



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Avaliação do suco de framboesa submetido a tratamento térmico e à tecnologia de ultrassom

Autor: Amanda da Rosa Andrade

Orientadora: Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadoras: Cibele Freitas de Oliveira

Bethania Brochier

Porto Alegre, junho de 2016

Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Símbolos	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 Framboesa (<i>Rubus idaeus</i>)	2
2.2 Compostos bioativos	3
2.2.1 Compostos fenólicos	3
2.2.1.1 Antocianinas	5
2.2.2 Ácido ascórbico	7
2.3 Tratamento térmico	8
2.3.1 Enzimas	8
2.4 Ultrassom (US)	9
3 Materiais e Métodos	12
3.1 Preparação do suco	12
3.2 Tratamento térmico	12
3.3 Ultrassom	12
3.4 Compostos bioativos	13
3.5 Determinação de antocianinas totais monoméricas	14
3.6 Análise de cor	15
3.7 Análises físico-químicas	16
3.7.1 pH	16
3.7.2 Acidez total titulável	16
3.7.3 Sólidos solúveis totais	16
3.8 Atividade enzimática	16
3.8.1 Peroxidase (POD)	16
3.8.2 Polifenoloxidase (PPO)	17
3.8.2.1 Metodologia adaptada de Walker (2001)	17
3.8.2.2 Metodologia adaptada de Garcia-Palazon et al. (2004)	18
3.8.3 Pectinametilesterase (PME)	18
3.8.4 Pectinase	19
3.9 Análise estatística	20
4 Resultados	21
4.1 Compostos bioativos	21

4.2	Antocianinas monoméricas	22
4.3	Análise de cor	24
4.4	Análises físico-químicas	25
4.5	Atividade enzimática	26
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	27
6	Referências	28
7	Anexos	34
8	Apêndice	35

Agradecimentos

Ao meu pai Adilson pelo amor incondicional, pelo constante incentivo em todos os momentos da minha vida e por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava.

Às minhas orientadoras Ligia, Cibele e Bethania pelo apoio, dedicação e paciência durante toda a execução desse trabalho.

Aos meus amigos e colegas que estiveram presentes em todos os momentos, sejam felizes ou difíceis.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Departamento de Engenharia Química, pelo ensino de qualidade.

Resumo

A framboesa é um alimento com boas propriedades nutricionais e fisiológicas devido à capacidade de reduzir o risco de doenças como câncer e doenças degenerativas. Isso se deve ao seu alto conteúdo de compostos bioativos, mais especificamente as antocianinas. Além disso, essa fruta é conhecida pelo seu sabor e odor agradável, o que leva o consumo do suco da framboesa ser uma alternativa saudável e prazerosa, tendo em vista seus benefícios. Contudo, para o consumo desse alimento, é necessário realizar tratamentos térmicos com o objetivo de inativar enzimas e microrganismos, aumentando a vida de prateleira e tornando-o mais seguro. Entretanto, em função das altas temperaturas comumente aplicadas nesses tratamentos térmicos, pode haver a degradação de compostos bioativos de interesse. Assim, busca-se a utilização de novas tecnologias para o processamento do suco, destacando-se o ultrassom. Desse modo, visando manter a qualidade do suco de framboesa, o objetivo desse trabalho foi comparar a tecnologia de ultrassom e o tratamento térmico convencional aplicados ao suco, e então, avaliar parâmetros como conteúdo de compostos bioativos, concentração de antocianinas, pH, sólidos solúveis totais, cor e acidez titulométrica. Para isso foram aplicadas duas temperaturas para o tratamento térmico (65 e 90 °C), assim como duas intensidades de potência para o ultrassom (423 e 508 W/cm²). Após os tratamentos, foi determinado o conteúdo de compostos bioativos e antocianinas, e também foram feitas análises de cor e análises físico-químicas. Os resultados mostraram que o ultrassom aumenta a disponibilidade dos compostos bioativos e antocianinas, enquanto os tratamentos térmicos causam uma degradação dos mesmos. Em relação aos parâmetros de cor, pH, acidez e sólidos solúveis não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre os resultados, antes e após todos os experimentos. Vale destacar que não foi possível observar nenhuma atividade enzimática da amostra em questão. Desse modo, com base nos resultados analisados nesse trabalho, acredita-se que o ultrassom apresenta potencial para ser utilizado como uma alternativa ao tratamento térmico convencional, principalmente devido ao elevado conteúdo de compostos bioativos e antocianinas.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Framboesa.....	2
Figura 2.2: Estrutura do cátion flavílico e da antocianina cianidina 3-glucosídeo.....	5
Figura 2.3: Formas estruturais de antocianinas em equilíbrio em solução aquosa.....	6
Figura 2.4: Formas reduzida e oxidada do ácido ascórbico	8
Figura 2.5: Tipos de ultrassom: tipo sonda e tipo banho.....	10
Figura 3.1: Sistema do ultrassom utilizado.	13
Figura 3.2: Diagrama tridimensional da escala de cor CIELAB.	15
Figura 3.3: Escala de cor CIELAB	15
Figura 4.1: Concentração residual dos compostos bioativos ao longo do tempo.	21
Figura 4.2: Concentração residual das antocianinas ao longo do tempo.....	23
Figura 7.1: Curva analítica com ácido gálico	34
Figura 8.1: Concentração residual dos compostos bioativos ao longo do tempo.	35
Figura 8.2: Concentração residual das antocianinas monoméricas ao longo do tempo.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Perfil nutricional da framboesa	3
Tabela 2.2: Classes e estruturas dos compostos fenólicos	4
Tabela 3.1: Volumes de reagentes testados nas cubetas para análise da atividade da POD.	17
Tabela 3.2: Volumes de reagentes testados nas cubetas para análise da PPO.	18
Tabela 3.3: Volumes de reagentes testados para análise da atividade enzimática da PPO.	18
Tabela 4.1: Análise colorimétrica para ultrassom 75 %.....	24
Tabela 4.2: Análise colorimétrica para ultrassom 90 %.....	24
Tabela 4.3: Análise colorimétrica para tratamento térmico a 65°C.....	25
Tabela 4.4: Análise colorimétrica para tratamento térmico a 90°C.....	25
Tabela 4.5: Análise de acidez titulométrica, pH e sólidos solúveis totais.....	25

Lista de Símbolos

A	absorbância
a/a_0	atividade enzimática residual
a^*, b^*	coordenadas cromáticas
C	concentração de grupos redutores liberados (mg/mL)
ϵ	absortividade molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
Eq	equivalente-grama
FD	fator de diluição
L^*	luminosidade
MM	massa molar (g/mol)
M_{NaOH}	concentração molar de NaOH
n	volume de solução de NaOH (mL)
N	normalidade da solução de NaOH
P	massa de amostra (g)
R^2	coeficiente de determinação
s_0	atividade enzimática no tempo 0
s	atividade enzimática no tempo t
v_f	volume final da reação para pectinase (mL)
v_e	volume amostra para pectinase
V_E	volume da amostra para PME (mL)
V_R	volume da reação para PME (mL)
V_T	volume da titulação para PME (mL)
t	tempo de reação para pectinase (min)
T	tempo de reação para PME (min)
U	unidade de PME (mg/mL)
u	unidade da pectinase (mg/mL)
x,y	coordenadas espaciais do sistema cartesiano

Lista de Abreviaturas e Siglas

PME Pectinametilesterase

POD Peroxidase

PPO Polifenoloxidase

US Ultrassom

1 Introdução

A sociedade moderna tem se preocupado, cada vez mais, com a qualidade de vida e, conseqüentemente, conscientizando-se com a importância de consumir alimentos que auxiliam na promoção da saúde. Desse modo, os alimentos funcionais estão em destaque, já que, por definição, eles possuem efeitos nutricionais adequados, além da capacidade de auxiliar na redução dos riscos de doenças como o câncer, diabetes, hipertensão, entre outras. As substâncias ativas encontradas nos alimentos podem ser probióticos e prebióticos, alimentos sulfurados e nitrogenados, pigmentos e vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras (Moraes e Colla, 2006).

A framboesa é reconhecida como um alimento funcional em razão de seu alto conteúdo de compostos fenólicos, antocianinas e vitamina C. Grande parte da sua produção destina-se à fabricação de sucos e estes devem passar por tratamentos usualmente térmicos para que sejam apropriados para o consumo. Esses tratamentos térmicos têm o objetivo principal de eliminar microrganismos e inativar enzimas que podem fazer com que o suco perca sua qualidade. Para isso, normalmente são aplicadas altas temperaturas para que a inativação das enzimas e eliminação dos microrganismos ocorra, aumentando a vida de prateleira do suco, mas ao mesmo tempo degradando compostos de interesse como as antocianinas (Rao e Snyder, 2010).

A presença de enzimas endógenas das frutas, como a polifenoloxidase e a peroxidase, pode causar o escurecimento enzimático além de alterações indesejáveis na textura, no sabor, no aroma e na composição nutricional dos sucos *in natura*. Ainda, segundo Prati (2004), pode ocorrer a alteração da viscosidade e a separação de fases do suco devido à atividade de enzimas pécnicas, devido ao desdobramento das pectinas em ácidos pécnicos e pectínicos.

Diante das desvantagens que o tratamento térmico convencional pode trazer para a qualidade dos produtos, tecnologias alternativas vêm recebendo maior atenção dos pesquisadores e da indústria de alimentos. O ultrassom (US) é uma tecnologia considerada atrativa no ramo de alimentos em função dos efeitos promissores com relação ao processamento e preservação de compostos de interesse. Seu princípio baseia-se na propagação da energia ultrassônica que irá provocar o fenômeno denominado de cavitação de bolhas no líquido (Tiwari *et al.*, 2009a). Assim, estudos têm mostrado que esta tecnologia pode ser utilizada para diversas aplicações (Abid *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2007; He *et al.*, 2016). Entre elas, destaca-se o uso do US como uma alternativa ao processo térmico convencional, afim de conservar propriedades funcionais, sensoriais e nutricionais do produto processado.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar o uso da tecnologia de ultrassom e do tratamento térmico convencional no processamento do suco de framboesa e analisar o conteúdo de compostos fenólicos, a concentração de antocianinas, a cor, o pH, a acidez titulométrica, os sólidos solúveis e, por fim, avaliar a inativação das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e pécnicas.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Framboesa (*Rubus idaeus*)

A framboesa (*Rubus idaeus*), mostrada na Figura 2.1, pertence à família das *Rosaceae* e seu fruto é composto por pequenos gomos, apresentando centro oco. Sua origem remete ao centro e norte da Europa e, também, em parte da Ásia; seu cultivo deve ser realizado em regiões que possuam verão relativamente fresco e inverno moderado, já que a fruta necessita de muitas horas de frio (acima de 600 horas). Além disso, é encontrada naturalmente em altitudes entre 1300 e 1400 m, mas adapta-se bem a altitudes menores de 500 m a 600 m. Por esses motivos seu cultivo no Brasil estende-se apenas aos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (Raseira *et al.*, 2004).



Figura 2.1: Framboesa. Fonte: Souza (2007).

Dentre seus vários usos, a framboesa pode ser consumida fresca ou passar por processamentos que irão gerar principalmente frutas congeladas, purês congelados, sucos, concentrados, enlatados, entre outros. O suco da framboesa é normalmente combinado com outros sucos de frutas como maçã, pera ou uva, em função do aroma e sabor que são muito intensos para consumo direto. Além disso, a crescente demanda por variedades de fermentados de frutas faz com que a framboesa apareça com uma alternativa. Para isso, algumas empresas adicionam suco de framboesa ao vinho de uva (Kim e Harris, 2016).

A produção mundial de framboesa cresceu em torno de 51 %, em um período de dez anos, apresentando em 2013 uma produtividade de, aproximadamente, 578 mil toneladas (FAO, 2013). Esse crescimento se deve a características como o sabor e aromas agradáveis da fruta, assim como sua aparência atraente. No entanto, suas características nutricionais e sua capacidade de prevenir algumas doenças são outros fatores atrativos (Souza, 2007).

A Tabela 2.1 apresenta a composição nutricional da framboesa. Do ponto de vista nutricional, pode-se notar que a framboesa é um alimento saudável. Isso pode ser percebido em função de sua baixa quantidade calórica, além do teor de sais minerais como potássio, cálcio, magnésio e ferro. Outro fator importante é a riqueza em vitamina C (ácido ascórbico), já que 100 g de framboesa apresentam mais de 30 % da dose diária recomendada dessa vitamina (Souza, 2007).

Tabela 2.1: Perfil nutricional da framboesa

Nutrientes		Sais minerais		Vitaminas	
(Quantidade em 100g)					
Umidade	85,57 g	Cálcio	22 mg	Ácido ascórbico	25 mg
Valor energético	49 kcal	Ferro	0,57 mg	Tiamina	0,030 mg
Proteínas	0,91 g	Magnésio	22 mg	Riboflavina	0,09 mg
Gordura total	0,55 g	Fósforo	12 mg	Niacina	0,90 mg
Carboidratos	11,57 g	Potássio	152 mg	Ácido pantotênico	0,4 mg
Fibras	3,00 g	Sódio	0	Vitamina B6	13 mg
Cinzas	0,4 mg	Zinco	0,46 mg	Vitamina A	13 UI
Colesterol	0	Cobre	0,074 mg		

Fonte: Rao e Snyder (2010).

Além de seu valor nutricional, as framboesas possuem uma grande quantidade de compostos bioativos, que inicialmente foram estudados por sua capacidade antioxidante, mas, atualmente, também são reconhecidos pela habilidade de influenciar as vias de sinalização celular. Esses compostos bioativos podem ser identificados principalmente como compostos fenólicos e, dentre eles os que mais se destacam nas framboesas são as antocianinas e os elagitaninos (Burton-Freeman *et al.*, 2016). Segundo Beekwilder *et al.* (2005), os fenólicos presentes na framboesa são compostos por 50 % de elagitaninos, 25 % de antocianinas e o restante divide-se entre outros tipos de fenólicos.

Sabe-se que, de todas as frutas produzidas no Brasil, 80 % se destina à produção de sucos e outros derivados, e apenas 10% são consumidas frescas, em razão da falta de logística de distribuição eficiente (Villa e Pinto, 2015). Assim, o suco de framboesa é uma ótima alternativa para o consumo da framboesa.

2.2 Compostos bioativos

Os compostos bioativos estão associados à proteção da saúde humana contra doenças crônicas degenerativas tendo em vista sua capacidade antioxidante. Os grupos que constituem os compostos bioativos e que vão contribuir para essa atividade antioxidante são os compostos fenólicos, vitamina C, carotenoides, entre outros (Lako *et al.*, 2007).

2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos como estruturas que possuem um ou mais grupos hidroxila ligado a um anel aromático. Esses compostos são produtos do metabolismo secundário das plantas e frutas e provêm funções essenciais em sua reprodução e crescimento. Além disso, atuam no mecanismo de defesa contra patógenos e parasitas e contribuem para a coloração das plantas e frutas (Shahidi e Naczk, 2006).

Existem cerca de 5.000 tipos de compostos fenólicos e eles podem ser encontrados em uma grande variedade de frutas como limão, laranja, tangerina, cereja, uva, ameixa, framboesa, maçã, entre várias outras (Shahidi e Naczk, 1996). Os fenólicos também são responsáveis por propriedades como cor, adstringência e aroma desses alimentos (Naczk e Shahidi, 2004). Além disso, eles possuem uma imensa diversidade de classes estruturais. A Tabela 2.2 apresenta as diversas combinações fenólicas existentes, sendo as mais importantes os flavonoides, ácidos fenólicos e taninos (Angelo e Jorge, 2007).

Tabela 2.2: Classes e estruturas dos compostos fenólicos.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: Angelo e Jorge (2007)

Os flavonoides são compostos muito presentes nos vegetais, estando inseridos em frutas, folhas, sementes e outras partes da planta. Possuem baixo peso molar e são constituídos de dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que formam um anel heterocíclico. Além disso, as substituições no anel heterocíclico gerarão diferentes classes de flavonoides como flavonois, flavonas, isoflavonas e antocianidinas. Já as substituições nos anéis aromáticos originaram diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (Hollman e Katan, 1999).

Outra classe de fenólicos importante são os taninos. Eles são compostos com alta massa molar e estão divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis. Os taninos condensáveis são denominados proantocianidinas e possuem uma estrutura semelhante à dos flavonoides. Eles são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan- 3,4-diol. Já os taninos hidrolisáveis incluem os galitaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico. A sensação de adstringência provocada pelos fenólicos ocorre em razão dos taninos. Esses compostos têm a capacidade de precipitar proteínas, desse modo, quando em contato com as proteínas da saliva formam um complexo insolúvel, conhecido por uma sensação adstringente (King e Young, 1999).

A terceira classe de fenólicos com mais destaque são os ácidos fenólicos. Este grupo tem propriedades antioxidantes tendo em vista sua estrutura composta de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (Soares, 2002). Os ácidos fenólicos são divididos em outros dois grupos: os ácidos hidroxibenzoicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Dentre os ácidos hidroxibenzoicos é possível citar os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, assim como os ácidos hidroxicinâmicos têm como exemplo os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico (Bravo *et al.*, 1998).

A atividade antioxidante dos fenólicos pode retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação. Esse mecanismo se dá por meio das propriedades de óxido-redução dos fenólicos que tem um papel importante na absorção e neutralização de radicais livres (Degáspari e Waszczyński, 2004). Segundo Pimentel *et al.* (2005), a ação antioxidante dos fenólicos está relacionada não somente à conservação da qualidade do alimento, como também à diminuição do risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer. Já foram estudados o efeito dos fenólicos na inibição de cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele (Carocho e Ferreira, 2013; Chi-Tang *et al.*, 1994; Wahle *et al.*, 2010).

2.2.1.1 Antocianinas

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides e possuem mais de 635 tipos identificados na natureza, sendo responsáveis pela coloração azul, roxa ou vermelha de diversas frutas, vegetais e flores (He e Giusti, 2010). Elas são derivadas de antocianidinas, que, por sua vez, têm como base da sua estrutura o cátion flavílico, mostrado na Figura 2.2. As antocianidinas não possuem grupos glicosídeos, mas apresentam na sua maioria, grupos hidroxila nas posições 3, 5 e 7. Um exemplo de antocianina também pode ser visto na Figura 2.2, onde temos a cianidina 3-glucosídeo, sendo uma das mais presentes nos vegetais (Março *et al.*, 2008). As antocianinas possuem uma ou mais dessas hidroxilas ligadas a açúcares, como glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose, entre outros. Esses açúcares serão responsáveis pela maior estabilidade e solubilidade das antocianinas, quando comparadas com as antocianidinas.

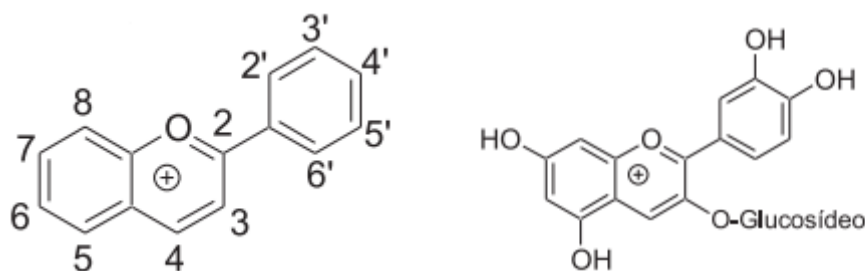


Figura 2.2: Estrutura do cátion flavílico e da antocianina cianidina 3-glucosídeo.

Fonte: Março *et al.* (2008).

Além da sua conhecida função como pigmento natural, as antocianinas também possuem um importante papel na medicina. Estudos já comprovaram que esse composto possui efeitos anticarcinogênicos, e que pode diminuir em até 5% os efeitos do câncer colorretal (Hagiwara *et al.*, 2001). Também foram constatados efeitos antioxidantes e antivirais (Kapadia *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000).

2.2.1.1.1 Estabilidades das antocianinas

As antocianinas possuem algumas limitações ao seu uso devido a sua estabilidade. Esses compostos podem sofrer com degradação durante o processamento, formulação e armazenamento dos alimentos (Giusti e Wrolstad, 2003). Desse modo, diversos fatores podem afetar sua estabilidade como pH, temperatura, luz, enzimas, entre outros.

2.2.1.1.1.1 pH

As antocianinas são um tipo único de flavonoides, tendo em vista a reversibilidade de sua estrutura em diferentes pHs, quando em solução aquosa. Quatro tipos principais de antocianinas existem em equilíbrio: o cátion flavílico, a base quinodal, a chalcona e o carbinol. Essas quatro estruturas possuem diferentes colorações e apresentam-se em diferentes valores de pH (He e Giusti, 2010).

A Figura 2.3 mostra as diferentes formas estruturais das antocianinas. Segundo descrito por Markakis (1982), em pH abaixo de 2 as antocianinas existem na forma de cátion flavílico, que possui coloração vermelha. Elevando-se o pH, forma-se a base quinodal (A), que possui coloração azul. Contudo, o cátion flavílico também pode ser hidratado e gerar o carbinol (B), que atinge lentamente o equilíbrio com a chalcona (C).

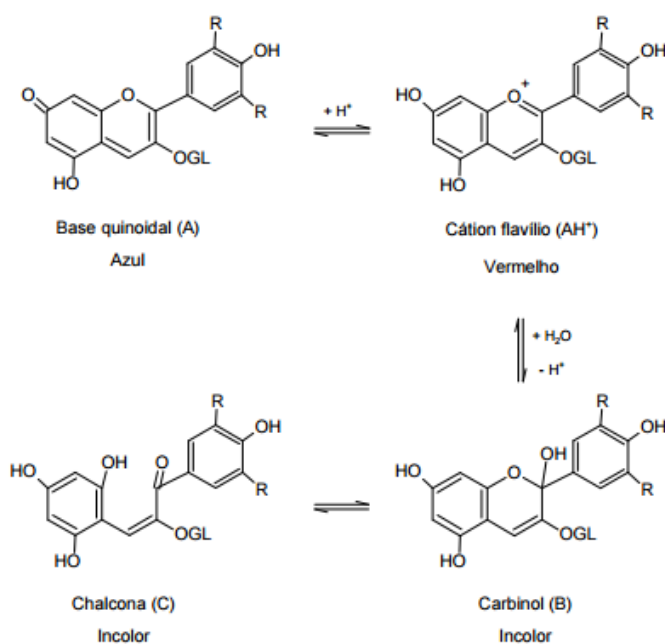


Figura 2.3: Formas estruturais de antocianinas em equilíbrio em solução aquosa.

Fonte: Malacrida e Motta (2006).

Essa diferença de estrutura em diferentes pHs pode auxiliar na quantificação das antocianinas por meio do método do pH diferencial. Nesse método, a amostra na qual devem ser quantificadas as antocianinas será diluída em tampão pH 1, ocorrerá a formação do cátion flavílico e as antocianinas serão coloridas; em pH 4,5, tem-se predominantemente o carbinol e a amostra estará incolor. Desse modo, a quantificação será feita a partir da absorbância dessas duas soluções em diferentes pHs nos comprimentos de onda de 520 nm, onde ocorre a máxima absorção das antocianinas em pH 1 e, praticamente, nenhum em pH 4,5, e em 700 nm com o objetivo de eliminar interferentes (Lee *et al.*, 2005).

2.2.1.1.1.2 Temperatura

As antocianinas são compostos muito instáveis em temperaturas elevadas. Alguns estudos conseguiram demonstrar a relação logarítmica entre a destruição das antocianinas e o aumento aritmético da temperatura. Desse modo, processos que utilizam uma alta temperatura, mas em menor tempo, são recomendados para uma melhor retenção desses pigmentos (Malacrida e Motta, 2006). Markakis (1982) mostrou que tratamentos térmicos em sucos de frutas vermelhas a 100 °C, mas com duração inferior a 12 minutos, não demonstraram uma grande perda de antocianinas.

A degradação térmica das antocianinas não teve seu mecanismo totalmente compreendido. Contudo, Adams (1973) demonstrou que em pHs entre 2,0 e 4,0 o aumento da temperatura causa a hidrólise da ligação glicosídica e, logo após, a formação da chalcona. Essa hidrólise da ligação glicosídica também é uma possibilidade de explicação para a perda de cor, já que a velocidade de liberação do açúcar é proporcional à velocidade de perda da cor vermelha.

2.2.1.1.1.3 Luz

A luz ultravioleta, visível ou outras formas de radiação ionizantes auxiliam na degradação das antocianinas. Isso ocorre principalmente nas antocianinas que possuem substituição no quinto carbono, pois são mais suscetíveis à decomposição fotoquímica. Palamidis e Markakis (1975) mostraram que a luz agilizou a degradação das antocianinas em bebidas carbonatadas, as quais foram adicionadas de antocianinas presentes na polpa da uva. Assim, o tempo de meia-vida das antocianinas a 20 °C foi de 416 dias quando deixadas no escuro e, expostas à luz ambiente, na mesma temperatura, esse período diminuiu para 197 dias.

2.2.1.1.1.4 Enzimas

As antocianinas podem ser degradadas por enzimas como glicosidases, polifenoxidase e peroxidases. As glicosidases hidrolisam as ligações glicosídicas, liberando açúcar e aglicona. A aglicona é um composto instável e degrada-se espontaneamente formando a chalcona, que é incolor. Já as polifenoxidases utilizam os substratos *o*-dihidroxifenóis no mecanismo de oxidação, formando as *o*-quinonas, que reagem entre si e com as antocianinas formando polímeros que possuem coloração escura. Por fim, as peroxidases só realizam a degradação das antocianinas quando há peróxido de hidrogênio no meio, ocorrendo, então, a oxidação dos compostos (Malacrida e Motta, 2006) e, conseqüentemente escurecimento enzimático. Desse modo, para inativar essas enzimas e preservar as propriedades dos alimentos são utilizados tratamentos térmicos.

2.2.2 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é um composto solúvel em água e que possui seis carbonos relacionados estruturalmente com a glicose e outras hexoses e é reversivelmente oxidado em ácido deidroascórbico no organismo; tal reação está mostrada na Figura 2.4. Nos vegetais e frutas o ácido ascórbico é sintetizado a partir da glicose e galactose; contudo, como o corpo humano não possui a enzima *L*-gulonolactona oxidase que participa da biossíntese de vitamina C, é necessária sua ingestão diária (Tavares De Queiroz *et al.*, 2000).

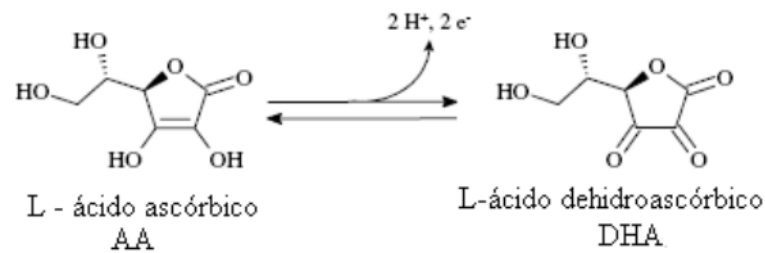


Figura 2.4: Formas reduzida e oxidada do ácido ascórbico (Lavarda, 2011)

A vitamina C possui diversas funções, dentre elas pode-se destacar a de antioxidante, tendo em vista sua capacidade de ceder elétrons, como no caso da regeneração da vitamina E. Além disso, esse composto é necessário para a síntese e manutenção do colágeno e também está presente na síntese de importantes neurotransmissores como a norepinefrina e a serotonina (Henrique *et al.*, 2008). Outra atuação importante é na diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares, no tratamento de hipertensão e na redução da incidência de cataratas. Também existem pesquisas que relacionam o consumo de vitamina C à prevenção do câncer, pois se acredita que há uma relação inversa entre a frequência de tumores e consumo de alimentos ricos em ácido ascórbico. Por fim, ela pode ser utilizada como suplemento alimentar, auxiliando na absorção de ferro e zinco (Lavarda, 2011).

2.3 Tratamento térmico

Os tratamentos térmicos consistem na aplicação de uma determinada temperatura por um certo período de tempo no alimento desejado. Esses métodos têm o objetivo de reduzir o número de patógenos e microrganismos deteriorantes, além de inativar enzimas prejudiciais à qualidade do alimento, tornando-o mais seguro e aumentando sua vida de prateleira (Caballero *et al.*, 2016).

A eficiência do tratamento térmico está relacionada com a resistência térmica dos microrganismos e enzimas presentes no alimento, o teor microbiano inicial contido no alimento antes do tratamento, o pH e o estado físico do mesmo. Além disso, esse tipo de método de conservação de alimentos é extremamente eficaz, contudo pode ser extremamente prejudicial aos nutrientes e outros compostos que sejam sensíveis à temperatura (Bibiano e Filho, 2010)

2.3.1 Enzimas

Enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza proteica que têm funções de catalisadores de reações químicas. Algumas enzimas são formadas apenas por proteínas, mas outras possuem componentes adicionais como carboidratos, lipídios, metais, fosfatos ou outro componente orgânico (Caballero *et al.*, 2016).

As enzimas mais encontradas nos alimentos são a polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POD) e pectinases, entre elas a pectinametilsterase (PME). Essas enzimas podem causar diversas transformações na qualidade de frutas e seus derivados.

A peroxidase é uma enzima que pertence à classe das oxidoredutases e possui a capacidade de catalisar um grande número de reações oxidativas, usando peróxido de

hidrogênio como substrato, ou utilizando oxigênio como aceptor de hidrogênio (Freitas *et al.*, 2008). Segundo Cunha *et al.* (2016), a peroxidase é uma das enzimas que apresenta maior estabilidade térmica e que está presente em frutas e vegetais. Além disso, ela apresenta regeneração quando não é totalmente inativada.

Em frutas e vegetais, a POD provoca mudanças negativas de sabor durante o armazenamento. Isso ocorre pois a POD catalisa a degradação de ácidos graxos insaturados, formando complexos que favorecerem o aparecimento de sabor desagradável e ranço (Cunha *et al.*, 2016).

Do mesmo modo que a POD, a PPO também faz parte da classe das oxidoredutases, contudo seu mecanismo baseia-se na oxidação de compostos fenólicos a *o*-quinonas, na presença de oxigênio molecular. As *o*-quinonas passarão por reações de condensação e polimerização entre a proteínas e fenólicos, dando origem a produtos de coloração marrom (escurecimento enzimático) (González *et al.*, 1999).

As pectinases são um grupo de enzimas que catalisam a degradação da pectina presentes nas células vegetais. A PME faz parte do grupo das enzimas péctinolíticas e seu mecanismo de ação baseia-se na desesterificação da pectina, produzindo metanol e pectina com baixa metoxilação. Desse modo, a pectina de baixa metoxilação se combina com cátions com forte capacidade de formar complexos, como íons cálcio, causando sua precipitação. Essa precipitação também ocasiona a perda de turbidez, sendo um problema que afeta a qualidade de sucos de fruta, já que comprometerá sua aparência, viscosidade, sabor e aromas característicos (Versteeg *et al.*, 1980).

2.4 Ultrassom (US)

Os primeiros efeitos das ondas de ultrassom em líquidos foram descobertos em 1927; contudo, o estudo era bem modesto, quando comparado com as diversas aplicações nas quais essa tecnologia está inserida nos dias de hoje. O US é utilizado para as mais diversas funcionalidades, como por exemplo, na medicina para o diagnóstico de doenças cardíacas e em exames preventivos em gestantes, assim como na indústria para soldar plásticos ou ainda em residências por meio da utilização de alarmes (Suslick, 1989).

Os efeitos químicos do US aparecem devido à criação, crescimento e implosão de bolhas de gás e vapor no líquido. Desse modo, as ondas do ultrassom consistem em ciclos de compressão e expansão. Os ciclos de compressão exercerão uma pressão positiva no líquido, aproximando as moléculas. Já os ciclos de expansão exercem uma pressão negativa e afastam as moléculas umas das outras. Durante o ciclo de expansão, a onda com uma grande pressão negativa e intensidade associada, sendo o suficiente para vencer a resistência à tração do líquido, pode gerar cavidades. A resistência à tração do líquido é então diminuída, mas gás fica aprisionado na cavidade. Assim, quando esse gás é exposto a uma pressão negativa, a redução na pressão faz com que ocorra a formação de uma pequena bolha na solução. Essa bolha passará por uma série de ciclos de expansão e compressão e sua temperatura interna aumentará muito, até o momento que colapsará (Suslick, 1989).

O processo de cavitação é constituído pela nucleação, crescimento das bolhas e posterior colapso. Ele pode ser afetado por diversos fatores, dentre eles a frequência, pois se sabe que a formação das bolhas diminui com a diminuição da frequência do ultrassom. Isso se deve ao tempo insuficiente para que o ciclo de expansão e compressão ocorra. Além

desse fator, também se sabe que a cavitação é menor em meios mais viscosos, diferentemente da intensidade de potência que gera um aumento na cavitação (Bendicho e Lavilla, 2013).

Existem basicamente dois tipos de equipamentos de ultrassom mais utilizados para a aplicação em alimentos, sendo o banho e a sonda, mostrados esquematicamente na Figura 2.5. Os mais comuns são os equipamentos tipo banho. Eles possuem uma série de transdutores de aço inoxidável posicionados na base do ultrassom que pode ser um recipiente de aço inoxidável. Alguns desses recipientes podem ser equipados com controle de temperatura e, normalmente, a densidade de potência fornecida para esses ultrassons são suficientes para processos de limpeza, desgaseificação de solventes e extração de metal e poluentes orgânicos de amostras, sendo, contudo, menos eficazes para analitos fortemente ligados à matriz do material. Um fato importante a ser destacado, é que para causar a cavitação dentro do banho a densidade de potência deve ser grande o suficiente, contudo isso muitas vezes não é alcançado com o US do tipo banho (Bendicho e Lavilla, 2013).

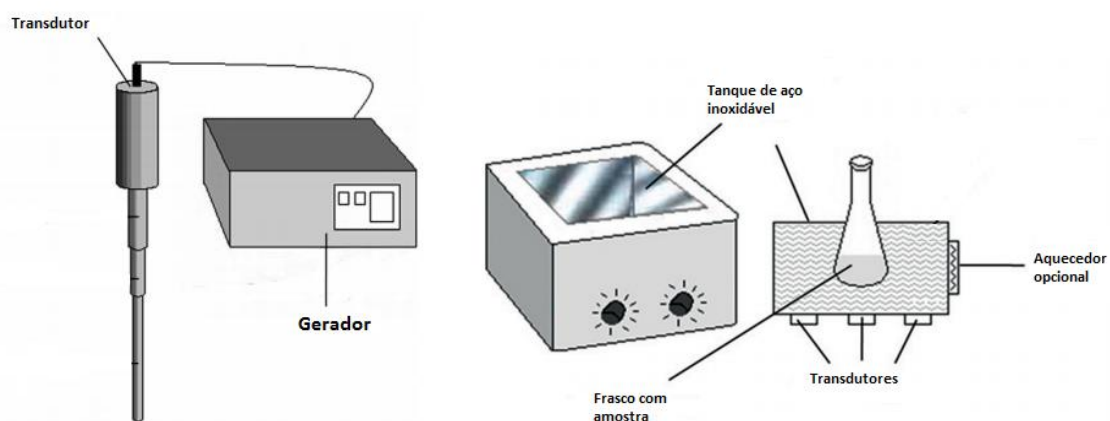


Figura 2.5: Tipos de ultrassom: tipo sonda e tipo banho.

Fonte: Adaptado de Bendicho e Lavilla (2013).

O ultrassom do tipo sonda é capaz de fornecer uma densidade de potência 100 vezes maior que o banho, portanto espera-se um desempenho mais satisfatório. O fato que faz esse tipo de equipamento de US obter mais sucesso em suas aplicações é que a energia ultrassônica não é transferida por meio de um líquido, e sim introduzida diretamente no sistema por meio da sonda. Entretanto, apesar da maior eficiência da sonda quando em comparação com o banho, alguns problemas também surgem com a utilização desse tipo de equipamento. O principal deles é seu alto custo, muitas vezes relacionado a dificuldade de ampliação de escala. Também se pode citar a perda de compostos voláteis em razão da alta densidade de potência, assim como a grande quantidade de calor gerado durante o processo, fazendo com que seja necessário muitas vezes um resfriamento no recipiente onde está sendo aplicado o US (Bendicho e Lavilla, 2013).

O uso do US em alimentos vem sendo objeto de estudo e desenvolvimento há alguns anos, sendo que na última década, o US surgiu como uma alternativa aos tratamentos

térmicos convencionais. O US possui sua própria combinação de calor e/ou pressão que será efetivo em processos de inativação enzimática e microbiológica (Rawson *et al.*, 2011). Pesquisas mostram que a utilização do ultrassom, muitas vezes combinado com tratamentos térmicos a temperaturas mais baixas, pode ser uma alternativa de substituição aos tratamentos térmicos convencionais. Suas vantagens vão desde um aumento na homogeneidade do alimento, perda mínima de sabor e aroma, até à economia de energia quando comparado com os tratamentos térmicos (Chemat *et al.*, 2011).

Estudos mostram que o ultrassom pode ser utilizado para a inativação de microrganismos e enzimas de sucos, mantendo sua qualidade e, até mesmo, aumentando a biodisponibilidade de compostos bioativos (Rawson *et al.*, 2011). Assim, o ultrassom é considerado uma ótima alternativa para o tratamento de frutas e seus respectivos sucos.

3 Materiais e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), localizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 Preparação do suco

Para a preparação do suco de framboesa foram adquiridas frutas congeladas em embalagens de 1 kg provenientes de um único lote. Após seu recebimento, essas frutas foram deixadas em temperatura ambiente para o descongelamento.

Em seguida, as framboesas foram colocadas em um Juicer Walita (Philips, modelo RI1870), onde se obteve a separação do suco e do bagaço. Como o bagaço em questão ainda estava muito úmido e contendo uma boa quantidade de suco que poderia ser utilizada, optou-se por extrair mais suco utilizando sacos de tecido sintético.

Para o armazenamento, o suco foi depositado em sacos plásticos, congelado com nitrogênio líquido e mantido em ultra freezer a uma temperatura de $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização dos experimentos. Desse modo, no momento dos experimentos, o saco plástico contendo o suco foi retirado do freezer e deixado em um banho de água em temperatura ambiente para o descongelamento.

3.2 Tratamento térmico

Os tratamentos térmicos foram realizados em duplicata para as duas temperaturas consideradas: $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para cada repetição, uma amostra de 140 mL de suco foi colocada em uma célula de vidro de 5,5 cm de diâmetro. Como essa célula é encamisada, o controle da temperatura foi realizado utilizando um banho termostático. A medição da temperatura foi realizada com um termômetro inserido na célula e a agitação do suco foi feita com o auxílio de um agitador magnético (Fisatom, modelo 752A, São Paulo) com rotação de 780 rpm.

Após estabilizada a temperatura no valor desejado ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $90\text{ }^{\circ}\text{C}$), o tratamento térmico seguiu por 10 minutos. Retiraram-se alíquotas de amostra a cada 2 minutos e durante todo experimento a temperatura foi monitorada. Após o término do experimento, as alíquotas foram colocadas na geladeira a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o início das análises.

3.3 Ultrassom

A Figura 3.1 apresenta o equipamento de ultrassom (Sonics & Materials, Inc., modelo VC750, Newtown, Estados Unidos) utilizado no presente trabalho, tipo sonda (diâmetro de 1,2 cm) e que possui um gerador de ondas ultrassônicas que emitirá ondas para o meio. Esse equipamento pode chegar a uma potência máxima de 750 W e a uma frequência máxima de 20 kHz.

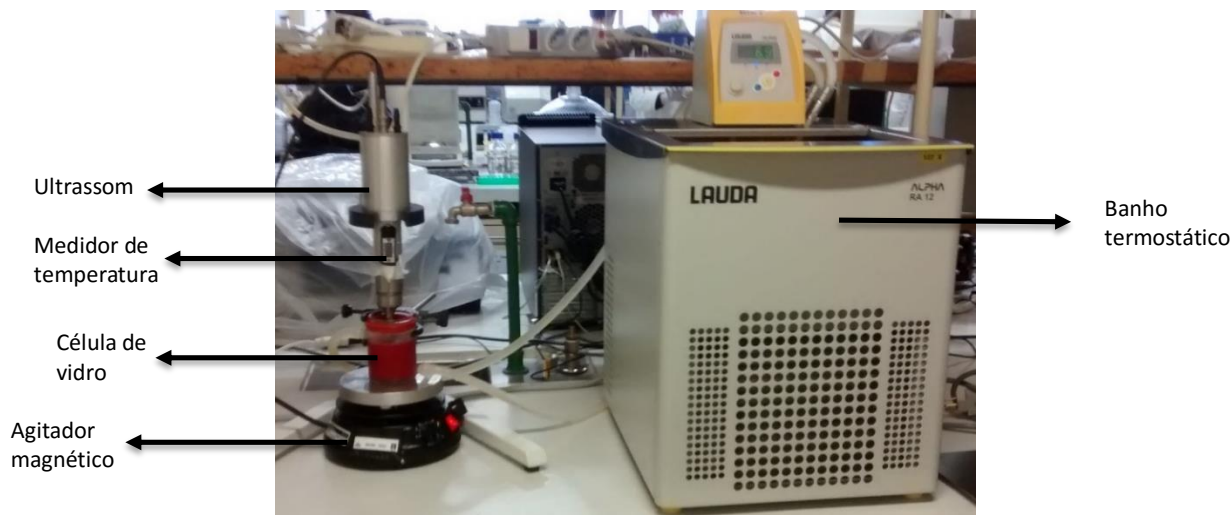


Figura 3.1: Sistema do ultrassom utilizado.

A aplicação do ultrassom foi feita utilizando duas potências de 423 W/cm^2 e 508 W/cm^2 (75 % e 90 % da capacidade de potência do equipamento, respectivamente) e a amostra permaneceu sob a influência dessa tecnologia por 10 minutos. Assim como no tratamento térmico, retiraram-se alíquotas do suco a cada 2 minutos e controlou-se a temperatura com um termômetro fixado na célula durante todo experimento. Após o término do experimento, as alíquotas foram colocadas na geladeira até o início das análises.

Como o objetivo é analisar a influência apenas do ultrassom na amostra e não da temperatura, e sabendo que os compostos fenólicos e antocianinas degradam-se com o aumento de temperatura, colocou-se a amostra em uma célula encamisada ligada a um banho termostático para poder realizar o controle da temperatura e manter o suco a uma temperatura menor do que $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Isso se deve ao fato das ondas do ultrassom causarem um aquecimento da amostra.

Além disso, para poder observar apenas o efeito do ultrassom na amostra também foram realizados experimentos de controle em duplicata para cada intensidade de potência testada. Nesses experimentos, a amostra foi submetida à máxima temperatura atingida pelo suco quando submetida ao ultrassom, sendo que, neste caso, o ultrassom manteve-se desligado e a célula teve sua temperatura controlada apenas pelo banho termostático.

3.4 Compostos bioativos

Os compostos bioativos totais foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu adaptado da metodologia proposta por Waterhouse (2002). O princípio desse método é a redução do reagente Folin-Ciocalteu que consiste em uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio. Os produtos da redução desses óxidos apresentam uma coloração azulada que tem sua máxima absorção em 765 nm .

Para essa análise, $850 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura foram transferidos para tubos Falcon, onde, logo após, foram adicionados $70 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $100 \text{ }\mu\text{L}$ de Folin-Ciocalteu (marca Fator 1). Após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu, a amostra foi agitada e, então, adicionaram-se $850 \text{ }\mu\text{L}$ de carbonato de sódio 7 % e agitou-se novamente. Por fim, deixou-se a solução repousar no escuro por 1 hora e à temperatura ambiente para, posteriormente, realizar a leitura de absorbância no comprimento de onda de 765 nm .

Para quantificar a concentração dos compostos bioativos, utilizou-se uma curva analítica padrão de ácido gálico (marca Sigma) previamente elaborada (apresentada nos Anexos) onde estão relacionadas absorvâncias com diferentes concentrações de ácido gálico. É importante ressaltar que antes de iniciar as análises, avaliou-se a diluição necessária da amostra, já que é necessário que o valor de absorvância esteja dentro da curva padrão de ácido gálico. Desse modo, a concentração de compostos bioativos é expressa em μg de ácido gálico por mL de amostra.

O método de Folin-Ciocalteu é comumente descrito como uma metodologia de determinação de compostos fenólicos totais, contudo um dos interferentes do método é o ácido ascórbico. Portanto, ao quantificar os compostos fenólicos estaremos também mensurando o conteúdo de vitamina C. Assim, considerando que o suco de framboesa possui uma considerável quantidade de vitamina C, optou-se por considerar o método de Folin-Ciocalteu como uma metodologia de quantificação de compostos bioativos (fenólicos e ácido ascórbico).

3.5 Determinação de antocianinas totais monoméricas

Após serem retiradas da geladeira as alíquotas de cada tempo, as mesmas foram centrifugadas (*Eppendorf*, MiniSpin plus, Alemanha) por 3 minutos a 13.400 rpm e o sobrenadante foi retirado.

A metodologia utilizada foi a do pH diferencial proposta por Lee et al. (2005). Nela, as amostras são diluídas em soluções tampão pH 1,0 (0,025 M de cloreto de potássio) e pH 4,5 (0,4 M de acetato de sódio). O fator de diluição foi predeterminado diluindo a amostra em tampão pH 1,0 até que apresentasse uma absorvância entre 0,2 e 0,8 no comprimento de onda de 520 nm (máxima absorção das antocianinas). Desse modo, adicionou-se 100 μL de amostra para 1900 μL de tampão e homogeneizaram-se as soluções. Estas foram mantidas em repouso no escuro e à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, a absorvância das amostras foi determinada, utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (PG Instruments Ltd, T80 UV/VIS Spectrometer, Reino Unido) em 520 nm (máxima absorção das antocianinas) e 700 nm (nenhuma absorvância da amostra ocorre).

Para determinar a absorvância da amostra diluída, utiliza-se a seguinte equação:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5} \quad (3.1)$$

em que $A_{520\text{nm}}$ é a absorvância no comprimento de onda de máxima absorção das antocianinas e $A_{700\text{nm}}$ é a absorvância em 700 nm, onde nenhuma absorvância acontece e essa medida tem o objetivo de corrigir erros em função de materiais coloidais suspensos na amostra que poderiam causar difusão de luz e turbidez.

A concentração de antocianinas monoméricas é expressa em mg/L da antocianina cianidina-3-glucosídeo e calculada pela seguinte equação:

$$\text{Antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A \times MM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times 1} \quad (3.2)$$

onde A foi calculada anteriormente pela Equação 3.1, MM é a massa molar da cianidina-3-glucosídeo (449,2 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$), FD é o fator de diluição predeterminado e ϵ é a absorvidade molar da mesma antocianina (26.900 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.6 Análise de cor

A cor das amostras foi medida por meio de um colorímetro (Color QUEST XE, Hunterlab, USA). Os parâmetros colorimétricos L^* , a^* e b^* com base na escala CIELAB foram obtidos com a lente de luz D65 no ângulo de observação de 10° , usando o modo de refletância especular incluída por leitura da amostra. O parâmetro L^* representa a luminosidade e varia de 0 (branco) até 100 (preto). A coordenada cromática a^* varia do vermelho ao verde, enquanto b^* varia do amarelo ao azul, como é possível observar na Figura 3.2.

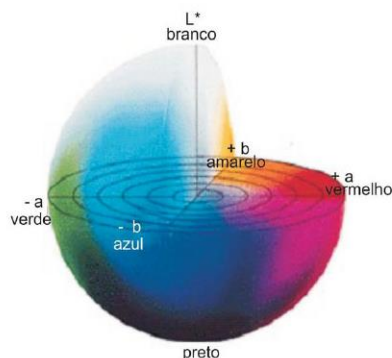


Figura 3.2: Diagrama tridimensional da escala de cor CIELAB.
Fonte: Stancil e Jordan (1985)

A partir dos parâmetros colorimétricos é possível calcular o Cromo e o ângulo de tonalidade $^\circ\text{Hue}$ a partir das equações abaixo:

$$\text{Croma} = (a^* + b^*)^{1/2} \quad (3.3)$$

$$^\circ\text{Hue} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3.4)$$

O Cromo representa a intensidade da cor, enquanto o $^\circ\text{Hue}$ representa a cor propriamente dita, ou seja, o ângulo que determina a localização correta da cor no espaço de cor, como pode ser visto na Figura 3.3.

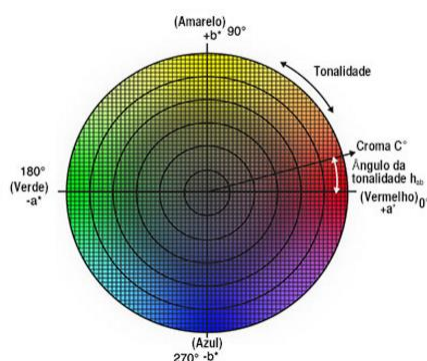


Figura 3.3: Escala de cor CIELAB. Fonte: Stancil e Jordan (1985)

3.7 Análises físico-químicas

3.7.1 pH

O pH das amostras foi medido em um phmetro digital (modelo DM-22, Digimed, São Paulo), onde determinou-se o pH das alíquotas do suco retirados nos tempos 0 e 10 minutos dos procedimentos de pasteurização e ultrassom. Esse phmetro foi calibrado, utilizando-se soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

3.7.2 Acidez total titulável

A acidez titulável foi determinada para os tempos de 0 e 10 minutos, mas antes de iniciar o procedimento o suco foi aquecido sob agitação por 15 minutos a uma temperatura de 90 °C para eliminar gases incorporados. Então, para determinar a acidez total titulável transferiu-se 10 g do suco para um erlenmeyer e completou-se até 100 mL com água destilada. Essa mistura foi titulada com NaOH 0,1 N até pH 8,2 ± 1.

Os resultados foram calculados a partir da Equação 3.5 e expressos em gramas de ácido cítrico por 100 mL de amostra.

$$ATT_{g/100mL} = \frac{n \times N \times Eq}{10 \times p} \quad (3.5)$$

onde, n é o volume da solução de NaOH gastos na titulação em mL, N é a normalidade da solução de NaOH, Eq é o equivalente-grama do ácido (64,02 para ácido cítrico) e p é a massa da amostra em gramas.

3.7.3 Sólidos solúveis totais

A quantidade total de sólidos solúveis foi determinada por refratometria (refratômetro portátil modelo SZJ-A) com leitura corrigida para 20 °C, conforme AOAC n° 932.12 (2000).

3.8 Atividade enzimática

Foram feitas análises de atividade enzimática para quatro enzimas apresentadas a seguir.

3.8.1 Peroxidase (POD)

A análise da atividade da enzima POD baseou-se no método proposto por Chisari *et al.* (2007). Para isso, primeiramente, preparou-se o extrato enzimático, na proporção 1:2 foram misturados (3 g de amostra com 6 mL de tampão (fosfato de sódio 0,05 M com pH 7), sendo que essa proporção foi determinada previamente. Logo após, essa mistura foi agitada em vortex e mantida em banho de gelo para manter a temperatura abaixo de 4 °C, evitando assim o início da atividade enzimática. A mistura foi centrifugada a 6.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e, então filtrada com filtro qualitativo, obtendo assim o extrato enzimático.

A próxima etapa foi a avaliação da atividade enzimática, onde foi preparado em triplicata uma série de cubetas que continham o extrato enzimático, tampão (fosfato de sódio 0,1 M com pH 5) e peróxido de hidrogênio 1 % (v/v). Para o branco, adicionou-se água

destilada no lugar do substrato (guaiacol). Foram testadas diversas proporções entre esses reagentes, buscando a maior atividade enzimática, mostradas na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Volumes de reagentes testados nas cubetas para análise da atividade da POD.

Reagentes	Volumes em mL		
	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Tampão pH 5	1	0,75	0,5
Extrato enzimático	0,25	0,5	0,75
H₂O₂	0,1	0,1	0,1

Já dentro do espectrofotômetro, adicionou-se 0,5 mL de guaiacol 1,5 % (v/v) e monitorou-se a coloração a cada 20 segundos por 3 minutos no comprimento de onda de 460 nm.

A atividade enzimática, denominada s , foi determinada a partir da variação na absorbância por minuto ($\Delta\text{abs}/\text{min}$), dividida pela massa de amostra na cubeta e, novamente, dividida por 0,001; utilizando-se somente a parte linear da curva para o cálculo, usando regressão linear. O valor é expresso em $\text{UAE}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, em que UAE é unidade de atividade enzimática. Assim, a atividade enzimática residual (a/a_0) pode ser calculada pela equação abaixo:

$$\text{Atividade enzimática residual } \left(\frac{a}{a_0}\right) (\%) = \frac{s}{s_0} \times 100 \quad (3.6)$$

onde s é atividade enzimática após tempo t e s_0 a atividade enzimática no tempo inicial.

3.8.2 Polifenoloxidase (PPO)

Para a enzima PPO foram realizadas duas metodologias diferentes de análise de atividade enzimática, podendo-se calcular sua atividade enzimática residual da mesma forma como a realizada para a POD, descrita no item anterior.

3.8.2.1 Metodologia adaptada de Walker (2001)

Nessa metodologia, assim como para POD, preparou-se o extrato enzimático com 3 g de amostra juntamente com 6 mL de tampão (fosfato de sódio 0,05 M com pH 7), tendo sido testadas outras proporções previamente. Manteve-se a mistura em banho de gelo (temperatura menor do que 4 °C) e centrifugou-se a 6.000 rpm por 10 minutos a 4°C, filtrando com filtro qualitativo logo em seguida para a obtenção do extrato enzimático.

Para a avaliação da atividade enzimática, preparou-se em triplicata cubetas com tampão (fosfato de sódio 0,05 M com pH 7) e extrato enzimático nas proporções descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Volumes de reagentes testados nas cubetas para análise da PPO.

Reagentes	Volumes em mL		
	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Tampão pH 7	1,1	1,3	1,0
Extrato enzimático	0,25	0,5	0,1

Para o branco, adicionou-se água destilada ao invés de substrato (catecol). Então, com as cubetas dentro do espectrofotômetro adicionou-se 0,3 mL de catecol 0,6 M, agitou-se e então foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 420 nm a cada 20 segundos durante 3 minutos.

3.8.2.2 Metodologia adaptada de Garcia-Palazon et al. (2004)

Nesse método, primeiramente preparou-se um extrato de extração enzimática com tampão pH 6,5 (fosfato de sódio 0,2 M) onde adicionou-se 4 % de polivinilpirrolidona (PVPP) e 1 % de Triton X-100 (marca Sigma-Aldrich). Logo após, 10 mL desse extrato de extração enzimática foram misturados com 5g de amostra e homogeneizados em vortex por 3 minutos, sendo colocados em banho de gelo logo após. Essa mistura foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 minutos a 4 °C e filtrado com filtro qualitativo, obtendo-se então o extrato enzimático.

Para a realização da análise da atividade enzimática, colocou-se o extrato enzimático em cubetas, juntamente com o tampão (fosfato de sódio 0,05 M com pH 6,5) e, já dentro do espectrofotômetro, adicionou-se catecol 0,07 M, iniciando-se as leituras de absorvância a cada 30 segundos durante 15 minutos. Para o branco, utilizou-se o dobro de água destilada no lugar do extrato enzimático. As quantidades de reagentes testadas são mostradas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Volumes de reagentes testados para análise da atividade enzimática da PPO.

Reagentes	Volumes em mL		
	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Tampão pH 6,5	1,2	1,1	1,3
Extrato enzimático	0,075	0,25	0,1
Catecol 0,07 M	0,3	0,25	0,1

3.8.3 Pectinametilesterase (PME)

A metodologia que será apresentada é baseada na titulação dos grupos carboxílicos liberados pela desesterificação da pectina cítrica descrita por Rouse e Atkins (1952). Primeiramente, adicionou-se 9,9 mL de substrato em copo de béquer. Esse substrato é composto de pectina (5 g.L⁻¹) diluído em tampão de NaCl pH 4,5 (0,15 mol.L⁻¹). Após,

colocou-se 0,1 mL de suco de framboesa e se incubou sob agitação por 10 minutos a 30 °C (também foram testadas outras duas proporções de substrato e de suco: 9,5 e 0,5 mL e 9,0 e 1,0 mL, respectivamente). Logo após, deve-se titular com NaOH (0,02 M) até atingir um pH final de 4,5. Desse modo, com o volume gasto de NaOH é possível calcular a quantidade de PME (U) que é necessária para liberar 1 miliequivalente de grupos carboxil por minuto. A equação para o cálculo de U , expressa em unidades/mL, é mostrada abaixo:

$$U \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{V_T \times M_{NaOH} \times V_R \times FD}{T \times V_E} \quad (3.7)$$

onde V_T é o volume da titulação em mL, M_{NaOH} é a concentração molar de NaOH, V_R é o volume da reação em mL, FD é o fator de diluição, T é o tempo de reação em minutos e V_E é o volume da amostra em mL.

3.8.4 Pectinase

A atividade enzimática das pectinases foi medida através do método DNS descrito por Miller (1959), que mede a liberação de grupos redutores devido à degradação da pectina. Assim, adicionou-se 0,9 mL de substrato contendo pectina 0,1 % (1 g.L⁻¹) diluída em tampão de citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) em tubo de ensaio (também foi feito teste com pectina 0,25%). Incubou-se em banho com agitação a 37°C e adicionou-se 0,1 mL de suco de framboesa, deixando agir por exatamente 1 minuto. Após esse tempo retirou-se o tubo do banho e colocou-se em gelo para interromper a atividade enzimática. Logo após, adicionou-se 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) – que também tem a função de parar a atividade enzimática – e ferveu-se a amostra por exatamente 5 minutos, interrompendo a reação com banho de gelo em seguida. Por fim, agitou-se o tubo em vortex e leu-se a absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

O ponto zero utilizado para zerar o equipamento consiste em 1,0 mL de tampão de citrato de sódio, enquanto que o branco resume-se a 0,9 mL de substrato e 0,1 mL de tampão de citrato de sódio. Os tubos do ponto zero e do branco também receberam o DNS e foram fervidos juntamente com os tubos da amostra (realizada em triplicata).

Os valores de absorbância podem ser convertidos em concentração (C) através de uma curva de calibração de glicose. Assim, uma unidade de pectinase é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de grupos redutores, expresso em glicose, por minuto, nas condições da reação e expressa em unidades/mL. Essa atividade total da pectinase pode ser calculada por:

$$u \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{C \times v_f \times FD}{t \times v_e} \quad (3.8)$$

onde C é a concentração de grupos redutores liberados (mg.mL⁻¹), v_f é o volume final da reação em mL, FD é o fator de diluição da amostra, t é o tempo de reação em minutos e v_e é o volume de amostra em mL.

O valor de C é determinado através da equação a seguir, obtida previamente através de uma curva de calibração com glicose.

$$\text{Absorbância (A da amostra - A do branco)} = 1,5343 \times C - 0,0177 \quad (3.9)$$

Para o cálculo da atividade em μmol.mL⁻¹, utiliza-se a equação abaixo:

$$u(\mu\text{mol/mL}) = \frac{u(\text{mg/mL}) \times 1000}{180} \quad (3.10)$$

3.9 Análise estatística

Todos os experimentos de ultrassom e tratamento térmico foram realizados em duplicata, enquanto todas as análises foram feitas em triplicata. Além disso, utilizou-se o software *Statistica*® versão 13.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos) para a realização dos Testes de Tukey com nível de significância de 5%, para comparação de médias.

4 Resultados

4.1 Compostos bioativos

A análise dos compostos bioativos foi realizada para cada amostra coletada nos tratamentos térmicos (65 °C e 90 °C) e ultrassom (intensidades de potência de 75 % e 90 %) com frequência de 20 kHz durante o tempo de 10 minutos. A temperatura durante todos os experimentos foi controlada. Foram realizados experimentos controle para o ultrassom a 75 % e a 90 %, na qual foram utilizadas as mesmas condições de temperatura e tempo do US porém sem ligar o equipamento. Assim, no controle para o US 75 % manteve-se uma temperatura de 24 ± 1 °C, que foi a máxima alcançada quando o ultrassom estava ligado. Do mesmo modo, para o US 90 % utilizou-se uma temperatura de 34 ± 1 °C.

Na Figura 4.1 estão apresentadas as concentrações residuais de compostos bioativos em função do tempo para as diferentes condições testadas e tabelas com esses resultados são encontradas no apêndice. Como é possível observar, os tratamentos com ultrassom realizados com potência de 423 W/cm^2 (75 % de intensidade de potência) e 508 W/cm^2 (90 % de intensidade de potência) causaram um aumento na concentração de compostos bioativos do suco de framboesa, quando comparados com o tempo inicial. Para 75 % de intensidade de potência, obteve-se um aumento de 17,2% em relação à concentração inicial, enquanto que para 90 % de intensidade de potência, o aumento no conteúdo dos compostos bioativos totais foi de 23,59 %. Além disso, observa-se que a medida que o tempo de aplicação do US aumenta, há um aumento na disponibilidade dos compostos bioativos.

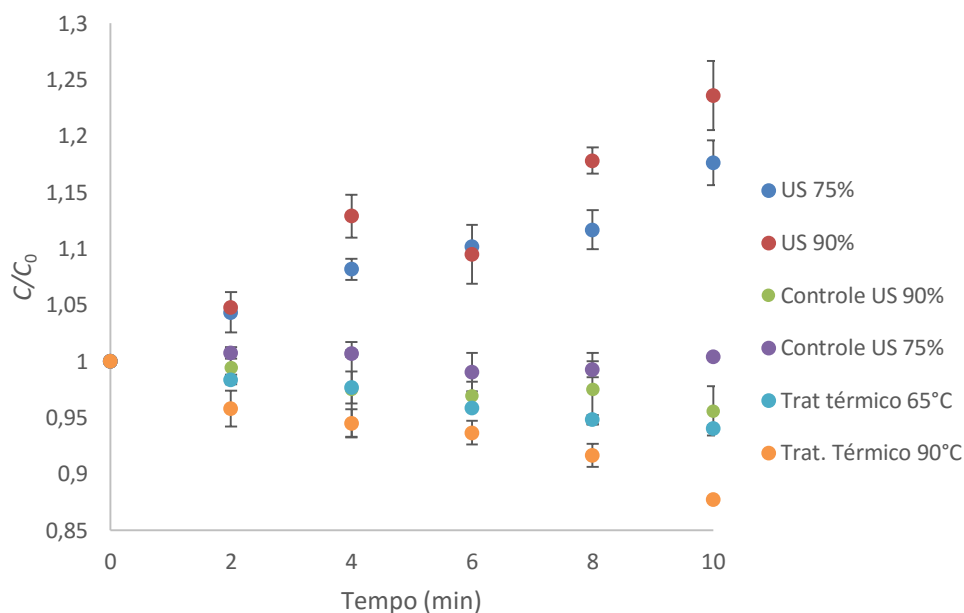


Figura 4.1: Concentração residual dos compostos bioativos ao longo do tempo.

Resultados semelhantes foram obtidos por Saeeuddin *et al.* (2015), que avaliaram a influência do ultrassom e da pasteurização comercial no suco de pera. Comparou-se a pasteurização a 65 °C com um tratamento que teve o auxílio do ultrassom na mesma temperatura e percebeu-se um aumento no conteúdo dos compostos bioativos para o US. O valor aumentou de $315,44 \pm 2,99 \mu\text{g GAE/g}$ para $325,74 \pm 3,21 \mu\text{g GAE/g}$, assim como o ácido ascórbico que aumentou de $3,46 \pm 0,05 \text{ mg/100mL}$ para $3,65 \pm 0,05 \text{ mg/100mL}$.

quando o US foi utilizado numa frequência de 20 Hz. O aumento no conteúdo dos compostos bioativos quando utilizado o ultrassom pode ser atribuído ao mecanismo de rompimento da parede das células causada pela repentina mudança de pressão gerada pela implosão de bolhas durante a cavitação, liberando assim esses compostos no líquido. O aumento nos compostos bioativos também pode estar relacionado ao aumento no conteúdo de ácido ascórbico. Solomon *et al.* (1995) constataram que o aumento na quantidade de oxigênio dissolvido causa uma maior degradação do ácido ascórbico, contudo Knorr *et al.* (2004) acreditam que o ultrassom auxilia na remoção do oxigênio dissolvido do suco. Desse modo, o ultrassom também auxiliaria no aumento da concentração de vitamina C, visto que haveria menos oxigênio dissolvido no suco.

Os experimentos controle não apresentaram quase nenhuma degradação dos compostos bioativos, com o decorrer do tempo nas temperaturas testadas. Para o controle do ultrassom 75 %, não foi observada nenhuma degradação, já o controle do ultrassom 90 % alcançou uma degradação final de 4,4 % em relação à concentração inicial desses compostos. Além disso, comparando os controles com seus respectivos experimentos de US percebe-se que o aumento no conteúdo de compostos bioativos deve-se essencialmente à tecnologia de US e que a temperatura a qual a amostra foi submetida durante o processo não tem influência na degradação dos compostos bioativos em análise.

Em relação aos tratamentos térmicos, após 10 minutos, nota-se que para uma amostra submetida a uma temperatura de 65 °C houve uma redução de 5,97 % no conteúdo de compostos bioativos do suco de framboesa, enquanto que para 90 °C essa diminuição foi de 12,3 %. Essa redução no conteúdo de compostos bioativos também foi observada por Santhirasegaram *et al.* (2015) para o suco de manga com tratamento térmico a 90 °C durante 60 segundos, onde os compostos fenólicos sofreram uma perda de 38 %. Entretanto para Azoifeifa *et al.* (2015), não foi encontrado nenhuma modificação no conteúdo de compostos bioativos do suco de amora tratado a 75 °C por 15 segundos e 92 °C por 10 segundos. Essa variabilidade de resultados confirma que o efeito do tratamento térmico depende da severidade e do tempo do aquecimento, assim como da matriz alimentícia (Rawson *et al.*, 2011).

Assim, pode-se constatar que, no presente trabalho, a tecnologia de US foi mais eficiente quando comparada ao tratamento térmico, já que ocasionou um aumento na biodisponibilidade dos compostos bioativos. Para os tratamentos térmicos avaliados foi observado uma maior degradação em temperaturas mais elevadas. Desse modo, o US mostra-se como uma alternativa à utilização de tratamentos térmicos.

4.2 Antocianinas monoméricas

A Figura 4.2 apresenta os valores de concentração residual de antocianinas em função do tempo para os diferentes tratamentos aplicados e tabelas com esses resultados são encontradas no apêndice. É possível observar que para o controle do US 90 % houve uma degradação de 1,4 % no conteúdo de antocianinas, o mesmo não ocorreu para o controle do ultrassom 75 %. Desse modo, percebe-se que os experimentos de US tiveram praticamente a influência apenas da tecnologia de US e não da temperatura (efeito térmico), visto que a degradação foi mínima para os experimentos de controle.

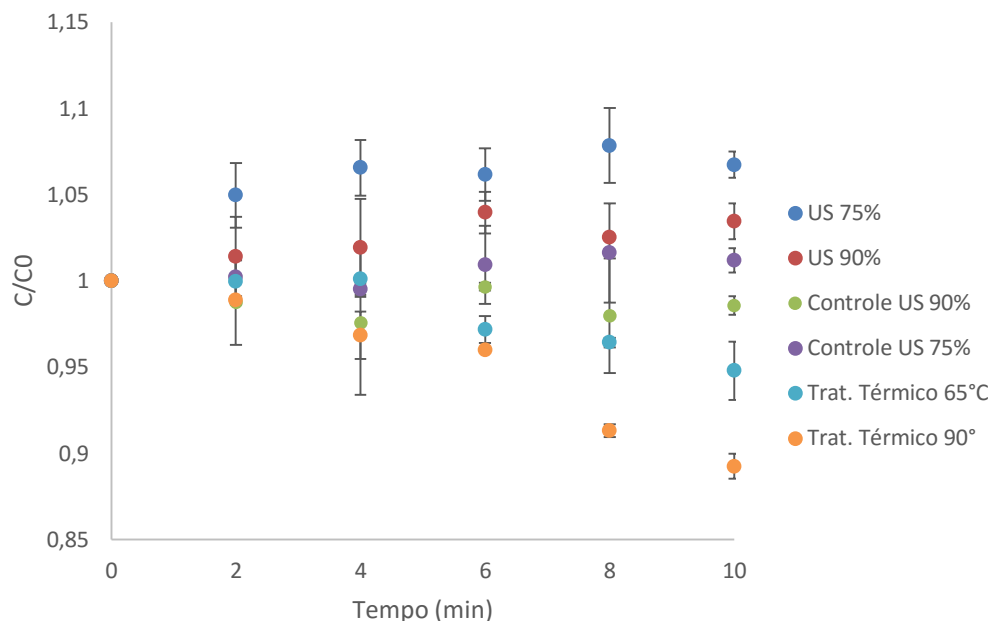


Figura 4.2: Concentração residual das antocianinas ao longo do tempo.

Analisando os tratamentos do suco de framboesa com ultrassom, percebe-se um aumento de 6,7 % na disponibilidade das antocianinas quando aplicada a tecnologia de ultrassom numa intensidade de potência de 75 %, enquanto que para o ultrassom 90 % esse aumento foi de apenas 3,4 %. Esse aumento é observado ao longo do tempo de 10 minutos. Golmohamadi *et al.* (2013) também notaram que um aumento na concentração de antocianinas utilizando o US por 30 minutos. Os mesmo autores, utilizando polpa de framboesa observaram um aumento de 12,6 % no conteúdo de antocianinas, quando foi aplicada a tecnologia de ultrassom por 10 minutos e numa intensidade de potência de 50 %.

Tiwari *et al.* (2008) obtiveram resultados semelhantes para o suco de morango. Os autores constataram que o conteúdo de antocianinas era menor quando foi aplicado intensidades de potência maiores. Por exemplo, para uma intensidade de potência de 70 % aplicada durante 5 minutos o conteúdo de antocianinas foi de 44,45 mg/100 mL de suco, enquanto que para o mesmo tempo, mas com uma intensidade de potência de 100 % esse valor cai para 43,62 mg/100 mL de suco. Levando-se em conta que o suco de morango tinha um conteúdo de antocianinas de $44,21 \pm 0,9$ mg/100 mL antes da aplicação do ultrassom, percebe-se que houve um aumento na concentração de antocianinas para uma intensidade de potência de 70 %, no entanto, para a intensidade de 100% foi observada uma redução.

O aumento na disponibilidade das antocianinas durante os processos utilizando o ultrassom pode ser explicado em função da cavitação que envolve o crescimento e colapso de bolhas, gerando uma alta pressão e posterior rompimento da parede das células. Contudo, em altas intensidades de potência essa cavitação ocasiona pressões e temperaturas locais muito altas, além de movimentos mecânicos entre interfaces líquidas e sólidas, que podem causar a degradação das antocianinas (Tiwari *et al.*, 2009a). Além disso, a degradação das antocianinas pode ocorrer em função da reação de oxidação entre ácidos orgânicos ou ácido ascórbico presentes no suco e os radicais livres formados durante o processo de ultrassom (Portenlänger e Heusinger, 1992).

Em relação aos tratamentos térmicos, percebe-se uma degradação no conteúdo de antocianinas para os dois procedimentos. Para o tratamento térmico, as antocianinas sofreram uma diminuição de 5,19 % em sua concentração, enquanto para o tratamento a 90 °C essa redução foi de 10,74 %. Esses resultados mostram que o aumento de temperatura e do tempo de aplicação do tratamento leva a um aumento na degradação das antocianinas, como era esperado, já que as mesmas são sensíveis a temperaturas elevadas. O mesmo comportamento foi observado por Türkyilmaz *et al.* (2012) que constataram em estudos com a cenoura negra que o tratamento térmico de 90 °C por 15 minutos reduz o conteúdo de antocianinas em 6,62 %.

4.3 Análise de cor

Após a obtenção das coordenadas cromáticas a^* e b^* e do parâmetro L^* foi possível calcular o Croma e o ângulo de tonalidade °Hue para cada amostra coletada. As Tabelas 4.1 a 4.4 apresentam a análise de cor para as diferentes condições avaliadas. Na Tabela 4.1 é possível perceber que não houve alterações na luminosidade (L^*), na intensidade da cor (Croma) e na cor propriamente dita (°Hue) quando foi aplicada a tecnologia de ultrassom com intensidade de potência de 75 %. Os experimentos realizados utilizando 90 % da potência do equipamento, também não apresentaram diferença significativa para os parâmetros de cor, como pode ser observado na Tabela 4.2. Além disso, também não houve diferença significativa para os experimentos controle.

Tabela 4.1: Análise colorimétrica para ultrassom 75 %.

Tempo (min)	L^*	Croma	°Hue
0	29,13 ± 0,04 ^a	16,72 ± 0,45 ^a	0,211 ± 0,01 ^a
2	29,18 ± 0,63 ^a	17,30 ± 0,84 ^a	0,219 ± 0,01 ^a
4	29,24 ± 0,28 ^a	17,29 ± 0,13 ^a	0,216 ± 0,01 ^a
6	29,23 ± 0,21 ^a	17,40 ± 0,39 ^a	0,219 ± 0,01 ^a
8	29,42 ± 0,12 ^a	17,61 ± 0,04 ^a	0,215 ± 0,01 ^a
10	29,64 ± 0,29 ^a	17,71 ± 0,28 ^a	0,211 ± 0,00 ^a

a Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 4.2: Análise colorimétrica para ultrassom 90 %.

Tempo (min)	L^*	Croma	°Hue
0	28,42 ± 0,37 ^a	15,69 ± 0,74 ^a	0,212 ± 0,01 ^a
2	28,92 ± 0,81 ^a	16,88 ± 1,20 ^a	0,218 ± 0,02 ^a
4	29,22 ± 0,72 ^a	17,50 ± 1,51 ^a	0,226 ± 0,02 ^a
6	29,20 ± 0,71 ^a	17,40 ± 1,64 ^a	0,224 ± 0,02 ^a
8	29,34 ± 0,89 ^a	17,84 ± 1,53 ^a	0,228 ± 0,02 ^a
10	29,67 ± 0,45 ^a	18,21 ± 1,52 ^a	0,227 ± 0,02 ^a

a Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tiwari *et al.* (2009b) obtiveram resultados diferentes para o suco de amora, onde o parâmetro L^* não foi influenciado pelo tempo de tratamento com ultrassom, no entanto, observou-se uma diminuição em L^* com intensidades de potência maiores.

Na análise colorimétrica do tratamento térmico a 65 °C apresentado na Tabela 4.3, também não foi observada diferença significativa para os valores de L^* , Croma e °Hue nos diferentes tempos observados. O mesmo comportamento ocorreu para o tratamento

térmico a 90 °C, apresentado na Tabela 4.4. Diferentemente do observado no presente trabalho, Santhirasegaram et al. (2015) encontraram variação nos parâmetros de cor para a pasteurização a 90 °C do suco de manga, quando comparou a amostra *in natura* com a pasteurizada por 60 segundos.

Tabela 4.3: Análise colorimétrica para tratamento térmico a 65°C.

Tempo (min)	L*	Croma	°Hue
0	29,13 ± 0,68 ^a	16,65 ± 1,08 ^a	0,227 ± 0,01 ^a
2	29,30 ± 0,77 ^a	16,41 ± 0,48 ^a	0,232 ± 0,02 ^a
4	28,91 ± 0,35 ^a	16,86 ± 1,01 ^a	0,226 ± 0,02 ^a
6	29,08 ± 0,26 ^a	16,63 ± 1,14 ^a	0,229 ± 0,01 ^a
8	29,05 ± 0,43 ^a	16,85 ± 1,22 ^a	0,225 ± 0,02 ^a
10	28,85 ± 0,57 ^a	16,73 ± 1,16 ^a	0,230 ± 0,01 ^a

a Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Tabela 4.4: Análise colorimétrica para tratamento térmico a 90°C

Tempo (min)	L*	Croma	°Hue
0	28,69 ± 0,82 ^a	15,53 ± 1,33 ^a	0,204 ± 0,01 ^a
2	28,69 ± 0,45 ^a	15,72 ± 0,20 ^a	0,207 ± 0,01 ^a
4	28,65 ± 0,41 ^a	15,64 ± 1,22 ^a	0,205 ± 0,01 ^a
6	28,65 ± 0,65 ^a	15,60 ± 0,81 ^a	0,200 ± 0 ^a
8	28,79 ± 0,49 ^a	15,94 ± 0,69 ^a	0,208 ± 0 ^a
10	28,71 ± 0,65 ^a	15,98 ± 0,91 ^a	0,205 ± 0 ^a

a Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Nas condições utilizadas no presente trabalho foi observado que os parâmetros de cor não foram modificados com o aumento do tempo de processamento.

4.4 Análises físico-químicas

As análises de acidez titulométrica, pH e sólidos solúveis foram realizadas no início e no final dos experimentos, ou seja, nos tempos 0 e 10 minutos e os resultados são apresentados na Tabela 4.5. Percebe-se que a acidez titulométrica não se modifica significativamente após os diferentes processos e tempos de processo. Esse comportamento é o mesmo para o pH e sólidos solúveis, onde também não há diferença significativa antes e após os tratamentos (p > 0,05). Para os experimentos controle também não foi observada diferença significativa em nenhum desses parâmetros.

Tabela 4.5: Análise de acidez titulométrica, pH e sólidos solúveis totais.

	Tempo	Acidez (g/100g)	pH	Sólidos solúveis (°Brix)
US 75 %	0 min	2,06 ± 0,01 ^a	3,05 ± 0,14 ^a	8,14 ± 0,80 ^a
	10 min	2,12 ± 0,05 ^a	3,00 ± 0,18 ^a	8,75 ± 0,50 ^a
US 90 %	0 min	2,03 ± 0,05 ^a	3,23 ± 0,06 ^a	8,67 ± 0,04 ^a
	10 min	2,02 ± 0,08 ^a	2,96 ± 0,07 ^a	8,83 ± 0,09 ^a
Trat. Térmico 65°C	0 min	2,05 ± 0,06 ^a	3,03 ± 0,15 ^a	8,90 ± 0,06 ^a
	10 min	2,04 ± 0,05 ^a	2,94 ± 0,16 ^a	9,03 ± 0,16 ^a
Trat.térmico 90°C	0 min	2,07 ± 0,09 ^a	2,88 ± 0,08 ^a	8,77 ± 0,23 ^a
	10 min	2,09 ± 0,06 ^a	2,89 ± 0,11 ^a	9,17 ± 0,11 ^a

a Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Os resultados encontrados são semelhantes ao comportamento também observado para o suco de pera submetido à tecnologia de US a 25, 45 e 65 °C com frequência de 20 Hz por 10 minutos e pasteurização comercial a 65 °C por 10 minutos e 95 °C por 2 minutos (Saeeduddin *et al.*, 2015). Tiwari *et al.* (2008a) também não encontraram diferenças significativas ($p > 0,05$) para os valores de pH, acidez titulométrica e °Brix para suco de laranja submetido a diferentes intensidades e tempos de aplicação do ultrassom. Aadil *et al.* (2013) observaram que o efeito do US a 20 °C e 70 % de intensidade de potência por 60 e 90 minutos não provocou modificações no suco de pomelo (*grapefruit*). Por fim, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que, nas condições testadas, as propriedades físico-químicas do suco de framboesa não foram afetadas significativamente.

4.5 Atividade enzimática

Foram realizadas análises de atividades enzimáticas para quatro enzimas: POD, PPO, pectinase (classificando pectinases totais) e PME. No entanto não foram encontrados sinais de atividade enzimática nas amostras *in natura*. Em seu estudo, Garcia-Palazon *et al.* (2004) não encontrou nenhuma atividade enzimática da POD em frutos frescos da framboesa, contudo foi encontrada atividade enzimática da PPO. No trabalho de Dragišić Maksimovic *et al.* (2013), foi observada atividade enzimática tanto para POD quanto para a PPO. Contudo, a atividade da POD foi até 24.000 vezes menor do que a da PPO. Essa baixa atividade da peroxidase pode ser explicada em função dos diversos mecanismos que podem inativar essa enzima como as reações entre peróxido de hidrogênio e intermediários de reação enzimáticos ou ainda reações irreversíveis entre a enzima e radicais fenoxil formados pela oxidação de compostos fenólicos (Rojas-Melgarejo *et al.*, 2004).

É possível que o uso de outro método analítico consiga quantificar alguma atividade de pectinases totais ou de PME, no entanto, com algumas dosagens de suco diferentes das utilizadas no presente trabalho. Outro aspecto importante que pode ter sido limitante para a atividade das enzimas, é o tempo utilizado durante as análises. Além disso, é importante ressaltar que é possível que os congelamentos da fruta (industrial) e do suco (ultra freezer) tenham inativado as enzimas do suco.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho avaliou o suco de framboesa quanto ao seu conteúdo de compostos bioativos, antocianinas, cor, pH, sólidos solúveis totais, acidez titulométrica e atividade enzimática quando submetido à tecnologia de ultrassom e a tratamentos térmicos convencionais.

Os experimentos mostraram que os compostos bioativos apresentaram um aumento na sua disponibilidade quando submetidos à tecnologia de ultrassom nas duas intensidades de potência avaliadas (75 % e 90 %) ao longo do tempo de 10 minutos. Esse incremento na concentração se deve provavelmente ao processo de cavitação que ocorre quando o ultrassom é aplicado. A análise do conteúdo de antocianinas monoméricas, quando aplicado o ultrassom, também mostrou um aumento no conteúdo desses compostos, entretanto, percebeu-se um maior aumento quando 75 % de intensidade de potência foi utilizada.

Em relação aos tratamentos térmicos, percebeu-se que tanto os compostos bioativos quanto as antocianinas apresentaram uma diminuição em suas concentrações ao longo do tempo, quando aplicadas as temperaturas de 65 °C e 90 °C. A temperatura de 90 °C gerou uma maior degradação tanto nas antocianinas quanto nos compostos bioativos, pois essas estruturas são sensíveis a altas temperaturas.

Em relação às análises de cor não foi possível identificar nenhuma diferença significativa entre os parâmetros L^* , Croma e °Hue para os diferentes processos e nos diferentes tempos. As análises físico-químicas também mostraram que o ultrassom e os tratamentos térmicos não afetaram as propriedades como o pH, a acidez titulométrica e os sólidos solúveis totais, tendo em vista que não houve diferenças significativas entre esses valores antes e após os tratamentos.

Diante dos resultados obtidos sugere-se, como trabalhos futuros, realizar análises microbiológicas antes e após os tratamentos para avaliar a eficiência das técnicas quanto à qualidade do suco para consumo, avaliar o conteúdo de ácido ascórbico, assim como realizar análises sensoriais do suco. Também aconselha-se estudar a combinação de diferentes temperaturas, intensidades de potência do ultrassom e tempos de aplicação do US. Por fim, é interessante realizar uma análise da aplicabilidade da tecnologia de US em escala industrial.

6 Referências

AADIL, R. M.; ZENG, X. A.; HAN, Z.; et al. Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3201–3206, 2013.

ABID, M.; JABBAR, S.; HU, B.; et al. Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 984–990, 2014.

ADAMS, J. B. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100 °C. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 24, n. 7, p. 747–762, 1973.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

AZOFEIFA, G.; QUESADA, S.; PÉREZ, A. M.; et al. Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 56–62, 2015.

BEEKWILDER, J.; JONKER, H.; MEESTERS, P.; et al. Antioxidants in raspberry: On-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3313–3320, 2005.

BENDICHO, C.; LAVILLA, I. Extraction: Ultrasound Extractions. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Vigo: Elsevier Inc., 2013. v. 3p. 1–9.

BIBIANO, A.; FILHO, D. M. **Técnico em Alimentos Conservação de Alimentos**. Recife: UFRPE, 2010.

BRAVO, L.; SOURCES, D.; SIGNIFICANCE, N. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

BURTON-FREEMAN, B. M.; SANDHU, A. K.; EDIRISINGHE, I. Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 7, n. 1, p. 44–65, 2016.

CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Elsevier Ltd, 2016.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. The role of phenolic compounds in the fight against cancer - a review. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 13, p. 1236–58, 2013.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.

CHEN, F.; SUN, Y.; ZHAO, G.; et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-

performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 6, p. 767–778, 2007.

CHISARI, M.; BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3469–3476, 2007.

CHI-TANG, H.; THOMAS, F.; QINYUN, C.; et al. Phytochemicals in Teas and Rosemary and Their Cancer-Preventive Properties. **Food Phytochemicals for Cancer Prevention II**, p. 2–19, 1994.

CUNHA, G. M. .; ALVES, J. K. .; DUARTE, W. K. .; et al. Estudo da cinética de inativação térmica da peroxidase presente na polpa de goiaba. n. June, 2016.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.

DRAGIŠIĆ MAKSIMOVIC, J. J.; MILIVOJEVIĆ, J. M.; POLEDICA, M. M.; et al. Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars (Autumn bliss and Polka). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 2, p. 173–179, 2013.

FAO. **FAO of UN: Economic and social Departmente: The Statical Division**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

FREITAS, A. A. DE; FRANCELIN, M. F.; HIRATA, G. F.; et al. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 172–177, 2008.

GARCIA-PALAZON, A.; SUTHANTHANGJAI, W.; KAJDA, P.; et al. The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*). **Food Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 7–10, 2004.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, n. 3, p. 217–225, 2003.

GOLMOHAMADI, A.; MÖLLER, G.; POWERS, J.; et al. Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1316–1323, 2013.

GONZÁLEZ, E. M.; DE ANCOS, B.; CANO, M. P. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4068–4072, 1999.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, K.; NAKANISHI, T.; et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, v. 171, n. 1, p. 17–25, 2001.

HE, B.; ZHANG, L. L.; YUE, X. Y.; et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace.

Food Chemistry, v. 204, p. 70–76, 2016.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HENRIQUE, P.; PROFA, O.; MARIA, D.; et al. **Estudo da cinética de degradação do ácido oascórbico na secagem de abacaxi em atmosfera modificada**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2008.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 937–942, 1999.

KAPADIA, G. J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H.; et al. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein-Barr virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Letters**, v. 115, n. 2, p. 173–178, 1997.

KIM, M. J.; HARRIS, G. K. Raspberries and Related Fruits. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 586–591, 2016.

KING, A.; YOUNG, G. **Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals** *Journal of the American Dietetic Association*, 1999.

KNORR, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V.; et al. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 5, p. 261–266, 2004.

LAKO, J.; TRENERRY, V. C.; WAHLQVIST, M.; et al. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1727–1741, 2007.

LAVARDA, L. **Determinação da Cinética de degradação térmica da vitamina C em polpa de acerola via aquecimento óhmico**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

MALACRIDA, R. C.; MOTTA, S. DA. **Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade** *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. Curitiba: [s.n.].

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. Londres: Academic Press, 1982.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. v. 3, n. 2, p. 109–122, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in food** *Journal of Chromatography A*, 2004.

PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. *Journal of Food Science*, v. 40, p. 1047–1049, 1975.

PIMENTEL, C. V. M. .; FRANCKI, V. .; A.P.B, G. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

PORTENLÄNGER, G.; HEUSINGER, H. Chemical reactions induced by ultrasound and γ -rays in aqueous solutions of l-ascorbic acid. *Carbohydrate Research*, v. 232, n. 2, p. 291–301, 1992.

PRATI, P. **Desenvolvimento de processo para estabilização de caldo de cana adicionado de sucos de frutas ácidos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.

RAO, A. V.; SNYDER, D. M. Raspberries and human health: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 7, p. 3871–3883, 2010.

RASEIRA, M. DO C. B.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R.; et al. **Aspectos técnicos da cultura da framboeseira**. Pelotas: [s.n.].

RAWSON, A.; TIWARI, B. K.; PATRAS, A.; et al. Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*, v. 44, n. 5, p. 1168–1173, 2011.

ROJAS-MELGAREJO, F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; et al. Stability of horseradish peroxidase immobilized on different cinnamic carbohydrate esters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 79, n. 10, p. 1148–1154, 2004.

ROUSE, A.; ATKINS, C. Heat inactivation of pectinesterase in citrus juices. *Food technology*, v. 6, n. 8, p. 291–294, 1952.

SAEEDUDDIN, M.; ABID, M.; JABBAR, S.; et al. Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *LWT - Food Science and Technology*, v. 64, n. 1, p. 452–458, 2015.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; GEORGE, D. S.; et al. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Food and Bioproducts Processing*, v. 94, n. August 2013, p. 313–321, 2015.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications. In: *Food Chemistry*. [s.l.: s.n.]. v. 57p. 481–482, 1996.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. [s.l.: s.n.], 2006,

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutricao*, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOLOMON, O.; SVANBERG, U.; SAHLSTRÖM, A. Effect of oxygen and fluorescent light on

- the quality of orange juice during storage at 8°C. **Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 363–368, 1995.
- SOUZA, M. B. Framboesa: qualidade pós-colheita. **Divulgação Agro 556**, v. 6, p. 35, 2007.
- STANCIL, W. C.; JORDAN, D. Precise color communication. **AATCC National Technical Conference, Book of Papers**, p. 33–35, 1985.
- SUSLICK, K. S. The Chemical Effects of Ultrasound. **Scientific American**, v. 260, n. 2, p. 80–86, 1989.
- TAVARES DE QUEIROZ, J. T.; LÔBO DA SILVA, C.; CARVALHO, L. A DE; et al. Estabilidade Do Ácido Ascórbico Em Suco De Laranja Submetido a Diferentes Tratamentos. **Magistra, Cruz das Almas-BA**, v. 12, p. 3–6, 2000.
- TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C. P.; et al. Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2423–2428, 2008a.
- TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 3-4, p. 137–145, 2009a.
- TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 2, p. 166–171, 2009b.
- TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; PATRAS, A.; et al. Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10071–10077, 2008b.
- TÜRKYILMAZ, M.; YEMI, O.; ÖZKAN, M. Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot (*Daucus carota* L.) juice. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1052–1058, 2012.
- VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, F. M.; SPAANSEN, C. H.; et al. Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 4, p. 969–972, 1980.
- VILLA, F. LA; PINTO, L. A. DA S. a Produção De Frutas Vermelhas Associadas Ao Turismo Rural E À Gastronomia. **Arquivos Brasileiros De Alimentação**, v. 1, n. 1, p. 21–29, 2015.
- WAHLE, K. W. J.; BROWN, I.; ROTONDO, D.; et al. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 698, p. 36–51, 2010.
- WALKER, J. R. L. **Expression and Measurement of Enzyme Activity**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- WANG, C. J.; WANG, J. M.; LIN, W. L.; et al. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical**

Toxicology, v. 38, n. 5, p. 411–416, 2000.

WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. I1.1.1.–I1.1.8, 2002.

7 Anexos

A seguir é apresentada pela Figura 7.1, a curva analítica com ácido gálico (marca Sigma) para realização do método de Folin-Ciocalteu com leitura de absorbância após uma hora de repouso da amostra.

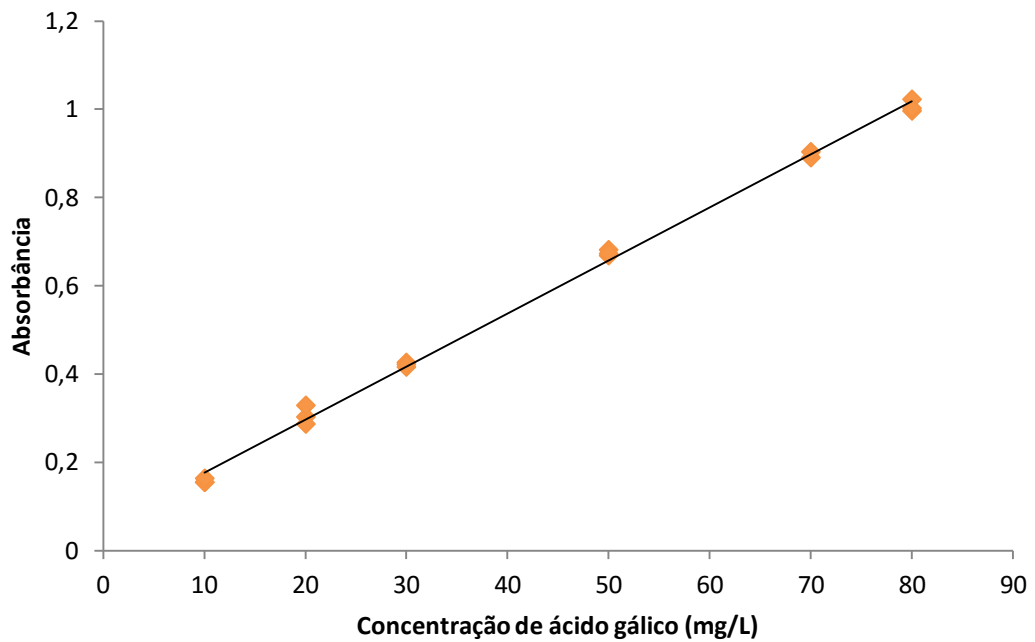


Figura 7.1: Curva analítica com ácido gálico

A equação correspondente da reta é $y = 0,012 x + 0,0555$ com $R^2 = 0,9974$.

8 Apêndice

São apresentadas a seguir as tabelas com os valores das concentrações residuais dos compostos bioativos e antocianinas para os experimentos de ultrassom e tratamento térmico.

Tempo	US 75%	Controle US 75%	US 90%	Controle US 90%	Trat. térmico 65 °C	Trat.térmico 90 °C
0	1,00 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0
2	1,04 ± 0,02	1,01 ± 0	1,05 ± 0	0,99 ± 0,01	0,98 ± 0	0,96 ± 0,02
4	1,08 ± 0,01	1,01 ± 0	1,13 ± 0,02	0,97 ± 0,04	0,98 ± 0,01	0,94 ± 0,01
6	1,10 ± 0	0,99 ± 0,02	1,09 ± 0,03	0,97 ± 0,01	0,96 ± 0	0,94 ± 0,01
8	1,12 ± 0,02	0,99 ± 0,01	1,18 ± 0,01	0,98 ± 0,03	0,95 ± 0	0,92 ± 0,01
10	1,18 ± 0,02	1,0 ± 0	1,24 ± 0,03	0,96 ± 0,02	0,94 ± 0	0,88 ± 0

Figura 8.1: Concentração residual dos compostos bioativos ao longo do tempo.

Tempo	US 75%	Controle US 75%	US 90%	Controle US 90%	Trat. térmico 65 °C	Trat.térmico 90 °C
0	1,00 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0
2	1,05 ± 0,02	1,0 ± 0	1,01 ± 0,02	0,99 ± 0,02	1,0 ± 0,01	0,99 ± 0
4	1,07 ± 0,02	1,0 ± 0	1,02 ± 0,03	0,98 ± 0,04	1,0 ± 0	0,97 ± 0,01
6	1,06 ± 0,02	1,01 ± 0,02	1,04 ± 0,01	1,0 ± 0	0,97 ± 0,01	0,96 ± 0
8	1,08 ± 0,02	1,02 ± 0,03	1,03 ± 0	0,98 ± 0,03	0,96 ± 0	0,91 ± 0
10	1,07 ± 0,01	1,01 ± 0,01	1,03 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,95 ± 0,02	0,89 ± 0,01

Figura 8.2: Concentração residual das antocianinas monoméricas ao longo do tempo.