



**Universidade de Aveiro**  
**2020**

**Departamento de Química**

**Luís Filipe**

**Gariso Agante Costa**

**Desenvolvimento de um sumo de  
maçã turvo**



**Universidade de Aveiro**  
**2020**

**Departamento de Química**

**Luís Filipe**  
**Gariso Agante Costa**

**Desenvolvimento de um sumo de**  
**maçã turvo**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes, Investigadora do CICECO no Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Engenheiro Oswaldo Trábulo, Diretor Geral da Indumape, Industrialização de Fruta, S.A.

*Dedico este trabalho aos meus pais.*

**o júri**

**presidente**

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues  
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**arguente**

Professora Doutora Dulcineia Maria de Sousa Ferreira Wessel  
Professora Coordenadora do Departamento de Indústrias Alimentares da Escola  
Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu

**orientador**

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes  
Investigadora Doutorada do Departamento de Química da Universidade de  
Aveiro

## **Agradecimentos**

À Universidade de Aveiro e à Doutora Cláudia Nunes pela orientação prestada, disponibilidade e conhecimento científico.

À Indumape - Industrialização de Fruta S.A. e ao Engenheiro Oswaldo Trabulo, pelo acolhimento e oportunidade de realização do estágio curricular.

À Engenheira Andreia Lopes pela simpatia, paciência, conhecimento e constante acompanhamento de todo o trabalho desenvolvido.

Aos restantes colaboradores da Indumape, pela simpatia, por me proporcionar uma fácil integração, por todo o conhecimento transmitido, em especial ao Senhor Luís, às Engenheiras Ana Paixão e Cátia Lopes e ao Rodrigo Silva.

Aos meus amigos João Letras e Renata Madeira, por toda a ajuda e amizade.

Aos meus pais um agradecimento especial, por me incentivarem todos os dias a fazer mais e melhor, e graças a eles a minha formação académica foi possível.

**Palavras-chave** Ácido ascórbico, pasteurização, turbidez, cor, análise sensorial.

## Resumo

O sumo de maçã turvo, bebida naturalmente turva com cor amarelo claro, é uma fonte de compostos nutricionalmente importantes, como compostos fenólicos, fibras e vitaminas. Os sumos turvos são normalmente instáveis, devido à degradação da cor, sedimentação precoce e alterações de sabor e aroma durante o processamento e armazenamento, para além da possível proliferação microbiana.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sumo de maçã turvo estável por um longo período de tempo. Numa primeira fase deste estudo, realizaram-se ensaios com o intuito de perceber qual o efeito da concentração de ácido ascórbico e da pasteurização no sumo de maçã turvo. O sumo com adição de 140 mg/L de ácido ascórbico revelou a melhor cor, sabor e aroma a maçã e o tratamento térmico a 80 °C/15 min foi o mais eficaz na inativação enzimática. Numa segunda fase, desenvolveram-se dois sumos turvos com duas maçãs de variedades diferentes, *Golden Delicious* e *Royal Gala*, de forma a avaliar o efeito das maçãs na estabilidade do sumo com o processamento e armazenamento. O efeito da temperatura de armazenamento também foi avaliado, tendo sido o sumo armazenado à temperatura de refrigeração (5 °C) e à temperatura ambiente. Comprovou-se que o tratamento térmico foi eficaz na eliminação microbiana e na inativação enzimática. Os parâmetros físico-químicos alteraram com o tratamento térmico, nomeadamente diminuição da intensidade de acastanhamento, aumento do teor em sólidos solúveis e turbidez. As análises ao sumo após 90 dias de armazenamento revelaram que era microbiologicamente seguro e verificou-se um aumento ligeiro da cor e turbidez dos sumos. Nos sumos armazenados a 5 °C observou-se uma menor variação nestas características físico-químicas. Na análise sensorial verificou-se que a cor e a aparência dos sumos são os atributos mais bem pontuados, sendo o sumo com melhor avaliação o produzido com maçã *Golden Delicious*. Em termos de sabor, os dois sumos de maçã turvos registaram sempre pontuações intermédias, exceto no armazenamento, em que o sumo produzido com a maçã *Golden Delicious* armazenado no frio teve uma melhor pontuação. Relativamente ao aroma, também o sumo fresco da *Golden Delicious* teve uma boa pontuação com a aplicação do tratamento térmico, mantendo-se estável com o armazenamento. Ao contrário, o sumo turvo da *Royal Gala* perdeu o aroma frutado durante o armazenamento às duas temperaturas.

O sumo de maçã *Golden Delicious* demonstra ser o sumo com mais qualidade e estabilidade, pelo menos, até 90 dias de armazenamento, principalmente quando armazenado à temperatura de refrigeração. Este sumo é o mais promissor para lançar no mercado, tendo em conta as características mais desejadas neste tipo de produto, cor amarelo claro, turbidez estável e aroma e sabor a maçã.

## Keywords

Ascorbic acid, pasteurization, turbidity, colour, sensorial analysis.

## Abstract

Cloudy apple juice, a naturally cloudy drink with a light yellow color, is a source of nutritionally important compounds, such as phenolic compounds, fibers and vitamins. Cloudy juices are usually unstable due to color degradation, early sedimentation and changes in flavor and aroma during processing and storage, in addition to possible microbial proliferation.

The aim of this work was to develop a cloudy apple juice that is stable for a long period of time. In the first phase of this study, tests were carried out in order to understand the effect of ascorbic acid concentration and pasteurization on the cloudy apple juice. The juice with 140 mg/L of ascorbic acid revealed the best color, flavor and aroma of apple and the heat treatment at 80 °C/15 min was the most effective for enzymatic inactivation. In a second phase, two cloudy juices were developed with two different apples varieties, Golden Delicious and Royal Gala, in order to assess the effect of apples on juice stability with processing and storage. The effect of the storage temperature was also evaluated with the juice being stored at refrigeration (5°C) and at room temperature. It was verified that the heat treatment was effective in microbial elimination and enzymatic inactivation. The physical-chemical parameters changed with the heat treatment, namely a decrease in the browning colour intensity and an increase in the content of soluble solids and turbidity. The juices analyzed after 90 days of storage revealed to be microbiologically safe with a slight increase in the color and turbidity. In juices stored at 5°C, it was observed less variation in these physical and chemical characteristics. The sensorial analysis showed that color and appearance of juices are the best punctuated attributes, being the juice with the best evaluation the one produced with Golden Delicious apple. In terms of flavor, the two cloudy apple juices always registered intermediate scores, except in storage, in which the juice produced with Golden Delicious apple stored in the cold had a better score. Regarding the aroma, Golden Delicious's fresh juice have a good score with the heat treatment, remaining stable with storage. On the contrary, the cloudy juice of the Royal Gala lost its fruity aroma during storage at two temperatures.

Golden Delicious apple juice is the juice with the highest quality and stability for, at least, 90 days of storage, especially when stored at refrigerated temperature. This juice is the most promising to launch on the market, taking into account the most desired characteristics in this type of product, light yellow color, stable turbidity and apple aroma and flavor.

# Índice Geral

Índice de figuras .....	10
Índice de tabelas .....	12
Lista de abreviaturas.....	13
1. Contextualização do trabalho na empresa.....	14
2. Revisão da literatura.....	16
2.1. Maçã.....	17
2.1.1. Composição da maçã.....	18
2.1.1.1. Polissacarídeos pécticos .....	19
2.1.1.2. Compostos fenólicos .....	21
2.1.2. Maturação da maçã.....	23
2.2. Caracterização do sumo de maçã turvo.....	24
2.3. Processamento do sumo de maçã turvo .....	25
2.4. Sumo de maçã turvo - Sistema coloidal .....	26
2.5. Efeito do processamento e armazenamento nas características do sumo de maçã turvo .....	28
2.5.1. Alteração da cor .....	28
2.5.2. Alteração da textura.....	31
2.5.3. Degradação microbiológica .....	33
2.6. Métodos de conservação para o sumo de maçã turvo .....	34
2.6.1. Tratamento térmico .....	34
2.6.2. Tratamento não térmico .....	35
3. Objetivo do trabalho .....	37
4. Materiais e métodos .....	39
4.1. Produção de sumo de maçã turvo .....	39
4.1.1. Ensaio preliminares dos tratamentos de conservação.....	40
4.2. Análise dos sumos de maçã turvo .....	41
4.2.1. Análise microbiológica.....	41
4.2.1.1. Determinação de microrganismos totais e bolores e leveduras.....	41
4.2.1.2. Determinação de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	43
4.2.2. Determinação da atividade da enzima polifenoloxidase .....	43
4.2.3. Análise físico-química .....	44
4.2.3.1. Determinação da intensidade de acastanhamento .....	44



4.2.3.2. Determinação da turbidez .....	44
4.2.3.3. Determinação do teor de sólidos solúveis (TSS) .....	45
4.2.3.4. Determinação do pH e da acidez titulável.....	45
4.2.3.5. Determinação do teor em compostos fenólicos totais.....	45
4.2.3.6. Determinação do conteúdo em ácido ascórbico.....	46
4.2.3.7. Determinação da atividade antioxidante.....	46
4.2.4. Avaliação sensorial .....	47
4.3. Análise estatística .....	48
5. Resultados e discussão .....	49
5.1. Seleção dos tratamentos de conservação .....	49
5.2. Avaliação das propriedades dos sumos de maçã turvo ao longo do armazenamento .....	52
5.2.1. Crescimento microbiano e atividade enzimática.....	53
5.2.2. Cor dos sumos.....	55
5.2.3. Turbidez e teor de sólidos solúveis.....	57
5.2.4. pH e acidez titulável .....	60
5.2.5. Teor em compostos fenólicos totais, conteúdo em ácido ascórbico e atividade antioxidante.....	62
5.2.6. Análise sensorial .....	65
6. Conclusão .....	69
7. Perspetivas futuras.....	70
8. Bibliografia .....	71
9. Anexo.....	77

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Logótipo da empresa Indumape Industrialização de Fruta, S.A.....	14
<b>Figura 2</b> - Evolução do consumo de sumos turvos (milhões de litros) na Europa e em Portugal.....	17
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da estrutura dos polissacarídeos pécticos mostrando os seus quatro domínios: homogalacturonanas (HG); xilogalacturonanas (XGA); ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II). Adaptada de <sup>23</sup> .....	21
<b>Figura 4</b> - Estruturas químicas: a) ácido clorogénico; b) epicatequina e c) cloridzina. ....	22
<b>Figura 5</b> - Reações de hidroxilação e oxidação catalisadas pela polifenoloxidase. Adaptada de <sup>27</sup> .....	29
<b>Figura 6</b> - Vias de degradação do ácido ascórbico (linha cheia, via anaeróbia; linha tracejada, via aeróbia). Adaptada de <sup>27</sup> .....	31
<b>Figura 7</b> - Variedades de maçãs utilizadas para produção dos sumos de maçã turvos: a - Golden Delicious e b - Royal Gala.....	39
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática das etapas para a colocação de amostra no Petrifilm para a deteção de bolores e leveduras e microrganismos totais. ....	41
<b>Figura 9</b> - Petrifilms com colónias: a - leveduras e bolores; e b - microrganismos totais..	42
<b>Figura 10</b> - Aspeto visual do sumo de maçã turvo submetido a diferentes concentrações de ácido ascórbico: Ensaio 1 - 125 mg/L; Ensaio 2 - 140 mg/L e Ensaio 4 - 250 mg/L. ....	50
<b>Figura 11</b> - Aspeto visual dos ensaios de sumo de maçã turvo sujeitos a diferentes binómios de pasteurização: 5 - 70 °C /5 min; 6 - 70 °C /15 min; 7 - 80 °C /5 min e 8 - 80 °C /15 min. ....	52
<b>Figura 12</b> - Intensidade de acastanhamento nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) são indicadas com letras diferentes. ....	56
<b>Figura 13</b> - Turbidez dos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.....	58
<b>Figura 14</b> - Teor de sólidos solúveis nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) são indicadas com letras diferentes. ....	59
<b>Figura 15</b> - pH dos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não tratados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.....	61
<b>Figura 16</b> - Acidez titulável nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não tratados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de	

refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.....	61
<b>Figura 17</b> - Teor de compostos fenólicos totais nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) não tratados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) a temperatura de refrigeração (Tref) e a temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes. ....	63
<b>Figura 18</b> - Conteúdo de ácido ascórbico nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) não tratados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes. ....	64
<b>Figura 19</b> - Atividade antioxidante nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não tratados (NP) e tratados termicamente (T0) a temperatura de refrigeração (Tref) e a temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.	65
<b>Figura 20</b> - Análise sensorial dos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente.....	67

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Composição química da maçã, apresentada em g/100 g de peso fresco, da parte edível (90%) <sup>13</sup> .....	18
<b>Tabela 2</b> - Ensaios preliminares do sumo de maçã turvo com diferentes tratamentos de conservação, ácido ascórbico (125, 140, 200 e 250 mg/L) e pasteurização (70 °C /5 min, 70 °C /15 min, 80 °C /5 min e 80 °C /15 min). ....	49
<b>Tabela 3</b> - Análise microbiológica de bolores e leveduras (B&L), microrganismos totais (MT) e Alicyclobacillus acidoterrestris (ACB) dos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) antes da pasteurização (NP), após a pasteurização (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento sob refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). ....	53
<b>Tabela 4</b> - Atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) não pasteurizados (NP) e pasteurizados (T0), armazenados sob refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). ....	55

## Lista de abreviaturas

ABTS - ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolinil-6-sulfónico)

ACB - *Alicyclobacillus acidoterrestris*

ACC - 1-ácido-aminociclopropano-1-carboxílico

DCIP - 2,6-diclorofenolindofenol

HG - homogalacturonanas

NP - não pasteurizado

NTU - unidades de turbidez

PG - poligalacturonase

PME - pectinametilesterase

POD - peroxidase

PPO - polifenoloxidase

RG-I - ramnogalacturonas do tipo I

RG-II - ramnogalacturonas do tipo II

SMT1 - sumo de maçã turvo 1

SMT2 - sumo de maçã turvo 2

T0 - após a pasteurização

T90 - ao fim de 90 dias de armazenamento

Tamb - temperatura ambiente

Tref - temperatura de refrigeração

XGA - xilogalacturonanas

## 1. Contextualização do trabalho na empresa

A Indumape - Industrialização de Fruta, S.A (**Figura 1**), empresa fundada em 1997, é especializada no desenvolvimento, transformação e produção de sumos concentrados de frutos para aplicação na indústria de bebidas. Nos últimos anos, esta empresa do setor agroalimentar, tem vindo a liderar a transformação de fruta em Portugal e quer acentuar cada vez mais a sua posição no mercado internacional. No momento atual, cerca de 80% da sua produção, é orientada para a exportação, para países como a Espanha, Reino Unido, Holanda e Alemanha.

Tem como principal objetivo desenvolver, para cada cliente, produtos que acrescentem valor à sua marca, diferenciando-se pela qualidade e excelência. Desta forma a empresa assegura a produção de sumos concentrados de maçã, pera, baga de sabugueiro e uva branca, e ainda dos seus respetivos aromas, que se conseguem através de uma etapa secundária do processo de produção do respetivo concentrado.

A empresa é constituída por uma unidade industrial em Portugal, situada na Parque Industrial Manuel da Mota, em Pombal. Nesta, existe um laboratório de análise alimentar, onde se realiza a caracterização microbiológica, físico-química e sensorial dos produtos. Com este laboratório, a empresa está capacitada a desenvolver novos produtos de forma a aumentar a capacidade de resposta às necessidades do cliente, e essencialmente, o ajuste rápido às mudanças bioquímicas dos produtos, sendo possível controlar continuamente a qualidade e a segurança do produto.



**Figura 1** - Logótipo da empresa Indumape Industrialização de Fruta, S.A.

A empresa está apostada na proatividade e inovação, conectada ao desenvolvimento de ideias de possíveis produtos, tendo em conta as tendências de mercado, como também as exigências do consumidor. Seguindo essa linha de base, a empresa está a investir na investigação e desenvolvimento de um novo produto para lançar no mercado, o sumo de

maçã turvo, ciente que o principal desafio é que se aproxime o mais possível da cor, sabor e aroma do fruto que lhe deu origem, e que seja estável por período extenso.

No entanto, dadas as características do sumo de maçã turvo, é recorrente ocorrer uma deterioração precoce do produto, decorrente da proliferação microbiana e atividade enzimática, levando à redução da qualidade e do tempo de vida do produto <sup>[1,2]</sup>. Daí a importância deste trabalho, que se centra nas características do sumo de maçã turvo, nas causas que levam à deterioração do mesmo e aprofunda procedimentos de conservação com intuito manter ou alargar a estabilidade e qualidade deste produto alimentar.

## 2. Revisão da literatura

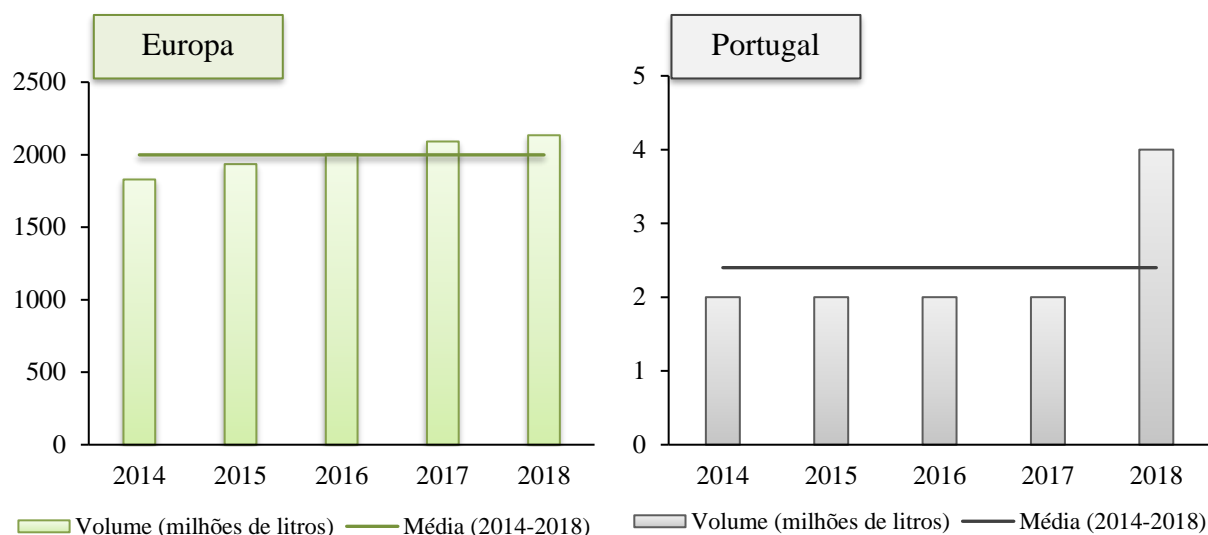
Os consumidores estão cada vez mais preocupados e conscientes da influência da alimentação na saúde, em parte, pela sensibilização para comportamentos saudáveis e pelas recomendações das mais diversas organizações de saúde que aconselham o aumento da ingestão de fruta e hortícolas <sup>[3]</sup>.

Neste contexto, os sumos de fruta, bebidas obtidas a partir do líquido retirado dos frutos, são produtos alternativos que, não substituindo a fruta fresca, podem oferecer uma opção adequada com uma composição variada e inserida num padrão alimentar saudável <sup>[4,5]</sup>. Os sumos de fruta são produtos minimamente processados, saudáveis, convenientes e seguros, condições enquadradas na exigência do consumidor atual. A ingestão destes produtos é fundamentada pela presença de compostos bioativos, provenientes inteiramente da fruta que lhes dá origem, que incluem vitaminas, minerais, fibras, carotenoides e compostos fenólicos, aos quais estão associadas propriedades benéficas para a saúde <sup>[5]</sup>. Por exemplo, os compostos fenólicos possuem ação antioxidante através de diversos mecanismos, entre eles incluem-se a capacidade de inibição de compostos oxidantes e/ou neutralização de radicais livres, limitando desta forma, a ocorrência de doenças cardiovasculares e crónicas, as principais causas de morte no mundo <sup>[6,7]</sup>.

O crescente protagonismo destes produtos, interligado com o volume de vendas no mercado global, tem conduzido a uma maior diversidade de sumos de fruta, assistindo-se constantemente à introdução de novas formas e novos sabores no mercado. No mercado dos sumos de fruta é de destacar uma evolução positiva do consumo de sumos turvos, cerca de 2% ao ano <sup>[6]</sup>.

O panorama geral do consumo de sumos turvos na Europa e em Portugal, segundo a AIJN (Associação Europeia de Sumos de Frutos), encontra-se evidenciado na **Figura 2**. A figura mostra que o consumo de sumo turvo foi tendencialmente crescente entre 2014 e 2018, este último ano com consumos de 2134 milhões de litros na Europa. Em Portugal esta tendência é ainda mais evidente com um aumento para o dobro no consumo deste produto em 2018 em relação aos anos anteriores. Prevê-se o aumento gradual do consumo de sumos turvos, associado inevitavelmente, à diminuição que se assiste no consumo de refrigerantes e até mesmo nos néctares, pois aos refrigerantes e néctares são adicionados açúcares tornando-os menos saudáveis <sup>[6]</sup>.





**Figura 2** - Evolução do consumo de sumos turvos (milhões de litros) na Europa e em Portugal.

## 2.1. Maçã

A maçã (*Malus domestica*) pertence à família *Rosaceae*, é um dos frutos mais consumidos e comercializados à escala global devido à expansão e resiliência agronómica da macieira e também às suas características organoléticas e propriedades nutricionais <sup>[8,9]</sup>. Em Portugal, a maçã é a espécie com maior peso na produção de frutos frescos, registando-se um aumento significativo da sua produção no ano de 2019, mais de 350 mil toneladas, subida de 35% face ao ano anterior. É nas regiões do Oeste, Ribatejo e Trás-os-Montes que há maior produção, seguindo-se das Beiras, Litoral e Interior. A maçã é consumida maioritariamente fresca, cerca de 70% da produção total, sendo a restante transformada nos mais diversos derivados, como fruta desidratada e sumos <sup>[10]</sup>.

O fruto existe em várias variedades, que variam na cor da epiderme, podendo adquirir cor vermelha, a mais frequente, verde e amarelo, entre tons mais claros ou escuros, e também na forma, que pode ser arredondada, alongada ou achatada. É caracterizado pelo seu sabor mais ou menos doce e ligeiramente ácido e textura farinhenta ou crocante, dependendo do estado de maturação e da variedade <sup>[11]</sup>. Compreendendo que há diferenças entre maçãs, que são capazes de influenciar a qualidade do sumo turvo, é pertinente estudar as características físicas e químicas do fruto.

### 2.1.1. Composição da maçã

A composição da maçã depende de vários fatores, tais como as condições de crescimento, região de cultivo, espécie e variedade, estado de maturação, duração e temperatura de armazenamento <sup>[12]</sup>.

A composição química média da parte edível da maçã (90%), que é o peso do fruto que pode ser integralmente utilizado como alimento, desprovido de materiais que se rejeitam por inutilizáveis, encontra-se sumariada na **Tabela 1** <sup>[13]</sup>.

**Tabela 1** - Composição química da maçã, apresentada em g/100 g de peso fresco, da parte edível (90%) <sup>13</sup>.

Macro constituintes	Valor por 100 g de parte edível
Água, g	82,9
Hidratos de carbono, g	15,5
dos quais açúcares, g	13,4
Proteína, g	0,2
Ácidos orgânicos, g	0,2
Lípidos, g	0,5
<b>Vitaminas</b>	
Vitamina A (equivalentes de retinol), µg	4,0
Caroteno, µg	26
a-tocoferol, mg	0,59
Tiamina, mg	0,02
Riboflavina, mg	0,03
Niacina, mg	0,10
Triptofano, mg	0,10
Vitamina B6, mg	0,04
Vitamina C, mg	7,0
Folatos, µg	5,0
<b>Minerais</b>	
Sódio, mg	6,0
Potássio, mg	139
Cálcio, mg	6,0
Fósforo, mg	8,0
Magnésio, mg	8,0
Ferro, mg	0,2

De acordo com a tabela 1, a água é o principal constituinte da maçã representado 82,9 g do seu peso, seguindo-se os hidratos carbono com 15,5 g dos quais 13,4 g são açúcares livres, 0,5 g de lípidos, 0,2 g de proteína e 0,2 g de ácidos orgânicos. A vitamina C é a vitamina que existe em maior quantidade, juntamente com a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). O potássio, o fósforo e o magnésio são os principais minerais do fruto <sup>[13]</sup>. Para além do conteúdo em fibra, a maçã contribui de forma positiva para a alimentação humana devido ao teor em compostos fenólicos, que variam entre 68 e 160 mg por 100 g de fruto <sup>[11]</sup>.

De acordo com a literatura, os açúcares frutose, sacarose e glucose são os mais comuns na maçã, representando cerca de 80% da quantidade total de hidratos de carbono. O equilíbrio entre o conteúdo em açúcares e o ácido málico, ácido orgânico maioritário na maçã, determina o sabor do fruto <sup>[14]</sup>. As características do seu aroma devem-se à presença de composto voláteis. Os mais importantes incluem ésteres, como acetato de butilo, etil-2-metilbutirato, aldeídos tais como o trans-2-hexenal e hexanal, os álcoois butanol e hexanol, e ainda cetonas, éteres e compostos terpénicos <sup>[15]</sup>.

Os atributos de qualidade desejáveis de maçãs utilizadas para a produção do sumo turvo são, atendendo à preferência do consumidor, a cor amarelo claro e a relação de açúcar e acidez <sup>[16]</sup>. Várias variedades de maçã são usadas para a elaboração de sumos turvos, mas a melhor qualidade de sumo é obtida com a *Golden Delicious* visto que do seu processamento resulta um sumo com coloração amarelo claro <sup>[17]</sup>. Contudo, a *Golden Delicious* contém elevado teor de enzimas, oxirredutases, e de compostos fenólicos, que são responsáveis pelo acastanhamento enzimático, que para a indústria é uma preocupação, pois pode colocar em causa prematuramente a qualidade do sumo turvo <sup>[17]</sup>. A *Granny Smith*, conhecida como maçã verde, por seu lado, tem baixa propensão a acastanhar devido ao reduzido teor de compostos fenólicos, que servem de substrato às enzimas oxirredutases, e à baixa acidez característica desta variedade <sup>[14]</sup>. Tendo em conta que cada variedade de maçã tem uma característica desejável para a elaboração do sumo de maçã turvo, muitas vezes a indústria de sumos combina variedades de maçã com o objetivo de obter produtos mais estáveis e até mais completos que vão de encontro aos desejos do consumidor <sup>[14]</sup>.

#### **2.1.1.1. Polissacarídeos pécticos**

Os polissacarídeos pécticos estão presentes em elevadas quantidades na maçã e são importantes para as características do fruto durante o crescimento, amadurecimento e processamento. Localizam-se na parede celular primária do fruto, estando em maior

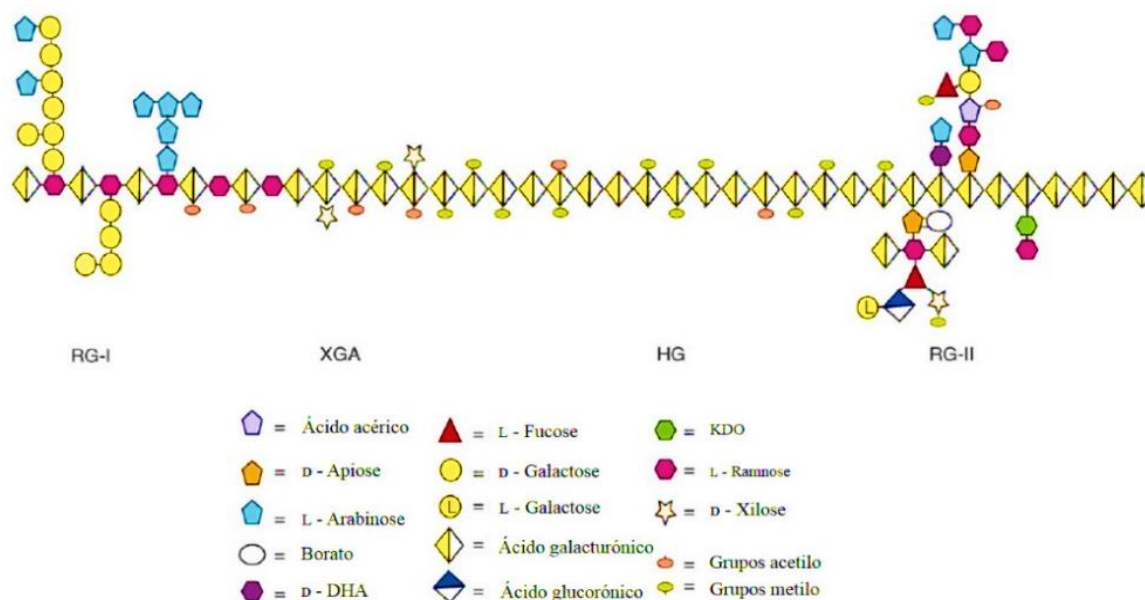
concentração na lamela média, contribuindo para a integridade e rigidez dos seus tecidos [18].

Os polissacarídeos pécticos são polímeros constituídos por ácido galacturónico que se encontram metilesterificados (denominados de pectinas), polímeros em que o ácido galacturónico se encontra desesterificado (ácidos pécticos), os sais de ácidos pécticos (pectatos) e os polissacarídeos neutros que encontram geralmente em associação com a cadeia principal de ácido galacturónico. São conhecidos quatro tipos de polissacarídeos pécticos (**Figura 3**), as homogalacturonanas (HG), as xilogalacturonanas (XGA) e as ramnogalacturonanas do tipo I e II (RG-I e RG-II) [19].

As homogalacturonanas são polissacarídeos pécticos constituídos por uma sequência longa e linear de resíduos de ácido D-galacturónico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4. Os resíduos de ácido D-galacturónico podem-se encontrar metil esterificados no grupo carboxílico C-6 ou acetilados no O-2 ou O-3. São os mais abundantes na maçã e, regra geral, têm elevado grau de metilação e baixo grau de acetilação [20].

As XGA são polissacarídeos pécticos ramificados em que os resíduos de D-xilose podem aparecer como ramificação ligados ao C-3 do ácido D-galacturónico da cadeia principal. Apesar de estarem presentes em todo o tipo de tecidos encontram-se maioritariamente nos tecidos reprodutivos [21].

As RG-II são polissacarídeos pécticos com o domínio mais complexo. Apesar da complexidade, a cadeia principal das RG-II é composta exclusivamente por resíduos de ácido D-galacturónico. As ramificações surgem no C-2 ou C-3 do ácido galacturónico. Estas podem ser constituídas por doze açúcares diferentes, incluindo a ramnose e arabinose, e podem ocorrer mais de vinte tipos de ligações diferentes entre os açúcares. Podem ainda fazer parte das cadeias laterais açúcares menos comuns, como a apiose, o ácido acérico, o ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico (DHA) e o ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) [21]. A cadeia poligalacturónica é interrompida por um domínio péctico denominado de ramnogalacturonana do tipo I, visto que a sua cadeia principal intercala resíduos de ácido D-galacturónico em ligação  $\alpha$ -1,4 com resíduos de L-ramnose em ligação  $\alpha$ -1,2. Por norma, cerca de 50% dos resíduos de ramnose são ramificados no C-4 com resíduos de arabinose e galactose, que formam arabinanas, galactanas e arabinogalactanas [22].



**Figura 3** - Representação esquemática da estrutura dos polissacarídeos pécticos mostrando os seus quatro domínios: homogalacturonanas (HG); xilagalacturonanas (XGA); ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II). Adaptada de <sup>23</sup>.

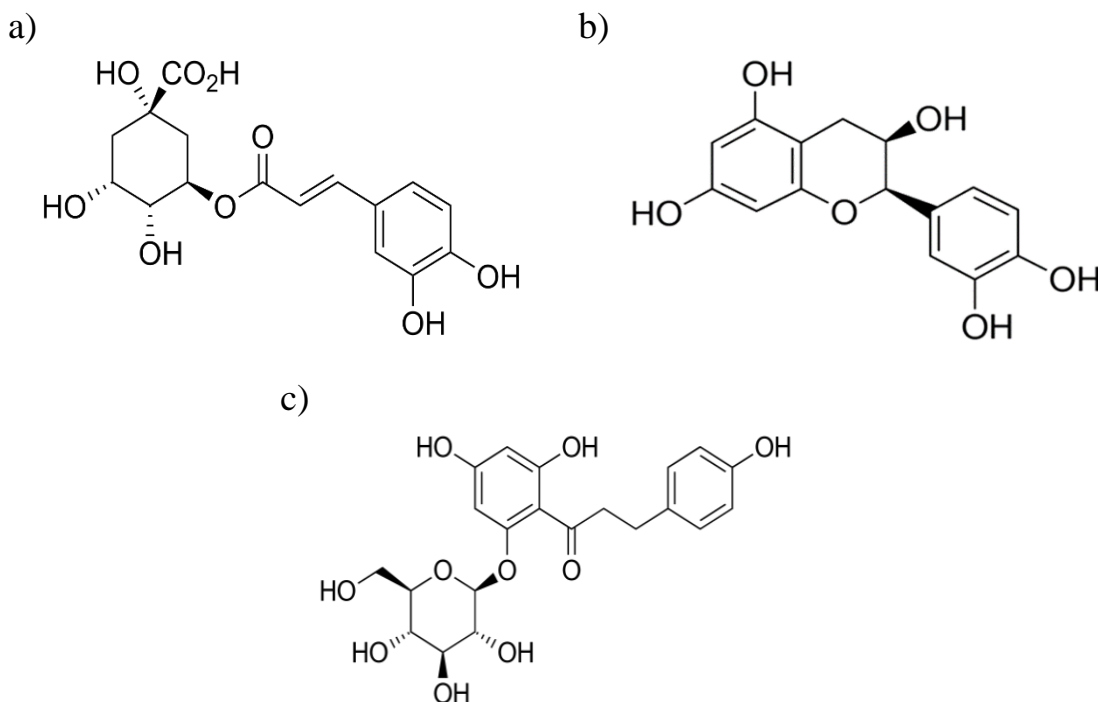
#### 2.1.1.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários que se caracterizam por possuírem, pelo menos, um grupo fenólico, ou seja, contêm um grupo hidroxilo associado a um anel aromático e abrangem desde moléculas simples até moléculas com algum grau de polimerização <sup>[24]</sup>. Os compostos fenólicos, associados à capacidade antioxidante, podem ser benéficos para a saúde, nomeadamente na prevenção de doenças cardiovasculares e crónicas <sup>[6]</sup>.

A nível industrial, concretamente na produção de sumos de maçã turvos, os compostos fenólicos são preponderantes na sua qualidade. Estes compostos são os principais responsáveis pela cor, sabor e adstringência dos sumos turvos. Nalgumas bebidas, tal como nos sumos de maçã turvos, os compostos fenólicos são responsáveis pela formação de turvação devido à agregação com as proteínas, característica que é desejável neste produto <sup>[25]</sup>. Por outro lado, a natureza destes compostos permite-lhes sequestrar radicais livres e serem facilmente oxidados a quinonas por ação das enzimas, polifenoloxidase e peroxidase. Por esta razão podem ser responsáveis pela alteração de características sensoriais, nutricionais e pela formação de compostos nocivos para a saúde <sup>[17]</sup>.

O conteúdo e composição em compostos fenólicos na maçã varia com a variedade, condições de cultivo, condições climáticas, estado de maturação dos frutos, e podem ser alterados durante o processamento e armazenamento devido à sua facilidade em participarem em reações de oxidação <sup>[11]</sup>.

Os compostos fenólicos da maçã pertencem a dois grupos, os ácidos fenólicos e flavonóides. Os primeiros incluem os ácidos hidroxicinâmicos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) e hidroxibenzóicos (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) <sup>[24,6]</sup>. Os ácidos hidroxicinâmicos são os mais expressivos no perfil fenólico da maçã com casca, tendo como principal representante o ácido 5-cafeoilquínico, conhecido como ácido clorogénico. Os flavonóides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) é o grupo maioritário na maçã e são representados por: 1) os flavanóis, que incluem a catequina, epicatequina e procianidinas (B1, B2, C1); 2) os flavonóis, principalmente quercetina e derivados de quercetina glicosilada; 3) as dihidrochalconas, como a cloridzina (polifenol característico da maçã); e 4) as antocianidinas, entre as quais a cianidina e derivados de cianidina glicosilada <sup>[26]</sup>. Estes compostos podem estar presentes sob a forma de ésteres, como acontece com os ácidos fenólicos, ou ligados a diferentes açúcares, como galactose, glucose, ramnose, arabinose, e xilose, no caso dos flavonóides <sup>[24]</sup>. De acordo com o padrão fenólico de várias variedades de maçã o ácido clorogénico, a epicatequina e a cloridzina são os compostos fenólicos mais abundantes, pela respetiva ordem <sup>[11,14]</sup>. Na **Figura 4** estão ilustradas as estruturas químicas dos principais compostos fenólicos presentes na maçã.



**Figura 4** - Estruturas químicas: a) ácido clorogénico; b) epicatequina e c) cloridzina.

### 2.1.2. Maturação da maçã

A maturação da fruta e as modificações físicas e bioquímicas que lhe estão associadas têm uma enorme influência, quer para o consumo direto ou para qualquer tipo de processamento, influenciando a sua aceitabilidade e a qualidade final de um produto processado [27].

A maturação é regulada predominantemente pelo etileno, uma hormona vegetal, e a via bioquímica para a sua síntese envolve um conjunto de reações que utilizam o aminoácido metionina como precursor. A metionina sofre a conversão em S-adenosil-metionina (SAM), mediada pela enzima metionina adenosil transferase, e posteriormente é convertido em 1-ácido-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima ACC sintase. Este composto, por sua vez, sofre ação da ACC oxidase convertendo o ACC em etileno [28]. A maçã é classificada como um fruto climatérico, quer isto dizer que, à medida que o amadurecimento ocorre existe um aumento na taxa de produção de etileno, acompanhado também pelo aumento da atividade respiratória [29].

A maturação tem efeitos positivos como a obtenção de um sabor, cor e textura desejável (características de qualidade da fruta), e disponibilidade de hidratos de carbono, ácidos orgânicos, fibra, vitaminas (características nutricionais), enquanto que os efeitos negativos podem ser a perda de peso e de firmeza e maior suscetibilidade a crescimento de microrganismos patogénicos [30].

A perda de firmeza da maçã com o armazenamento e outras alterações na sua textura estão relacionadas com a degradação dos polissacarídeos pécticos da parede celular. Esta degradação resulta da atividade de enzimas endógenas como a pectinametilesterase e poligalacturonase, responsáveis pela metil desesterificação e despolimerização dos polissacarídeos pécticos, respetivamente [31]. Por norma, a atividade da pectinametilesterase é máxima assim que se dá o início do estágio de maturação, sendo reportado um decréscimo quase total com o evoluir da maturação. Enquanto que a atividade da poligalacturonase só aumenta quando o decréscimo da pectinametilesterase. É necessária uma ação conjunta e coordenada da pectinametilesterase e da poligalacturonase para que ocorra uma maior degradação dos polissacarídeos pécticos [32].

Durante a maturação, o amido acumulado na maçã transforma-se em açúcares simples e oligossacarídeos, resultante da ação combinada de enzimas amilolíticas como a  $\alpha$ -amilases, a  $\beta$ -amilases e as amiloglucosidases [31]. Em termos práticos e no caso concreto do sumo de maçã turvo, é importante que as maçãs a utilizar tenham baixo conteúdo em amido, pois

caso assim não seja, podem induzir invariavelmente sumos turvos cinzentos devido ao processo de gelatinização do amido. Inclusivamente, durante o armazenamento dos sumos turvos pode ocorrer outro fenómeno designado de retrogradação do amido que consiste na reorganização das moléculas de amido gelatinizado através de ligações de hidrogénio em estruturas mais ordenadas, o que pode promover floculação indesejável <sup>[33]</sup>.

As mudanças fisiológicas observadas durante a maturação refletem-se também no sabor do fruto, sendo que a degradação do amido está diretamente relacionada com aumento do conteúdo total de açúcares e sensação de sabor doce no fruto. A diminuição da acidez com o avançar da maturação, é também responsável pelo sabor do fruto, dado que os ácidos orgânicos se convertem em açúcares, por via da gluconeogénese. Os compostos fenólicos tidos como responsáveis pelo sabor ácido e adstringente do fruto diminuem com o avançar do processo, até que se mantêm constantes. A diminuição do seu conteúdo deve-se ao facto de estes compostos serem muito reativos com propensão a oxidarem <sup>[27]</sup>.

As maçãs devem ser colhidas no momento certo para ter frutos de boa qualidade. No caso da elaboração do sumo turvo não há padrões de qualidade definidos para as maçãs. Contudo, consoante as composições químicas deste produto é possível constatar que no momento da colheita o teor de sólidos solúveis da maçã deve situar-se entre 10 e 16 °Brix. As maçãs devem também estar firmes e não podem apresentar cortes na casca, amolgadelas e manchas apodrecidas, podendo isto ser avaliado com facilidade visualmente.

## **2.2. Caracterização do sumo de maçã turvo**

O sumo de maçã turvo é um produto muito atrativo e apreciado para as diversas faixas etárias, graças às suas excelentes propriedades nutricionais e características de cor, aroma e sabor <sup>[1]</sup>. Na sua essência, o sumo de maçã turvo é uma bebida leve de cor amarelo claro, com turbidez definida e sem sedimentação, encorpado, suculento, não adstringente e singular quanto ao sabor doce e ácido <sup>[34]</sup>. Os principais requisitos apontados como fatores de qualidade do sumo de maçã turvo é a estabilidade da cor e da suspensão coloidal. Por outras palavras, o sumo de maçã turvo deve permanecer com a sua cor original e nenhuma ou apenas uma parte muito insignificante de partículas em suspensão no sumo deve sedimentar durante o prazo de validade definido <sup>[35,1]</sup>.

Os sumos de maçã turvos são genericamente constituídos por 84-89% de água, 10-15% de açúcares, 0,2-0,7% de fibra, 0,2% de ácidos orgânicos, 0,1-0,5% de proteína e 0-0,4% de lípidos. Os açúcares do sumo são exclusivos da fruta, nomeadamente glucose, frutose e



sacarose, proporcionando a sensação de doçura. Contêm também outros componentes como sais minerais, predominantemente potássio e sódio, vitaminas como as do complexo B (tiamina, riboflavina e niacina) e vitamina C, e ainda compostos fenólicos <sup>[36,37]</sup>. Podem também fazer parte destas bebidas alguns aditivos, como os antioxidantes, que têm como objetivo prevenir o acastanhamento enzimático e consequentemente manter a estabilidade do produto, assegurando que as suas características organoléticas se mantenham intactas durante o maior tempo possível <sup>[38,37]</sup>. No entanto, a composição química do sumo turvo depende da(s) variedade(s) de maçã que lhe dão origem, do estado de maturação da fruta e sobretudo do tipo e tempo de processamento <sup>[1]</sup>.

### **2.3. Processamento do sumo de maçã turvo**

Para a produção de sumo turvo deve-se utilizar maçãs de boa qualidade, ou seja, maduras e sem indícios de deterioração, uma vez que o estado sanitário da matéria-prima influencia a qualidade do produto final. O sumo de maçã turvo resulta de um processo industrial no qual a fruta passa por uma série de etapas que requerem o controlo permanente de qualidade. De um modo geral, o processo de fabrico começa com a lavagem das maçãs com água e agentes antimicrobianos para evitar a contaminação posterior do sumo. Em seguida, as maçãs vão para o moinho, onde por ação mecânica de lâminas rotativas vão sendo trituradas até serem reduzidas a polpa. Segue-se a prensagem, onde a polpa anteriormente obtida é espremida, de modo a extrair a maior quantidade de sumo possível. Na etapa da moagem e prensagem pode-se adicionar o ácido ascórbico, habitualmente uma quantidade que pode variar entre 100 e 700 g/L <sup>[39]</sup>. Uma vez obtido o sumo, este é sujeito a uma decantação a frio durante 24 horas, para que as partículas de maior diâmetro e peso que o constituem depositem no fundo do tanque. Após o tempo definido, é retirado o sumo do tanque de decantação com uma mangueira, que realiza a sucção da parte líquida, transferindo-a para um tanque de armazenamento. Deve-se garantir que o maior número possível de partículas fique no tanque de decantação de forma a evitar a sua sedimentação, mais tarde, na embalagem durante o período de armazenamento. Em seguida, o sumo é pasteurizado com o objetivo de inativar microrganismos e enzimas que possam desencadear a deterioração da cor, textura, sabor e odor no produto final. O sumo é depois arrefecido a uma temperatura próxima dos 20 °C para evitar a proliferação de microrganismos e a fim de preservar a textura, sabor, qualidade e aparência. Este passo, apesar de parecer discreto, permite salvaguardar o conteúdo de vitamina C e de proteínas no sumo, pois são particularmente sensíveis ao calor,

sendo que quanto mais rápido for o arrefecimento do sumo de maçã turvo, melhor será para a sua qualidade. Por último, o sumo é embalado em condições de assepsia de forma a evitar contaminações. Este sistema de enchimento evita o contacto do produto com o oxigénio, é seguro, higiénico e o enchimento efetua-se a uma temperatura próxima do ambiente, garantindo uma maior qualidade do sumo turvo <sup>[40]</sup>.

No fim do processo, o sumo de maçã turvo é submetido a um controlo de qualidade rigoroso que determina se cumpre as especificações necessárias para este tipo de produto. Este controlo de qualidade consiste na análise de parâmetros físico-químicos, tais como sólidos solúveis (°Brix), pH, acidez titulável, turbidez, cor e conteúdo em ácido ascórbico, e análises microbiológicas onde é avaliada a presença microrganismos totais, bolores e leveduras e *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

## **2.4. Sumo de maçã turvo - Sistema coloidal**

O sumo de maçã turvo é um sistema complexo que contém partículas finas de polpa em suspensão (suspensão coloidal) dispersas de forma heterogénea numa solução aquosa (sumo) de açúcares, pectina, ácidos orgânicos e sais <sup>[41]</sup>. As partículas da fase dispersa têm dimensões irregulares, variam entre 0,25 e 5 µm, e consoante os seus diâmetros podem ocorrer duas ações: a) partículas acima de 0,65 µm são instáveis e podem flocular e b) partículas abaixo de 0,65 µm são estáveis e apresentam carácter coloidal <sup>[42]</sup>. O diâmetro das partículas em suspensão desempenha um papel importante na qualidade do sumo de maçã turvo, principalmente no conteúdo nutricional e na estabilidade da suspensão <sup>[1]</sup>.

A suspensão coloidal, que ocorre naturalmente aquando da extração do sumo, é uma estrutura composta por um núcleo de proteínas com carga elétrica positiva, circundado e protegido por uma camada de pectina carregada negativamente <sup>[35]</sup>. O mecanismo mais aceite para a formação da suspensão coloidal é a complexação/associação entre a pectina e as proteínas, assim que os biopolímeros se misturam. A complexação/associação é fomentada quando os biopolímeros possuem cargas opostas um do outro (polianião-polycatião) resultando na formação de um sistema de duas fases coexistentes, uma fase é rica em solvente possuindo uma pequena quantidade de biopolímeros e a outra fase é rica nos biopolímeros <sup>[43]</sup>.

Os compostos fenólicos presentes no sumo têm a capacidade de se ligarem às proteínas formando um complexo proteína-compostos fenólicos e, deste modo, para além da pectina e das proteínas, também os compostos fenólicos compõem a suspensão coloidal <sup>[35]</sup>.

Basicamente, os compostos fenólicos apresentam zona apolares, como o anel aromático, que podem interagir com zonas apolares das proteínas, tais como as cadeias laterais de aminoácidos como a prolina. A interação entre as proteínas e os compostos fenólicos dependem sobretudo de ligações hidrofóbicas e de ligações por pontes de hidrogénio. Sabe-se ainda que os compostos fenólicos também têm capacidade de se auto-associar com outros compostos fenólicos, mesmo quando estão ligados a proteínas <sup>[44]</sup>.

O comportamento reológico da suspensão coloidal é regulado pelas: a) características do sumo como viscosidade, composição química, polaridade e concentração de eletrólitos; b) características das partículas em suspensão que englobam dimensão, forma, tamanho e distribuição; e c) forças eletrostáticas repulsivas e forças de Van der Waals que ocorrem entre partículas <sup>[42]</sup>.

A pectina presente no sumo age como um coloide protetor, decisivo para a estabilidade da suspensão coloidal. A pectina apresenta uma superfície altamente hidrofílica com afinidade à fase aquosa, que impede a agregação de componentes hidrofóbicos e consequente floculação <sup>[45]</sup>. No entanto a presença de enzimas endógenas do sumo que atuam sobre a pectina podem provocar a instabilidade da suspensão coloidal <sup>[46]</sup>. É o caso da pectinametilesterase que promove a desesterificação dos resíduos de ácido galacturónico da pectina <sup>[47]</sup>. Quando o processo de desesterificação é rápido e/ou extenso dá-se a formação de ácidos pécticos insolúveis, permitindo a formação de agregados de componentes hidrofóbicos e subsequente floculação, que conduz à perda da conformação coloidal <sup>[35]</sup>. A complexação entre compostos fenólicos e proteínas pode levar também à formação de agregados e eventual floculação, dependendo das concentrações relativas de proteínas e compostos fenólicos. Um estudo evidencia que a catequina e epicatequina, dois flavanóis abundantes no sumo de maçã turvo, podem-se associar à proteína, havendo o aumento da área de superfície hidrofóbica que impulsiona a floculação <sup>[35]</sup>. Os compostos fenólicos ao sofrerem reações oxidação por ação da polifenoloxidase podem contribuir para a instabilidade do sumo de maçã turvo, uma vez que formam pequenas gotículas insolúveis que coalescem em gotículas maiores. Segundo a literatura, espera-se que este acontecimento não seja apreciável dado que o tratamento térmico aplicável aos sumos de maçã turvos inibe a atividade da polifenoloxidase <sup>[35]</sup>.

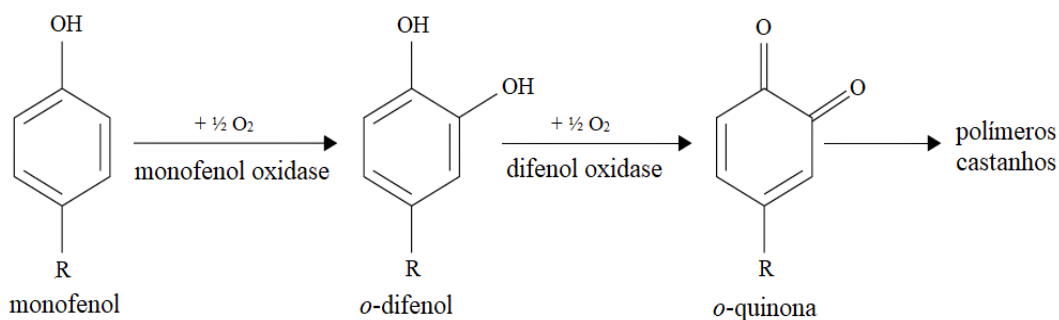
## 2.5. Efeito do processamento e armazenamento nas características do sumo de maçã turvo

O principal entrave na indústria de sumos turvos é o seu curto tempo de vida devido à suscetível deterioração dos mesmos. O processo de produção aplicado e o armazenamento promovem reações que afetam as características do sumo de maçã turvo, entre as mais impactantes as modificações de cor e textura, que advêm da ação enzimática e não enzimática e a deterioração microbiana. A deterioração do sumo de maçã turvo é um acontecimento progressivo e dependente das condições de processamento e armazenamento a que o produto é sujeito <sup>[36,48,49]</sup>.

### 2.5.1. Alteração da cor

A modificação de cor no sumo de maçã turvo de amarelo claro a castanho deve-se, ao contacto entre os compostos fenólicos localizados predominantemente nos vacúolos e as enzimas oxidativas situadas no citoplasma, que promovem o acastanhamento aquando da descompartimentação celular <sup>[50]</sup>. O acastanhamento enzimático, catalisado pela enzima polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1), também denominada de monofenoloxidase, difenoloxidase, catecoloxidase ou tirosinase, consoante a especificidade ao substrato, é um dos problemas mais salientados neste produto, tendo um impacto negativo não só na cor, mas também na textura, odor e valor nutricional <sup>[51,49]</sup>.

O processamento proporciona o contacto direto dos compostos libertados com a atmosfera envolvente, tornando-os suscetíveis a reações de oxidação <sup>[49]</sup>. A polifenoloxidase contém cobre no seu centro ativo que, na presença de oxigénio, reage com compostos fenólicos, catalisando duas reações (**Figura 5**), a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois e a oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas pela atividade da monofenoloxidase e difenoloxidase, respetivamente. As quinonas, incolores e resultantes da oxidação dos fenóis, são altamente reativas e podem reagir com polímeros de elevado peso molecular ou com complexos macromoleculares contendo proteínas, originando pigmentos castanhos <sup>[52,53]</sup>.



**Figura 5** - Reações de hidroxilação e oxidação catalisadas pela polifenoloxidase. Adaptada de <sup>27</sup>.

A incidência do acastanhamento enzimático está diretamente relacionada com o conteúdo de compostos fenólicos e com a atividade da enzima polifenoloxidase e com a temperatura, o pH e a disponibilidade de oxigénio no meio <sup>[51]</sup>. Dos compostos fenólicos presentes na maçã, os ácidos hidroxicinâmicos e os flavanóis servem de substrato para a enzima <sup>[54]</sup>.

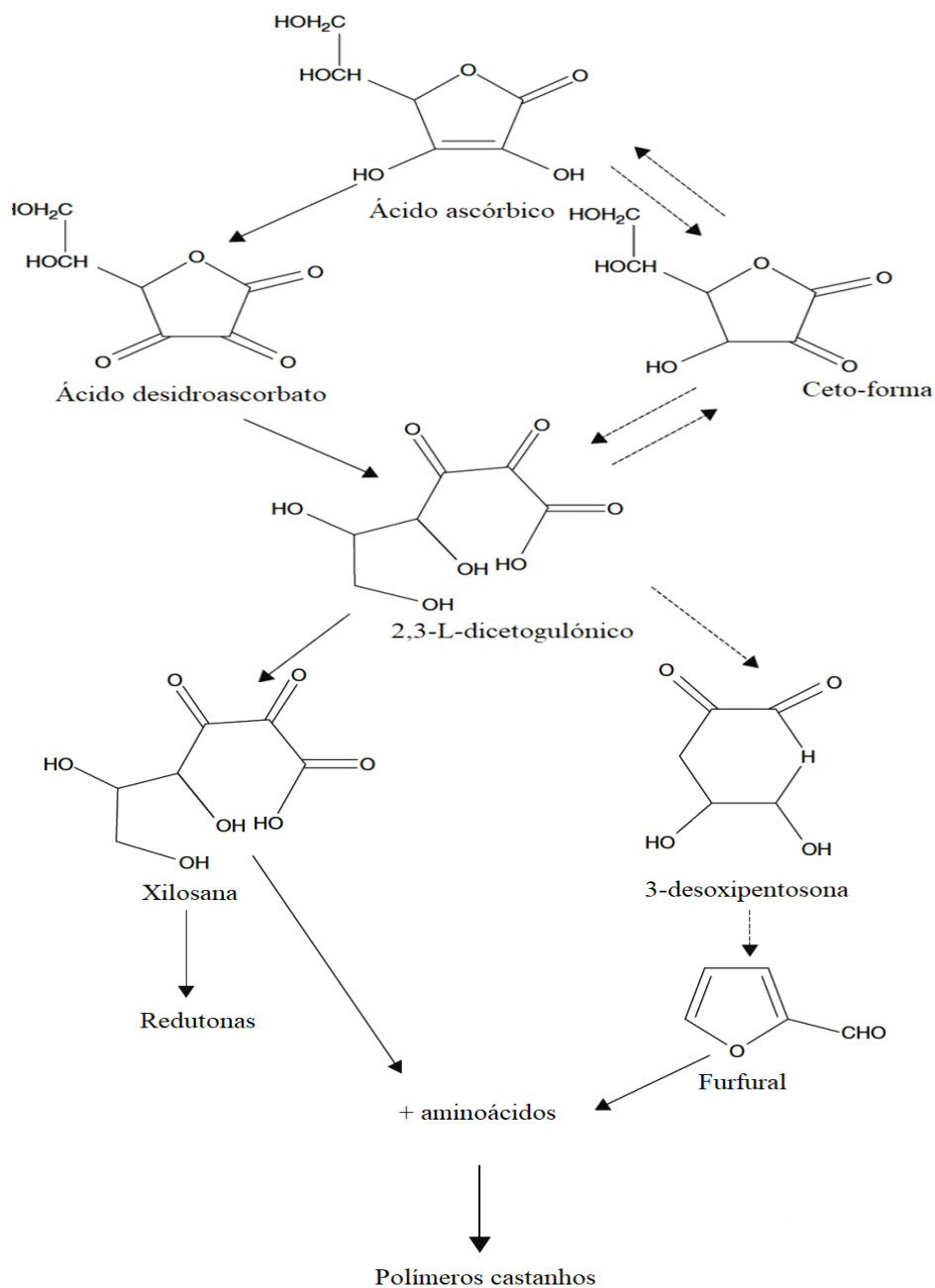
Adicionalmente, a peroxidase (E.C. 1.11.1.7) é também uma oxirredutase relevante para o acastanhamento enzimático, que catalisa reações de oxidação de compostos fenólicos na presença de peróxido de hidrogénio ou oxigénio levando à formação de pigmentos castanhos. Com base na literatura a polifenoloxidase pode ter efeito promotor da peroxidase, pois o peróxido de hidrogénio que a peroxidase usa como substrato é gerado durante a oxidação dos compostos fenólicos catalisados pela polifenoloxidase <sup>[27]</sup>.

No sumo de maçã turvo é fundamental prevenir o acastanhamento enzimático, que pode ser conseguido inibindo ou inativando a enzima por: 1) remoção de um dos substratos ( $\text{O}_2$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , compostos fenólicos ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 2) adição de antioxidantes (ácido ascórbico), 3) adição de acidulantes (ácido cítrico), 4) uso de tratamento térmico (pasteurização), ou 5) refrigeração <sup>[37,38]</sup>. A remoção dos substratos indicados acima são processos geralmente complexos e pouco eficazes, daí não serem vulgarmente utilizados na indústria. Ainda assim, para a remoção do  $\text{O}_2$  pode-se adicionar nitrogénio no tanque onde o sumo é sujeito a decantação, para a remoção do  $\text{Cu}^{2+}$  pode-se usar ciclodextrinas e para a remoção dos compostos fenólicos a quitosana <sup>[27]</sup>. Os acidulantes normalmente aplicados têm o intuito de diminuir o pH do meio, diminuindo assim, a velocidade da reação de escurecimento enzimático <sup>[27]</sup>. Geralmente para um controlo mais eficaz do acastanhamento enzimático é recomendado a aplicação de vários procedimentos simultaneamente <sup>[55,38]</sup>.

O acastanhamento do sumo de maçã turvo não é exclusivo da atividade enzimática, havendo reações não enzimáticas que contribuem de igual modo para a mudança de cor, sobretudo durante o armazenamento, como a reação de *Maillard* e a reação de degradação

do ácido ascórbico <sup>[56,36]</sup>. A reação de *Maillard* é a reação química entre um aminoácido ou resíduos de aminoácidos nas proteínas, portador de um grupo amina livre, e um açúcar redutor como a glucose, que resulta na formação de um produto de condensação, a glicosilamina *N*-substituída. A glicosilamina, por rearranjo, origina a formação da base Schiff, e, posteriormente, dos produtos de Amadori. Subsequentemente ocorre a degradação dos produtos de Amadori, com condições de pH ácido, que leva ao aparecimento de compostos intermédios como o furfural (quando pentoses estão envolvidas) ou hidroximetilfurfural (quando hexoses estão envolvidas). Numa fase avançada da reação, sucedem-se uma série de reações, que incluem ciclizações, desidratações, rearranjos, isomerizações e outras condensações, que conduzem à formação de polímeros azotados castanhos, denominados de melanoidinas <sup>[57]</sup>. A reação é uma preocupação na indústria de sumos, sobretudo quando os sumos são tratados termicamente pois as altas temperaturas favorecem a reação de *Maillard* <sup>[56]</sup>. A taxa de ocorrência da reação de *Maillard* depende do conteúdo em açúcares redutores e da quantidade de aminoácidos no meio. Apesar de no sumo de maçã turvo a quantidade de aminoácidos ser baixa, é suficiente para promover esta reação e afetar a sua qualidade <sup>[1,27]</sup>.

O sumo de maçã turvo é uma fonte considerável de ácido ascórbico, sendo utilizado na indústria de sumos como antioxidante, com objetivo de evitar o acastanhamento enzimático e dessa forma aumentar o tempo de vida do produto <sup>[38]</sup>. Nos sumos de fruta, a vitamina C é rapidamente degradada na presença da luz, oxigénio e de iões metálicos (como o Cu (II) e o Fe (III)) <sup>[27]</sup>. O ácido ascórbico é muito instável e facilmente se degrada tanto por via aeróbia como anaeróbia (**Figura 6**), ambas causando o acastanhamento do sumo e a mudança de sabor e odor <sup>[58]</sup>. Quando o oxigénio está presente no sistema, o ácido ascórbico degrada-se em ácido desidroascorbato (DHAA). Este composto não é estável e converte-se espontaneamente em ácido 2,3-L-dicetogulónico que pode descarboxilar, originando xilosana que, por sua vez, se converte em redutonas. Na ausência de oxigénio o ácido ascórbico é degradado a ácido 2,3-L-dicetogulónico via cetotautómero, de seguida ocorre uma  $\beta$ -eliminação no C-4 e uma descarboxilação dando origem à 3-desoxipentosona, que é degradada a furfural. As redutonas e o furfural poderão combinar-se com grupos amina livres em solução e integrar a reação de *Maillard*. Atendendo à existência de oxigénio residual em sumos turvos embalados, a causa primária de degradação do ácido ascórbico é a oxidação em condições aeróbias <sup>[59,27]</sup>. A reação de degradação do ácido ascórbico também pode ser catalisada pelas enzimas ácido ascórbico oxidase e polifenoloxidase, todavia é menos frequente.



**Figura 6** - Vias de degradação do ácido ascórbico (linha cheia, via anaeróbia; linha tracejada, via aeróbia). Adaptada de <sup>27</sup>.

### 2.5.2. Alteração da textura

Na indústria de sumos turvos o estudo da reologia é importante no fabrico e processamento dos mesmos, uma vez que as características reológicas do sumo podem levar à sua aceitabilidade por parte do consumidor dado que estas influenciam as suas propriedades sensoriais. Desta forma, a viscosidade do sumo e a estabilidade e firmeza das

partículas em suspensão são importantes para a sua textura e outras características sensoriais, tais como a aparência [60,56].

A estabilidade dos parâmetros reológicos está relacionada com as características que os polissacarídeos pécticos conferem ao sistema, como emulsificante [61]. As enzimas pécticas divididas em dois grupos, as que catalisam reações de desesterificação (esterases) e de despolimerização (hidrolases), limitam o período de vida útil dos sumos de maçã turvos [62], levando à diminuição da viscosidade do sumo.

Teoricamente a instabilidade da suspensão coloidal é iniciada pela pectinametilesterase que converte pectinas de elevado grau de metilação em ácidos pécticos, que por sua vez, têm uma forte capacidade de interação com iões divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ), originando pectatos de cálcio. Os pectatos de cálcio podem precipitar, dado o aumento do tamanho e peso das partículas, desenrolando-se a separação de fases do sumo de maçã turvo, o que resulta num sistema de duas fases correspondendo a uma clarificação na parte superior e a um precipitado na parte inferior do sumo. Além disso, podem ainda servir de substrato para a poligalacturonase, que os degrada [33,41,56].

A ação sinérgica da PME e PG resultam nas modificações da pectina que contribuem para a limitação do período de vida útil dos sumos de maçã turvos [35]. Recorrendo ao tratamento térmico, usualmente a pasteurização, é conseguida a estabilização da suspensão coloidal pela inativação da pectinametilesterase, pois desta forma, a pectina atua como um coloide protetor retardando a agregação das partículas [41]. No entanto, o processamento térmico pode fornecer as condições necessárias para que haja degradação e perda de funcionalidade de polissacarídeos pécticos por mecanismos não enzimáticos [35]. Os polissacarídeos sofrem mudanças no grau de polimerização durante o processamento térmico, sendo estas mudanças explicadas pelas reações de  $\beta$ -eliminação, que consistem na quebra de ligação glicosídica entre resíduos de ácido galacturónico, acompanhada de desidratação e formação de uma dupla ligação entre C-4 e C-5. Um segundo mecanismo de degradação durante o processamento térmico é a hidrólise ácida impulsionada pela metil desesterificação. As reações não enzimáticas, sejam estas de  $\beta$ -eliminação ou de hidrólise ácida, provocam uma diminuição significativa da viscosidade e do peso molecular dos polissacarídeos pécticos, existindo um aumento na sua solubilidade e consequente perda de turvação dos sumos de maçã turvos [62].



### 2.5.3. Degradação microbiológica

A contaminação microbiana é um problema comumente associado aos sumos turvos e provêm principalmente da microflora natural das matérias-primas durante o processo de colheita, processamento, armazenamento e distribuição <sup>[63]</sup>. Os microrganismos representam dois pontos críticos: a presença e crescimento de microrganismos patogénicos e a deterioração e redução do tempo de vida do produto <sup>[64]</sup>.

Os sumos de maçã turvo apresentam uma característica muito específica, o seu reduzido pH (~4), devido ao pH da maçã e à adição de ácido ascórbico <sup>[49]</sup>. Este parâmetro representa um fator inibidor para a grande maioria dos microrganismos, nomeadamente a inibição do crescimento de microrganismos patogénicos. Deste modo, a principal preocupação em torno da flora microbiana dos sumos de maçã turvos prende-se com a presença de microrganismos, tolerantes ao meio ácido, capazes de deteriorar o produto <sup>[65]</sup>.

As leveduras e os bolores são os grupos mais associados à degradação dos sumos de maçã turvos, na medida em que são resistentes em meio ácido, a temperaturas elevadas e à refrigeração, fazendo destes potenciais contaminantes do sumo. A deterioração provocada pelo crescimento de leveduras está associada à formação de sedimento, névoa e mau sabor e, caso ocorra fermentação há produção de dióxido carbono, o que no caso do sumo embalado, as embalagens ficam opadas e podem rebentar. Tanto as leveduras como os bolores têm a particularidade da sua germinação ser despoletada pela ausência de oxigénio e as condições anaeróbias do interior das embalagens não são suficientes para garantir a sua morte <sup>[66]</sup>.

Um dos casos mais estudados nos últimos anos devido à sua grande emergência como causador de deterioração dos sumos de fruta é o *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ACB), ocorrendo cada vez mais frequentemente em alimentos como as polpas, concentrados e os sumos de maçã <sup>[67]</sup>. O *Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria não patogénica, moderadamente termófila, acidófila, estritamente aeróbia e formadora de esporos <sup>[68]</sup>. As condições de processamento aplicadas na indústria dos sumos tratados termicamente, normalmente 80-96 °C durante 15-120 s, não são suficientes para reduzir os níveis de ACB no sumo de maçã, e assim os seus endósporos são capazes de germinar e crescer acabando por deteriorar o produto <sup>[69]</sup>. A deteção visual da deterioração durante o armazenamento é difícil, uma vez que este microrganismo não está associado à produção de gás. Na maioria dos casos os sumos deteriorados aparentam estar com as suas características naturais intactas, podendo ser notório apenas um pequeno sedimento ou turvação. A principal

característica da deterioração que pode permitir a identificação é o odor desagradável, descrito como “fumado”, “medicinal” e “desinfetante”, associado à produção de guaiacol (2-metoxifenol) <sup>[69]</sup>.

A contaminação por esta bactéria é proveniente de diversas fontes, nomeadamente o solo e poeiras. Deste modo, o principal veículo de transmissão do *Alicyclobacillus acidoterrestris* nos sumos é a matéria-prima utilizada, essencialmente quando a limpeza e desinfecção não é adequada. É indicado na literatura que a adição de ácido ascórbico a sumos com concentração igual ou superior a 150 mg/L pode impedir ou inibir o crescimento de ACB. Atendendo a essa evidência, os sumos de maçã turvos podem ser menos suscetíveis à deterioração por ACB já que, lhes é adicionado ácido ascórbico na ordem de grandeza referida anteriormente <sup>[69]</sup>.

## **2.6. Métodos de conservação para o sumo de maçã turvo**

Os procedimentos de conservação adotados pela indústria têm como objetivo garantir a segurança, bem como evitar a deterioração dos sumos turvos e estender o seu tempo de vida. Fundamentalmente as metodologias de conservação devem alterar o menos possível as características originais do produto, como as propriedades organoléticas, nutricionais e funcionais <sup>[70]</sup>.

Nos sumos turvos, o tratamento térmico, a adição de aditivos como antioxidantes (ácido ascórbico) e a refrigeração são os procedimentos mais usuais de conservação. No entanto, as altas pressões hidrostáticas e os campos elétricos pulsados são duas tecnologias inovadoras de tratamento não térmico com espaço de crescimento neste tipo de produto. A indústria na sua esmagadora maioria combina vários métodos de conservação para proporcionar a segurança e qualidade dos sumos turvos <sup>[71,38,55]</sup>.

### **2.6.1. Tratamento térmico**

A pasteurização é o método de conservação mais utilizado na indústria de sumos turvos, em que os mesmos são sujeitos à ação do calor para inativação de microrganismos e enzimas. O tratamento térmico inativa as enzimas responsáveis pelas modificações de cor e textura no sumo de maçã turvo <sup>[72]</sup>. A aplicação de temperaturas próximas dos 80 °C é suficiente para inativar totalmente a atividade da pectinametilesterase, uma enzima relativamente estável a temperaturas elevadas, e da polifenoloxidase <sup>[36,73]</sup>.

Os sumos de maçã turvos produzidos com o intuito de serem comercializados são frequentemente sujeitos à pasteurização, podendo variar na duração e temperatura empregue. O procedimento mais aplicado pela indústria é a pasteurização a alta temperatura num curto espaço de tempo (HTST), entre 77 e 88 °C durante 25 a 35 s <sup>[71]</sup>. O binómio temperatura/tempo de pasteurização tem de ser bem controlado uma vez que as altas temperaturas inevitavelmente geram efeitos negativos, como perda de nutrientes, modificação de textura, formação de sabores e odores desagradáveis, favorecendo ainda as reações de acastanhamento não enzimático <sup>[74,2]</sup>. Nos últimos anos, com o aparecimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris* tem existido a necessidade de implementação de novos binómios de temperatura/tempo para garantir a estabilidade dos produtos. No caso do *Alicyclobacillus acidoterrestris*, para alcançar a sua redução de 5 log exigida pela *U.S. Food and Drug Administration* é necessário aplicar um tratamento de 115 °C durante 8 s <sup>[69]</sup>.

### **2.6.2. Tratamento não térmico**

Os métodos de conservação não-térmicos incluem as técnicas de preservação dos alimentos que não envolvem aplicação de calor. A adição de antioxidantes e a refrigeração são tratamentos regularmente aplicados ao sumo turvo para aumentar a qualidade e o tempo de vida <sup>[38,75]</sup>.

O ácido ascórbico (E 300), um antioxidante bastante utilizado na indústria produtora de sumos, tem como objetivo prevenir o acastanhamento enzimático durante o processamento e armazenamento para manter a cor original do sumo de maçã turvo, sendo adicionado na forma de sais, por norma diluído em água <sup>[76,17]</sup>. O seu mecanismo de ação assenta na capacidade de reduzir quinonas resultantes da oxidação de compostos fenólicos a compostos fenólicos, antes das mesmas reagirem para formar produtos castanhos <sup>[38]</sup>. Embora o consumidor dê primazia a produtos sem conservantes químicos, o ácido ascórbico é seguro e aceite, em boa parte por ser um complemento extra de vitamina C que é adicionado ao produto.

Nos sumos de maçã turvos a quantidade a aplicar de ácido ascórbico depende da variedade de maçã processada, uma vez que cada variedade difere nas atividades de polifenoloxidase e peroxidase e na concentração de compostos fenólicos <sup>[77]</sup>. O recomendado na literatura para retardar a alteração da cor é a adição entre 100 e 700 mg de ácido ascórbico por kg de maçã <sup>[78]</sup>. Apesar da importância do ácido ascórbico para a manutenção da cor amarelo claro dos sumos turvos, quando adicionado em elevadas concentrações altera as

suas propriedades sensoriais <sup>[38]</sup>. Quando tal acontece, o ácido ascórbico despoleta um aumento de odores indesejáveis (odor verde) e diminuição de odores frescos, frutados e semelhantes aos da maçã fresca. O aumento de odores indesejáveis está diretamente relacionado com o acréscimo de aldeídos no sumo de maçã turvo, facultado pelo antioxidante, sendo a concentração de hexanal e trans-2-hexenal quatro a cinco vezes superior no sumo com ácido ascórbico comparativamente com o sumo não tratado <sup>[38]</sup>. A hidroperóxido liase, enzima chave para a síntese de compostos voláteis, cliva os hidroperóxidos resultantes da ação da lipoxigenase em aldeídos, que quando em concentrações acima dos níveis normais, despoleta o desenvolvimento do “*off-flavor*”, exatamente o processo descrito acima <sup>[79]</sup>.

Para conservar os sumos turvos por maiores períodos de tempo é recomendado armazenar os produtos sob refrigeração <sup>[80]</sup>. O sumo de maçã turvo deve ser armazenado a temperaturas inferiores a 10 °C. Manter o produto a esta temperatura permite retardar o crescimento da atividade dos microrganismos e desacelerar as reações químicas. Contudo, é de referir que mesmo a uma taxa de crescimento lento, o crescimento microbiano pode ocorrer a esta temperatura, resultando em níveis microbiológicos que podem afetar a qualidade do produto, limitando o seu tempo de vida <sup>[81]</sup>.

A aplicação da refrigeração neste tipo de produto tem vantagens notórias, no entanto a sua frequente utilização acarreta elevados gastos energéticos e aumenta a produção de CO<sub>2</sub>, contribuindo para o aquecimento global e para as alterações climáticas que ameaçam o planeta <sup>[82]</sup>. Além do mais, a aquisição de equipamentos de refrigeração obriga a gastos avultados para a empresa. Tais razões, tornam necessário estudar o efeito das características fundamentais intrínsecas do sumo de maçã turvo durante o armazenamento a temperatura ambiente, podendo este armazenamento ser eficaz na preservação em alternativa à refrigeração.

### 3. Objetivo do trabalho

O desenvolvimento do sumo de maçã turvo é importante para o crescimento continuado da Indumape - Industrialização de Fruta, S.A, e caso este seja bem-sucedido, vai dar uma nova oportunidade de desenvolvimento da empresa, podendo substituir outros produtos que não são tão lucrativos aumentando a sua viabilidade económica. O sumo de maçã turvo será produzido exclusivamente com fruta espremida, sem recorrer a concentrados, garantindo desse modo uma maior proximidade organolética e nutricional com a fruta fresca. A aposta para a elaboração do sumo turvo recaiu na maçã, dado que é a matéria-prima mais processada na fábrica e a mais fácil de adquirir no mercado nacional de fruticultura devido à sua elevada produção. Para além disso, no panorama geral de sumos de fruta, o sumo de maçã está no top-3 dos mais consumidos a nível mundial <sup>[83]</sup>.

O sumo de maçã turvo, devido à proliferação microbiana e atividade enzimática, fundamentalmente enzimas pécticas e oxirredutases, é um produto muito suscetível à deterioração em função do tempo, sendo uma problemática para a indústria, pois pode diminuir consideravelmente o tempo de vida do produto. O uso de refrigeração pode contribuir para o aumento do período em que o produto se encontra em condições para consumo, pois teoricamente, atenua o crescimento de microrganismos e das reações enzimáticas. No entanto, a refrigeração é uma metodologia de conservação economicamente dispendiosa para uma empresa, sendo por isso, importante perceber se o sumo de maçã turvo se mantém estável durante o armazenamento à temperatura ambiente.

Assim, este trabalho teve como objetivos específicos:

- 1) Estimar a estabilidade microbiológica e físico-química do sumo de maçã turvo usando a pasteurização e a adição de ácido ascórbico como métodos de conservação.
- 2) Estudar qual a variedade da maçã mais adequada na produção do sumo que permite a manutenção das características físico-químicas e sensoriais do sumo com o processamento e para tempos de armazenamento alargados.
- 3) Determinar se a temperatura de refrigeração (5 °C) aumenta consideravelmente a estabilidade do sumo de maçã, em comparação com o armazenamento à temperatura ambiente.

Para avaliar a estabilidade do sumo turvo foram efetuadas diversas análises que incluem: a) análise microbiológica de microrganismos totais, bolores e leveduras e *Alicyclobacillus acidoterrestris*; b) análise físico-química de intensidade de acastanhamento, turbidez, teor

de sólidos solúveis, pH, acidez titulável, teor em compostos fenólicos totais, conteúdo da atividade antioxidante e o conteúdo em ácido ascórbico; e c) análise sensorial de cor, aparência, aroma a maçã e sabor a maçã.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Produção de sumo de maçã turvo

Tal como em todo o processo de desenvolvimento de um novo produto, foi necessário aprender e implementar o processo produtivo do sumo de maçã turvo, à escala laboratorial. Para tal, foram utilizadas técnicas e equipamentos com a mesma base de funcionamento da produção industrial descrita no subcapítulo 2.3., no entanto com dimensões diferentes e com condições mais limitantes.

No presente trabalho foram elaborados dois sumos turvos com os mesmos ingredientes base, maçã com casca e ácido ascórbico (E 300), diferindo apenas na variedade de maçã utilizada, isto é, o sumo de maçã turvo 1 (SMT1) resultou da transformação exclusiva de maçã *Golden Delicious* e um sumo de maçã turvo 2 (SMT2) da maçã *Royal Gala* (Figura 7). Para cada sumo de maçã turvo foram produzidos dois lotes com maçã com calibre e estado de maturação idênticos, tendo sido utilizado por lote 10 kg de maçã, que equivale a aproximadamente 4 L de sumo. Cada lote foi armazenado durante 90 dias a temperaturas diferentes, refrigeração (5 °C) e temperatura ambiente.



**Figura 7** - Variedades de maçãs utilizadas para produção dos sumos de maçã turvos: a - *Golden Delicious* e b - *Royal Gala*

O primeiro passo para a produção dos sumos turvos foi a lavagem das maçãs com água e com uma solução de peróxido de hidrogénio 5%, um agente antimicrobiano, e a desinfeção dos utensílios utilizados com álcool etílico 96%. Os 10 kg de maçã, consoante o sumo pretendido, foram cortados em pedaços pequenos e seguidamente triturados com o auxílio de um triturador de cozinha, onde a fruta passa num moinho até ser transformada em polpa.

Simultaneamente à trituração da fruta, foi adicionada a solução de ácido ascórbico, preparada a partir da dissolução de 560 mg de ácido ascórbico em 80 mL de água, com o auxílio de um conta gotas. Depois deste passo, transferiu-se a polpa obtida para um saco de filtração de polipropileno, que foi pressionado manualmente. Imediatamente após a prensagem, o sumo foi colocado no frigorífico a uma temperatura de 5 °C, a fim de evitar possíveis fermentações que colocariam em causa a sua qualidade, onde permaneceu a decantar durante 24 h. Passado o tempo, retirou-se o sumo do frigorífico e decantou-se com o auxílio de uma mangueira de látex, em que uma das saídas da mangueira foi colocada no centro do sumo a decantar, de modo a não sugar o sedimento nem as impurezas, enquanto a outra saída foi colocada num gobelé de 3 L, para onde foi separado o sumo decantado. O sumo decantado foi acondicionado em garrafas de vidro de 200 mL adequadamente fechadas, tendo sido este processo realizando na câmara de fluxo laminar (marca Telstar modelo Bio-II-A) e as garrafas e rolhas previamente esterilizadas em autoclave. De imediato, o sumo foi pasteurizado a 80 °C durante 15 minutos numa placa de aquecimento. Depois disto o sumo foi arrefecido gradualmente por contacto com água fria até atingir a temperatura próxima dos 20 °C. De forma a estudar a estabilidade dos sumos turvos ao durante o armazenamento, as amostras foram armazenadas em diferentes condições de temperatura, temperatura de refrigeração (5 °C) e temperatura ambiente.

#### **4.1.1. Ensaios preliminares dos tratamentos de conservação**

O ácido ascórbico e a pasteurização foram os dois tratamentos de conservação estudados na elaboração do sumo de maçã turvo. Foram testadas diferentes concentrações do ácido ascórbico (125 a 200 g/L) e diferentes binómios de tempo (5 e 15 min)/temperatura (70 e 80 °C) na pasteurização.

Foram preparadas soluções com concentrações de 125, 140, 200 e 250 mg/L de ácido ascórbico, tendo sido posteriormente adicionadas aquando a trituração de maçãs *Golden Delicious*. Como se quis ter uma perceção isolada do efeito do ácido ascórbico nas características fundamentais intrínsecas do sumo turvo (cor, aroma a maçã e sabor a maçã), estes ensaios não foram pasteurizados, tendo sido avaliados por análise sensorial (cor, aroma e sabor), imediatamente após a decantação do sumo.

Os binómios de tempo/temperatura na pasteurização testados foram: 70 °C/5 min, 70 °C/15 min, 80 °C/5 min e 80 °C/15 min. Depois da preparação de sumo de maçã turvo com 140 mg/L de ácido ascórbico, aplicou-se a pasteurização em ambiente laboratorial: 1)



Colocar um recipiente com água na placa de aquecimento deixando-a ferver; 2) Introduzir as garrafas de sumo no banho até a temperatura interna do sumo atingir a temperatura de 70 ou 80 °C ( $\pm 1$  °C); 3) Manter os sumos durante o tempo estipulado (5 ou 15 min) para cada pasteurização, controlando rigorosamente a sua temperatura. Após o tratamento térmico, analisou-se visualmente os ensaios para verificar a inativação das enzimas responsáveis pelo acastanhamento enzimático.

## 4.2. Análise dos sumos de maçã turvo

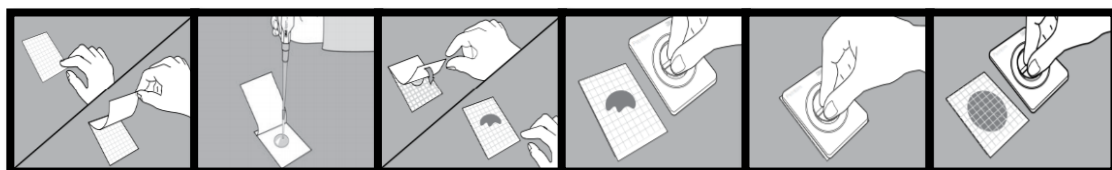
Os diferentes sumos de maçã turvos produzidos foram sujeitos a análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, antes da pasteurização (NP), após a pasteurização (T0), e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90), para avaliar as suas qualidades e segurança alimentar. Antes de cada análise a amostra foi homogeneizada.

### 4.2.1. Análise microbiológica

A análise microbiológica a que foram submetidas as amostras de sumo de maçã turvo, seguiu a metodologia de controlo de qualidade a nível microbiológico aplicável pela Indumape - Industrialização de Fruta, S.A. Procedeu-se à deteção de microrganismos totais, bolores e leveduras, e especificamente a *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

#### 4.2.1.1. Determinação de microrganismos totais e bolores e leveduras

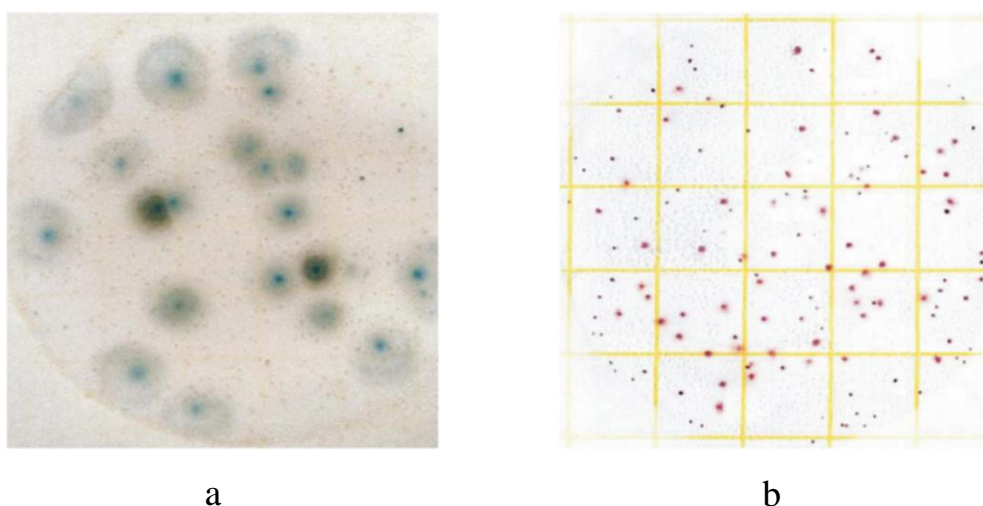
Nas análises microbiológicas de microrganismos totais (também referidos como aeróbios totais) e bolores e leveduras foi utilizado um tipo *Petrifilm* 3M™ específico consoante o microrganismo a detetar, aeróbios totais (AC) e leveduras e bolores (YM) [84,85]. O *Petrifilm* é um meio de cultura pronto a usar que contém um agente gelificante solúvel em água fria, nutrientes e um corante indicador para facilitar a contagem dos microrganismos. O procedimento de aplicação da amostra de sumo de maçã turvo no *Petrifilm* é similar para as duas análises dos microrganismos e encontra-se ilustrado na **Figura 8**.



**Figura 8** - Representação esquemática das etapas para a colocação de amostra no *Petrifilm* para a deteção de bolores e leveduras e microrganismos totais.

Começou-se por pipetar 1 mL da amostra de sumo de maçã turvo diretamente para a membrana do *petrifilm*, levantando-se a película superior protetora, no centro da folha inferior da membrana que contém o meio seletivo apropriado. Recobriu-se com a película superior e espalhou-se a amostra com o auxílio de um difusor de plástico especial para o tipo de microrganismo, com o lado liso para baixo e exercendo uma ligeira pressão. Espera-se a solidificação do meio que demora cerca de 1 min. As análises microbiológicas foram executadas em condições de assepsia, ou seja, numa câmara de fluxo laminar e com proximidade ao bico de *Bunsen*, e todo o material usado foi previamente esterilizado em autoclave. Por fim, os meios foram incubados na estufa (marca Binder) a 25 °C por 5 dias para a deteção de bolores e leveduras e a 35 °C por 2 dias para a determinação dos microrganismos totais.

Após a conclusão do tempo de incubação foi realizada a contagem dos microrganismos, sendo representadas em unidades formadoras de colónias por mL (UFC/mL). As leveduras são tipicamente indicadas por pequenas colónias de tom azul-esverdeado, com bordas definidas e sem foco no centro (**Figura 9a**). Os bolores são evidenciados por colónias grandes de cores variáveis (preto, azul, etc.), com bordas difusas e usualmente têm um foco escuro no centro. A presença de microrganismos totais é manifestada pelo surgimento de colónias vermelhas no *Petrifilm*, independentemente do tamanho da colónia ou intensidade da cor (**Figura 9b**).



**Figura 9** - *Petrifilms* com colónias: a - leveduras e bolores; e b - microrganismos totais.

#### 4.2.1.2. Determinação de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

A análise para a detecção de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi efetuada seguindo a diretriz do método N.12 da Federação Internacional dos Produtores de Sumo de Fruta (IFU), intitulado como método de detecção e enumeração de bactérias termoacidófilas formadoras de esporos [86].

Transferiu-se 100 mL de amostra de sumo de maçã turvo diretamente para um frasco de laboratório redondo de 250 mL previamente esterilizado com tampa roscada e posteriormente colocou-se o frasco na estufa a 45 °C durante 24 h para favorecer o crescimento do ACB. Passado este período, transferiu-se 1 mL do sumo diretamente para uma placa de *petri*, preparada previamente com o meio de cultura BAT Agar. Por último incubou-se a placa de *petri*, com a tampa para baixo, a 45 °C por 5 dias.

A contaminação por *Alicyclobacillus acidoterrestris* é evidenciada quando a placa de *petri* apresenta colónias com tonalidade amarelo. O cheiro desagradável que se pode sentir, descrito como “fumado”, “medicinal” e “desinfetante”, é outro indicador da presença de ACB.

#### 4.2.2. Determinação da atividade da enzima polifenoloxidase

Para a determinação da atividade da polifenoloxidase recorreu-se a um método espectrofotométrico, monitorizando a absorvância a 420 nm [16]. Este método baseia-se na quantificação de um produto cromóforo formado devido à oxidação do substrato (catecol) pela enzima polifenoloxidase.

Previamente, preparou-se o tampão de *Mcllavaine*, também conhecido como tampão citrato-fosfato, pesando-se 33 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e dissolvendo-se em 400 mL de água destilada. Procedeu-se à leitura do pH da solução de fosfato de sódio dibásico, utilizando um potenciómetro (marca Hanna Instruments modelo 210) acoplado a um eléctrodo, e ajustou-se o pH até 6,5 com uma solução de ácido cítrico, preparada a partir de 39,5 g de ácido cítrico monoidratado dissolvida em 500 mL de água destilada.

Numa célula de espectrofotómetro de vidro adicionou-se 0,5 mL de amostra, apropriadamente diluída, a 1 mL de solução de catecol 0,2 M e 2 mL de tampão de *Mcllavaine* pH 6,5. De seguida foi lida a absorvância a 420 nm num espectrofotómetro UV/Vis (marca Hach modelo DR 5000) de 10 em 10 s durante 10 min. A atividade da polifenoloxidase foi determinada calculando a velocidade da reação de catálise pelo declive da zona linear da

curva em função do tempo. A unidade de atividade enzimática corresponde à variação de Abs 420 nm/min por mL de sumo de maçã turvo.

A atividade residual (AR) da enzima foi calculada com base na equação 1 (1):

$$AR(\%) = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

onde  $A_0$  e  $A$  são a atividade enzimática antes e após o tratamento térmico, respetivamente.

#### **4.2.3. Análise físico-química**

As análises físico-químicas dos sumos de maçã turvos envolvem a medição de vários parâmetros considerados serem os mais relevantes para este tipo de produto. Os parâmetros determinados foram a intensidade de acastanhamento, a turbidez, o teor de sólidos solúveis, o pH, a acidez titulável, o teor em compostos fenólicos totais, o conteúdo em ácido ascórbico e a atividade antioxidante.

##### **4.2.3.1. Determinação da intensidade de acastanhamento**

A intensidade de acastanhamento do sumo de maçã turvo foi determinado por medição da absorvância a 420 nm <sup>[16]</sup>. O sumo de maçã turvo foi diluído com água (1:1) e centrifugou-se a 4200 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi transferido para uma célula de espectrofotómetro de vidro e leu-se a absorvância a 420 nm num espectrofotómetro UV/Vis. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

##### **4.2.3.2. Determinação da turbidez**

A leitura da turbidez foi efetuada num turbidímetro (marca Hach modelo 2100 AN), devidamente calibrado antes da sua utilização, com um kit de calibração específico da marca, que compreende um conjunto de seis padrões de formazina em diferentes concentrações (<0,1 NTU a 7500 NTU). Colocou-se a célula de vidro contendo a amostra de maçã turvo no compartimento destinado à leitura no refratómetro e passados 3 min registou-se o valor de turbidez. A turbidez foi expressa em unidades de turbidez (NTU). Foram realizadas análises em duplicado para cada amostra.

#### 4.2.3.3. Determinação do teor de sólidos solúveis (TSS)

O teor de sólidos solúveis foi medido através de um refratômetro automático (marca Bellingham+Stanley modelo RFM732) previamente calibrado com água destilada e devidamente seco. Com o auxílio de uma vareta de vidro colocou-se uma pequena quantidade de sumo de maçã turvo na lente do refratômetro, de maneira a que a lente ficasse totalmente coberta. A leitura deve ser realizada o número de vezes necessárias até que se obtenha um valor concordante, sendo o seu valor expresso em unidades de °Brix. Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

#### 4.2.3.4. Determinação do pH e da acidez titulável

Para a determinação do pH utilizou-se um potenciômetro acoplado a um eletrodo. Antes da utilização, higienizou-se devidamente o eletrodo com água destilada e o aparelho foi calibrado com soluções tampão de pH 10, 7 e 4. A leitura foi obtida após a imersão do eletrodo em 40 mL de amostra de sumo turvo (não diluída).

A acidez titulável foi determinada através de uma titulação potenciométrica da amostra de sumo com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M até se atingir um pH de  $8,1 \pm 0,1$ . Os resultados da acidez titulável foram expressos em mg de ácido málico/g de sumo de maçã turvo. Tanto para o pH como para a acidez titulável foram realizadas análises em duplicado para cada amostra.

#### 4.2.3.5. Determinação do teor em compostos fenólicos totais

O conteúdo em compostos fenólicos totais no sumo de maçã turvo foi determinado pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*, um método que se baseia na redução do reagente de *Folin-Ciocalteu* (complexo polimérico formado pelos ácidos fosfomolibdicos ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) e fosfotúngsticos ( $H_3PW_{12}O_{40}$ )) <sup>[87]</sup>. O método consiste numa reação de oxidação rápida dos compostos fenólicos presentes na amostra utilizando, predominantemente, uma solução concentrada de carbonato de sódio, o que produz uma quantidade significativa de íons fenolatos que irão reduzir os compostos do reagente de Folin (inicialmente com coloração amarelo). Os produtos da redução do reagente de Folin (óxidos de tungsténio ( $W_8O_{23}$ ) e de molibdénio ( $Mo_8O_{23}$ )) têm uma cor azul, proporcionais à quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras e que podem ser medidos espectrofotometricamente a 760 nm <sup>[88]</sup>.

Resumidamente, a 125  $\mu$ L de amostra apropriadamente diluída com água adicionaram-se 500  $\mu$ L de água destilada e 125  $\mu$ L de reagente de *Folin-Ciocalteu*. A mistura foi homogeneizada e deixada a reagir durante 5 min. Após esse tempo, adicionaram-se 1,25 mL de solução de carbonato de sódio 75 g/L e 6 mL de água destilada. Deixou-se reagir durante 60 min à temperatura ambiente e, posteriormente, realizaram-se as leituras de absorvância da mistura a 760 nm utilizando o espectrofotômetro UV/Vis.

Através das absorvâncias registradas foi calculado a concentração em compostos fenólicos totais, expressa em equivalentes de ácido gálico. Para isso, construiu-se uma curva de calibração em que foi usado o ácido gálico como padrão, utilizando soluções com concentrações compreendidas entre 0 e 250 mg/L. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

#### **4.2.3.6. Determinação do conteúdo em ácido ascórbico**

A quantificação do conteúdo em ácido ascórbico foi efetuada pelo método colorimétrico que se baseia na redução de 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) pelo ácido ascórbico em meio ácido<sup>[89]</sup>. O DCIP é um corante que em meio básico apresenta uma cor azul, em meio ácido uma tonalidade cor-de-rosa e na forma reduzida apresenta-se incolor<sup>[90]</sup>. Assim, a adição de ácido ascórbico resulta na descoloração do DCIP, que origina uma solução incolor a partir de uma solução cor-de-rosa. Esta reação pode ser monitorizada espectrofotometricamente a 518 nm.

Adicionaram-se 4,5 mL de DCIP 36 mg/L a 0,5 mL de amostra de sumo apropriadamente diluída com ácido oxálico. Dada a instabilidade do ácido ascórbico, as leituras espectrofotométricas foram efetuadas de imediato. As medições foram efetuadas num espectrofotômetro UV/Vis a 515 nm. As absorvâncias obtidas foram usadas para calcular a concentração em ácido ascórbico, expressa em mg/L de ácido ascórbico. Para tal, realizou-se uma curva de calibração em que foi usado o ácido ascórbico como padrão, utilizando soluções com concentrações compreendidas entre 0 e 100 mg/L. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

#### **4.2.3.7. Determinação da atividade antioxidante**

O método do ABTS, ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolinil-6-sulfónico), é um método espectrofotométrico utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante<sup>[91]</sup>. Neste método, o ABTS é convertido para o seu catião radical,  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , por oxidação com o

persulfato de sódio, originando um cromóforo esverdeado, que depois é reduzido na presença de compostos dadores de hidrogénio ou de eletrões. A redução do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , estimulada pela presença de antioxidantes dadores de hidrogénio ou de eletrões, provoca a perda de coloração.

A solução de ABTS 7 mM foi preparada em persulfato de potássio 2,45 mM. Deixou-se a solução a reagir no escuro à temperatura ambiente durante 16 h para a formação do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Posteriormente, diluiu-se a solução de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  em etanol e fez-se a leitura de absorvância a 734 nm num espectrofotómetro UV/Vis, ajustando a concentração da solução para um valor de absorvância próximo de 0,700. Colocaram-se 50  $\mu\text{L}$  de amostra apropriadamente diluída com etanol em 1 mL da solução de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e deixou-se reagir no escuro durante 15 min, até ser lida a absorvância. A partir das absorvâncias obtidas foi calculada a atividade antioxidante, expressa em equivalentes de Trolox, através de substituição dos valores de absorvância na equação da reta obtida para a curva de calibração do Trolox. Para a realização da curva de calibração utilizaram-se soluções com concentrações compreendidas entre 0 e 400  $\mu\text{M}$  de Trolox. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

#### **4.2.4. Avaliação sensorial**

No desenvolvimento dos sumos de maçã turvo mostrou-se fundamental a realização de análise sensorial para que estes pudessem ser avaliados por diversas pessoas com vista à obtenção de uma visão global relativamente à aceitação do produto antes e após a pasteurização e ao fim de 90 dias de armazenamento, considerando as características sensoriais apreciadas pela sociedade para este produto.

O tipo de análise sensorial adotada para os sumos de maçã turvos, uma vez que se deseja avaliar a aceitabilidade do produto, foi um teste hedónico. Esta tipologia de prova é aquela em que o provador indica a sua reação subjetiva relativamente ao produto. A escala hedónica utilizada para a análise sensorial era composta por 5 pontos de classificação, entre “Gosto Muito” e “Desgosto Muito”, e os atributos em estudo foram a cor, aparência, aroma a maçã e sabor a maçã. Um modelo de ficha de prova usada está presente em anexo. Considerando que se trata de uma prova de medição do grau de satisfação, não foi necessário o treino do painel de provadores, tendo-se recorrido a cinco colaboradores da empresa (os mesmos provadores em todas as provas), conhecedores das características do produto.

Durante as sessões de prova tentou-se ao máximo ter em atenção as condições exigidas para a realização do teste sensorial. O local escolhido foi o laboratório, uma vez que as amostras se encontravam armazenadas neste local, evitando assim o seu transporte para outras áreas. As amostras foram apresentadas em copos de plástico brancos e cada provador teve à sua disposição um guardanapo de papel, um copo de água e uma bolacha de água e sal. Foi ainda indicado aos provadores que, quer as bolachas de água e sal quer a água, deveriam ser usados entre as provas de forma a libertar o sabor da boca (limpar palato), quando necessário. As amostras de sumo de maçã turvo foram servidas à temperatura dos seus respetivos armazenamentos, ou seja, umas foram servidas frias e outras a temperatura ambiente.

### **4.3. Análise estatística**

Os dados obtidos para os parâmetros físico-químicos dos sumos de maçã turvo foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os períodos de armazenamento, para cada um dos parâmetros em estudo, foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) a um fator com um nível de significância de 95 %. As diferenças foram aceites como significativas quando  $p < 0,05$ . Para a realização do teste estatístico recorreu-se ao software do Microsoft Office Excel.



## 5. Resultados e discussão

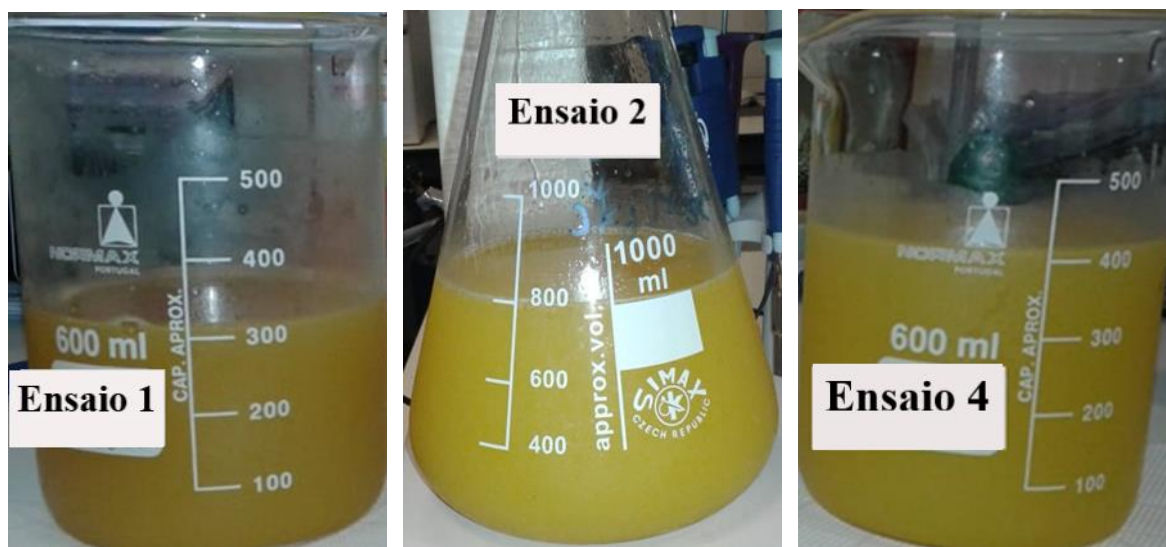
### 5.1. Seleção dos tratamentos de conservação

Numa primeira fase foram realizados ensaios preliminares para testar a eficiência dos dois tratamentos de conservação do sumo de maçã turvo, a adição de ácido ascórbico e a pasteurização (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Ensaios preliminares do sumo de maçã turvo com diferentes tratamentos de conservação, ácido ascórbico (125, 140, 200 e 250 mg/L) e pasteurização (70 °C /5 min, 70 °C /15 min, 80 °C /5 min e 80 °C /15 min).

Ensaios preliminares de sumo de maçã turvo	
<b>Ensaio 1</b>	125 mg/L ácido ascórbico
<b>Ensaio 2</b>	140 mg/L ácido ascórbico
<b>Ensaio 3</b>	200 mg/L ácido ascórbico
<b>Ensaio 4</b>	250 mg/L ácido ascórbico
<b>Ensaio 5</b>	140 mg/L ácido ascórbico + 70 °C /5 min
<b>Ensaio 6</b>	140 mg/L ácido ascórbico + 70 °C /15 min
<b>Ensaio 7</b>	140 mg/L ácido ascórbico + 80 °C /5 min
<b>Ensaio 8</b>	140 mg/L ácido ascórbico + 80 °C /15 min

A adição de diferentes concentrações de ácido ascórbico (125, 140, 200 e 250 mg/L) no sumo de maçã turvo teve como objetivo verificar qual a mais eficaz na prevenção do acastanhamento enzimático, reação que ocorre durante o processamento e que pode comprometer a qualidade do produto final. As diferentes quantidades de ácido ascórbico foram adicionadas à polpa aquando a trituração da fruta. A utilização de ácido ascórbico pode, quando adicionado em excesso, alterar as características gustativas e odoríferas do sumo, sendo importante mantê-las o mais semelhantes possível à maçã fresca. A **Figura 10** ilustra os ensaios de sumo de maçã turvo correspondentes à concentração de ácido ascórbico: ensaio 1 (125 mg/L), ensaio 2 (140 mg/L) e ensaio 4 (250 mg/L).



**Figura 10** - Aspeto visual do sumo de maçã turvo submetido a diferentes concentrações de ácido ascórbico: Ensaio 1 - 125 mg/L; Ensaio 2 - 140 mg/L e Ensaio 4 - 250 mg/L.

A adição de 125 mg/L de ácido ascórbico à polpa da fruta resultou num sumo com uma cor acastanhada, distante da coloração amarelo-claro pretendida pelo consumidor neste produto, denotando assim a incapacidade da concentração em reduzir as quinonas resultantes da oxidação dos compostos fenólicos, devido à ação das oxirredutases. No entanto, a adição desta quantidade de ácido ascórbico deu origem a um sumo com aroma e sabor bastante agradáveis e salientes a maçã fresca. A adição de 140 mg/L de ácido ascórbico à polpa da fruta (Ensaio 2) originou um sumo amarelo claro e com um aroma e sabor característicos a maçã fresca. Aumentando a quantidade de ácido ascórbico para 200 e 250 mg/L, o sumo não apresenta aroma e sabor frutado, tendo uma sensação de odor e sabor a verde devido a uma elevada concentração de ácido ascórbico. Estes dois sumos apresentaram uma cor amarelo claro, como é possível ver na figura 10, uma cor desejável para este produto. Todavia, no desenvolvimento do sumo de maçã turvo como em qualquer outro produto alimentar, de pouco vale ter uma característica com um nível de qualidade apreciável quando outras são insatisfatórias, sendo indispensável a harmonia da cor, aroma e sabor maçã para a aceitação do sumo de maçã turvo por parte do consumidor.

A adição de 125, 200 e 250 mg/L denotam um efeito negativo ao nível das características fundamentais do sumo, cor característica, aroma e sabor a maçã, mostrando que a produção de sumo de maçã turvo com estas concentrações de ácido ascórbico não é exequível. No entanto, a quantidade de ácido ascórbico de 140 mg/L revelou ser a melhor para manter as

características intrínsecas da maçã no sumo (cor, aroma e sabor), sendo esta concentração de ácido ascórbico adotada para a preparação do sumo de maçã turvo nos ensaios seguintes.

A aplicação de diferentes binómios de tempo/temperatura de pasteurização teve o intuito de identificar qual o mais eficiente para a inativação enzimática, especialmente oxirredutases, e na destruição dos microrganismos capazes de deteriorar o sumo de maçã turvo. A **Figura 11** mostra os sumos de maçã turvos sujeitos às pasteurizações 70 °C /5 min, 70 °C /15 min, 80 °C /5 min e 80 °C /15 min, notando-se, claramente, tonalidades distintas no sumo de maçã turvo. O binómio de pasteurização 70 °C /5 min e 80 °C /5 min, evidenciaram um amarelo mais escuro comparativamente aos de 70 °C /15 min e 80 °C /15 min, em que foram observados um amarelo mais claro, o que vai ao encontro da cor desejável para o produto final. A diferença de tonalidades demonstra que 5 minutos não é suficiente para inativar totalmente as enzimas responsáveis pelo acastanhamento enzimático, independentemente da temperatura, e por esta razão foram descartados os binómios de pasteurização com este tempo. Contrariamente, o tratamento térmico de 15 min aparentou ser eficiente para inativação total das enzimas oxirredutases no sumo, para as duas temperaturas, 70 °C e 80 °C, sendo que nos sumos não foram detetados bolores e leveduras nem microrganismos totais. Dado que é imperativo garantir a estabilidade do sumo foi escolhido o tratamento térmico com a temperatura mais elevada (80 °C) durante 15 min por forma a garantir a inativação enzimática, permitindo prolongar o tempo de vida do sumo.



**Figura 11** - Aspetto visual dos ensaios de sumo de maçã turvo sujeitos a diferentes binómios de pasteurização: 5 - 70 °C /5 min; 6 - 70 °C /15 min; 7 - 80 °C /5 min e 8 - 80 °C /15 min.

## **5.2. Avaliação das propriedades dos sumos de maçã turvo ao longo do armazenamento**

Após a seleção das condições mais adequadas para a elaboração dos sumos turvos, adição de 140 mg/L de ácido ascórbico à polpa durante o processamento e o tratamento térmico de 80 °C por 15 min, foram produzidos dois sumos de maçã turvos, um constituído exclusivamente por maçãs da variedade *Golden Delicious* (SMT1) e outro constituído por maçãs da variedade *Royal Gala* (SMT2). Dado que a temperatura é um fator determinante durante o armazenamento dos sumos, os sumos foram mantidos a duas temperaturas distintas durante o armazenamento: a temperatura de refrigeração ( $T_{ref}$ , 5 °C) e a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ , aproximadamente 20 °C). A aplicação de uma temperatura mais baixa faz com que as reações que acontecem naturalmente nos sumos ocorram a velocidades inferiores, permitindo, deste modo, aumentar o tempo de vida útil do sumo. Foi testado o armazenamento à temperatura ambiente com o intuito de averiguar se o sumo turvo é estável por períodos semelhantes ao refrigerado, o que reduziria os gastos que o sistema de refrigeração acarreta. Diversos parâmetros, microbiológicos, físico-químicos e sensoriais, foram avaliados antes e após a pasteurização e após o armazenamento durante 90

dias dos sumos, de forma a averiguar o efeito da temperatura de armazenamento nas propriedades dos dois sumos de maçã turvos.

### 5.2.1. Crescimento microbiano e atividade enzimática

O crescimento microbiano e a atividade enzimática são indicadores importantes para a estabilidade do sumo de maçã turvo por períodos alargados, pois os microrganismos e a atividade das oxirredutases e enzimas pécicas podem levar à deterioração do produto <sup>[92]</sup>. Estes indicadores foram determinados com o intuito de verificar a eficácia da pasteurização e o efeito do armazenamento na qualidade dos sumos de maçã turvos.

Relativamente à análise microbiológica efetuada às amostras de sumo de maçã turvo, esta teve como principal enfoco a caracterização da flora microbiana dos dois sumos de maçã turvos ao nível de bolores e leveduras, microrganismos totais e *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ACB). Na **Tabela 3** é possível observar a variação nas contagens microbianas em unidades formadores de colónias (UFC/mL) dos sumos não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb).

**Tabela 3** - Análise microbiológica de bolores e leveduras (B&L), microrganismos totais (MT) e *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ACB) dos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) antes da pasteurização (NP), após a pasteurização (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento sob refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb).

Inibição microbiana (UFC/mL)					
	Armazenamento	Fase	B&L	MT	ACB
<b>SMT1</b> ( <i>Golden Delicious</i> )	Tref	NP	$0,75 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	sc
		T0	sc	sc	sc
		T90	sc	sc	sc
	Tamb	NP	$0,75 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	sc
		T0	sc	sc	sc
		T90	sc	sc	sc
<b>SMT2</b> ( <i>Royal Gala</i> )	Tref	NP	$0,75 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	sc
		T0	sc	sc	sc
		T90	sc	sc	sc
	Tamb	NP	$0,75 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	sc
		T0	sc	sc	sc
		T90	sc	sc	sc

sc - sem crescimento

As análises microbiológicas mostraram que a pasteurização foi eficiente na eliminação total do crescimento microbiano uma vez que os microrganismos presentes nos sumos turvos antes do tratamento térmico (B&L e MT) deixaram de existir logo após o tratamento térmico (T0). Relativamente à *Alicyclobacillus acidoterrestris*, é possível verificar que os sumos turvos frescos (NP) não apresentaram contaminação por esta bactéria. A adição de ácido ascórbico nos sumos na ordem de grandeza de 150 mg/L ou mais, pode prevenir ou impedir o crescimento do ACB [69].

Para o tratamento térmico ser eficaz na destruição dos microrganismos deteriorantes, é necessário um controlo adequado e rigoroso para que não possa ocorrer qualquer tipo de contaminação microbiológica que ponha em causa a qualidade e segurança do produto ao longo do armazenamento. Em conformidade com os resultados obtidos para o crescimento microbiológico das amostras de sumo de maçã turvos armazenadas a temperatura de refrigeração e a temperatura ambiente, ao fim de 90 dias de armazenamento, é possível concluir que as mesmas permaneceram estáveis não existindo evidências de quaisquer microrganismos nos dois sumos SMT1 e SMT2.

A **Tabela 4** mostra a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) dos sumos de maçã turvos não pasteurizados (NP) e após o tratamento térmico (T0). A polifenoloxidase foi a escolhida para avaliar nos sumos porque é a enzima que causa maiores problemas ao sumo turvo, em particular o acastanhamento repentino do sumo, sendo relevante a sua monitorização [17].

A atividade enzimática da PPO inicialmente medida nas amostras de sumo de maçã turvo não pasteurizadas variou entre 0,015 e 0,025 Abs/min.mL. Os valores diferentes de atividade da polifenoloxidase determinados nos sumos, principalmente nos SMT2 não pasteurizados, pode estar diretamente relacionado com diferentes estados de maturação da fruta, ou seja, se o fruto está mais maduro a atividade da enzima é superior pois a atividade aumenta ao longo do desenvolvimento do fruto e diminui com amadurecimento [27]. No entanto, o binómio de pasteurização aplicado nos sumos de maçã turvos foi eficaz para a inativação total da enzima polifenoloxidase, quer no SMT1 como no SMT2.

**Tabela 4** - Atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) não pasteurizados (NP) e pasteurizados (T0), armazenados sob refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb).

Atividade enzimática da polifenoloxidase			PPO ( $\Delta\text{Abs}/\text{min.mL}$ )	% inativação
<b>SMT1</b> ( <i>Golden Delicious</i> )	Tref	NP	$1,68 \times 10^{-2}$	100%
		T0	0,00	
	Tamb	NP	$1,52 \times 10^{-2}$	100%
		T0	0,00	
<b>SMT2</b> ( <i>Royal Gala</i> )	Tref	NP	$2,48 \times 10^{-2}$	100%
		T0	0,00	
	Tamb	NP	$1,76 \times 10^{-2}$	100%
		T0	0,00	

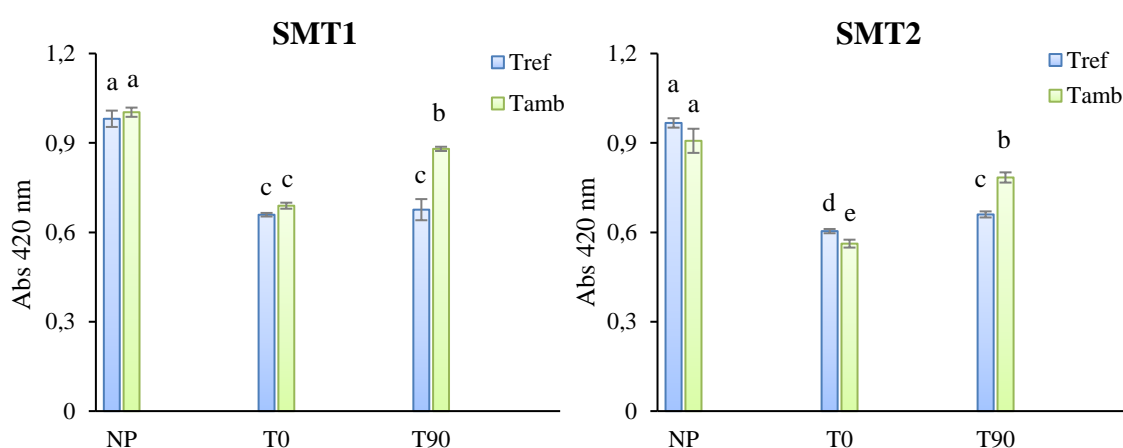
Como abordado anteriormente, a pectinametilesterase é a enzima que pode estar associada à instabilidade das partículas em suspensão no produto, contudo não foi determinada a sua atividade enzimática, pois é descrito que a pectinametilesterase e a polifenoloxidase apresentam estabilidade semelhante ao calor. Por outras palavras, para o mesmo binómio de pasteurização, a percentagem de inativação é idêntica para as duas enzimas [36]. Assim sendo, estima-se que o tratamento térmico aplicado nos SMT1 e SMT2 tenha inativado por completo também a pectinametilesterase. Em conclusão, os métodos de conservação usados para os sumos de maçã turvos são eficientes na inativação das enzimas oxirredutases.

### 5.2.2. Cor dos sumos

A cor amarelo claro do sumo de maçã turvo constitui uma característica de qualidade crucial e decisiva na escolha dos consumidores, mas que se pode alterar durante o seu processamento e armazenamento [2].

A **Figura 12** apresenta a variação da intensidade de acastanhamento dos dois sumos de maçã turvos analisados (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente. Os dois sumos de maçã turvos apresentam o mesmo comportamento relativamente à intensidade de acastanhamento antes e após a pasteurização. O SMT1 apresenta uma diminuição significativa da absorvância de 32%, enquanto que no SMT2 diminuiu 38% ( $p < 0,05$ ). Este resultado revela que o tratamento térmico contribui para a

redução da intensidade de acastanhamento dos sumos de maçã turvos. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que verificaram que em sumos de maçã turvos pasteurizados a intensidade de acastanhamento diminui significativamente após a aplicação do tratamento térmico [36]. O decréscimo do acastanhamento, ou inversamente, a intensificação da cor amarelo claro, pode ser justificado pela libertação dos pigmentos que conferem esta cor, carotenoides, clorofila e antocianinas, acumulados na camada do parênquima, no sumo de maçã turvo, tornando os sumos mais corados. Adicionalmente, o tratamento térmico pode destruir os pigmentos castanhos existentes nos sumos frescos, devido ao acastanhamento enzimático aquando a descompartimentação celular [93,94,36].



**Figura 12** - Intensidade de acastanhamento nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.

Tal como demonstra a figura 12, verifica-se que ao fim de 90 dias de armazenamento existiu um aumento significativo do acastanhamento ( $p < 0,05$ ), de 8% e 35% para o SMT2 armazenado no frio e à temperatura ambiente, respetivamente. Também o SMT1 armazenado à temperatura ambiente aumentou em 22% a intensidade de acastanhamento, comparativamente ao tempo zero. Como foi comprovado anteriormente a via enzimática (oxirredutases), que poderia contribuir para o acastanhamento, foi inativada pelo tratamento térmico, assim o aumento do acastanhamento deve-se às reações não enzimáticas, concretamente à reação de *Maillard* e à degradação do ácido ascórbico. O tratamento térmico desencadeia a reação entre os aminoácidos portadores de um grupo amina livre e açúcares redutores presentes nos sumos de maçã turvos levando à formação de produtos de Amadori. Subsequentemente, devido às condições acídicas dos sumos, dá-se a degradação

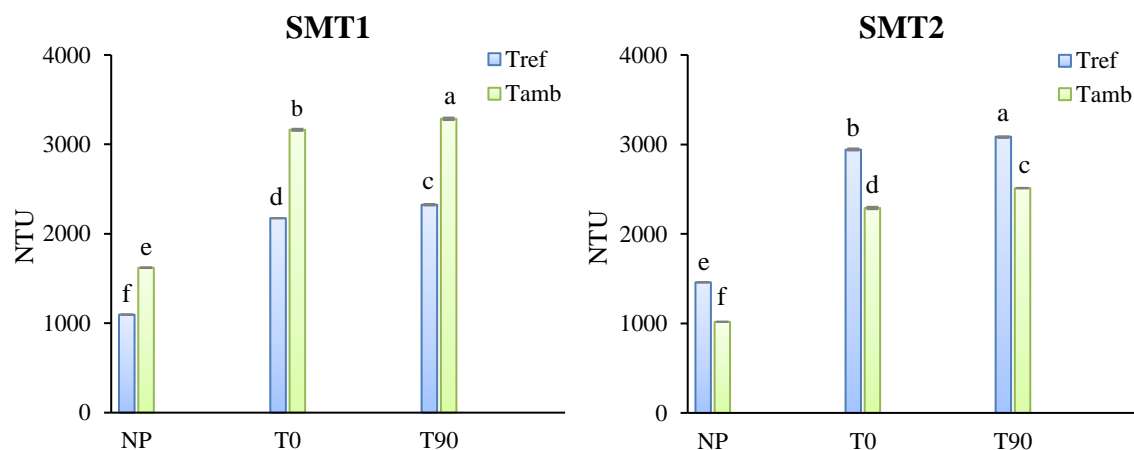


dos produtos de Amadori, levando ao aparecimento de furfural e hidroximetilfurfural, que por uma série de reações conduzem à formação de polímeros castanhos, as melanoidinas, responsáveis pelo acastanhamento <sup>[57]</sup>. Nos sumos armazenados à temperatura de refrigeração, verifica-se que os valores de absorvância a 420 são mais baixos, isto é, são menos castanhos, face aos sumos de maçã turvos armazenados à temperatura ambiente ( $p < 0,05$ ). A menor perda de cor amarelo claro registada nos sumos armazenados sob refrigeração, possivelmente está associada à aplicação de frio na matriz alimentar, que proporciona uma menor velocidade da reação de *Maillard* e de degradação de ácido ascórbico.

### 5.2.3. Turbidez e teor de sólidos solúveis

A turbidez é um parâmetro de grande interesse em sumos turvos, que permite avaliar a presença de partículas em suspensão, de tamanho e natureza variadas. Essas partículas podem ser proteínas, pectina ou compostos fenólicos, que tiveram origem na quebra das paredes celulares da fruta aquando do processamento. Sendo o sumo de maçã turvo proveniente de maçãs espremidas, sem qualquer tratamento de filtração e clarificação, é de esperar que a turbidez seja elevada <sup>[1]</sup>.

Na **Figura 13** está representado o efeito do tratamento térmico (NP para T0) e do armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e ambiente na turbidez nos sumos de maçã turvos. As amostras de sumo turvo não pasteurizadas revelaram diferenças assinaláveis ( $p < 0,05$ ) entre lotes de 33% e 31% para os SMT1 e SMT2, respetivamente. Estas variações ocorreram devido à variabilidade no processo de decantar, que não permite separar com precisão o mesmo número de partículas. Os valores de turbidez são elevados ( $> 1000$  NTU) para os dois sumos turvos devido à utilização da decantação para remover as partículas de maior diâmetro e estabilizar o produto, contrariamente à centrifugação que é a mais usada na indústria permitindo a obtenção de valores de turbidez mais baixos na ordem dos 1000 NTU após o processamento térmico.



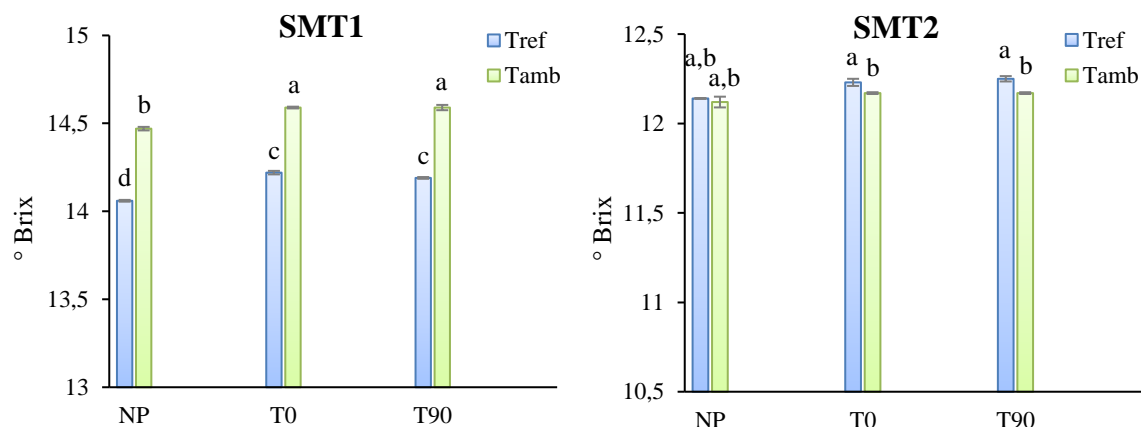
**Figura 13** - Turbidez dos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.

Atendendo à evolução do comportamento com a pasteurização, denota-se que o tratamento térmico teve efeito imediato na turbidez resultando num aumento acentuado ( $p < 0,05$ ) de cerca de 50%, tanto para o SMT1 como SMT2. Este aumento deveu-se ao uso de elevada temperatura que promove a degradação da pectina, que origina uma diminuição do peso molecular e consequente aumento da solubilidade. A degradação da pectina nos sumos turvos pode estar relacionada com a hidrólise ácida das ligações glicosídicas nos polissacarídeos da parede celular em que a hidrólise do ácido poligalacturónico ocorre mais rapidamente que a hidrólise dos polissacarídeos neutros <sup>[97]</sup>. A  $\beta$ -eliminação é outro mecanismo não enzimático responsável pela degradação da pectina <sup>[97]</sup>. Esta reação é potenciada pelo aumento da temperatura e reduzido pH e consiste na remoção de um átomo de hidrogénio no carbono 5 e do carbono 4 dos resíduos de ácido galacturónico.

Comparando o tempo de armazenamento, SMT1 e SMT2 apresentam o mesmo comportamento, tendo um aumento muito ligeiro ( $p < 0,05$ ) da turbidez de T0 até T90, acontecimento francamente positivo, e que permite concluir que o armazenamento não provoca a perda de turbidez, critério tão desejável no produto. O efeito da temperatura de armazenamento na turbidez dos sumos turvos tem um comportamento inverso, e tal, deve-se, meramente, à discrepância entre os lotes de sumo não pasteurizados.

O teor de sólidos solúveis é um parâmetro básico na produção e desenvolvimento de sumos, expresso em °Brix. A determinação dos sólidos solúveis foi utilizada para indicar a percentagem de açúcares presentes no sumo de maçã turvo, pelo que é, uma importante medida da qualidade sensorial do produto.

A **Figura 14** demonstra a variação do teor em sólidos solúveis nos dois sumos de maçã turvos analisados (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente.



**Figura 14** - Teor de sólidos solúveis nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.

É de salientar que a quantidade de sólidos solúveis presentes nos sumos turvos depende fundamentalmente da matriz usada no sumo, mais concretamente da variedade de maçã, apresentando entre si diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). O SMT1 de *Golden Delicious* detém um valor de °Brix maior (~ 14 °Brix) comparativamente ao SMT2 de *Royal Gala* (~ 12 °Brix). Estes valores estão dentro da gama estabelecida pelo código de prática da Associação Europeia de Sumos de Fruta (AIJN), que estabelece o teor de sólidos solúveis mínimo para um sumo de maçã espremido de 10 °Brix <sup>[95]</sup>. Pela figura 14 observa-se um valor superior para o sumo armazenado à temperatura ambiente (Tamb), em relação ao refrigerado (Tref) nas amostras de SMT1. Esta diferença deve-se ao facto de serem dois lotes de sumo, elaborados de fruta com estados de maturação distintos, querendo com isto dizer, que maçãs mais maduras originam um sumo com °Brix superior <sup>[96]</sup>.

Após a pasteurização, registou-se um aumento ligeiro ( $p < 0,05$ ) no teor de sólidos solúveis de 1% a 3% para Tref e Tamb, respetivamente, no SMT1. Por comparação, no sumo SMT2 não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no teor de sólidos solúveis para as duas temperaturas de armazenamento (Figura 14). A degradação da pectina deve ser o principal responsável pelo aumento do teor de sólidos solúveis no SMT1, ocorrendo exclusivamente por mecanismos não enzimáticos, nomeadamente a hidrólise ácida das ligações glicosídicas

e reações de  $\beta$ -eliminação. Estes resultados não vão de encontro com os da turbidez na mesma fase, uma vez que com o aumento tão acentuado da turbidez seria de esperar que os sólidos solúveis também aumentassem, o que indica que a degradação da pectina não proporcionou biodisponibilidade de açúcares livres no meio.

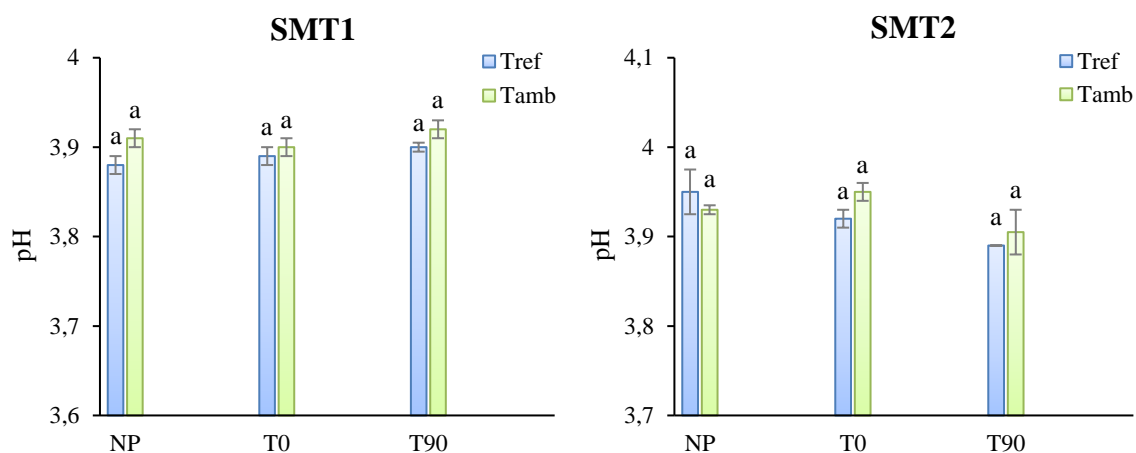
Atendendo à evolução do comportamento do teor de sólidos solúveis com o armazenamento, verifica-se que os SMT1 e SMT2 armazenados sob refrigeração e à temperatura ambiente não sofreram alterações significativas nos sólidos solúveis ( $p < 0,05$ ). Sobre isto, retira-se que o tempo e a temperatura de armazenamento não parecem influenciar o teor de sólidos solúveis nos sumos de maçã turvos desenvolvidos.

#### 5.2.4. pH e acidez titulável

O pH é uma característica importante no sumo de maçã turvo que afeta o perfil sensorial do produto.

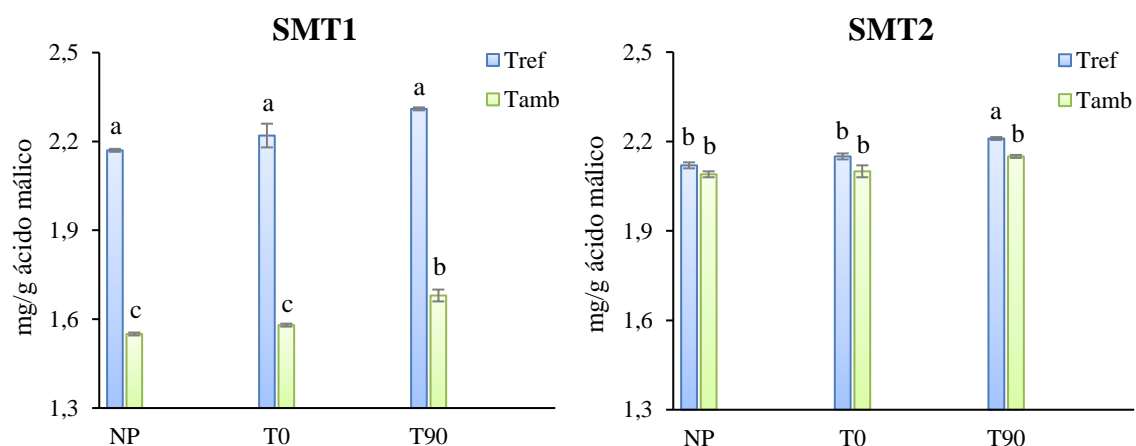
A **Figura 15** apresenta a variação de pH dos dois sumos de maçã turvos analisados (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e após 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente.

Dado o nível próximo de acidez titulável das duas variedades de maçã que compõem os sumos turvos <sup>[10]</sup>, o pH dos sumos frescos (NP) foi de  $\sim 3,90$  e  $3,95$  para os sumos SMT1 e SMT2, respetivamente. Pela análise da figura 15 verifica-se que o tratamento térmico não acarreta diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no pH dos dois sumos analisados SMT1 e SMT2. O tempo e a temperatura de armazenamento (Tref e Tamb) a que os sumos de maçã turvos foram submetidos também não têm influência no pH dos sumos, sendo que após 90 dias de armazenamento não se registou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Um estudo descrito na literatura é consistente com este comportamento do pH, verificando que a pasteurização e o tempo de armazenamento têm um impacto mínimo neste parâmetro físico-químico <sup>[36]</sup>. Nesse mesmo estudo é referido que a variedade de maçã influencia o valor de pH e consequentemente a acidez titulável, informação corroborada neste estudo, em que o SMT1 de variedade *Golden Delicious* tem pH ligeiramente inferior, ou seja, acidez titulável superior ao SMT2 produzido com variedade *Royal Gala*.



**Figura 15** - pH dos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não tratados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.

A acidez do sumo turvo é dada pela presença dos ácidos orgânicos que constituem a maçã, principalmente o ácido málico, pois é o ácido orgânico predominante na maçã [11,36]. Na **Figura 16** encontra-se representado a alteração da acidez titulável, expressa em mg/g de ácido málico dos sumos de maçã turvos frescos (NP), pasteurizados (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente.



**Figura 16** - Acidez titulável nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não tratados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.

O sumo SMT1 revelou uma grande diferença entre lotes não pasteurizados, cerca de 29%, devendo-se provavelmente esta discrepância ao estado de maturação da fruta, pois com a

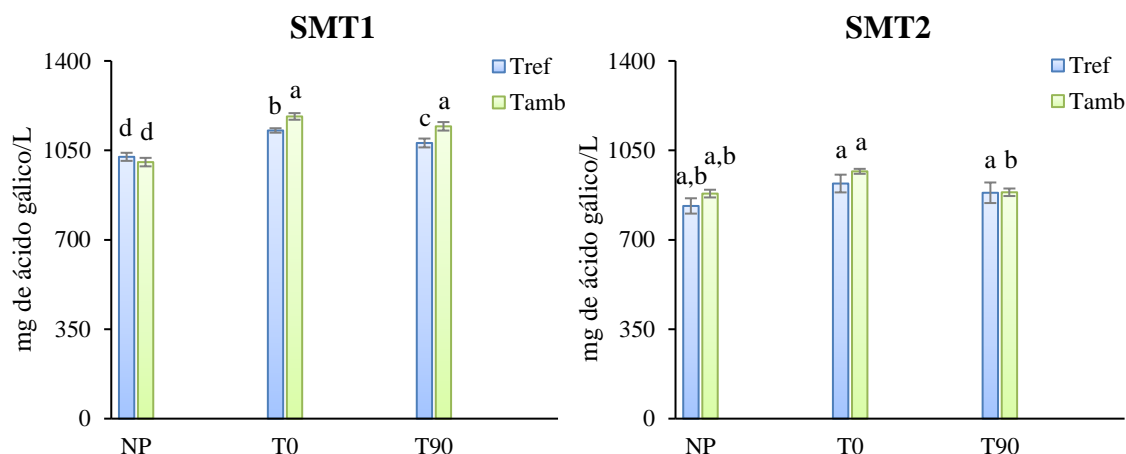
maturação existe a diminuição da acidez do fruto. Esta observação está de acordo com o referido para o teor de sólidos solúveis que foi superior nesta amostra. Estes resultados permitem concluir que as maçãs representativas de Tamb estavam mais maduras, pois a sua acidez é mais reduzida e o teor de sólidos solúveis superior comparativamente à Tref <sup>[27]</sup>.

Pela análise estatística verifica-se que os SMT1 e SMT2 não apresentam alterações significativas do valor de acidez titulável de NP para T0, deduzindo-se assim, que o tratamento térmico aplicado não induz a libertação de ácidos orgânicos, situados na parede celular do fruto, no sumo turvo. Relativamente ao armazenamento, ao fim de 90 dias, o SMT1 armazenado à temperatura ambiente sofreu um incremento significativo da acidez de 6%, contrariamente ao mesmo sumo armazenado à temperatura de refrigeração, em que não foram visíveis diferenças significativas. Inversamente, o SMT2 apresentou um ligeiro aumento da acidez ( $p < 0,05$ ) de 3 % para o sumo armazenado no frio, enquanto que o sumo armazenado a temperatura ambiente se manteve estável de T0 para T90. O comportamento da acidez não é consistente nos sumos, ainda assim um aumento com o armazenamento pode estar relacionado com a rutura das paredes celulares dos frutos, que liberta ácidos orgânicos para o meio envolvente.

#### **5.2.5. Teor em compostos fenólicos totais, conteúdo em ácido ascórbico e atividade antioxidante**

Os compostos fenólicos, apesar de existirem em concentrações baixas nos alimentos, são essenciais para o organismo devido ao seu potencial antioxidante. Sendo o sumo de maçã turvo proveniente inteiramente da fruta, sem qualquer tipo de adição de açúcar, água e enzimas, o seu teor em compostos fenólicos vai ser importante para a atividade antioxidante, assim como para as características organoléticas e sensoriais <sup>[49]</sup>.

Na **Figura 17** está representada a variação do teor de compostos fenólicos nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente. Os resultados revelam valores de compostos fenólicos distintos entre os SMT1 e SMT2 frescos (NP). O SMT1 apresentou um conteúdo fenólico superior a 1000 mg de ácido gálico/L e o SMT2 apresentou ~900 mg de ácido gálico/L, valores que estão de acordo com os referenciados na literatura <sup>[1]</sup>, em que a maçã *Golden Delicious* com casca é constituída por um teor superior de compostos fenólicos em relação à *Royal Gala* <sup>[9]</sup>.



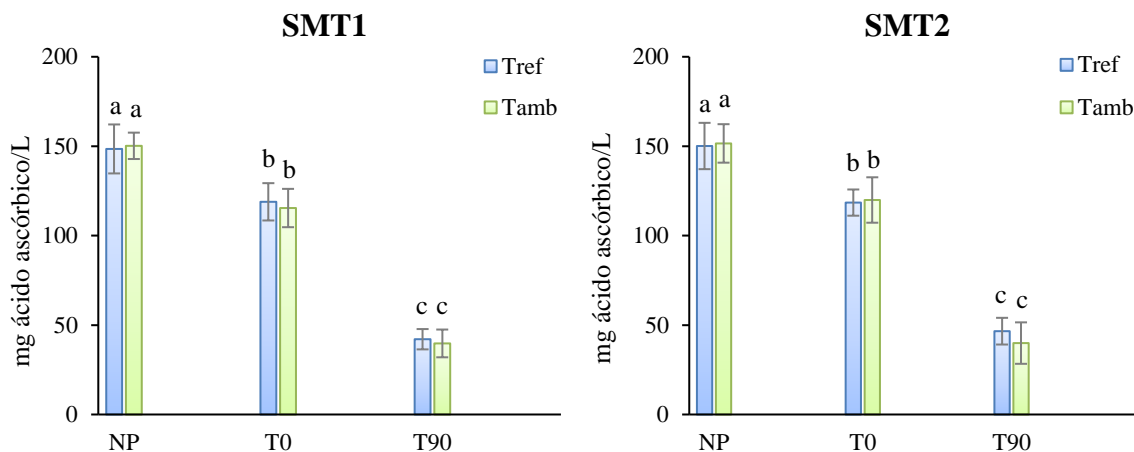
**Figura 17** - Teor de compostos fenólicos totais nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) não tratados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) a temperatura de refrigeração (Tref) e a temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.

O tratamento térmico potenciou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de compostos fenólicos no sumo de cerca de 9% e 15% para o SMT1 identificado como Tref e Tamb, respetivamente, e 11% para o SMT2. Este aumento pode surgir devido à hidrólise dos compostos fenólicos com a temperatura, que leva à libertação destes compostos ainda existentes nas paredes celulares dos frutos e consequente aumento da biodisponibilidade nos sumos de maçã turvos. O SMT1 armazenado no frio apresenta um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) de 4% no teor de compostos fenólicos após 90 dias de armazenamento, comparativamente ao sumo pasteurizado (T0), enquanto o sumo armazenado à temperatura ambiente manteve o conteúdo em compostos fenólicos. Inversamente, o SMT2 armazenado sob refrigeração não registou diferenças significativas no teor de compostos fenólicos de T0 para T90, enquanto o sumo armazenado a temperatura ambiente sofreu uma diminuição considerável de 8% no teor destes compostos. A diminuição no teor de compostos fenólicos após 90 dias de armazenamento pode dever-se a uma eventual oxidação dos compostos ou a reações de polimerização, que reduzem o número de grupos hidroxilo determinados pelo método *Folin-Ciocalteu*. No entanto, a diminuição no conteúdo em compostos fenólicos é ligeira e não parece estar relacionada com a temperatura de armazenamento.

O ácido ascórbico é um nutriente essencial na alimentação humana, tendo, entre outros, um papel relevante na proteção antioxidante. O sumo de maçã turvo não é naturalmente muito rico nesta vitamina, motivo pelo qual face à necessidade de preservar e melhorar a cor do produto, este foi adicionado durante o processamento. Este antioxidante, permite reverter a ação das quinonas, uma vez que consegue bloquear as reações de escurecimento numa

primeira fase, levando à regeneração do composto fenólico original e complementarmente aumenta do valor nutricional do sumo de maçã turvo [38].

Na **Figura 18** está apresentado o conteúdo de ácido ascórbico nos dois sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e passados 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente.



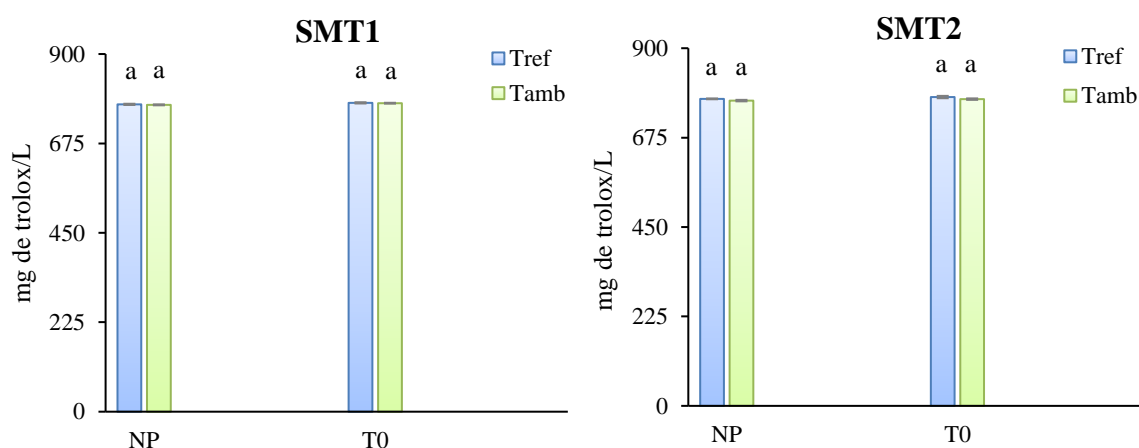
**Figura 18** - Conteúdo de ácido ascórbico nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) não tratados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração (Tref) e à temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.

Os sumos de maçã turvos frescos (NP) apresentam cerca de 150 mg de ácido ascórbico/L, estando este valor de acordo com a quantidade de ácido ascórbico adicionado à polpa da fruta durante o processamento do sumo. Os dois sumos de maçã turvos apresentam claramente reduções significativas ( $p < 0,05$ ) do teor de ácido ascórbico, cerca de 20% menos com a pasteurização do sumo (de NP para T0). Estes resultados estão de acordo com a literatura em que está descrito que ocorre uma diminuição da concentração de ácido ascórbico com o tratamento térmico devido à sensibilidade do ácido ascórbico à temperatura resultando na sua degradação [36]. Tendo em conta os resultados obtidos, verifica-se que o tempo de armazenamento afeta significativamente o conteúdo em ácido ascórbico ( $p < 0,05$ ) nos sumos de maçã turvos, observando-se uma diminuição passado os 90 dias de armazenamento. Estas perdas correspondem, respetivamente, a 64 e 66%, para o SMT1 armazenado no frio e à temperatura ambiente, e a 61 e 67% para o SMT2 armazenado sob refrigeração e à temperatura ambiente, respetivamente, comparativamente aos respetivos sumos pasteurizados. A degradação do ácido ascórbico nos sumos de maçã turvo deveu-se à degradação não enzimática, sobretudo à via aeróbia, dado o tipo de engarrafamento do



sumo <sup>[36]</sup>. Na presença de oxigénio o ácido ascórbico degrada-se em ácido desidroascorbato (DHAA) que se converte espontaneamente em ácido 2,3-L-dicetogulónico, que pode originar redutonas. As redutonas podem associar-se com aminoácidos presentes no sumo turvo e integrar a reação de *Maillard*.

A variação da atividade antioxidante nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2) foi avaliada para sumos frescos (NP) e sujeitos a tratamento térmico (T0) (**Figura 19**). A atividade antioxidante é semelhante nos dois sumos de maçã turvos frescos analisados, rondando um valor de 770 mg de trolox/L. Nos sumos SMT1 e SMT2, a pasteurização não despoletou alterações significativas ( $p < 0,05$ ) na capacidade antioxidante. O aumento da biodisponibilidade de compostos fenólicos e a degradação do ácido ascórbico com o tratamento térmico, podem ditar o comportamento estável do perfil antioxidante nos sumos turvos, considerando que estes dois compostos antioxidantes se equilibram.



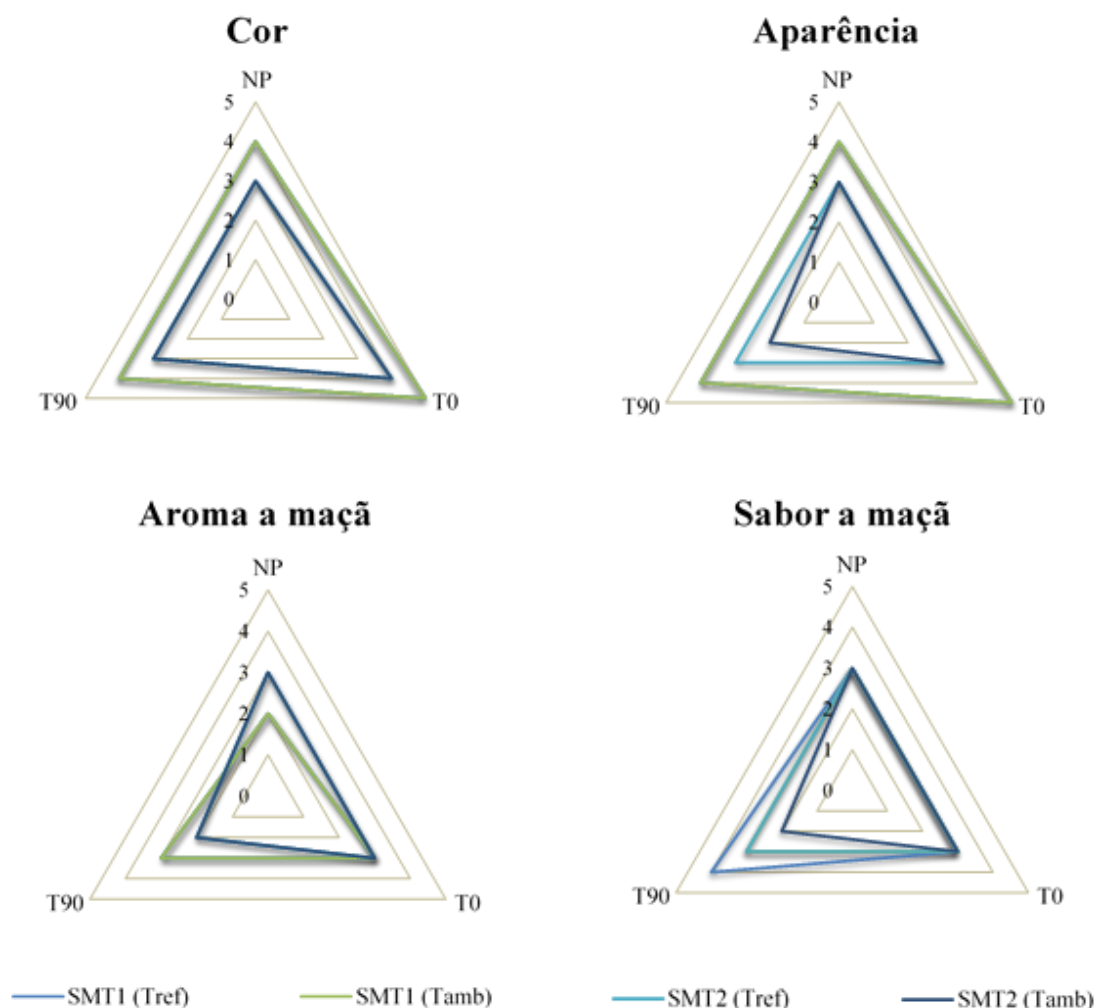
**Figura 19** - Atividade antioxidante nos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não tratados (NP) e tratados termicamente (T0) a temperatura de refrigeração (Tref) e a temperatura ambiente (Tamb). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas com letras diferentes.

#### 5.2.6. Análise sensorial

A avaliação das propriedades sensoriais dos sumos de maçã turvos é de extrema importância, tendo a indústria um grande interesse no desenvolvimento de produtos que sejam facilmente aceites pelo consumidor. Para avaliar a aceitabilidade dos sumos de maçã turvos, o painel não treinado de provadores da Indumape-Industrialização de Fruta S.A analisou as diferentes características sensoriais, descritas como as fundamentais para aprovação deste produto, concretamente a cor, aparência, aroma e sabor a maçã, através de

um teste hedônico numerado de 1 a 5 (1 - desgosto muito; 2 - desgosto; 3 - nem gosto nem desgosto; 4 - gosto; 5 - gosto muito).

A **Figura 20** apresenta os resultados de cada atributo sensorial nos dois sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e após 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente. Após observação dos resultados da análise sensorial por escala hedônica, verifica-se que o tratamento térmico contribui essencialmente para a melhoria da cor e aparência dos sumos de maçã turvos. Na cor é possível verificar que os SMT1 e SMT2 sofreram uma subida na cotação de 1 valor (de 4 para 5) e (de 3 para 4), respetivamente, de NP para T0, denotando que a pasteurização intensifica a cor característica do produto, devido à libertação de compostos de cor, como carotenoides, clorofila e antocianinas, no sumo de maçã turvo. A melhoria da cor percecionada pelos provadores está de acordo com os resultados físico-químicos, intensidade de acastanhamento, obtidos para este parâmetro de NP para T0. Ao nível da aparência do sumo não pasteurizado para o sumo tratado termicamente, constatou-se um aumento da cotação no SMT1 de 1 valor (de 4 para 5), enquanto o SMT2 não sofreu alteração (cotação 3), apesar do aumento considerável da turbidez verificadas nas análises físico-químicas. O sabor a maçã foi o único atributo sensorial não afetado pelo tratamento térmico, apresentando cotação 3 nos SMT1 e SMT2 não pasteurizados e pasteurizados. No entanto, os provadores sentiram uma intensificação do aroma frutado a maçã no SMT1 (de 2 para 3), despoletado pelo choque térmico, ao invés do SMT2 no qual não foi reconhecido qualquer alteração, registando uma cotação de 3 tanto no sumo fresco (NP) como no sumo tratado termicamente. O aroma mais saliente a fruta no SMT1 pasteurizado comparativamente ao fresco, deve-se possivelmente à degradação de ácido ascórbico, pela aplicação de calor, uma vez que maiores concentrações deste antioxidante tendem a despoletar odores indesejáveis e menos frutados, estando de acordo com os resultados respetivos para este parâmetro físico-químico. Os resultados para o SMT2 também revelam uma perda de ácido ascórbico com a aplicação de calor, porém, neste sumo, não foi percecionado melhoria no aroma.



**Figura 20** - Análise sensorial dos sumos de maçã turvos (SMT1 e SMT2), não pasteurizados (NP), tratados termicamente (T0) e ao fim de 90 dias de armazenamento (T90) à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente.

O armazenamento tem alguma influência, quer positiva como negativa, nas características organoléticas dos sumos de maçã turvos. A cor é o atributo mais afetado com o armazenamento, verificando-se a redução de intensidade da cor amarelo-claro, resultante de reações de *Maillard* e reações de degradação do ácido ascórbico. O SMT1 sofreu uma descida na cotação da cor de 1 valor (de 5 para 4) do sumo pasteurizado para o sumo armazenado durante 90 dias a refrigeração e a temperatura ambiente, e o SMT2 uma descida na cotação de 1 valor (de 4 para 3) nos sumos armazenados às diferentes temperaturas. Também na aparência os provadores identificaram uma descida de cotação de 1 valor (de 5 para 4) do SMT1 pasteurizado para o sumo armazenado durante 90 dias no frio e à temperatura ambiente. O SMT2 armazenado no frio manteve a sua cotação 3 em T0 e T90, ao contrário do armazenado à temperatura ambiente que sofreu um decréscimo de 1 valor

(de 3 para 2). Em termos de sabor a maçã, o SMT1 armazenado no frio foi o único que sofreu um aumento da cotação de 1 valor (de 3 para 4) do sumo pasteurizado para o sumo armazenado durante 90 dias. O SMT1 armazenado à temperatura ambiente e o SMT2 armazenado no frio mantiveram a sua cotação 3 do sumo pasteurizado para o sumo avaliado após 90 dias de armazenamento. O SMT2 armazenado a temperatura ambiente mostrou ser o sumo menos estável em termos de sabor a maçã, pois registou uma diminuição da cotação de 1 valor (de 3 para 2) de T0 para T90. No aroma, o SMT1 não sofreu alteração na cotação 3 dos sumos pasteurizados para os sumos avaliados ao fim de 90 de armazenamento à temperatura de refrigeração e temperatura ambiente. Contrariamente, o SMT2 desceu 1 valor na cotação (de 3 para 2) do sumo pasteurizado para os sumos armazenados em ambas as condições.

Finalmente, conjugando os resultados obtidos para os quatro atributos sensoriais, é de destacar que em termos gerais os dois sumos de maçã turvos desenvolvidos apresentaram aceitabilidade ao nível do painel de provadores. Relativamente às conclusões alcançadas com a análise sensorial, verifica-se que o SMT1 constituído por maçã *Golden Delicious* foi o preferido dos provadores, que a muito se deve à cor e aparência destes sumos comparativamente ao sumo constituído por *Royal Gala*. Esta preferência é compatível com a literatura, que indica, precisamente, que os consumidores preferem em geral sumo de maçã turvo proveniente de maçãs *Golden Delicious*, devido à cor amarelo claro que proporcionam ao sumo, atributo de qualidade do produto.

Comparando a influência das diferentes condições de armazenamento (Tref e Tamb) é possível afirmar que o sumo armazenado no frio se manteve mais estável sensorialmente em termos de aroma e sabor a maçã comparativamente ao sumo armazenado à temperatura ambiente, percecionando-se inclusivamente uma melhoria de sabor a fruta no SMT1 após 90 dias de armazenamento. Relativamente à cor e aparência não foi possível retirar conclusões específicas, em ambas as temperaturas de armazenamento os sumos de maçã turvos decrescem 1 valor, sendo que o que parece influenciar é a preferência inicial dos dois sumos frescos (NP).

## 6. Conclusão

As condições, antioxidante (ácido ascórbico a 140 mg/L), tratamento térmico (pasteurização a 80 °C durante 15 min) e temperatura de refrigeração (5 °C), foram utilizadas com a finalidade de investigar a estabilidade dos sumos de maçã turvos ao longo do armazenamento.

As análises microbiológicas permitiram concluir que os sumos de maçã turvos desenvolvidos são seguros passado 90 dias de armazenamento, tanto os armazenados sob refrigeração como a temperatura ambiente, pois após esse tempo não foram detetados microrganismos deteriorantes nos sumos.

A cor é provavelmente o atributo mais impactante para aceitação do produto, tendo-se manifestado a tendência a acastanhar com armazenamento. Ainda assim, ao fim de 90 dias de armazenamento à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente os sumos de maçã turvos apresentaram boa estabilidade de cor, percebida na análise de intensidade de cor, e corroborada pelos provadores na análise sensorial. Ambos os sumos turvos aumentaram ligeiramente a turbidez (4 a 6%) com o armazenamento para as duas temperaturas. O conteúdo em ácido ascórbico foi o parâmetro mais afetado, constatando-se uma diminuição (61 a 67%) comparativamente aos sumos pasteurizados, o que pode estar relacionado com o aumento da intensidade de acastanhamento, apesar de continuarem a serem considerados aceitáveis na análise sensorial em termos de cor, aroma e sabor, principalmente no sumo armazenado a frio.

O sumo turvo elaborado da maçã *Golden Delicious* apresenta um teor em compostos fenólicos superior ao sumo turvo de *Royal Gala*. Esta indicação, de um elevado conteúdo em compostos fenólicos, e o conhecimento da sociedade, que associam estes compostos à prevenção de doenças cardiovasculares e crónicas, poderá tornar o sumo turvo de *Golden* como o mais aconselhável para o consumidor.

A análise sensorial foi decisiva para perceber que o sumo de maçã turvo elaborado com *Golden Delicious* poderá ter potencialidade no mercado de sumos de fruta, uma vez que foi o sumo mais bem cotado em todos os atributos sensoriais analisados (cor, aparência, aroma a maçã e sabor a maçã) ao longo do armazenamento. No entanto, os provadores apontaram o sumo armazenado no frio como mais estável comparativamente ao armazenado a meio ambiente, este último já com a percepção de sabor e aroma indesejáveis. Este armazenamento permite que o sumo seja estável ao nível microbiológico e sensorial, pelo menos, durante 90 dias, o que já é aceitável para um sumo de maçã turvo.

## 7. Perspetivas futuras

Num trabalho futuro seria interessante o uso de diferentes variedades de maçã para a produção do sumo turvo, de forma a apurar uma formulação ideal em termos sensoriais. O uso combinado de maçãs, facilmente aplicado na indústria, pode ter capacidade “natural” de reduzir reações bioquímicas deteriorantes, como a maçã *Granny Smith*, que tem baixa propensão a acastanhar devido ao reduzido teor em compostos fenólicos quer servem de substrato às oxirredutases e à baixa acidez, e pode inclusive dar espaço a variedades que atualmente não tenham valor para a elaboração deste produto. No entanto esta ideia, poderá implicar a testagem novamente de concentrações de ácido ascórbico, uma vez que a variação da composição química de cada variedade, no que respeita ao perfil fenólico, conteúdo de ácidos orgânicos e atividade enzimática, está implicada diretamente na concentração de antioxidante a utilizar na elaboração do sumo.

O uso de conservantes naturais na elaboração de sumos de maçã turvo, pode também ser objeto de estudo, dada a visão do consumidor para produtos com rótulos “limpos”. Como possível substituto natural é contemplado o kiwi ou puré de kiwi, fruto que atua na prevenção do acastanhamento enzimático dado que se trata de uma excelente fonte de vitamina C, e adicionalmente aumenta o valor acrescido do sumo, específico do incremento da atividade antioxidante. Ainda assim é indispensável um estudo rigoroso para “acertar” a formulação do sumo turvo, uma vez que o uso de kiwi ou puré de kiwi em quantidades tidas como exageradas pode comprometer a cor amarelo claro do sumo, não sendo isso o pretendido com a sua aplicação. Este tema até já foi descrito em artigos, onde estudaram o potencial de adição de puré de kiwi na minimização de perdas de qualidade do sumo de maçã turvo <sup>[48]</sup>.

## 8. Bibliografia

- [1] - Teleszko, M., Nowicka, P., Wojdylo, A. (2016). Chemical, enzymatic and physical characteristic of cloudy apple juices. *Journal Agricultural and Food Science*, 25(3), 34-43.
- [2] - Y, Junjie, Kebede, B.T., Buvé, C, Grauwet, T, Loey, V.A., Hu, X, Hendrickx, M. (2017). Quality change during high pressure processing and thermal processing of cloudy apple juice. *Food Science and Technology*, 75 (1), 85-92.
- [3] - Os novos paradigmas do consumo alimentar (2019). Instituto de marketing research.
- [4] - Santos, M., Santos, L., Aguiar, A.A., Carvalho, S. M., Fonseca, S. C. (2017). Produção de sumos de frutos. *Revista Tecnoalimentar*, 9.
- [5] - Associação Portuguesa de Nutrição. (2017). Colher saber. E-book nº 45. Porto: Associação Portuguesa de Nutrição.
- [6] - AIJN - European Fruit Juice association (2018). Liquid Fruit Market Report.
- [7] - Kalinowska, Monika., Bielawska, A., Lewandowska, H., Priebe, W., Lewandowski, W. (2014). Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 169-188.
- [8] - FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). Food Balance Sheets: Food supply quantity (kg/capita/yr).
- [9] - Cindrić, I.V., Krizman, I., Zeiner, M., Kampić, Š., Medunić, G., Stingeder, G. (2012). ICP-AES determination of minor- and major elements in apples after microwave assisted digestion. *Food Chemistry*, 135(4), 2675–2680.
- [10] - INE - Instituto nacional de estatística. (2019). Previsões agrícolas, 1-6.
- [11] - Feliciano, R. P., Antunes, C., Ramos, A., Serra, A. T., Figueira, M. E., Duarte, C. M. M., Carvalho, A., Bronze, M. R. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical, and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 35-45.
- [12] - Róth, E., Berna, A., Beullens, K., Lammertyn, J., Schenk, A., Nicolai, B. (2007). Postharvest quality of integrated and organically produced apple fruit. *Acta Horticulturae*, (737), 39-45.
- [13] - INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge). (2006). Tabela da composição de alimentos. IS662.
- [14] - Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, 103(1), 88–93.
- [15] - Dixon, J.; Hewett, E. W. (2000). Factors affecting apple aroma/flavor volatile concentration. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 28(3), 155-173.
- [16] - Yi, J., Kebede, B. T., Hai Dang, D. N., Buvé, C., Grauwet, T., Van Loey, A. Hendrickx, M. (2017). Quality change during high pressure processing and thermal processing of cloudy apple juice. *LWT*, 75, 85-92.
- [17] - Özoğlu, H., Bayındır, A. (2002). Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control*, 13(4-5), 213-221.
- [18] - Andersson, R., E. Westerlund, P. Åman (2006). Cell-Wall Polysaccharides: Structural, Chemical, and Analytical Aspects, *Carbohydrates in Food*, 129- 166.

- [19] - Zhan, D., Janssen, P., J. Mort, A. (1998). Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin. *Carbohydrate Research*, 308(3-4), 373-380.
- [20] - Caffall, K. H., Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900
- [21] - Vincken, J. P., H. A. Schols, R. Oomen, M. C. McCann, P. Ulvskov, A. G. J. Voragen & R. G. F. Visser (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* 132(4), 1781-1789.
- [22] - Willats, W. G., Knox, J. P., Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.
- [23] - Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266-277.
- [24] - Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223–229.
- [25] - Franke S. I., Ckless K., Silveira J., Rubensam G., Brendel M., Erdtmann B., Henriques J. A. (2004). Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chemistry*, 88, 45-55.
- [26] - Oszmianski, J., Wojdylo, A., Kolniak, J. (2009). Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7078-7085.
- [27] - Simpson, B. K., Nollet, L. M. L., Toldrá, F., Benjakul, S., Hui, Y. H. (2012). Food Biochemistry and Food Processing.
- [28] - Van de Poel, B., Smet, D., Van Der Straeten, D. (2015). Ethylene and Hormonal Cross Talk in Vegetative Growth and Development. *Plant Physiology*, 169(1), 61–72.
- [29] - Giné-Bordonaba, J., Echeverria, G., Duaigües, E., Bobo, G., Larrigaudière, C. (2018). A comprehensive study on the main physiological and biochemical changes occurring during growth and on-tree ripening of two apple varieties with different postharvest behaviour. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- [30] - Valero, D., Romero, M., Serrano, M.A. (2002). The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6), 228-234.
- [31] - Li. X., Xu, C., Korban, S.S., Chen, K. (2010). Regulatory mechanisms of textural changes in ripening fruits. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(4), 222-243.
- [32] - Nunes, C., Santos, C., Pinto, G., Silva, S., Lopes-da-Silva, J. A., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2009). Effects of ripening on microstructure and texture of “Ameixa d’Elvas” candied plums. *Food Chemistry*, 115(3), 1094–1101.
- [33] - Beveridge, T. (2002). Opalescent and Cloudy Fruit Juices: Formation and Particle Stability. *Food Science and Nutrition*, 42(4), 317-337.
- [34] - Nagel, B. (1992). Continuous production of high-quality cloudy apple juices. *Fruit Process*, 59 (1), 6-8.
- [35] - Zhao, G.-Y., Zong, W., An, G.-J. (2008). Effect of Storage on Cloud Stability of Cloudy Apple Juice. *Food Science and Technology International*, 14(1), 105-113.
- [36] - Wibowo, S., Essel, E. A., Man, S., Bernaert, N., Droogenbroeck, B., Grauwet, T., Loey, A., Hendricks, M. (2019). Comparing the impact of high pressure, pulsed electric field and thermal pasteurization on quality attributes of cloudy apple juice using targeted and untargeted analyses. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 54, 64-77.



- [37] - Yi, J., Kebebe, B., Kristiani, K., Grauwet, T., Loey, A.V., Hendrickx, M. (2018). Minimizing quality changes of cloudy apple juice: The use of kiwifruit puree and high-pressure homogenization. *Food Chemistry*, 249, 202-212.
- [38] - Komthong, P., Igura, N., & Shimoda, M. (2007). Effect of ascorbic acid on the odours of cloudy apple juice. *Food Chemistry*, 100(4), 1342-1349.
- [39] - Pecoroni, S. (1996). Using modern physical measurement techniques to analyze technological factors influencing the manufacture of cloudy juices. *Flüssiges Obst*, 63, 706-711.
- [40] - Guiné, R. F. (2012). Projeto de uma Indústria de Processamento de Néctares de Maçã e de Pera. *Millenium*, 42, 175-189.
- [41] - Genovese, D. B., Lozano, J. E. (2006). Contribution of colloidal forces to the viscosity and stability of cloudy apple juice. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 767-773.
- [42] - Genovese, D.B., Lozano, J.E. (2000). Effect of cloud particle characteristics on the viscosity of cloudy apple juice. *Journal Food Science*, 65 (4), 641-645.
- [43] - Tolstoguzov, V.B. (1991). Functional properties of food proteins and role protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 429-468.
- [44] - McMurrough I., Madigan D., Kelly R. and O'Rourke T. (1999). Haze formation shelf-life prediction for lager beer. *Food Technology* 53(1), 58-62.
- [45] - Genovese, D. B., Lozano, J. E. (2006). Contribution of colloidal forces to the viscosity and stability of cloudy apple juice. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 767-773.
- [46] - Genovese, D. B., Elustondo, M. P., Lozano, J. E. (1997). Color and Cloud Stabilization in Cloudy Apple Juice by Steam Heating During Crushing. *Journal of Food Science*, 62(6), 1171-1175.
- [47] - Genovese, D. B., & Lozano, J. E. (2001). The effect of hydrocolloids on the stability and viscosity of cloudy apple juices. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 1-7.
- [48] - Yi, J., Kebebe, B., Kristiani, K., Grauwet, T., Loey, A.V., Hendrickx, M. (2018). Minimizing quality changes of cloudy apple juice: The use of kiwifruit puree and high-pressure homogenization. *Food Chemistry*, 249, 202-212.
- [49] - Marszalek, K., Wozniak, L., Barba, F., Skapska, S., Lorenzo, J.M., Zambon, A., Splilimbergo, S. (2018). Enzymatic, physicochemical, nutritional and phytochemical profile changes of apple (*Golden Delicious* L.) juice under supercritical carbon dioxide and long-term cold storage. *Food chemistry*, 268, 279-286.
- [50] - Lee, C. Y., Whitaker, J. R. (1995). Enzymatic Browning and Its Prevention. Washington: Washington: ACS Symposium Series 600, 251-266.
- [51] - Queiroz, C., Lopes, M. L.M., Fialho, E., Mesquita, V. L. (2008). Polyphenol oxidase: characteristic and mechanisms of browning control. *Food Rev Int*, 24(4), 361-375.
- [52] - Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of Science and Food Agriculture*, 81, 853-876.
- [53] - Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 441-448.
- [54] - Chow, Y. N., Louarme, L., Bonazzi, C., Nicolas, J., Billaud, C. (2011). Apple polyphenoloxidase inactivation during heating in the presence of ascorbic acid and chlorogenic acid. *Food Chemistry*, 129(3), 761-7.

- [55] - El Hajj Assaf, C., De Clercq, N., Van Poucke, C., Vlaemynck, G., Van Coillie, E., Van Pamel, E. (2019). Effects of ascorbic acid on patulin in aqueous solution and in cloudy apple juice. *Mycotoxin Research*.
- [56] - Krapfenbauer, G., Kinner, M., Gossinger, M., Schonlechner, R., Berghofer, E. (2006). Effect of Thermal Treatment on the Quality of Cloudy Apple Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (15), 5453-5460.
- [57] - Echavarría, A. P., Pagán, J., Ibarz, A. (2012). Melanoidins Formed by *Maillard* Reaction in Food and Their Biological Activity. *Food Engineering Reviews*, 4(4), 203-223.
- [58] - Vernin, G., Chakib, S., Rogacheva, S. M., Obretenov, T. D., Parkanyi, C. (1998) Thermal decomposition of ascorbic acid. *Carbohydr. Res*, 305, 1-15.
- [59] - Hsu, H.-Y., Tsai, Y.-C., Fu, C.-C., Wu, J. S.-B. (2012). Degradation of Ascorbic Acid in Ethanolic Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(42), 10696–10701.
- [60] - Kregiel, D. (2015). Health safety of soft drinks: contents, containers, and microorganisms.
- [61] - Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, A.C., Carmona, E.C. (2009). Pectins and Pectinases: Production, Characterization, and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3, 9-18.
- [62] - Sila, D., Buggenhout, S., Duvetter, T., Fraeye, I., Roeck, A., Hendricks, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part II - Structure - function relationships. *Food Science and Food Safety*, 8(2), 86-104.
- [63] - Hui, Y.H. (2006). Handbook of Fruits and Fruit Processing. 1<sup>a</sup> ed. Blackwell Publishing Ltd.
- [64] - Penteado, A. L., Leitão, M. F. F. (2004). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon, and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 89-94.
- [65] - Sapers, G.M., Gorny, J.R., Yousef, A.E. (2006). Microbiology of Fruits and Vegetables. 1<sup>a</sup> ed. CRC Press.
- [66] - Deák, T. (2008). Handbook of Food Spoilage Yeasts. 2<sup>a</sup> Edition.
- [67] - Steyn, C.E., Cameron, M., Witthuh, R.C. (2011). Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment. *Int J Food Microbiol*, 147, 1-11.
- [68] - Heyndrickx, M., (2011). The Importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Applied and Environmental Soil Science*, 1-11.
- [69] - Clotteau, M.S. (2014). *Alicyclobacillus* spp. Control in fruit juice industry. Food and Beverage.
- [70] - Liao, H., Jiang, L., Cheng, L., Liao, X., Zhang, R. (2018). Application of nisin-assisted thermosonication processing for preservation and quality retention of fresh apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 42, 244-249.
- [71] - Aguilar-Rosas, S.F., Ballinas-Casarrubias, M.L., Nevarez-Moorillon, G.V., Martin-Belloso, O., Ortega-Rivas, E. (2007). Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 41-46.
- [72] - Rupasinghe, H. P. V., Yu, L. J. (2012). Emerging preservation methods for fruit juices and beverages. *Food additive*, pp. 55-77.
- [73] - Nguyen, L., Loey, A., Fachin, D., Verlent, I., Hendrickx, M. (2012). Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish). *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 683-691.

- [74] - Paepe, D., Valkenborg, D., Coudijzer, K., Noten, B., Servaes, K., Loose, M., Vourspoels, S., Diels, L., Van Droongenbroeck, B. (2014). Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. *Food Chemistry*, 162, 176-185.
- [75] - Genovese, D. B., Elustondo, M. P., Lozano, J. E. (1997). Color and Cloud Stabilization in Cloudy Apple Juice by Steam Heating During Crushing. *Journal of Food Science*, 62(6), 1171-1175.
- [76] - Li, H., Cheng, K.-W., Cho, C.-H., He, Z., Wang, M. (2007). Oxyresveratrol as an Antibrowning Agent for Cloudy Apple Juices and Fresh-Cut Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2604-2610.
- [77] - Markowski, J. (1998). Some factors affecting quality and stability of cloudy apple juice. *Fruit Processing*, 7, 277-282.
- [78] - Pecoroni, S. (1996). Using modern physical measurement techniques to analyse technological factors influencing the manufacture of cloudy juices. *Flüssiges Obst*, 63, 706-711.
- [79] - Terefe, N.S., Buckow, R., Versteeg, C. (2014). Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, part 1: high-pressure processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(1), 24-63.
- [80] - Codex Alimentarius Commission (1999). Code of hygienic practice for refrigerated packaged foods with extended shelf life. CAC/RCP 46.
- [81] - Coulomb, D. (2008). Refrigeration and cold chain serving the global food industry and creating a better future: two key IIR challenges for improved health and environment. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 413-417
- [82] - James, S.J., James, C. (2010). The food cold-chain and climate change. *Food Research International*, 43, 1944-1956.
- [83] - A Global Look at Juice North America, Europe, APAC. (2017). *Fona Internacional Inc.*, 2.
- [84] - 3M™ Petrifilm™ Placa para contagem de leveduras e bolores, Guia de Interpretação.
- [85] - Petrifilm™ Placa para contagem de aeróbios, Guia de Interpretação.
- [86] - International Federation of Fruit Juice Producers. (2007). Method on the detection of taint producing Alicyclobacillus in fruit juices. 12, 1-11.
- [87] - Huang, D. J., Ou B. X., Prior RL. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- [88] - Sinica D. P., Jadhav A. P., Kareparamban J. A., Nikam P.H., Kadam V.J. (2012). Spectrophotometric Estimation of Ferulic Acid from Ferula asafoetida by Folin - Ciocalteu's Reagent. *Pelagia Research Library*, 3, 680-684.
- [89] - Pearson D. (1970). The Chemical Analyses of Foods. 6th Edition, Gloucester Place, London.
- [90] - Oliveira R. G., Godoy H. T., Prado M.A. (2010). Optimization of a colorimetric method to determine ascorbic acids in fruit jelly, *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 30, 244-249.
- [91] - Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.

- [92] - Niu, S., Xu, Z., Fang, Y., Zhang, L., Yang, Y., Liao, X., Hu, X. (2010). Comparative study on cloudy apple juice qualities from apple slices treated by high pressure carbon dioxide and mild heat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 91-97.
- [93] - Stinco, C. M., Szczepańska, J., Marszałek, K., Pinto, C. A., Inácio, R. S., Mapelli-Brahm, P., Meléndez-Martínez, A. J. (2019). Effect of high-pressure processing on carotenoids profile, color, microbial and enzymatic stability of cloudy carrot juice. *Food Chemistry*, 125112.
- [94] - Nagy, A., Riczu, P., Tamás, J. (2016). Spectral evaluation of apple fruit ripening and pigment content alteration. *Scientia Horticulture*, 201, 256-264.
- [95] - AIJN - European Fruit Juice association (2018). The AIJN Code of Practice.
- [96] – Musacchi, S., Serra, S. (2018). Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234, 409-430.
- [97] - Sila, D., Buggenhout, S., Duvetter, T., Fraeye, I., Roeck, A., Hendricks, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part II - Structure - function relationships. *Food Science and Food Safety*, 8(2), 86-104.

## 9. Anexo

### Ficha de prova para análise sensorial dos sumos de maçã turvos

Tipo de sumo de maçã turvo: \_\_\_\_\_

Nome do provador: \_\_\_\_\_

#### **Indicações gerais:**

- ✓ Por favor lave a boca com água antes de começar e antes de cada amostra, quantas vezes necessitar.
- ✓ Prove as amostras de sumo de maçã turvo que lhe forem apresentadas e indique, de acordo com a escala da tabela abaixo, a sua opinião relativamente a cada uma delas.
- ✓ Marque com uma cruz (x) a classificação que corresponde à classificação que atribui a cada amostra.

Data	Fase	Cor					Aparência					Aroma a maçã					Sabor a maçã					Observações
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	--

1 - Desgosto muito; 2 - Desgosto; 3 - Nem gosto nem desgosto; 4 - Gosto; 5 - Gosto muito

**Obrigado pela sua colaboração!**