pós de acetona na solução de pectato.

Solução Pectato + Pó de acetona	Pó de acetona	Ensaio	Tempo de escoamento (s)	Média ± Desvio Padrão
	Semana 44 (Out)	1	76,97	78,44 ± 1,34
		2	79,60	
		3	78,75	
	Semana 4 (Jan)	1	51,47	52,08 ± 0,99
		2	52,69	
		3	53,42	
	Semana 15 (Abr)	1	48,26	48,30 ± 0,20
		2	48,13	
		3	48,52	

Destes ensaios, o pó de acetona que levou a uma maior redução da viscosidade da solução, ou seja, cujo tempo de escoamento foi menor e, portanto, que correspondeu à maior atividade desta enzima, foi o pó obtido a partir das maçãs processadas tendo decorrido mais tempo depois de terem sido colhidas, pois provavelmente encontravam-se num estado de maturação mais avançado, portanto, mês de abril, tal como verificado para a atividade da enzima pectina metilesterase. Wu *et al.*⁸⁸, investigaram a presença e o modo de atuação da poligalacturonase durante o processo de amadurecimento. Através de ensaios bioquímicos, imunológicos e moleculares, provaram que a atividade desta enzima é claramente expressa durante o desenvolvimento e maturação das maçãs. Ou seja, à medida que a fruta vai amadurecendo, a atividade da poligalacturonase aumenta, permitindo uma maior degradação, neste caso, das cadeias de pectato. Consequentemente, a turbidez dos sumos concentrados produzidos com maçãs mais maduras será menor.

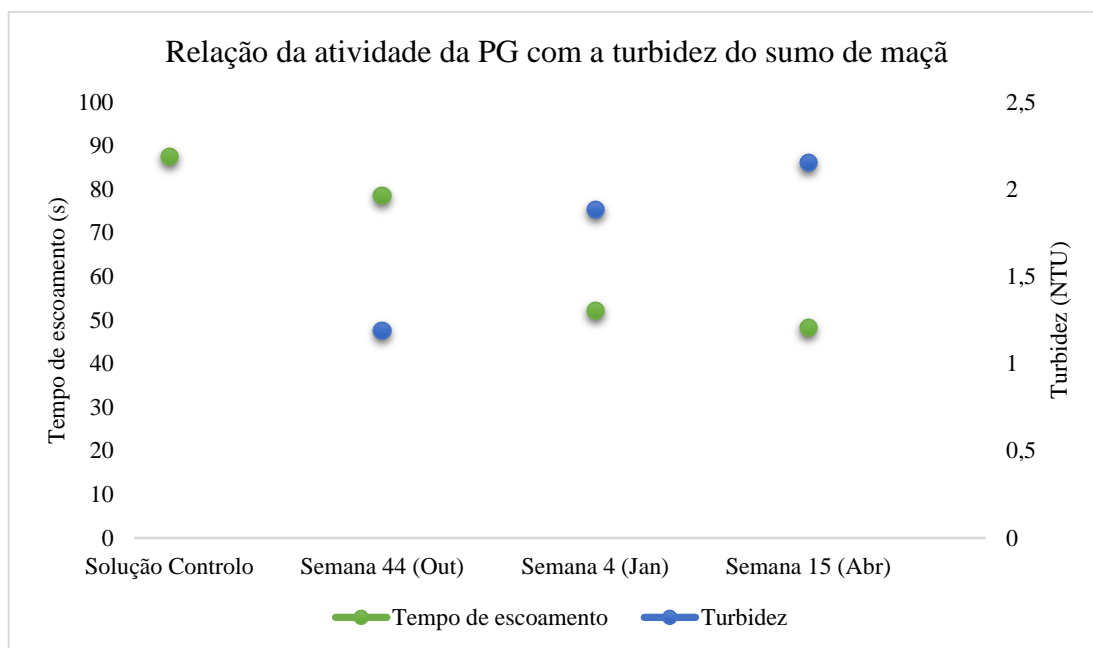


Figura 16 - Expressão da atividade de enzima poligalacturonase numa solução pectato 3% e sua relação com a turbidez dos lotes de sumo concentrado de maçã produzidos durante as mesmas semanas de onde se obteve os pós de acetona.

O gráfico acima (Figura 16) mostra a diferença entre os tempos de escoamento das soluções preparadas utilizando os pós de acetona obtidos a partir das maçãs colhidas nas diferentes semanas e os respetivos valores de turbidez dos lotes de sumo concentrado de maçã produzidos durante estas mesmas semanas. Primeiramente, pode-se verificar que os tempos de escoamento da solução pectato 3% com os diferentes pós de acetona foram reduzindo à medida que se foi adicionando um pó obtido a partir de maçãs com maior tempo decorrido após a colheita, provavelmente mais maduras, comparativamente com a solução controlo (máxima viscosidade). Verificou-se que com o pó da semana 15, o tempo de escoamento da solução foi o mais baixo, representando, portanto, a maior redução de viscosidade e a maior atividade da enzima poligalacturonase. No entanto com o pó de acetona da semana 4, a redução no tempo de escoamento foi mais significativa. Deste modo, comprovou-se que à medida que o tempo após colheita das maçãs é superior, a atividade da poligalacturonase vai aumentando.

Por outro lado, relacionando a atividade desta enzima com os valores de turbidez do sumo concentrado produzido com as maçãs colhidas nestas mesmas semanas, verifica-se o oposto do que era esperado, visto que quanto maior foi a atividade da enzima (menor tempo de escoamento e menor viscosidade), maior foi a turbidez. Uma explicação para este acontecimento reside na quantidade de enzimas exógenas aplicada durante o processo de

produção de concentrado, que pode ter sido em demasia atendendo ao estado de maturação das maçãs. Esta adição de enzimas exógenas em excesso pode ter promovido uma hidrólise mais extensa dos polissacarídeos pécticos existentes, por estes já se encontrarem parcialmente hidrolisados por ação da PG endógena de maçãs em elevado estado de maturação. Por sua vez, os fragmentos daqui resultantes tornaram-se solúveis com capacidade de agregação e conseqüentemente, de precipitação, fazendo com que permanecessem em suspensão e contribuindo para o desenvolvimento de turbidez.

3.3. Identificação e quantificação dos compostos voláteis no aroma de pera

Como referido inicialmente, um dos objetivos deste trabalho de estágio consistiu na identificação e quantificação de alguns compostos voláteis existentes no aroma de pera. Inicialmente foi determinado o perfil volátil do aroma de pera por GC-MS e GC-FID. Passada esta fase, foram selecionados três compostos voláteis, representativos do aroma a pera, denominados comercialmente por aromas positivos, o acetato de hexilo, o acetato de butilo e o (*E,Z*)-2,4-decadienoato de etilo. Deste modo, foram feitas análises mensais a diferentes amostras de condensado de aroma de pera recolhidas, permitindo elaborar uma carta controlo. Mediante a realização destes ensaios no equipamento disponível na Indumape e aplicando o método igualmente implementado no trabalho anterior, mas relativo ao aroma de maçã, foi permitido verificar que o tempo de retenção do acetato de butilo é aproximadamente aos 6 minutos e o do acetato de hexilo aos 22 minutos. Quanto ao (*E,Z*)-2,4-decadienoato de etilo, não foi possível a sua identificação.

Como referido anteriormente, na análise efetuada por GC-MS foi possível identificar os compostos voláteis existentes no aroma de pera produzido na Indumape, para além do acetato de butilo e do acetato de hexilo. Foram identificados um total de 20 compostos, dos quais a maioria são ésteres e álcoois. Estes compostos voláteis e os respetivos tempos de retenção encontram-se descritos na tabela seguinte (Tabela 9).

Tabela 9 - Compostos voláteis do condensado de aroma de pera identificados por GC-MS.

Composto volátil identificado	Tempo de Retenção aproximado (min)
Ésteres	
Acetato de etilo	0,90
Acetato de propilo	1,30
Butanoato de etilo	1,90
2-Metil-butanoato de etilo	2,05
Acetato de butilo	2,30
Acetato de 2-metil-butilo	3,20
Acetato de amilo	4,60
Acetato de hexilo	9,00
Álcoois	
Etanol	1,10
Butanol	3,80
Hexanol	13,0
2-Etil hexanol	21,0
Octanol	24,1
Octadecanol	32,1
Aldeídos	
Hexanal	2,41
Trans-2-hexenal	6,05
Nonanal	15,0
Acetonas	
2-Metil-2-hepteno-6-ona	11,9
Geranyl acetona	31,0
Terpenos	
Trans-farnesol	38,0

Nas figuras que se seguem estão representados alguns dos cromatogramas obtidos a partir da análise dos padrões externos correspondentes aos dois compostos voláteis identificados nos diferentes condensados de aroma de pera. Como tem vindo a ser referido, estes foram utilizados para a construção das curvas de calibração e consequente identificação e quantificação dos compostos.

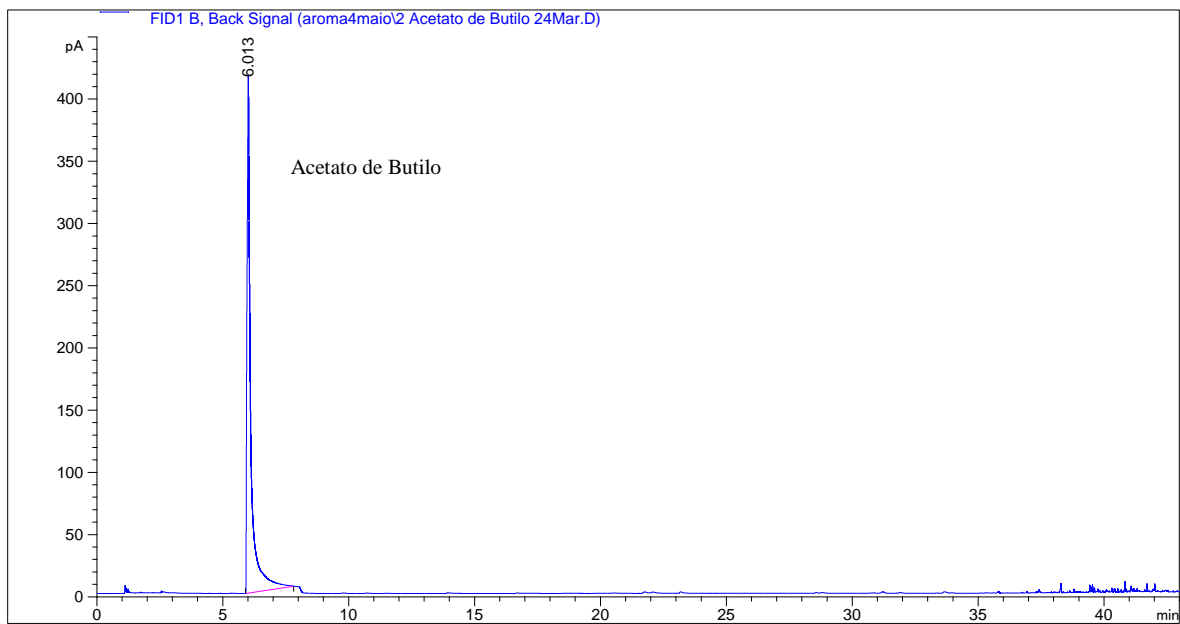


Figura 17 - Cromatograma obtido da análise do padrão acetato de butilo (14,08 mg/L).

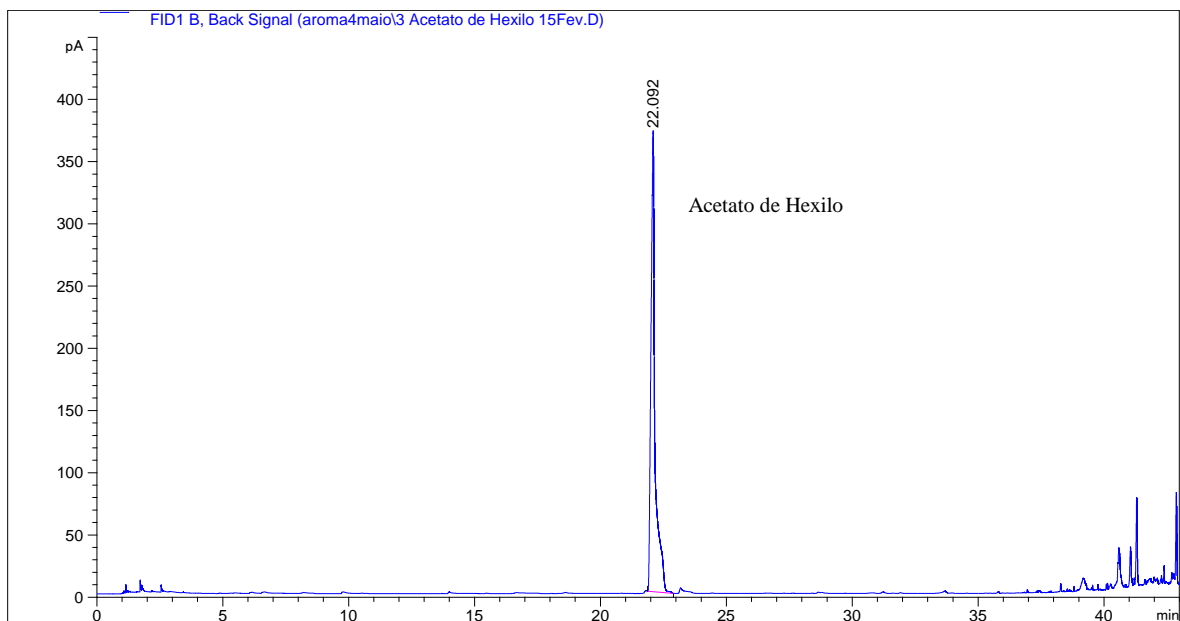


Figura 18 - Cromatograma obtido da análise do padrão acetato de hexilo (3,48 mg/L).

A Figura 19 representa um dos cromatogramas obtidos através da análise de uma das amostras de condensado de aroma de pera por GC-FID. Por comparação com os tempos de retenção dos padrões, foi efetuada a identificação dos picos correspondentes aos compostos de interesse.

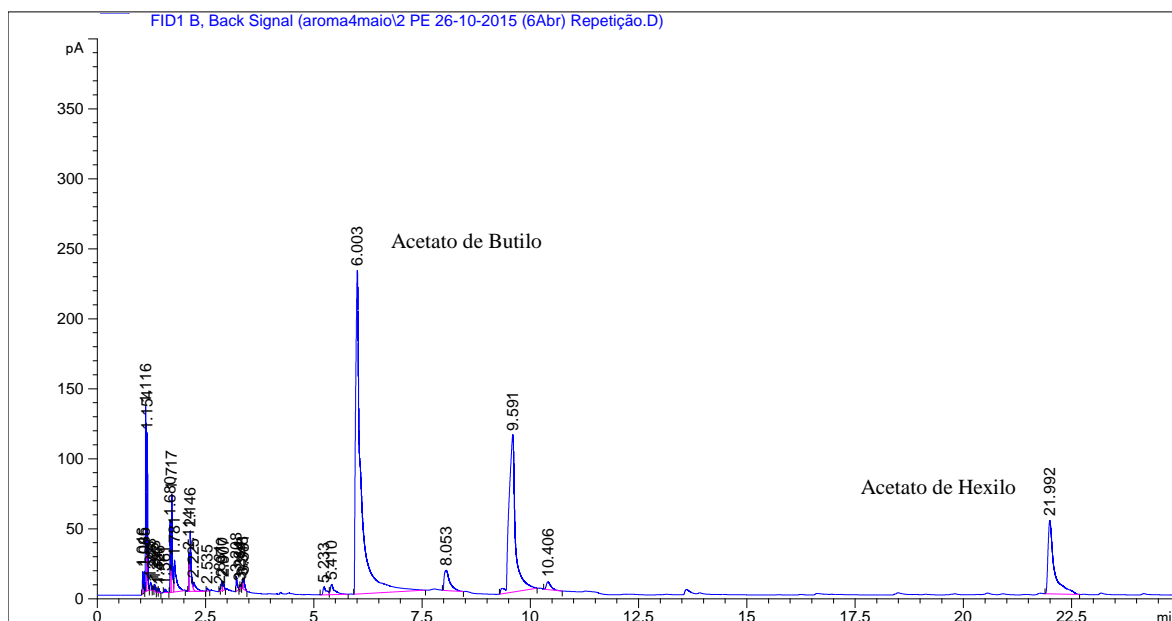


Figura 19 - Cromatograma associado à amostra de condensado de aroma de pera AFDez.

O acetato de butilo e o acetato de hexilo são os principais ésteres identificados nos condensados de aroma de pera⁸⁹. É possível observar através do cromatograma acima que a separação destes dois compostos foi bem-sucedida, na medida em que apresentam picos únicos nos tempos de retenção mencionados. Estes resultados sugerem que o acetato de butilo e de hexilo são voláteis de fácil extração e separação, através do método e do programa de temperatura aplicados. Como são ambos compostos polares com pontos de ebulição altos (acetato de butilo: 124-126°C e acetato de hexilo: 168-170°C), correspondendo, portanto, a compostos com menor volatilidade, permite que fiquem retidos na coluna mais tempo e que sejam, posteriormente, melhor separados. Quanto ao (*E,Z*)-2,4-decadienoato de etilo, também um composto importante na caracterização do aroma de pera como referido no capítulo inicial, não foi possível a sua separação com o equipamento utilizado e com o programa de temperatura aplicado. Foram realizadas várias diluições para o padrão externo, mas o aparecimento de vários picos com diferentes intensidades e tempos no mesmo cromatograma, não permitiu concluir qual o tempo de retenção exato do composto. Para além disso, no ensaio efetuado no GC-MS verificou-se a presença de vários isómeros deste composto volátil no padrão, mostrando que este não é suficientemente puro para se poder construir uma reta de calibração e, conseqüentemente, identificar e quantificar o decadienoato de etilo nas diferentes amostras de condensado de aroma de pera analisadas.

É possível ainda verificar nos condensados de aroma analisados outros compostos de fácil identificação devido à sua eficiente separação, tornando-se interessante a sua quantificação por cromatografia em fase gasosa num trabalho futuro.

Após a primeira fase de identificação do acetato de butilo e do acetato de hexilo por GC-FID, foi possível quantificá-los nos diferentes aromas analisados. Na Tabela 10 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 10 - Concentrações dos compostos voláteis de interesse nas diferentes amostras de condensado de aroma de pera sujeitas a análise cromatográfica.

Concentração na amostra (mg/L)		
Amostra analisada	Acetato de Butilo	Acetato de Hexilo
AFOut	7944,2	617,2
AFNov	3516,7	520,3
AFDez	9311,8	1130,4
AFJan	13562,7	1215,0
AFFeb	8020,9	916,6
AFMar	8540,6	582,4
AFAbr	8587,8	982,0
AFMai	7284,3	480,2

De um modo geral, as concentrações de acetato de butilo de aroma para aroma são idênticas, verificando-se uma maior variação nos condensados de aroma de novembro e de janeiro. Relativamente ao acetato de hexilo, as concentrações apresentaram algumas variações de mês para mês, sendo que nos condensados de aroma de dezembro e janeiro a concentração deste composto é maior.

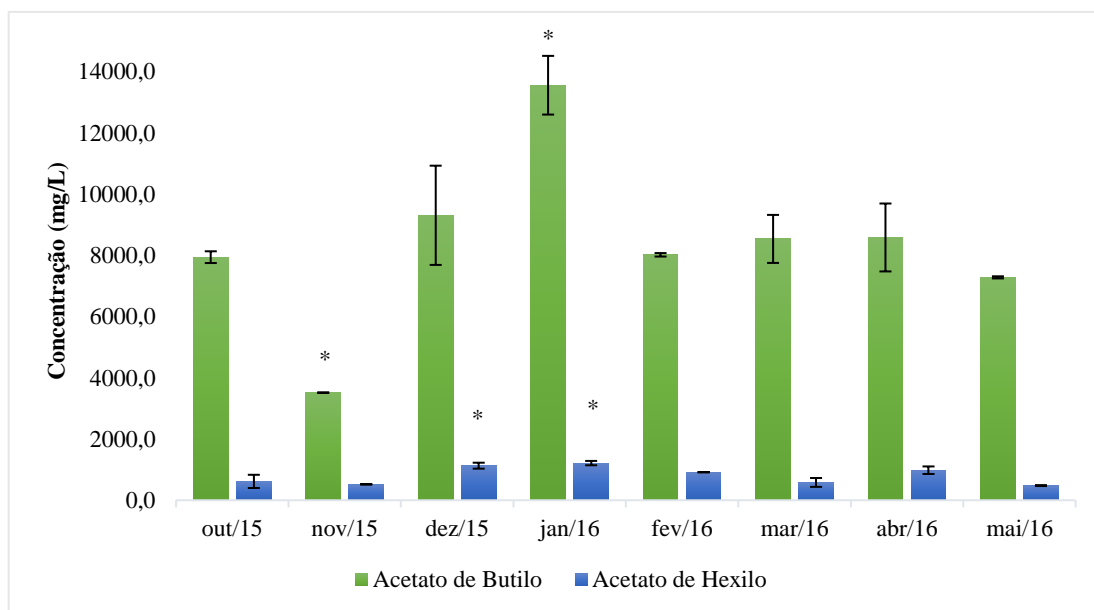


Figura 20 - Concentração do acetato de butilo e do acetato de hexilo nas diferentes amostras de condensado de aroma de pera analisadas mensalmente.
* $p < 0,05$;

Observando o gráfico de barras (Figura 20), e comparando os dois compostos voláteis analisados, a concentração do acetato de butilo nos diferentes condensados de aroma destaca-se comparativamente à do acetato de hexilo, visto que foi significativamente maior em todos os meses analisados ($p < 0,05$). Contudo, o aroma correspondente ao mês de janeiro foi o que apresentou maiores variações, visto que tanto as concentrações de acetato de butilo, como de acetato de hexilo, são significativamente maiores. Isto pode ser justificado pelo facto das peras já se encontrarem num estado de maturação mais elevado dos que as dos meses anteriores, dado que o amadurecimento é um processo regulado geneticamente, onde ambas as alterações moleculares e bioquímicas conduzem à modificação física da fruta, incluindo alterações de cor, amaciamento e o desenvolvimento de aroma e sabor característicos⁹⁰⁻⁹². Assim, a síntese de compostos voláteis do aroma está associada ao amadurecimento dos frutos e, por conseguinte, irá depender de estágio de desenvolvimento no momento da colheita. Desta forma, quanto mais maduro estiver o fruto, maior será a síntese dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma, neste caso a pera, justificando a elevada concentração dos ésteres nestes meses. No entanto, nos meses seguintes a concentração dos voláteis reduziu, podendo ser justificado pelo tempo de armazenamento das próprias peras em condições de atmosfera modificada. O armazenamento de frutos sob condições de atmosfera controlada pode reduzir a capacidade destes produzirem etileno e

alterar a produção de compostos voláteis no fruto⁵⁵. Num estudo de Lara *et al.*⁶⁷, verificaram que a inibição da biossíntese volátil é causada essencialmente pelo fornecimento limitado do substrato das enzimas, ao invés da degradação enzimática ou inativação. Para além disso, sugerem também que os frutos armazenados sob baixa concentração de oxigénio (hipoxia), apresentam uma redução na produção de voláteis quando são expostos novamente às condições ambientais, pelo facto destas condições causarem uma diminuição na atividade das LOX, podendo levar assim à escassez de lípidos como precursores para a biossíntese de ésteres. Ainda em relação às diferenças estatísticas, destaca-se também o mês de novembro para o acetato de butilo, mas por ter sido o mês que apresentou concentração menor deste composto, podendo ser justificado pelo estado de maturação em que a fruta se encontrava, como descrito acima

Ainda relativamente aos compostos existentes no aroma de pera, Kahle *et al.*⁹³ e Zlatic *et al.*⁹⁴, em estudos cujo objetivo foi identificar os compostos voláteis existentes na pera verificaram que também o acetato de butilo e o acetato de hexilo são dos mais indicativos do aroma a pera. Para além disso, também os ésteres de “pera” foram identificados, isto é, os isómeros de decadienoato de etilo e de metilo, assim como álcoois, tais como o butanol e o hexanol.

Para além das concentrações, foram também calculados os índices de aroma para cada composto detetado em cada uma das amostras de condensado de aroma analisadas. Este valor foi obtido através do rácio entre as diferentes concentrações de ambos os compostos voláteis nas amostras de aroma de pera ($\mu\text{g/L}$) e o limite de perceção sensorial associado a cada composto (Tabela 2), em $\mu\text{g/L}$.

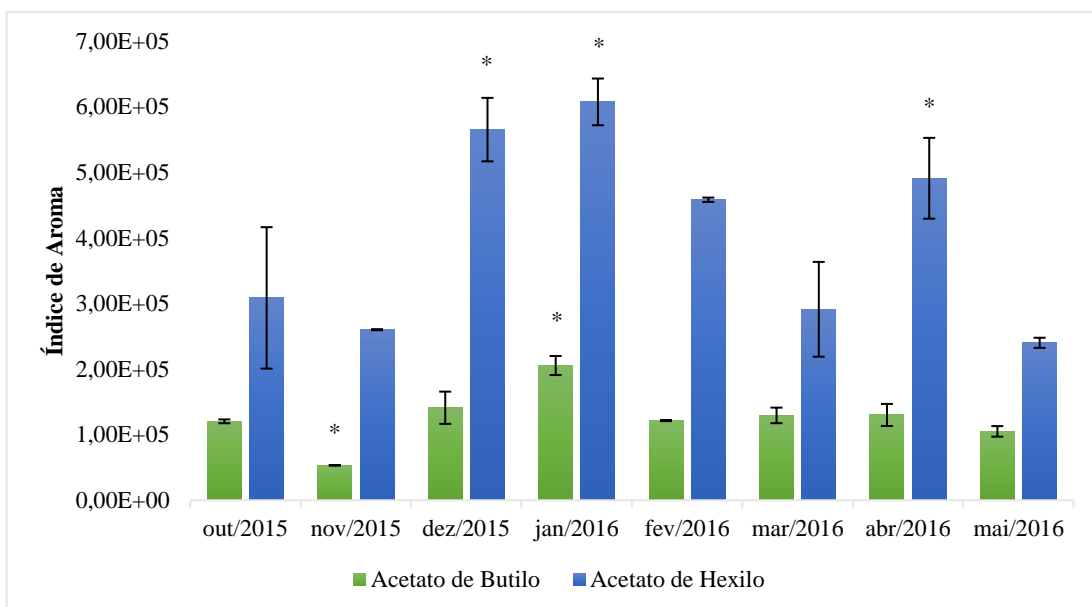


Figura 21 - Índice de aroma do acetato de butilo e de hexilo nas diferentes amostras de condensados de aroma de pera analisadas mensalmente.
* $p < 0,05$;

O índice de aroma permite determinar a relevância de cada composto volátil nos diferentes condensados de aroma analisados. Observando a Figura 21 pode-se verificar que, contrariamente ao que se constatou nas concentrações, o acetato de hexilo é quem apresenta um índice de aroma significativamente maior, sendo, neste caso, o que mais contribui para o aroma de pera. Este índice de aroma do acetato de hexilo foi, portanto, mais significativo ($p < 0,05$) nos meses onde se verificou maior concentração deste composto (dezembro e janeiro).

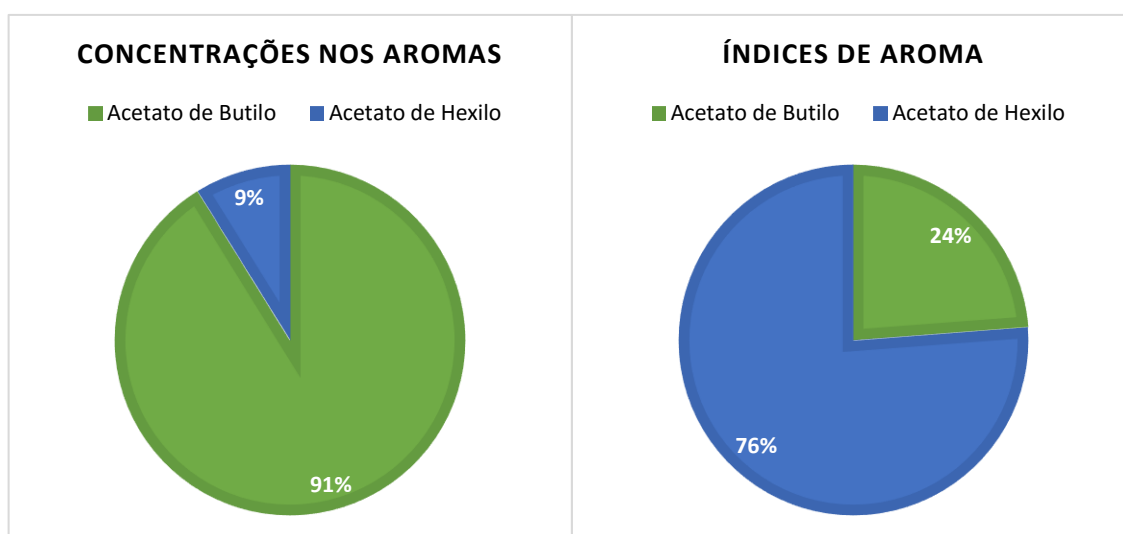


Figura 22 - Comparação das concentrações com os índices de aroma do acetato de butilo e do acetato de hexilo.

Como verificado anteriormente, o facto de uns compostos estarem presentes em maior concentração do que outros não significa que contribuam mais para o aroma a pera, pois tudo depende do limite de percepção sensorial de cada composto e, conseqüentemente, do índice de aroma. Na Figura 22 pode-se observar essa mesma diferença, ou seja, que elevadas concentrações não implicam elevados índices de aroma. Deste modo, apesar do acetato de butilo apresentar maior concentração nos diferentes aromas analisados, é o acetato de hexilo que apresenta maior índice de aroma. Tal acontece pelo facto de o acetato de hexilo ter menor limite de percepção sensorial (2 µg/L) do que o acetato de butilo (66 µg/L), contribuindo bastante para o aroma a pera, frutado.

Por outro lado, também através da análise sensorial realizada a todos os aromas recebidos após produção, se pode comprovar os elevados índices de aroma de ambos os compostos em alguns meses^{95, 96}. A análise sensorial é amplamente utilizada no auxílio do desenvolvimento de novos produtos, para se poder compreender a sua natureza, estudar a sua validade e manter a sua qualidade. Na Indumape, os condensados de aroma são avaliados numa escala de 1 a 5, quer no odor, quer no sabor. Deste modo, na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos da análise sensorial realizada aos diferentes condensados de aroma de pera analisados por cromatografia.

Tabela 11 – Resultados da análise sensorial realizada às diferentes amostras de condensado de aroma de pera frescos analisados.

Condensados de aroma de pera frescos analisados									
Data de Recolha		26-10-2015	18-11-2015	17-12-2015	07-01-2016	11-02-2016	03-03-2016	07-04-2016	06-05-2016
Análise Sensorial	Odor	3	3	4	3	3	4	3	3
	Sabor	4	3	4	3	3	4	3	3

Como se pode verificar, nos meses de outubro, dezembro e março os condensados de aroma de pera apresentaram-se mais intensos a nível de sabor, e os dois últimos referidos também a nível de odor. Contudo, e tendo em conta as concentrações de acetato de hexilo, composto com maior índice de aroma, e de acetato de butilo, apenas o mês de dezembro vai ao encontro com os resultados obtidos. Isto pode ser justificado pela presença de outros compostos voláteis que estejam também a contribuir para o aroma de pera e não estão a ser quantificados. A existência de compostos voláteis com descritores de aroma negativos também pode estar a contribuir negativamente para uma classificação sensorial mais baixa apesar da presença elevada dos compostos de descritor a pera.

Capítulo 4 – Conclusão e Perspetivas Futuras

Relativamente à análise da atividade das duas enzimas pectolíticas estudadas nas maçãs, conclui-se que ambas apresentam a maior atividade na fruta que se encontra num estado de maturação elevado (Semana 15). Verificou-se que ambas as PME's presentes nos pós de acetona testados promovem um aumento da libertação de metanol à medida que o tempo de reação aumenta. No entanto, a PME apresentou maior libertação de metanol e, conseqüentemente maior atividade (83,505 $\mu\text{mol MeOH/min}$), no pó de acetona correspondente a maçãs com mais tempo decorrido após a sua colheita. Já a PG destas mesmas maçãs provocou uma maior redução do tempo de escoamento da solução de pectato e, portanto, da viscosidade. Assim, provou-se que quanto maior o tempo decorrido após colheita das maçãs, maior a atividade das enzimas e, conseqüentemente, menor o desenvolvimento de turbidez nos sumos produzidos com este tipo de fruta. Perante estes resultados, a Indumape necessita de adicionar estas enzimas à polpa de maçãs com menor estado de maturação, minimizando assim os fenómenos de turvação. Quando as maçãs a utilizar se encontram em adiantado estado de maturação, ou seja, com maior tempo decorrido após a sua colheita, poderá não ser necessária a utilização de enzimas exógenas, pois as enzimas expressas pela própria maçã degradam as pectinas de modo a evitar a turvação do concentrado de sumo. Será assim necessário ajustar a quantidade de enzimas adicionadas consoante o estado de maturação das maçãs processadas.

Através da análise das diferentes amostras de condensados de aroma de pera pode-se concluir que tanto o acetato de hexilo como o acetato de butilo são compostos importantes na caracterização deste aroma produzido na Indumape, devido à elevada concentração e índice de aroma. Verificou-se que, embora o acetato de butilo exista em elevadas concentrações nestas amostras, é o acetato de hexilo que tem maior índice de aroma e, portanto, poderá contribuir mais para o odor a pera.

Futuramente, seria relevante realizar uma análise mais completa do perfil volátil do condensado de aroma de pera, não só compostos de aroma positivos, como também a nível de compostos voláteis de aromas negativos, pois do ponto de vista comercial é importante ter esse controlo. A par com a identificação, poder-se-ia também quantificar os mesmos para se poder fazer uma boa correlação em função da análise sensorial praticada na Indumape. Para além disso, também seria importante analisar se as condições de armazenamento dos aromas produzidos influenciam a sua qualidade, a nível sensorial e da concentração dos compostos de interesse. Quanto à atividade enzimática, seria importante adequar a utilização

de enzimas exógenas ao estado de maturação em que se encontra fruta, tendo também em conta os tempos de reação em que a sua ação é mais eficiente, de modo a prevenir o desenvolvimento de turvação nos sumos.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

- [1] Indumape - Industrialização de Fruta SA. Produtos [Em linha]. [Consult. 29-09-2015]. Disponível em: http://www.indumape.pt/produtos_descricao.php.
- [2] FAO. Principles and practices of small and medium-scale fruit juice processing [Em linha]. [Consult. 18-01-2016]. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/005/y2515e/y2515e10.htm#P5_34.
- [3] Sinha NK, Sidhu JS, Barta J, Wu J, Cano MP. Handbook of Fruits and Fruit Processing, Second Edition. 2012. 677 p.
- [4] Gunko S, Verbych S, Bryk M, Hilal N. Concentration of apple juice using direct contact membrane distillation. *Desalination Journal*. 2006; 190:117-124.
- [5] Tapre AR, Jain RK. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*. 2014; 21:447-453.
- [6] Pinelo M, Zeuner B, Meyer AS. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*. 2010; 88:259-265.
- [7] Sorrivias V, Genovese DB, Lozano JE. Effect of pectinolytic and amylolytic enzymes on apple juice turbidity. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2006; 30:118-133.
- [8] Alvarez S, Alvarez R, Riera FA, Coca J. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Journal of Food Processing and Preservation*. 1998; 138:377-382.
- [9] Çoklar H, Akbulut M. Effect on Phenolics, Hmf and Some Physico-Chemical Properties of Apple Juice Concentrate of Activated Carbon Applied at the Different Temperatures. *Journal of Food Process Engineering*. 2010; 33:370-383.
- [10] Carrín ME, Buglione MB, Lozano JE. Removal of dark compounds from fruit juices by membrane separation. 2007:16-20.
- [11] Yazdanshenas M, Tabatabaenezhad AR, Roostaazad R, Khoshfetrat AB. Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. *Separation and Purification Technology*. 2005; 47:52-57.
- [12] Li J, Wang Z, Ge Y, Sun Q, Hu X. Clarification and sterilization of raw depectinized apple juice by ceramic ultrafiltration membranes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006; 86:148-155.
- [13] Falguera V, Ibarz A. Squeezing Fruits in the Second Decade of the Twenty-First Century: The Current Situation of the Juice Industry. *Juice Processing - Quality, Safety and Value-Added Opportunities*. 2014. p. 394.
- [14] Onsekizoglu P, Bahceci KS, Acar MJ. Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment. *Journal of Membrane Science*. 2010; 352:160-165.
- [15] Benitez EI, Genovese DB, Lozano JE. Scattering efficiency of a cloudy apple juice: Effect of particles characteristics and serum composition. *Food Research International*. 2007; 40:915-922.
- [16] Bagci PO. Potential of membrane distillation for production of high quality fruit juice concentrate. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015; 55:1098-1113.
- [17] Echavarría AP, Torras C, Pagán J, Ibarz A. Fruit Juice Processing and Membrane Technology Application. *Food Engineering Reviews*. 2011; 3:136-158.
- [18] Feliciano RP, Antunes C, Ramos A, Serra AT, Figueira ME, Duarte CM, Carvalho A, Bronze MR. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods*. 2010; 2:35-45.

- [19] Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Detalhe Alimento: Maçã com casca [Em linha]. [Consult. 18-01-2016]. Disponível em: <https://insa.foodcase.ch/foodcomp/food?731>.
- [20] Srivastava P, Malviya R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2011; 2:10-18.
- [21] Dapeng Z, Yongzhang W. β -amylase in developing apple fruits: activities, amounts and subcellular localization. *Science in China*. 2002; 45:429-440.
- [22] Alkorta I, Garb C, Llama MJ, Serra JL. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. 1998; 33:21-28.
- [23] Instituto Nacional de Estatística. Human consumption of fruits per capita (kg/inhab) by Fruit specie [Em linha]. [Consult. 02-11-2015]. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000163&selTab=tab0&xlang=en.
- [24] FAO/WHO. Codex General Standard for Fruit Juices and Nectars (Codex Stan 247-2005) 2005.
- [25] Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Detalhe Alimento: Sumo de frutos 100%, maçã [Em linha]. [Consult. 24-12-2015]. Disponível em: <https://insa.foodcase.ch/foodcomp/food?901>
- [26] Nath A, Deka BC, Singh A, Patel RK, Paul D, Misra LK, Ojha H. Extension of shelf life of pear fruits using different packaging materials. *Journal of Food Science and Technology*. 2012; 49:556-563.
- [27] Santinho C, Barreiro MG, De Sousa R, Vilas Boas L. Volatile compounds of "rocha" pear clones after storage under regular or controlled atmospheres. 2003. p. 361-364.
- [28] Caffall KH, Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 2009; 344:1879-1900.
- [29] Ferreira SS, Passos CP, Madureira P, Vilanova M, Coimbra MA. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2015; 132:378-396.
- [30] Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*. 2010; 153:384-395.
- [31] Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008; 11:266-277.
- [32] Perez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*. 2003; 85:109-121.
- [33] Ponomareva SA, Golovchenko VV, Patova OA, Vanchikova EV, Ovodov YS. Comparative analysis of the spectrophotometric methods of the protein amount determination in the pectic polysaccharide samples. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2015; 41:133-139.
- [34] Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 2001; 57:929-967.
- [35] Popov SV, Ovodov YS. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. *Biochemistry (Moscow)*. 2013; 78:823-835.
- [36] Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*. 2006; 17:97-104.

- [37] Urias-Orona V, Rascon-Chu A, Lizardi-Mendoza J, Carvajal-Millan E, Gardea A, Ramirez-Wong B. A novel pectin material: extraction, characterization and gelling properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010; 11:3686-3695.
- [38] Wei J, Ma F, Shi S, Qi X, Zhu X, Yuan J. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2010; 56:147-154.
- [39] Vincken JP, Schols HA, Oomen R, Beldman G, Visser R, Voragen A. Pectin - The hairy thing. *Advances in pectin and pectinase research*. 2003:47-59.
- [40] Keegstra K. Plant cell walls. *Plant Physiology*. 2010; 154:483-486.
- [41] Dever MC, Cliff M, Lau OL. Maturity and ripening effects on chemical and sensory properties of apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1992; 60:355-360.
- [42] Mangas JJ, Dapena E, Rodriguez MS, Moreno J. Changes in Pectic Fractions during Ripening of Cider Apples. *Hortscience*. 1992; 27:328-330.
- [43] Giovane A, Servillo L, Balestrieri C, Raiola A, D'Avino R, Tamburrini M, Ciardiello MA, Camardella L. Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2004; 1696:245-252.
- [44] Wu LC, Siebert KJ. Characterization of Haze-Active Proteins in Apple Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50:3828-3834.
- [45] Horváthová V, Janeček S, Sturdík E. Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties. *Biologia, Bratislava*. 2000; 55:605-615.
- [46] Warren FJ, Zhang B, Waltzer G, Gidley MJ, Dhital S. The interplay of α -amylase and amyloglucosidase activities on the digestion of starch in in vitro enzymic systems. *Carbohydrate Polymers*. 2015; 117:192-200.
- [47] Kohli P, Kalia M, Gupta R. Pectin Methylesterases: A Review. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 2015; 5:1-7.
- [48] Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*. 2009; 3:9-18.
- [49] Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 2005; 40:2931-2944.
- [50] Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 2001; 77:215-227.
- [51] Schnurer M, Vogl K, Gossinger M. Prevention of conglomerate formation in not-from-concentrate single-cultivar cloudy apple juice by using different treatment methods. *Food Science and Technology International*. 2013; 19:89-96.
- [52] Jolie RP, Duvetter T, Van Loey AM, Hendrickx ME. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research*. 2010; 345:2583-2595.
- [53] 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; 29:222-228.
- [54] Yamasaki M, Yasui T, Arima K. Pectic Enzymes in the Clarification of Apple Juice. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1964; 28:779-787.

- [55] El Hadi MA, Zhang FJ, Wu FF, Zhou CH, Tao J. Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*. 2013; 18:8200-8229.
- [56] Riu-Aumatell M, Castellari M, Lopeztamames E, Galassi S, Buxaderas S. Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chemistry*. 2004; 87:627-637.
- [57] Predieri S, Rapparini F. Pear Fruit Volatiles. In: Janick J, editor. *Horticultural Reviews*. 2003.
- [58] Diban N, Ruiz G, Urtiaga A, Ortiz I. Granular activated carbon for the recovery of the main pear aroma compound: Viability and kinetic modelling of ethyl-2,4-decadienoate adsorption. *Journal of Food Engineering*. 2007; 78:1259-1266.
- [59] Sanz C, Olias JM, Perez AG. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: Press OU, editor. *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. 1997. p. 125–155.
- [60] Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*. 2008; 54:712-732.
- [61] Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist Journal*. 2013; 198:16-32.
- [62] Qin G, Tao S, Zhang H, Huang W, Wu J, Xu Y, Zhang S. Evolution of the aroma volatiles of pear fruits supplemented with fatty acid metabolic precursors. *Molecules*. 2014; 19:20183-20196.
- [63] Li G, Jia H, Wu R, Hussain S, Teng Y. Characterization of aromatic volatile constituents in 11 Asian pear cultivars belonging to different species. *African Journal of Agricultural Research*. 2012; 7:4761-4770.
- [64] Chen JL, Wu JH, Wnag Q, Deng H, Hu XS. Changes in the Volatile Compounds and Chemical and Physical Properties of Kuerle Fragrant Pear (*Pyrus serotina Rehd*) during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54:8842-8847.
- [65] Chervin C, Speirs J, Loveys B, Patterson BD. Influence of low oxygen storage on aroma compounds of whole pears and crushed pear flesh. *Postharvest Biology and Technology*. 2000; 19:279–285.
- [66] Riu-Aumatell M, López-Tamames E, Buxaderas S. Assessment of the Volatile Composition of Juices of Apricot, Peach, and Pear According to Two Pectolytic Treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53:7837-7843.
- [67] Lara I, Miró RM, Fuentes T, Sayez G, Graell J, López ML. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 2003; 29:29-39.
- [68] Sert E, Atalay FS. Esterification of Acetic Acid with Butanol. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2011; 25:221-227.
- [69] Martins AB, Graebin NG, Lorenzoni ASG, Fernandez-Lafuente R, Ayub MAZ, Rodrigues RC. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. *Process Biochemistry*. 2011; 46:2311-2316.
- [70] Vas G, Vekey K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004; 39:233-254.
- [71] Merkle S, Kleeberg K, Fritsche J. Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis - A Review. *Chromatography*. 2015; 2:293-381.
- [72] Lord H, Pawliszyn J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*. 2000; 885:153-193.

- [73] Crowell AM, Wall MJ, Doucette AA. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. *Anal Chim Acta*. 2013; 796:48-54.
- [74] Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 2011.
- [75] Nunes C, Castro SM, Saraiva JA, Coimbra MA, Hendrickx ME, Van Loey AM. Thermal and high-pressure stability of purified pectin methylesterase from plums (*Prunus domestica*). *Journal of Food Biochemistry*. 2006; 30:138-154.
- [76] Nunes C, Saraiva JA, Coimbra MA. Effect of candying on cell wall polysaccharides of plums (*Prunus domestica L.*) and influence of cell wall enzymes. *Food Chemistry*. 2008; 111:538-548.
- [77] Goulao LF, Santos J, de Sousa I, Oliveira CM. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2007; 43:307-318.
- [78] Unal MU, Sener A. Extraction and characterization of pectin methylesterase from Alyanak apricot (*Prunus armeniaca L.*). *Journal of Food Science and Technology*. 2015; 52:1194-1199.
- [79] Nunes C, Rocha SM, Saraiva J, Coimbra MA. Simple and solvent-free methodology for simultaneous quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID). *Carbohydrate Polymers*. 2006; 64:306-311.
- [80] Gross KC. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *Hortscience*. 1982; 17:933-934.
- [81] Torres S, Sayago JE, Ordonez RM, Isla MI. A colorimetric method to quantify endo-polygalacturonase activity. *Enzyme Microb Technol*. 2011; 48:123-128.
- [82] Gusakov AV, Markov AV, Grishutin SG, Semenova MV, Kondratyeva EG, Sinitsyn AP. Viscometric Method for Assaying of Total Endodepolymerase Activity of Pectinases. *Biochemistry (Moscow)*. 2002; 67:815-822.
- [83] Fiorini D, Pacetti D, Gabbianelli R, Gabrielli S, Ballini R. A salting out system for improving the efficiency of the headspace solid-phase microextraction of short and medium chain free fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 2015; 1409:282-287.
- [84] Garcia-Esteban M, Ansorena D, Astiasaran I, Ruiz J. Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta*. 2004; 64:458-466.
- [85] Denès J-M, Baron A, Renard C, Péan C, Drilleau J-F. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research*. 2000; 327:385-393.
- [86] Johnston JW, Hewett EW, Hertog M. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2010; 30:145-160.
- [87] Ortiz A, Graell J, Lara I. Preharvest calcium applications inhibit some cell wall-modifying enzyme activities and delay cell wall disassembly at commercial harvest of 'Fuji Kiku-8' apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2011; 62:161-167.
- [88] Wu Q, Szakacs-Dobozi M, Hemmat M, Hrzardina G. Endopolygalacturonase in apples (*Malus domestica*) and its expression during fruit ripening. *Plant Physiology*. 1993; 102:219-225.
- [89] Lu P-F, Qiao H-L, Xu Z-C, Cheng J, Zong S-X, Luo Y-Q. Comparative analysis of peach and pear fruit volatiles attractive to the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. *Journal of Plant Interactions*. 2013; 9:388-395.

- [90] Echeverría G, Graell J, López ML, Lara I. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2004; 31:217-227.
- [91] Seymour GB, Taylor, J.E., Tucker, G.A. . *Biochemistry of Fruit Ripening*. 1993. 454 p.
- [92] Berger RG. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. 2007.
- [93] Kahle K, Preston C, Richling E, Heckel F, Schreier P. On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products. *Food Chemistry*. 2005; 91:449-455.
- [94] Zlatić E, Zadnik V, Fellman J, Demšar L, Hribar J, Čejčić Ž, Vidrih R. Comparative analysis of aroma compounds in 'Bartlett' pear in relation to harvest date, storage conditions, and shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*. 2016; 117:71-80.
- [95] Chambers E, Koppel K. Associations of volatile compounds with sensory aroma and flavor: the complex nature of flavor. *Molecules*. 2013; 18:4887-4905.
- [96] Vilanova M, Genisheva Z, Masa A, Oliveira JM. Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchemical Journal*. 2010; 95:240-246.

Capítulo 6 – Anexos

6.1 Anexo I: Fluxograma de Produção de sumo concentrado de maçã e pera, aplicado na Indumape – Industrialização de Fruta, S.A.

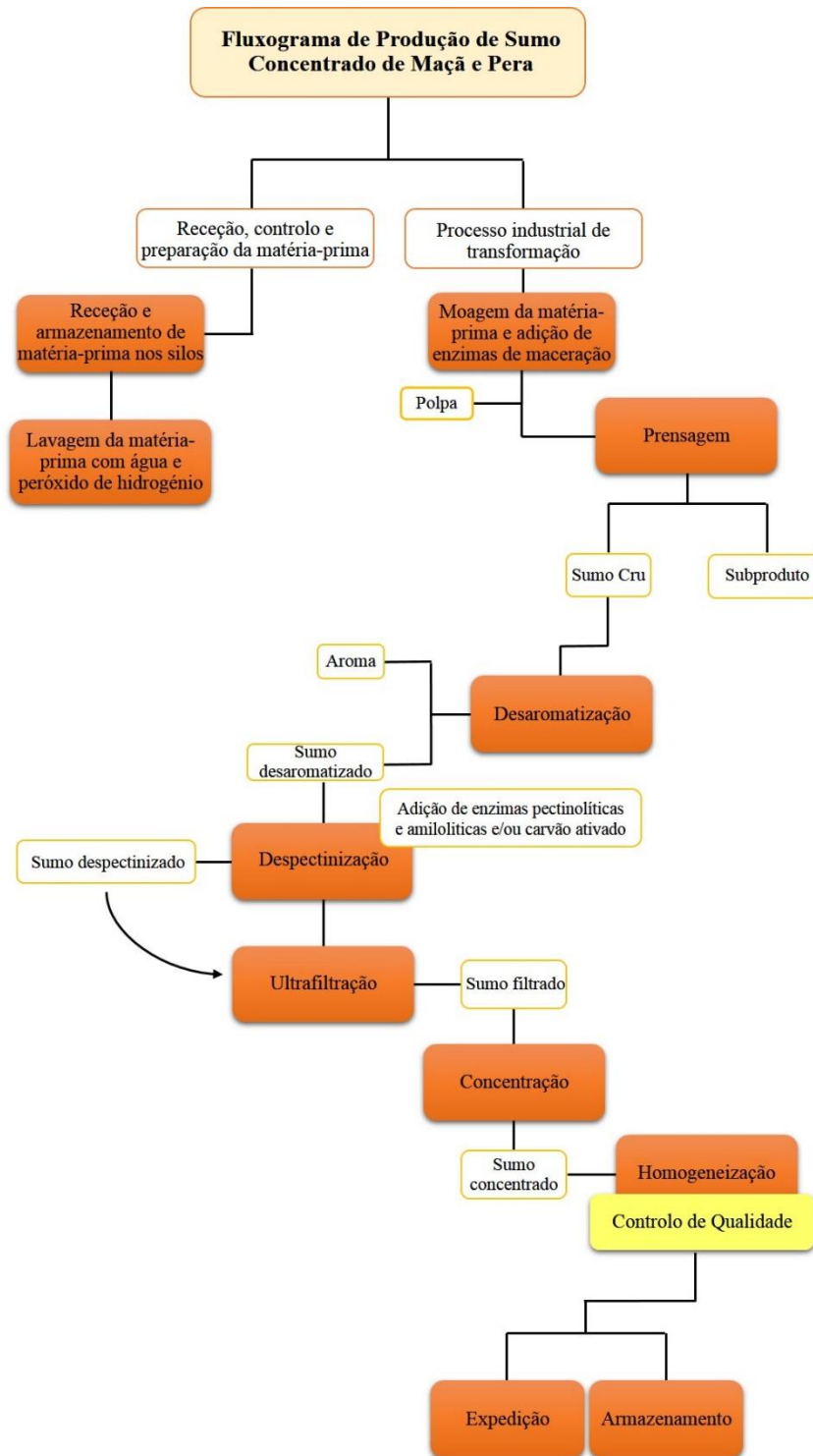


Figura 23 - Processo de Produção de sumo concentrado de maçã e de pera (Adaptado dos documentos fornecidos pelo Departamento de Qualidade da Indumape).

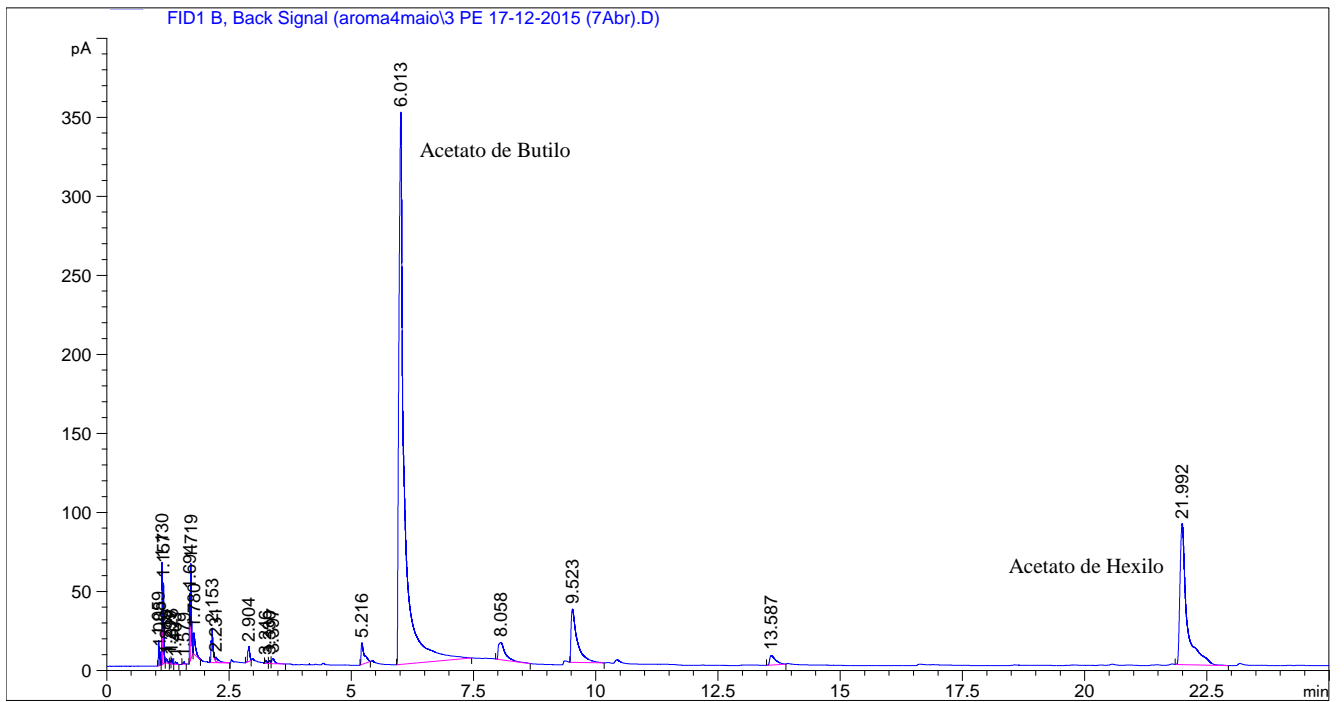


Figura 26 - Cromatograma associado à amostra AFDez.

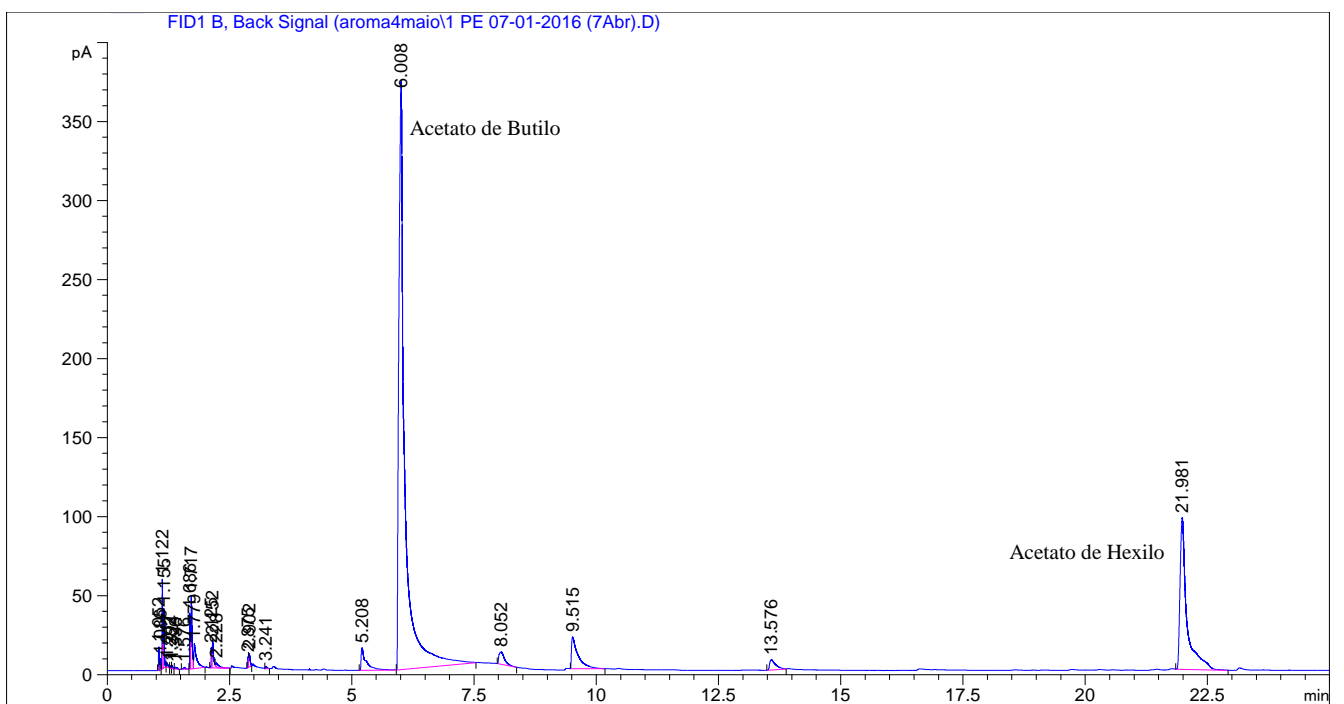


Figura 27 - Cromatograma associado à amostra AFJan.

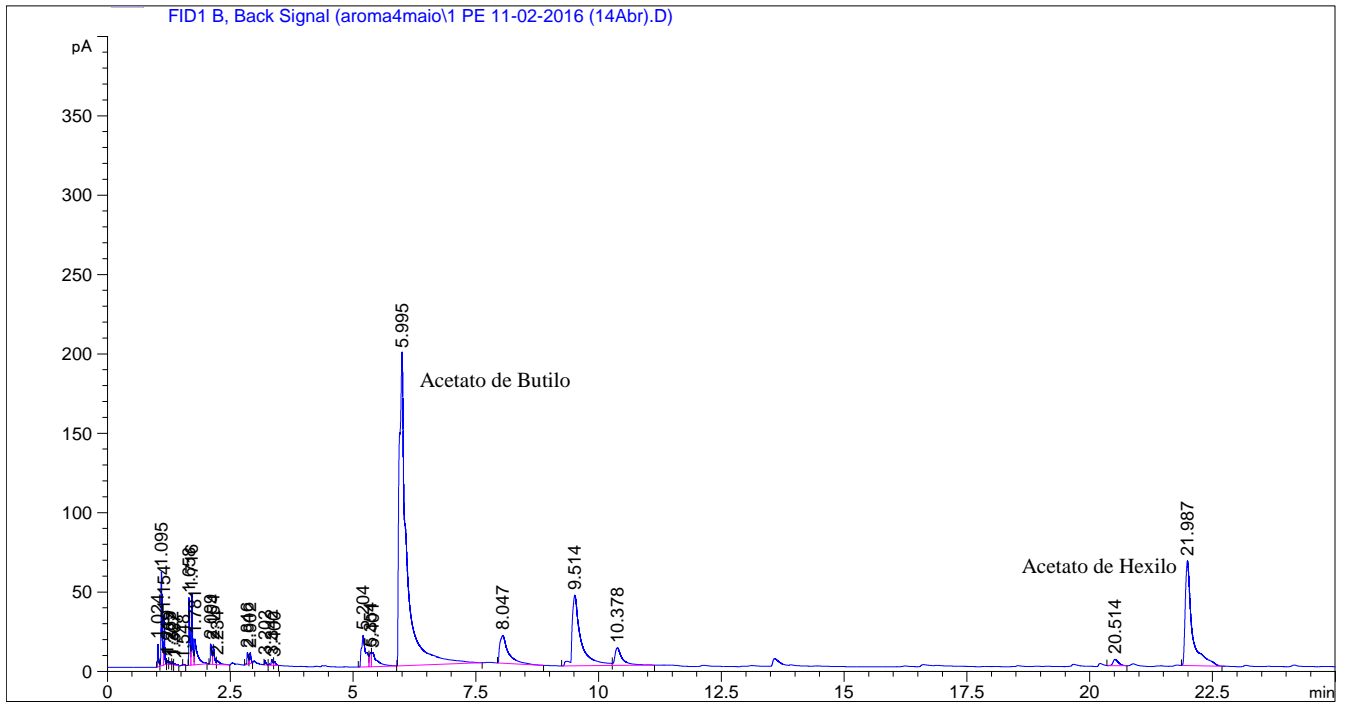


Figura 28 - Cromatograma associado à amostra AFFev.

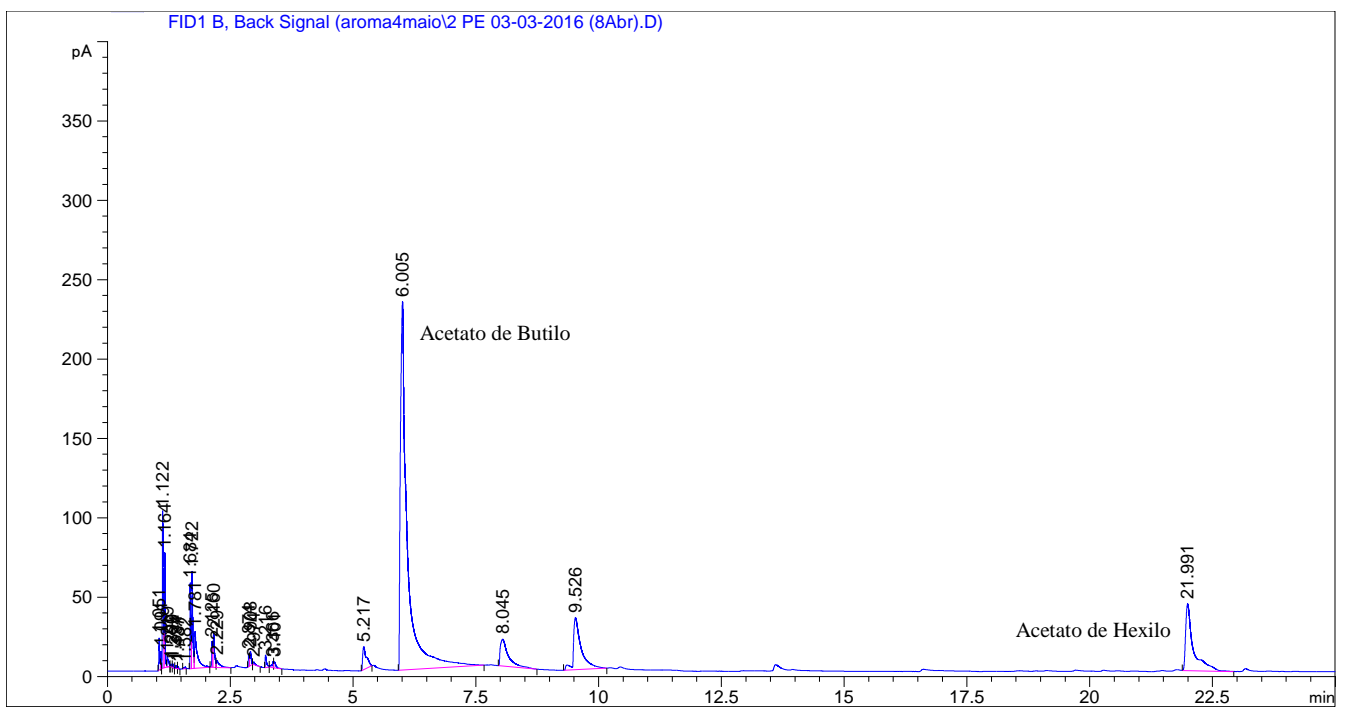


Figura 29 - Cromatograma associado à amostra AFMar.

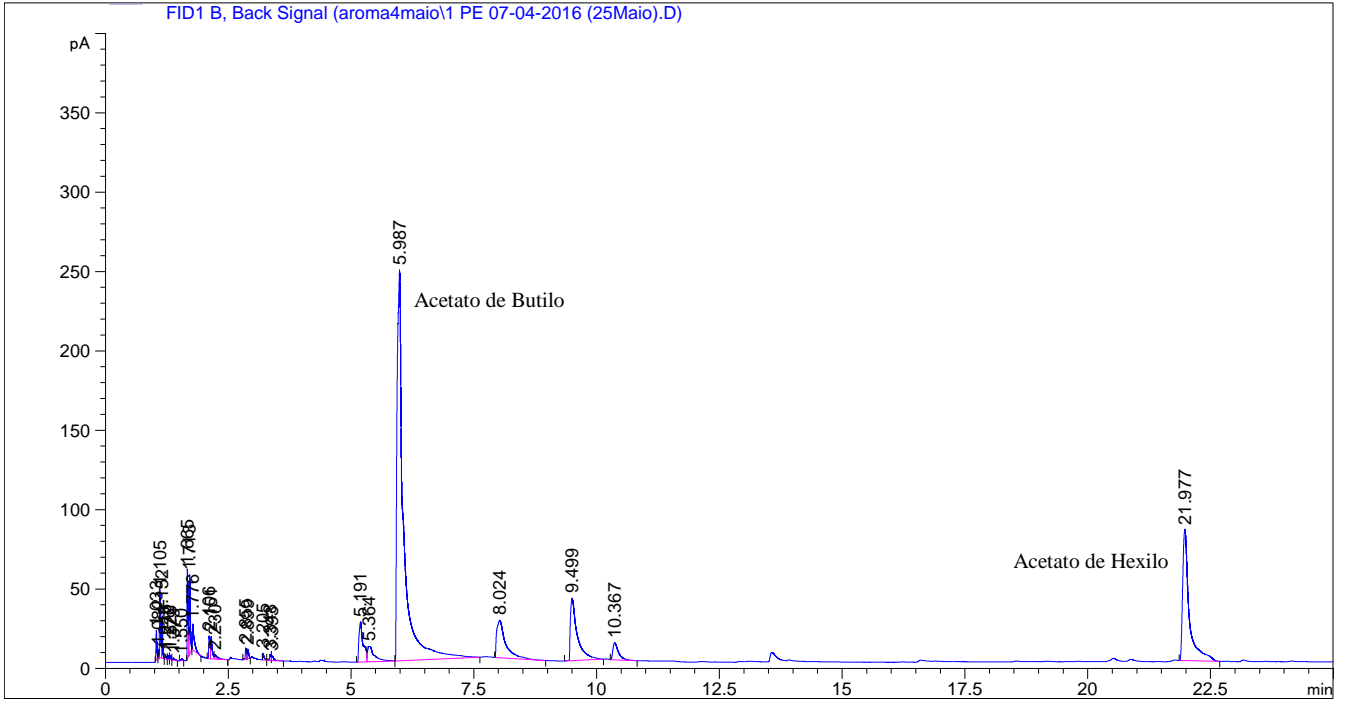


Figura 30 - Cromatograma associado à amostra AFABr.

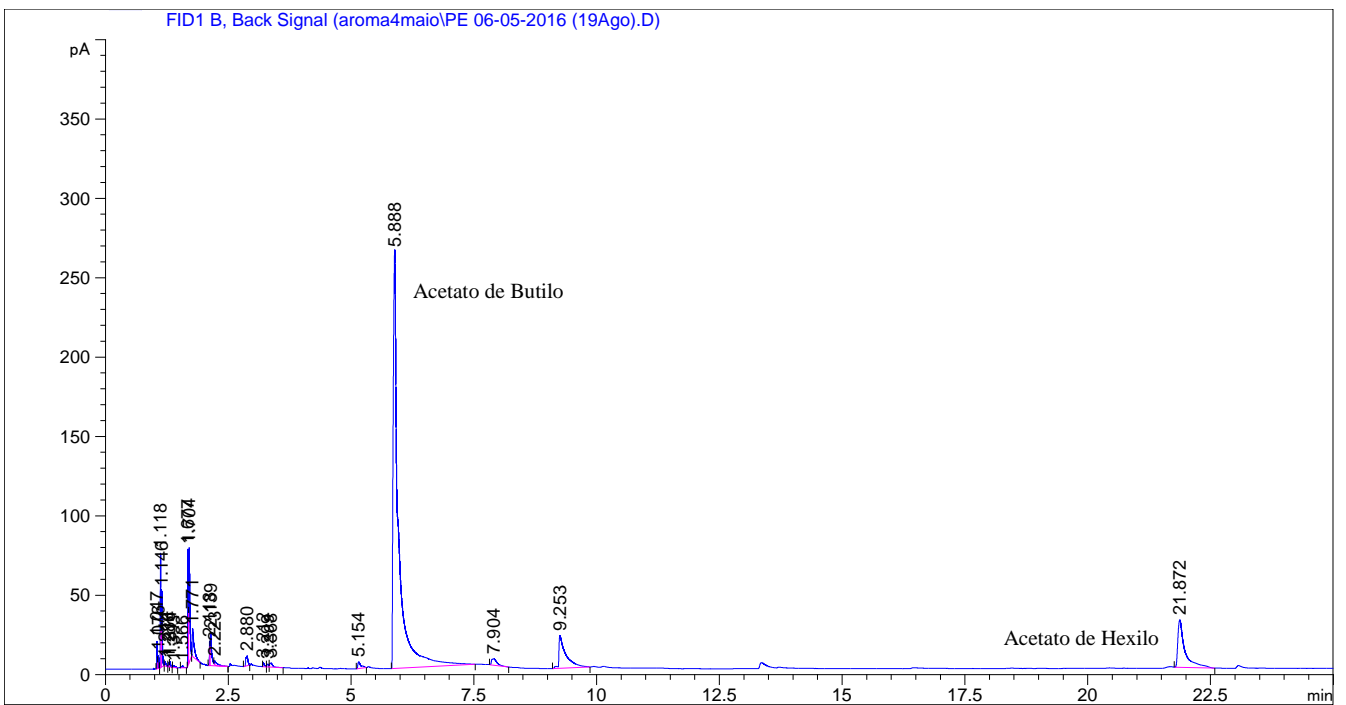


Figura 31 - Cromatograma associado à amostra AFMai.

6.3 Anexo III: Cromatogramas das soluções PME 1 (S44) e PME 3 (S15) analisadas em diferentes tempos de extração

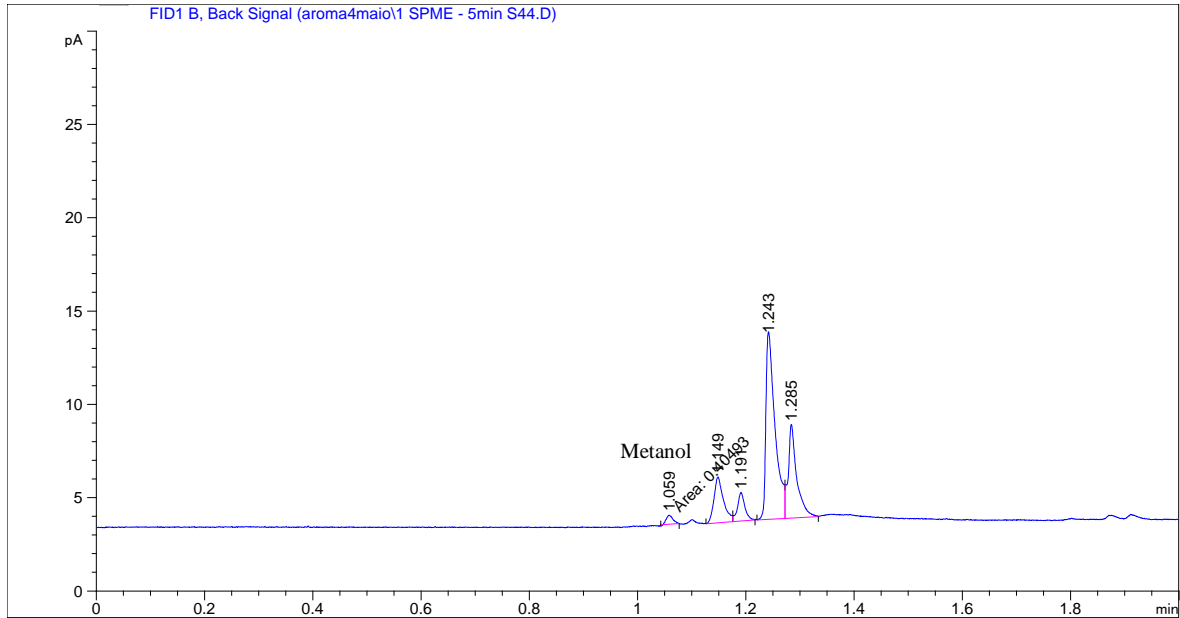


Figura 32 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 1 (5 min).

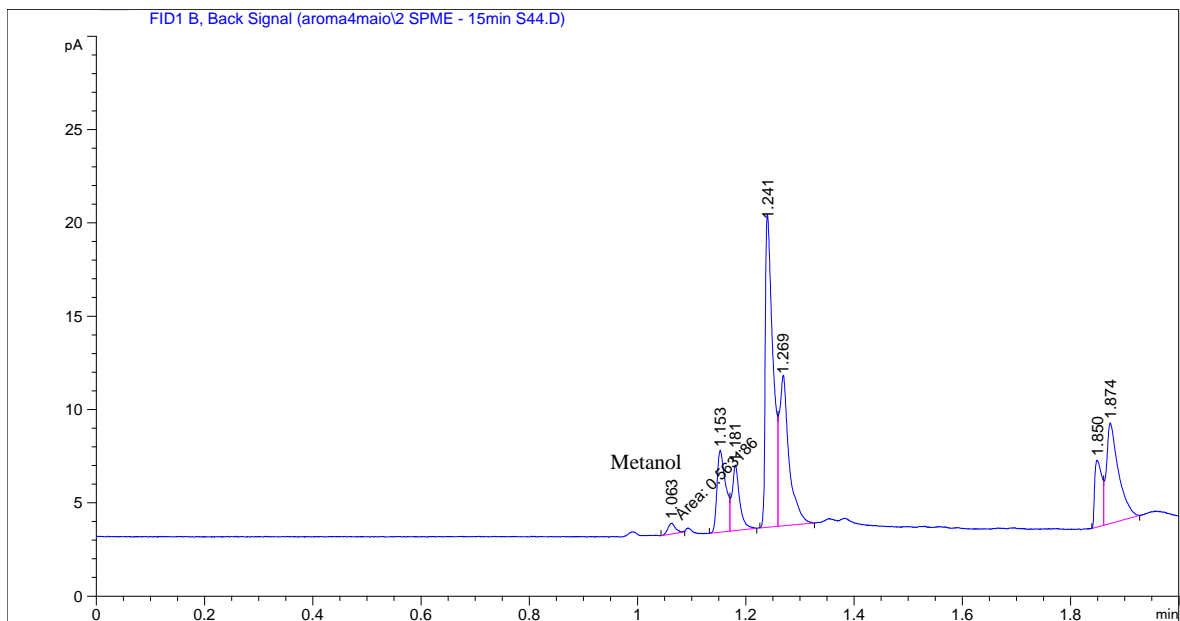


Figura 33 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 1 (15 min).

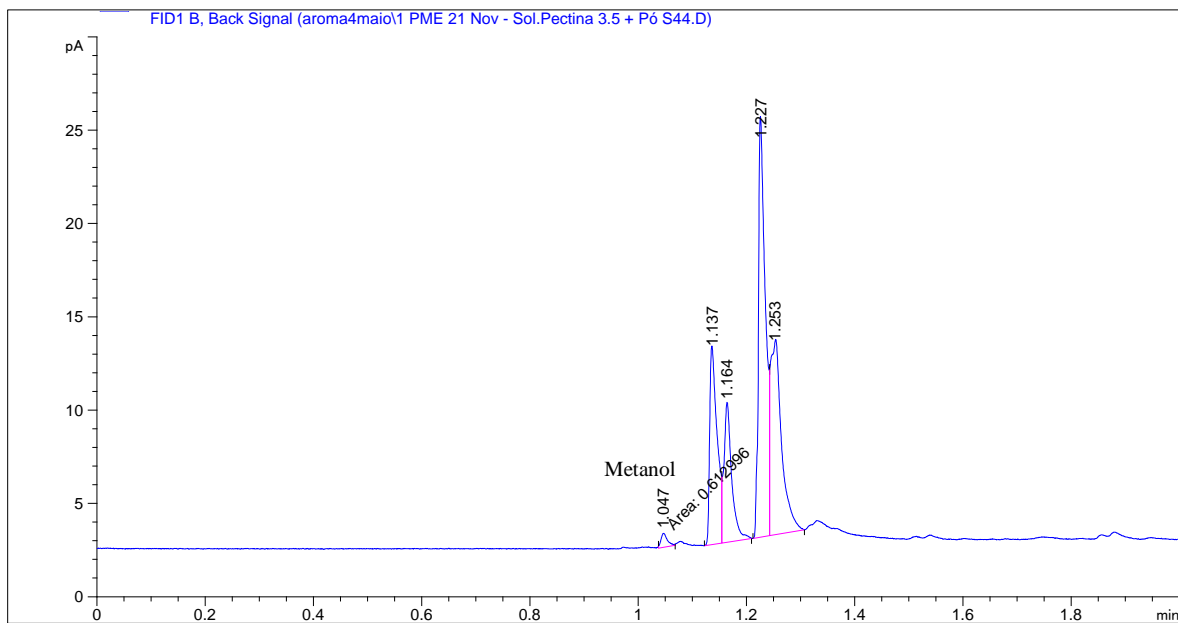


Figura 34 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 1 (30 min).

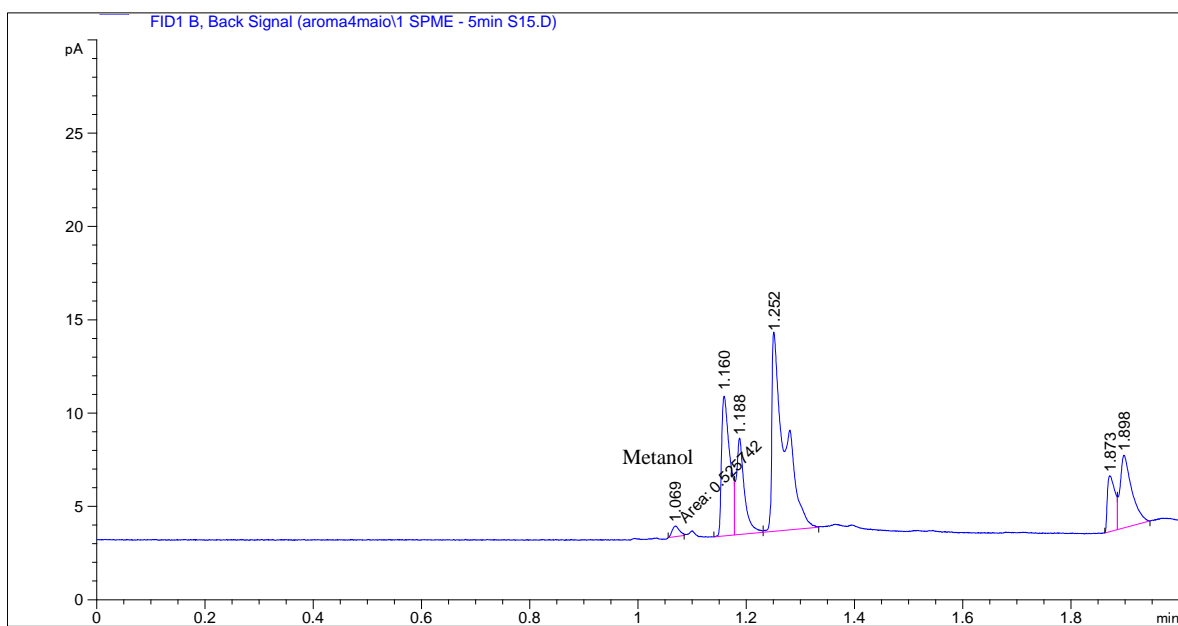


Figura 35 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 3 (5 min).

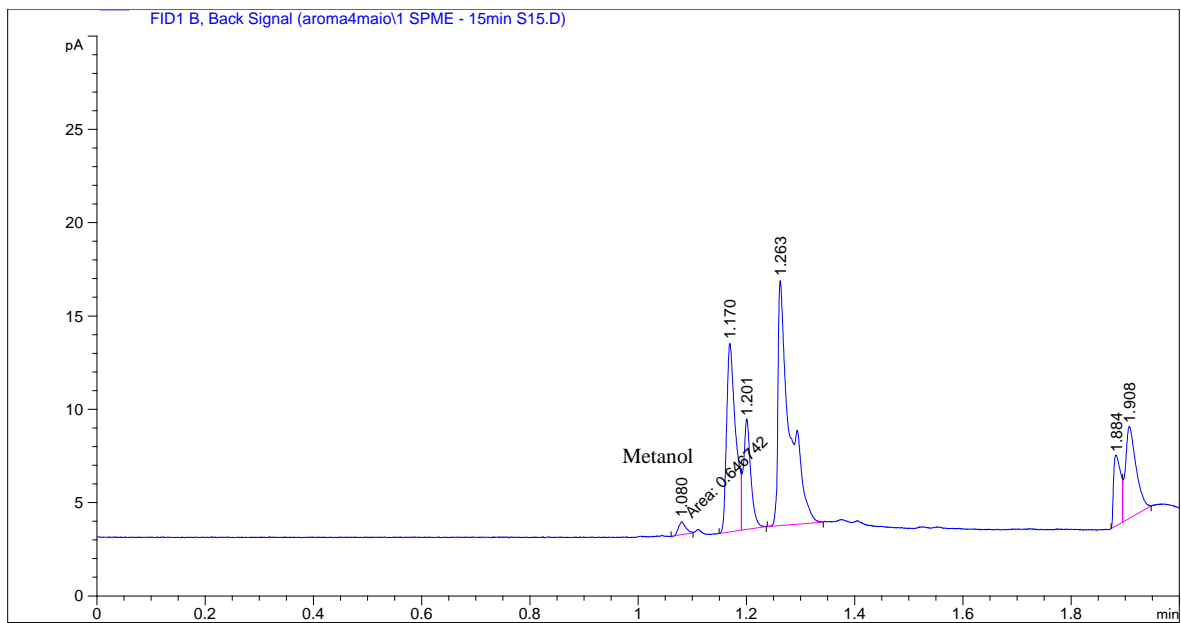


Figura 36 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 3 (15 min).

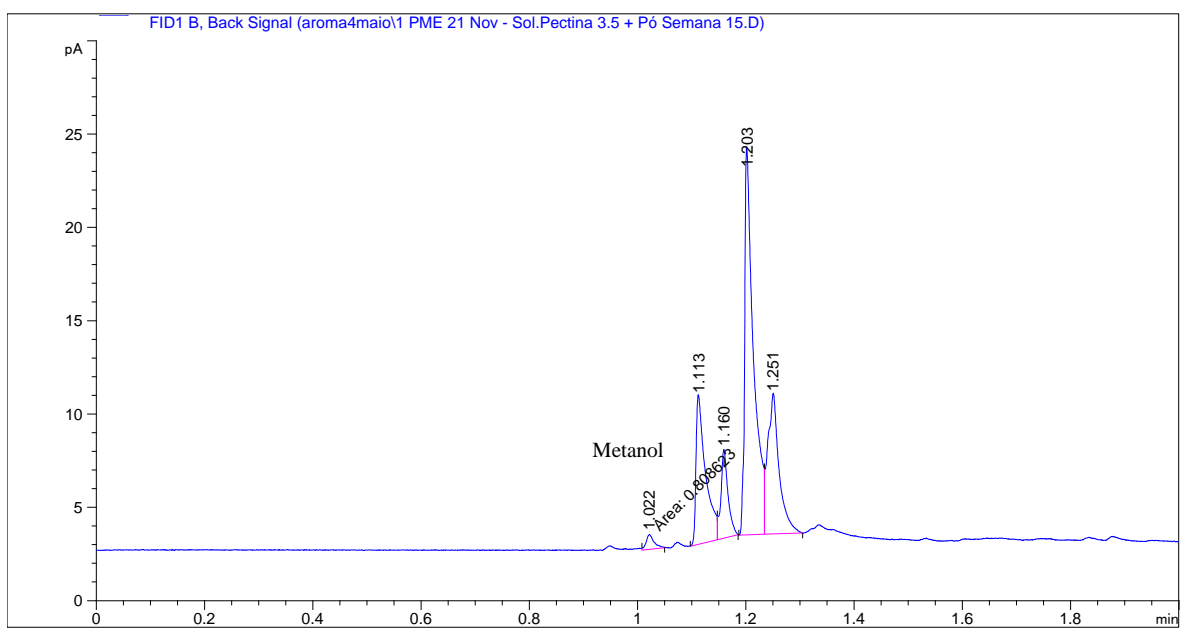


Figura 37 - Cromatograma obtido da análise da solução PME 3 (30 min).

6.4 Anexo IV: Curvas de Calibração dos padrões externos utilizados na detecção da atividade da pectina metilesterase e na caracterização do condensado de aroma de pera

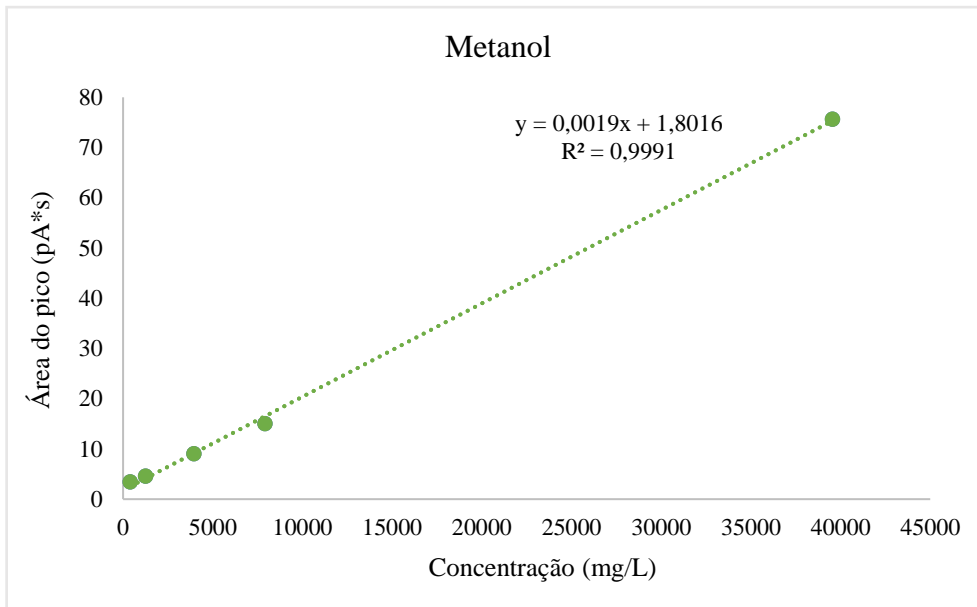


Figura 38 - Curva de calibração do metanol.

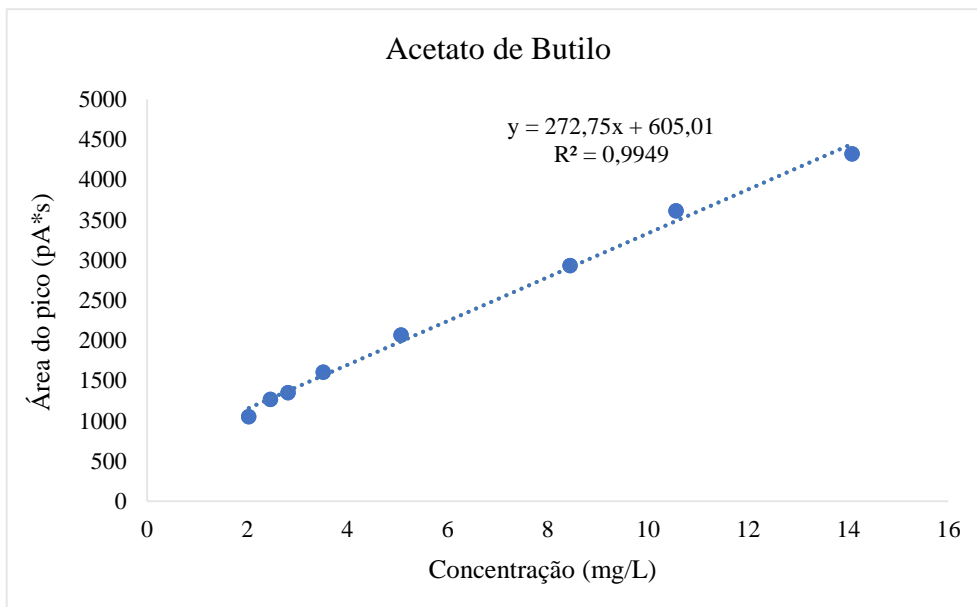


Figura 39 - Curva de calibração do acetato de butilo.

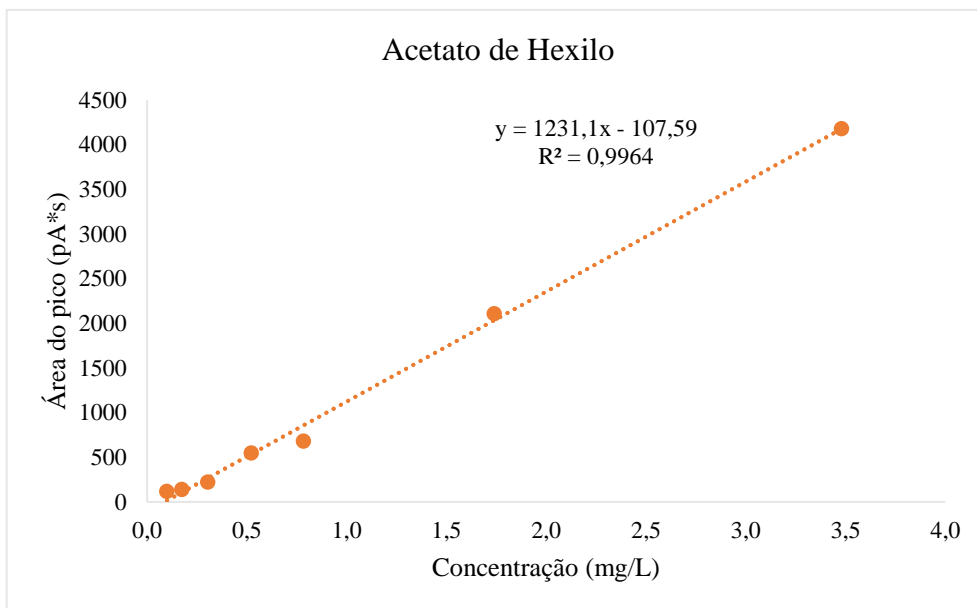


Figura 40 - Curva de calibração do acetato de hexilo.