



**Diana Fernandes Quitério Bértolo**

Licenciada em Bioquímica

**Aplicação de Quitosano na Redução do Escurecimento  
Enzimático em Sumo de Maçã Não Pasteurizado  
(Estabilizado por Hiperpressão)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Fernando José Cebola Lidon, PhD, FCT-UNL

Co-orientador: Claudia Sánchez Lara, PhD DFV-INRB





**Diana Fernandes Quitério Bértolo**

Licenciada em Bioquímica

**Aplicação de Quitosano na Redução do Escurecimento  
Enzimático em Sumo de Maçã Não Pasteurizado  
(Estabilizado por Hiperpressão)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Fernando José Cebola Lidon, PhD, FCT-UNL

Co-orientador: Claudia Sánchez Lara, PhD, DFV-INRB



**Setembro 2011**

Aplicação de Quitosano na Redução do Escurecimento Enzimático em Sumo de Maçã Não Pasteurizado (Estabilizado por Hiperpressão) Copyright de Diana Fernandes Quitério Bértolo, FCT/UNL e UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

Aos meus pais e irmã, que a vida inteira apoiaram as minhas decisões e sempre confiaram em mim, mesmo quando a minha teimosia e mau humor se tornavam insuportáveis, obrigada. Tudo o que sou devo-o a vocês.

Ao meu orientador, Doutor Fernando Lidon por todo o apoio, disponibilidade e por me ter dado a oportunidade de fazer um trabalho tão estimulante e compensador, um enorme obrigada por toda a confiança em mim depositada.

À minha orientadora, Doutora Claudia Sánchez por toda a amizade, pelo dinamismo contagiante a disponibilidade incansável e por me ajudado na realização deste trabalho.

Parte do trabalho, agora apresentado, contou com o apoio financeiro da UE através do projecto de IED *Theoretical Developments and Empirical Measurement of External Costs of pesticides* (TEAMPEST), que muito agradeço.

Queria agradecer também à Frubaça-Cooperativa de Hortofruticultores CRL, cediada em Évora-de-Alcobaça e à Eng<sup>a</sup> Carla Raimundo que tão gentilmente colaboraram com este trabalho e sempre disponibilizaram toda a ajuda necessária.

Um especial agradecimento à Doutora Maria da Graça Barreiro, ao Eng<sup>o</sup> Mário Santos, à Paula Santos, à Isabel Pais e a todos os elementos do DFV-EAN por toda a disponibilidade, ajuda e paciência que tiveram ao longo do estágio, sem vós seria muito mais difícil ultrapassar esta etapa, e os vossos ensinamentos foram essenciais no meu crescimento pessoal e profissional.

À Eng<sup>a</sup> Margarida Santos, ao Eng<sup>a</sup> Eduardo Leitão e à Eng<sup>a</sup> Margarida Lobo agradeço a prontidão com que se disponibilizaram a ajudar, que em muito facilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus avós, e todos os familiares, especialmente ao Edgar, um enorme obrigada por sempre me apoiarem e me darem uma força enorme e uma esperança sem igual.

À Mariana um enorme agradecimento pelos 6 meses que trabalhámos juntas, foi um prazer e uma alegria enorme poder contar com a tua boa disposição e simpatia nesta fase tão importante do meu percurso académico.

Queria agradecer à Joana, à Xana, à Tita, ao Tino e Rúben a paciência que tiveram comigo ao longo destes anos e os momentos únicos que partilhámos. A vossa amizade foi essencial para ultrapassar todos os obstáculos que me apareceram ao longo deste caminho, e sem todas as gargalhadas que partilhámos não teria sido o mesmo.

À Inês, à Cláudia e a todos os meus amigos que me acompanharam ao longo dos últimos anos, um enorme agradecimento por fazerem parte da minha vida e terem estado lá no meu melhor e no meu pior.



## Resumo

A maçã, sendo um dos frutos com maior produção em Portugal, detentor de elevado valor nutricional, apresenta um potencial comercial e industrial elevado. O consumo de sumo de maçã natural, não pasteurizado e estabilizado por hiperpressão, está em franca expansão, sendo muito apreciado pelo consumidor. No entanto, o seu tempo de prateleira é consideravelmente curto, apresentando um escurecimento enzimático acelerado. Aspecto que é considerado indesejável pelo consumidor.

Equacionando as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do quitosano, um polissacárido proveniente da quitina, neste trabalho caracterizou-se a acção de duas formas de adição desta entidade química (em solução com ácido ascórbico e em pó) e três concentrações (0,6 g/L, 0,7g/L e 0,8g/L) no sumo de maçã. Verificou-se uma redução do escurecimento enzimático do sumo após a adição das formas e concentrações de quitosano, mantendo o mesmo, uma cor mais clara, quando comparado com o sumo de maçã que já existe no mercado. Grande parte das características do sumo foram mantidas com a adição do quitosano, não existindo diferenças entre concentrações ou entre formas de adição. De acordo com resultados obtidos por um painel de provadores não treinados, a aceitação em parâmetros como a cor, sabor e doçura persistiu. Ainda assim, verificaram-se ligeiras variações em parâmetros como o pH, acidez titulável e no teor de ácido ascórbico. Apesar de levar a uma redução do escurecimento enzimático, não ocorreu um aumento do período de conservação do sumo de maçã, pois mesmo com adição do quitosano as contagens microbiológicas persistiram elevadas para as diferentes concentrações e formas de quitosano adicionadas.

Palavras chave: Conservação, Escurecimento Enzimático, Maçã, Sumo, Quitosano.

## Abstract

Apple is one of the fruits that in Portugal has the the highest production, having a high nutritional value, along with a strong commercial and industrial potential. The natural apple juice, non pasteurized and hiper-pressure stabilized is a product in expansion, being its characteristics appreciated by the consumers. However its shelf time is considerably small, revealing a fast enzymatic browning undesired by the consumer.

Following the antioxidant and antimicrobial properties of chitosan, a polissacharide extracte from chitin, in this study the action mode as two different ways of chitosan addiction (in solution with ascorbic acid and in dust) and three different concentrations (0,6 g/L, 0,7g/L e 0,8g/L) to apple juice.

It was found a decrease in the juice's enzymatic browning after addition of the different forms and concentrations of chitosan, yet the lighter color persisted when compared with the existent juice in the market. A great part of the juice's characteristics where also preserved with the addition of chitosan, independently of the concentrations and the ways of the addition. Data obtained by a non professional tasting panel, approved color, taste and sweetness parameters. Though there were found slight variations in the pH, total acidity and levels of ascorbic acid. Despite leading to an enzymatic browning reduction it also didn't extended the conservation period of the apple juice, because even with the addition of chitosan persisted high microbiologic counting's for the different concentrations and ways of chitosan adicioned.

Key Words: Apple, Chitosan, Enzymatic Browning, Juice, Preservation.

## Índice

Índice de Figuras.....	- 3 -
Índice de Tabelas.....	-4-
1.Introdução .....	- 5 -
1.1 Maçã.....	- 5 -
1.2 Sumo de maçã e agentes antioxidantes .....	- 6 -
1.3 Estabilização por hiperpressão .....	- 8 -
1.4 Quitina e quitosano .....	- 9 -
1.5 Propriedades antioxidantes do quitosano (inibição do escurecimento de sumos) ..	- 12 -
1.6 Propriedades antimicrobianas do quitosano.....	- 16 -
1.7 Valor nutricional do quitosano .....	- 20 -
1.8 Objectivos .....	- 20 -
2.Materiais e Métodos.....	- 21 -
2.1 Análises preliminares.....	- 21 -
2.1.1 Ensaios de solubilidade do quitosano em soluções aquosas de ácido ascórbico 1% e 0,5% e ácido acético 5% .....	- 21 -
2.1.2 Ensaios de solubilidade do quitosano em sumo de maçã.....	- 21 -
2.2 Incorporação do quitosano nos sumos e avaliação da respectiva acção .....	- 21 -
2.2.1 Matéria-prima .....	- 21 -
2.2.2 Quitosano .....	- 22 -
2.2.3 Tratamento .....	- 22 -
2.3 Avaliação do efeito da adição de quitosano ao sumo de maçã .....	- 24 -
2.3.1 Determinação de sólidos solúveis totais .....	- 24 -
2.3.2 Determinação do pH.....	- 24 -
2.3.3 Determinação da acidez titulável .....	- 24 -
2.3.4 Determinação da Cor .....	- 24 -
2.3.5 Determinação da turbidez.....	- 25 -
2.3.6 Determinação açúcares por HPLC .....	- 25 -
2.3.7 Determinação de compostos fenólicos .....	- 26 -
2.3.8 Determinação de ácido ascórbico.....	- 26 -
2.3.9 Análises microbiológicas .....	- 27 -

2.3.10 Análise sensorial .....	- 27 -
2.3.11 Análise estatística.....	- 28 -
3. Resultados e discussão.....	- 29 -
3.1 Ensaio de solubilidade .....	- 29 -
3.2 Efeito da adição de quitosano em sumo de maçã .....	- 30 -
3.2.1 pH .....	- 31 -
3.2.2 Sólidos solúveis totais .....	- 33 -
3.2.3 Acidez titulável .....	- 35 -
3.2.4 Análise colorimétrica .....	- 39 -
3.2.5 Turbidez .....	- 43 -
3.2.6 Teor de sacarose, glucose, frutose, sorbitol e açúcares totais.....	- 46 -
3.2.7 Fenóis totais .....	- 57 -
3.2.8 Ácido ascórbico .....	- 60 -
3.2.9 Análises microbiológicas .....	- 62 -
3.2.10 Análise sensorial .....	- 63 -
4. Conclusão e Perspectivas Futuras .....	- 67 -
5. Bibliografia .....	- 69 -
6. Anexos .....	- 72 -
Anexo I .....	- 73 -
Anexo II .....	- 74 -

## Índice de Figuras

Figura 1.1- Área geográfica de produção da maçã de Alcobaça.....	- 6 -
Figura 1.2- Composição nutricional de algumas variedades de maçã produzidas na região Oeste de Portugal.....	- 7 -
Figura 1.3- Estrutura molecular do quitosano.....	- 9 -
Figura 1.4- Processo de produção do quitosano.....	- 10 -
Figura 1.5- Diversas aplicações do quitosano na indústria alimentar.....	- 11 -
Figura 1.6- Efeitos da concentração de quitosano proveniente de fungos e crustáceos (camarão) e da variação da temperatura nos valores de luminosidade (L) em sumos de fruta. (Rungsardthong <i>et al.</i> , 2006).....	- 13 -
Figura 1.7—Efeito do quitosano, com diferentes pesos moleculares, no radical superóxido, comparado com ácido ascórbico (a) e no sumo de maçã (b).....	- 14 -
Figura 1.8- Efeito de agentes clarificantes na turbidez de sumo de maçã (A), uva (B), limão (C) e laranja (D).- 16 -	- 16 -
Figura 1.9- Actividade antimicrobiana do quitosano, expressa na concentração mínima inibitória do crescimento microbiana (MIC) para diversos fungos e bactérias.....	- 18 -
Figura 2.1- Cabine de provas para a análise sensorial dos sumos maçã.....	- 27 -
Figura 3.1.1-Amostras de sumo sem adição de solução e com adição de 4 concentrações de quitosano.....	- 29 -
Figura 3.1.2- Solubilidade de solução de quitosano em ácido ascórbico 0,5 e 1% em sumo de maçã.....	- 30 -
Figura 3.2.1.1- Variação do pH ao longo do tempo para as diferentes modalidades - 1º ensaio.....	- 32 -
Figura 3.2.1.2- Variação do pH ao longo do tempo para as diferentes modalidades- 2º ensaio.....	- 33 -
Figura 3.2.10.1- Resultados da análise sensorial do sumo de maçã.....	- 64 -
Figura 3.2.10.2- Análise estatística dos parâmetros sensoriais do sumo de maçã.....	- 65 -
Figura 3.2.10.3- Dendograma dos parâmetros sensoriais do sumo de maçã.....	- 66 -
Figura 3.2.10.3- Dendograma dos parâmetros sensoriais do sumo de maçã.....	- 66 -
Figura 3.2.3.1- Variação da acidez titulável para o 1ºensaio.....	- 37 -
Figura 3.2.3.2- Variação da Acidez titulável para o 2ºensaio.....	- 39 -
Figura 3.2.4.1- Diagrama de Cielab.....	- 39 -
Figura 3.2.4.2- Variação da tonalidade das amostras ao longo do primeiro ensaio.....	- 41 -
Figura 3.2.4.3- Variação da tonalidade da amostra ao longo do 2º ensaio.....	- 43 -
Figura 3.2.5.1- Variação da turbidez das amostras ao longo do 1º ensaio.....	- 45 -
Figura 3.2.5.2- Variação da turbidez da amostra ao longo do segundo ensaio.....	- 46 -
Figura 3.2.6.1- Curvas de calibração para os diferentes açúcares analisados no sumo.....	- 47 -
Figura 3.2.6.10- Variação da concentração de açúcares totais para o 2º ensaio.....	- 57 -
Figura 3.2.6.2- Variação da concentração de sacarose para as diferentes modalidades- 1º ensaio.....	- 49 -
Figura 3.2.6.3- Variação da concentração de sacarose para as diferentes modalidades 2º ensaio.....	- 49 -
Figura 3.2.6.4- Variação da concentração de glucose para as diferentes modalidades- 1º ensaio.....	- 51 -
Figura 3.2.6.5- Variação da concentração de glucose para as diferentes modalidades - 2º ensaio.....	- 51 -
Figura 3.2.6.6- Variação da concentração de frutose para as diferentes modalidades 1º ensaio.....	- 53 -
Figura 3.2.6.7- Variação da concentração de frutose para as diferentes modalidades- 2º ensaio.....	- 53 -
Figura 3.2.6.7- Variação da concentração de sorbitol para as diferentes modalidades 1º ensaio.....	- 55 -
Figura 3.2.6.8- Variação da concentração de sorbitol para as diferentes modalidades- 2º ensaio.....	- 55 -
Figura 3.2.6.9- Variação da concentração de açúcares totais para o 1º ensaio.....	- 57 -
Figura 3.2.7.1- Variação da concentração de fenóis totais para o 1º ensaio.....	- 59 -
Figura 3.2.7.2- Variação da concentração de fenóis totais para o 2º ensaio.....	- 59 -
Figura 3.2.8.1- Curva de calibração para a determinação da quantificação de ácido ascórbico.....	- 60 -
Figura 3.2.10.1- Resultados da análise sensorial do sumo de maçã.....	-64-
Figura 3.2.10.2- Análise estatística dos parâmetros sensoriais do sumo de maçã.....	-65-
Figura 3.2.10.3- Dendograma dos parâmetros sensoriais do sumo de maçã.....	-66-
Figura 6.1- Modalidades B (Sumo) e C1 (Sumo + água destilada) 1 dia após o início do ensaio.....	- 74 -
Figura 6.2- Modalidades C2 (Sumo + solução de ácido ascórbico 1%) e A1 (Sumo + solução de ácido ascórbico 1% + quitosano 0,6 g/L) 1 dia após o início do ensaio.....	- 74 -
Figura 6.3- Modalidades C3 (Sumo + ácido ascórbico em pó 0,08%) e A1 (Sumo + ácido ascórbico em pó 0,08%+ quitosano 0,6 g/L) 1 dia após o início do ensaio.....	- 74 -

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1- Esquema representativo da estratégia utilizada para o primeiro ensaio. ....	- 23 -
Tabela 2.2- Esquema representativo da estratégia utilizada para o segundo ensaio.....	- 23 -
Tabela 3.2.1.1- Variação dos valores médios de pH para as diferentes modalidades do 1º ensaio. ....	- 31 -
Tabela 3.2.1.2- Variação dos valores médios de pH para o 2º ensaio. ....	- 32 -
Tabela 3.2.2.1- Variação dos valores médios de sólidos solúveis totais para o 1º ensaio. ....	- 34 -
Tabela 3.2.2.2- Variação dos valores médios de sólidos solúveis totais para o 2º ensaio. ....	- 35 -
Tabela 3.2.3.1- Variação dos valores médios de acidez titulável (g de ácido málico/Litro de sumo) para o 1º ensaio. ....	- 36 -
Tabela 3.2.3.2- Variação dos valores médios de acidez titulável para o 2º ensaio. ....	- 38 -
Tabela 3.2.4.1- Tonalidade média das amostras para o 1º ensaio.....	- 40 -
Tabela 3.2.4.2- Tonalidade média das amostras para o 2º ensaio.....	- 42 -
Tabela 3.2.5.1- Valores médio de turbidez para o 1º ensaio.....	- 44 -
Tabela 3.2.5.2- Valores médio de turbidez para o 2º ensaio.....	- 45 -
Tabela 3.2.6.1- Concentração média de sacarose (g/100mL de sumo) nas amostras correspondentes ao 1º e 2º ensaio. ....	- 48 -
Tabela 3.2.6.2- Concentração média de glucose (g/100mL de sumo) para o 1º e 2º ensaio. ....	- 50 -
Tabela 3.2.6.3- Concentração média de frutose (g/100mL de sumo) para o 1º e 2º ensaio. ....	- 52 -
Tabela 3.2.6.4- Concentração média de sorbitol (g/100mL de sumo) para as diferentes modalidades do 1º e 2º ensaio. ....	- 54 -
Tabela 3.2.6.5- Determinação da concentração de açúcares totais (g/100mL de sumo) para o 1º e 2º ensaios-	56-
Tabela 3.2.7.1- Concentração de fenóis totais (g/100mL de sumo) para o 1º e 2º ensaio. ....	- 58 -
Tabela 3.2.8.1- Concentração média de ácido ascórbico (mg/100mL de sumo) para o 1º ensaio.....	- 61 -
Tabela 3.2.8.2- Concentração média de ácido ascórbico (mg/100mL de sumo) para o 2º ensaio.....	- 62 -
Tabela 3.2.9.1- Determinação da carga microbiana em UFC/mL de sumo para o 1º e 2º ensaio.....	- 63 -

## 1.Introdução

### 1.1 Maçã

Em Portugal, a maçã representa um importante sector na produção agrícola, sendo a espécie com maior peso na produção de frutos frescos, no Continente, sobretudo nas regiões de Lisboa (Ribatejo e Oeste), Porto e Norte (Trás-os-Montes) e Centro, correspondendo a sua produção a 26,5% do volume total [11].

A maçã é um fruto importante numa alimentação saudável, fornecendo fibras, vitaminas, sais minerais, substâncias antioxidantes e fitonutrientes. Pobre em gordura e equilibrada em frutose, pode ser utilizada em dietas de emagrecimento, ser comida entre refeições ou no final das mesmas (fresca e em sobremesas). Pode ainda constituir um ingrediente nos mais variados pratos

Existem diversas variedades de maçã. Em Portugal as variedades que se cultivam em maior quantidade em Portugal são as *Golden Delicious*, *Royal Gala*, *Red Delicious/Starking*, *Jonagold* e *Jonagored*, Reineta e Bravo de Esmolfe. Além destas são também produzidas, ainda que em menor quantidade, a Riscadinha de Palmela, Casa Nova de Alcobaça, *Granny Smith* e a *Pink Lady*.

Em Portugal existem zonas diferenciadas que são de enorme importância, pois levam a uma melhor organização dos produtores e à conquista de novos mercados. A maçã reúne em Portugal uma Denominação de Origem Protegida (DOP) – Maçã Bravo de Esmolfe, e quatro Indicações Geográficas Protegidas (IGP) – Maçã da Beira Alta, Maçã da Cova da Beira, Maçã de Portalegre e Maçã de Alcobaça, sendo esta última a mais famosa das maçãs portuguesas IGP. Qualificada pela União Europeia e pelo Ministério da Agricultura em 1994, esta maçã possui características únicas. Segundo o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, em 2003 existiam 747 explorações produtoras deste tipo de maçã, que ocupavam uma área de 812 hectares e uma produção de 862 toneladas de maçã certificada (cerca de 10% do volume total de maçã certificada produzida nesse ano). Assim, a zona na qual a maçã IGP de Alcobaça é produzida, está localizada entre a Serra dos Candeeiros e o Oceano Atlântico (figura 1.1), sendo uma das regiões de produção mais a sul na Europa [11,12].

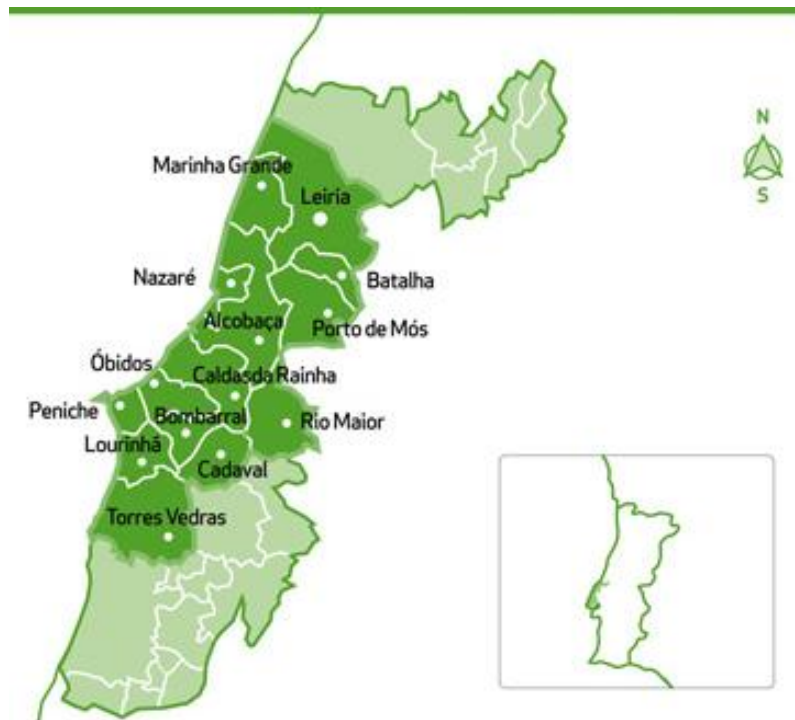


Figura 1.1- Área geográfica de produção da maçã de Alcobaça [11].

## 1.2 Sumo de maçã e agentes antioxidantes

Segundo o *Codex Alimentarius* (2005) [37], um sumo de frutas é considerado um líquido, natural ou fermentado, obtido essencialmente através da parte edível de frutos maduros e frescos. Os sumos de frutas são preparados através de determinados processos tecnológicos (filtração, fermentação, entre outros) que devem assegurar a manutenção das características físicas, químicas, organolépticas e nutricionais. O valor nutricional, sensorial e funcional do sumo de maçã (*Pyrus malus*) actualmente é considerado elevado. Este, tal como a polpa da maçã, deve apresentar, entre outras propriedades, uma tonalidade amarela, característica da frescura do produto [23].

A produção mundial de sumo de maçã tem aumentado gradualmente desde 2003, atingindo valores, em 2005, de cerca de 1,3 milhões de toneladas e sendo a China seguida da Polónia, Argentina, Alemanha, Hungria e Itália os principais produtores. Os dados sobre o consumo de sumos de fruta, indicam que, em 2006, o consumo de sumo de maçã na Alemanha anualmente se encontrava já nos 12L por pessoa, sendo 30% desse valor relativo ao consumo de sumo de maçã não pasteurizado [36].

Os sumos de frutas apresentam, em geral, boas características nutricionais e, por isso, podem constituir adequados complementos alimentares. Devido aos elevados teores de fitoquímicos, designadamente polifenóis e fibras, apresentam, por acréscimo, efeitos benéficos para a saúde humana. O teor calórico do sumo de fruta pode variar entre 45 a 71kcal por cada 100g de fruto. Os sumos de maçã, constituídos em regra por diversas variedades de maçã, apresentam valores nutricionais diferenciados [36].

As variedades de maçã com maior expressão, produzidas no Oeste (*Golden Delicious*, *Granny Smith* e *Fuji*), constituem a matéria-prima base, do sumo não pasteurizado usado neste trabalho. Para uma conveniente caracterização e fixação das propriedades destes sumos é fundamental proceder a uma avaliação da qualidade da fruta utilizada na elaboração dos sumos. Para tal existem diversos parâmetros que devem ser tidos em conta na determinação da qualidade do fruto, pois podem condicionar, de modo significativo, a qualidade final do sumo tratado por hiperpressão (Figura 1.2).

	VARIEDADES DE MAÇÃ		
	Golden Delicious	Granny Smith	Fuji
<b>Humidade (%)</b> NP EN 12145.	84.814±0.057	84.451±0.100	80.100±0.041
<b>Proteína Bruta (%)</b> NP 2030.	0.236±0.007	0.330±0.020	0.184±0.009
<b>Fibra (%)</b> NP 1005.	2.191±0.255	0.792±0.148	0.697±0.145
<b>Gordura Total (%)</b> NP 1613 adaptada.	0.037±0.003	0.039±0.012	0.026±0.004
<b>Cinza Total (%)</b> NP 1615 adaptada.	0.302±0.051	0.210±0.003	0.410±0.045
<b>Hidratos de Carbono (%)</b> TCAP (G. Ferreira, 1961).	12.408±0.326	14.177±0.155	18.583±0.109

Figura 1.2- Composição nutricional de algumas variedades de maçã produzidas na região Oeste de Portugal [6].

A indústria alimentar, atenta às necessidades e exigências do consumidor, vem equacionando, de forma acrescida, o desenvolvimento de novos produtos, com utilização de tecnologias que se pretendem inovadoras. Neste contexto, os sumos de frutas não pasteurizados, tratados com recurso a pressões elevadas e estabilizados em atmosferas modificadas, vêm sendo aperfeiçoados nos sistemas de produção. No entanto, um dos principais problemas com que a indústria dos alimentos se confronta é o rápido escurecimento destes sumos, após a sua extracção, o que reduz drasticamente o respectivo período de comercialização. Assim, para se promover um aumento do período de conservação dos produtos, há que diminuir a acção do escurecimento enzimático. Para tal são normalmente adicionadas substâncias antioxidantes [23].

Entre eles os mais utilizados são os sulfitos, contudo estes começam a ser questionados por se considerar que têm efeitos adversos na saúde dos consumidores. Em alternativa, verifica-se uma tendência crescente para substituir esses agentes antioxidantes por outros que não sejam tão prejudiciais à saúde (nomeadamente agentes redutores). Entre estes encontram-se o ácido ascórbico e respectivos análogos, destacando-se o glutatião e a L-cisteína. Além desses redutores também são considerados inibidores enzimáticos, agentes quelantes, acidulantes, complexantes e diversas enzimas [23].

A actuação dos agentes antioxidantes está direccionada essencialmente para 3 tipos de substâncias: enzimas (polifenoloxidase) e respectivos substratos e, colateralmente, para produtos decorrentes da reacção de escurecimento.

Entre os produtos das reacções de escurecimento enzimático encontram-se as quinonas, compostos bastante reactivos que podem ser facilmente reconvertidos em fenóis ou ficar

complexados pela adição de corantes. Alguns dos agentes que irão actuar nesses compostos são a L-cisteína,  $\beta$ -ciclodextrina e os ácidos ascórbico, cinâmico e sórbico. Destes, a L-cisteína é a que se considera melhor antioxidante para este tipo de sumos [23].

### 1.3 Estabilização por hiperpressão

Os sumos de frutas que não apresentam tratamento térmico ficam mais susceptíveis às acções microbiana e enzimática e, por isso, degradam-se a uma taxa muito mais rápida do que aqueles que são submetidos a temperaturas elevadas (exemplo da pasteurização). Apesar disso, são os produtos alimentares minimamente processados e sem aditivos que têm cada vez maior aceitação e procura por parte do consumidor. Como tal, torna-se necessário, promover o desenvolvimento de outras técnicas de conservação que não alterem as características organolépticas dos sumos frescos e prolonguem o período de conservação, evitando assim a sua rápida degradação.

Os tratamentos de hiperpressão (*High Hydrostatic Pressure-HPP*) nos sumos de fruta fresca revelaram ser uma alternativa eficaz para a inactivação enzimática e microbiológica. Esta técnica utiliza combinações de pressão-tempo-temperatura que são variáveis de acordo com diversos factores, nomeadamente o tipo de microrganismo, a enzima que se pretende inactivar e o tipo de sumo.

Nestes tratamentos, o produto é embalado num recipiente flexível (normalmente uma garrafa de plástico) e colocado numa câmara cheia com um fluido que permite transmitir a pressão. Esse fluido normalmente é água pressurizada que vai transferir o aumento de pressão para a garrafa e, conseqüentemente, para o alimento. Essa pressão é normalmente aplicada durante cerca de 3 a 5 minutos, e uma vez que é transmitida em todas as direcções uniformemente não existe deformação da garrafa. Com esta tecnologia não é aplicado aumento de temperatura e, por isso, as características sensoriais e nutricionais não são alteradas. Finalmente, a embalagem é retirada da câmara estando apta para comercialização [22].

As várias espécies de microrganismos, potenciais contaminantes dos sumos, apresentam diferentes graus de resistência à pressão utilizada. Em geral, as células na fase estacionária são mais resistentes ao aumento de pressão do que as células na fase exponencial e as bactérias Gram-negativas também são mais sensíveis que as bactérias Gram-positivas [3].

A estabilização por hiperpressão apresenta um papel essencial na inibição enzimática, com efeito irreversível dependente de diversos factores, nomeadamente a pressão, temperatura, tempo, pH, estrutura enzimática e tipo e concentração de solutos e enzima. As lipoxigenase, lactoperoxidase, pectinesterase, lipase, phoshatase, catalase, polifenoloxidase e peroxidase são exemplos de enzimas susceptíveis à inactivação pelo aumento de pressão (sendo a peroxidase, a mais sensível e a lipoxigenase, a mais resistente a este tipo de inactivação).

Nos sumos de frutas não pasteurizados é necessário inibir o escurecimento enzimático que ocorre devido à acção da polifenoloxidase na fase pós colheita e durante o processamento. Em sumos de maçãs verificou-se que aplicações de pressões a partir de 600 MPa, à temperatura ambiente, eram suficientes para inibir a polifenoloxidase, impedindo a oxidação enzimática dos fenóis



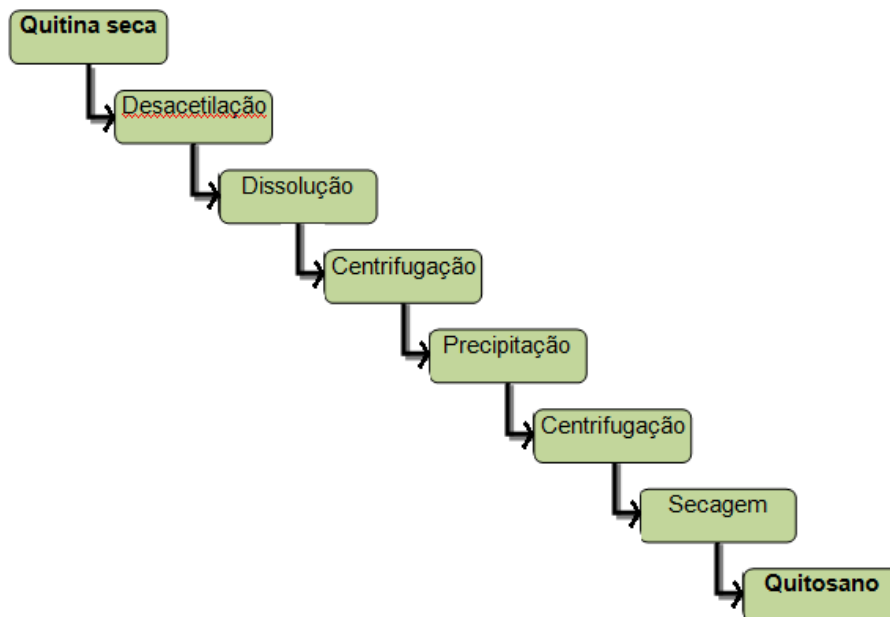


Figura 1.4- Fluxograma simplificado relativo à produção do quitosano [19].

Este polissacárido tem origem numa das formas mais abundantes de glicídios, a quitina, que depois da celulose é o segundo biopolímero mais abundante. A quitina provém essencialmente do exoesqueleto de crustáceos com destaque para o camarão e o caranguejo [18,36]. É um polímero natural, insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos e álcoois. A quitina é uma molécula de estrutura linear e constituída pela unidade monomérica,  $\beta$ -1,4 N-acetilglucosamina. Apresenta forma sólida, cristalina ou amorfa e o seu teor nos exoesqueletos varia com a espécie, podendo chegar a 12% da massa corpórea total ou até 42% da massa da casca [8]. Além disso, existe sobre três formas:  $\alpha$ -quitina,  $\beta$ -quitina e  $\gamma$ -quitina. A forma mais abundante na natureza, e também mais estável, é a  $\alpha$ -quitina que apresenta cadeias poliméricas em disposição antiparalela, o que confere uma maior rigidez ao exoesqueleto dos artrópodes. A forma  $\beta$ -quitina apresenta cadeias em disposição paralela, sendo a  $\gamma$ -quitina uma mistura dos dois tipos de cadeia. Estas formas apresentam assim um maior grau de flexibilidade, sem que a resistência se perca [25].

O quitosano apresenta essencialmente três tipos de grupos funcionais: um grupo amina, e dois grupos hidroxilo primário e secundário, que estão respectivamente na posição C-2, C-3 e C-6. [30]. Esses grupos funcionais, na presença de soluções ácidas vão adquirir carga positiva, possibilitando a existência de reacções químicas. Neste contexto, o quitosano pode apresentar propriedades diversas.

O quitosano é uma base fraca, insolúvel em água, sendo solúvel em soluções fracas dos ácidos acético, fórmico, succínico, láctico e málico [26]. Já as suas formas conjugadas (com acetato, malato e lactato) são solúveis em água [21]. A sua solubilidade está directamente relacionada com a

quantidade de grupos amina que se encontram protonados. Um maior número destes grupos vai levar a uma maior repulsão das cadeias (devido ao número elevado de interacções electrostáticas), o que permite uma maior solvatação em água [25]. Devido à sua grande biodegradabilidade, carácter não tóxico, permeabilidade selectiva e capacidade de quelação (de iões como o ferro, cobre, cádmio e magnésio) e adsorptiva, os polímeros compostos por quitosano têm sido alvo de aplicações industriais. Segundo Martín-Diana *et al.* (2009) [18], este polímero pode ter funções de imobilização e purificação de enzimas e ainda de aditivo para desenvolvimento de novos produtos alimentares, alterando as propriedades gelificantes, estabilizadoras e de espessamento, entre outras. Uma das propriedades mais importantes deste polímero decorre da respectiva capacidade para quebrar ligações lipídicas através da sua carga iónica positiva.

O quitosano, com este largo espectro de funções, pode apresentar diversas aplicações, destacando-se o aumento da conservação de diversos alimentos, pela diminuição da deterioração microbiana através da sua utilização em biofilmes, purificação da água e ainda clarificação e desacidificação de sumos de frutas (Figura 1.5).

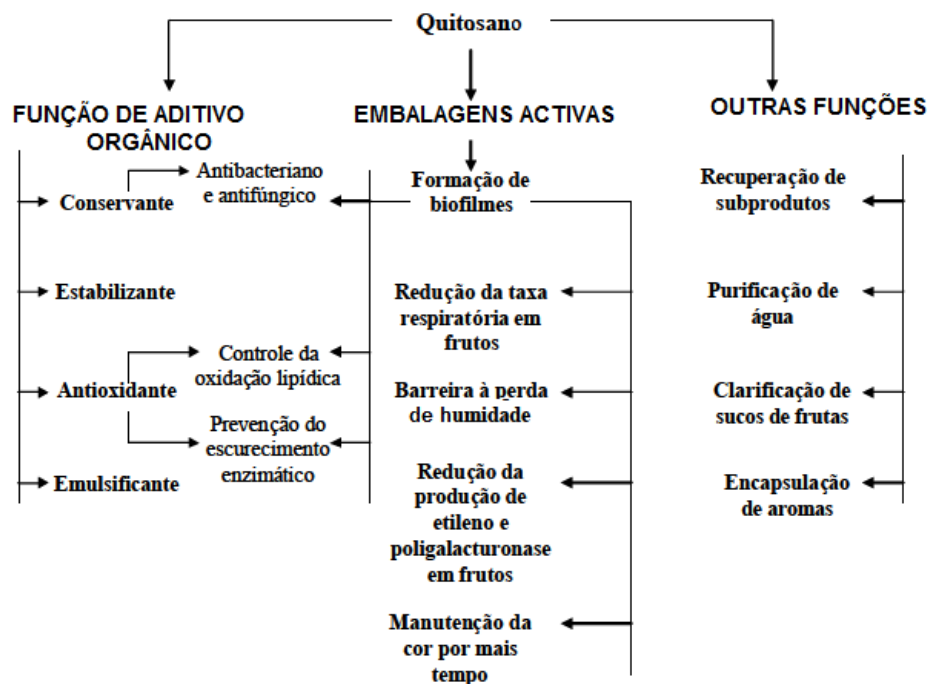


Figura 1.5- Diversas aplicações do quitosano na indústria alimentar [8].

Ao longo de várias décadas, o consumidor foi alterando as suas necessidades e prioridades em relação aos produtos de origem alimentar. Os objectivos da indústria alimentar focam-se essencialmente no aumento de conservação dos produtos, tentando prolongar o período para o qual as características do alimento se mantêm inalteradas. Actualmente, além da segurança e da qualidade alimentar, que são parâmetros essenciais na escolha do tipo de produtos a consumir, existe também uma procura elevada de produtos alimentares cada vez mais naturais e sem adição de

corantes e conservantes. Neste enquadramento, o quitosano sendo uma substância de origem natural, pode incrementar a conservação de sumos não pasteurizados, sem que as suas propriedades e características organolépticas sejam significativamente alteradas.

Neste contexto, o quitosano é considerado um aditivo alimentar com uma função essencial na conservação (agente de clarificação ou floculação e antioxidante), impossibilitando ou atrasando a deterioração microbiana ou enzimática do alimento [8,37]. A sua utilização como conservante é bastante recomendada, pois apresenta níveis de toxicidade muito reduzidos. Sabe-se que a glicose tem uma dose letal que ronda as 8 a 12g por kg de massa corporal (em mamíferos), enquanto que o quitosano numa concentração de 18g por kg de massa corporal não apresenta sinais de toxicidade e menos ainda de mortalidade. De acordo com Fai *et al.*, (2008) [8], o único sinal indicando efeitos secundários, provenientes de doses excessivas de quitosano, é a desidratação gástrica. De facto, o aumento da ingestão de fibra natural, a qual o organismo não tem capacidade de digerir, induz um aumento do seu volume (é expandida devido aos baixos valores de pH existentes no estômago), o que posteriormente gera um aumento do desconforto intestinal.

### **1.5 Propriedades antioxidantes do quitosano (inibição do escurecimento de sumos)**

Para inibir o escurecimento dos sumos torna-se necessário recorrer ao uso de agentes antioxidantes, grupo que inclui a polivinilpirrolidona e os taninos. O grau de acastanhamento depende de diversos factores, designadamente da concentração, de oxigénio no meio de processamento, da presença de substâncias redutoras, de iões metálicos, do pH, da temperatura, e da actividade de diversas enzimas, essencialmente da polifenoloxidase [17]. O quitosano, como apresenta uma carga positiva parcial, vai contribuir, de forma bastante eficiente, para a redução do escurecimento e da acidez destes sumos, através da capacidade de quebra de ligações entre ácidos. Segundo Shahidi *et al.* (1999) [30], uma concentração de 0,8g/L de quitosano é suficiente para obter uma turbidez aproximadamente nula nos sumos. No entanto, no caso dos sumos de frutas não pasteurizados, a turbidez do sumo é considerada um factor positivo, indicador da sua origem natural, devido à presença de partículas sólidas provenientes da ruptura das células e tecidos dos frutos. Além dessa actividade clarificante, o quitosano apresenta ainda uma elevada afinidade para os compostos fenólicos, nomeadamente catequinas, proantocianidinas e ácido cinâmico que, se complexados podem evitar ou reduzir o escurecimento enzimático.

Além do quitosano extraído do exoesqueleto dos crustáceos, é também conhecida outra origem deste polímero, que pode apresentar menores custos. É possível obter, de forma mais rentável, o quitosano a partir de fungos, uma vez que estes crescem muito rapidamente e apresentam uma elevada taxa de produção de biomassa [29]. Esta via pode considerar-se da maior importância, pois existem diversas limitações no processo de produção do quitosano a partir dos crustáceos, nomeadamente a sua adaptabilidade ao clima, a sazonalidade, e os locais de confinamento. Acresce ainda que o processamento em larga escala pode dar origem a resíduos indesejados provenientes da conversão química da quitina em quitosano [8]. Nos fungos a sazonalidade não é relevante, sendo a quantidade extraída apenas dependente de factores intraespecíficos e nutricionais.

Existem diversas espécies de fungos capazes de produzir este biopolímero, nomeadamente *Saccharomyces cerevisiae*, *Absidia spp.*, *Mucor rouxii*, *Mucor spp.*, *Neurospora crassa* e *Rhizopus spp.* Rungsardthong *et al.* (2006) [29] determinaram a eficácia do quitosano na clarificação de sumos de maçã, utilizando quitosano proveniente do exoesqueleto do camarão e do crescimento de fungos. Neste estudo verificou-se que tem de existir uma boa e permanente homogeneização do meio de cultura para que os fungos apresentem um crescimento elevado. Esta prática impede a limitação do teor de O<sub>2</sub>, e assegura uma distribuição uniforme do teor nutritivo do meio. Ainda segundo Rungsardthong *et al.* (2006) [29], comparativamente ao exoesqueleto de camarão, os fungos apresentam um maior grau de desacetilação do quitosano (70 para o exoesqueleto de camarão e 85% para a *Absidia glauca var. paradoxa* respectivamente). Essa diferença, nos valores de desacetilação, é essencial na clarificação dos sumos de maçã, porque, para o mesmo intervalo de concentrações, existe maior poder clarificante, nos sumos com adição de quitosano de origem fúngica (Figura 1.6).

Temp (°C)	Concentração de quitosano (g/L)	Quitosano (fungo) L <sup>a</sup>	Quitosano (camarão) L <sup>a</sup>
30	0.1	0.68 ± 0.23	2.53 ± 0.04
	0.5	9.59 ± 0.16	6.58 ± 0.08
	0.7	9.83 ± 0.09	6.94 ± 0.06
	1.0	7.31 ± 0.12	6.35 ± 0.05
35	0.1	1.18 ± 0.26	2.23 ± 0.38
	0.5	9.69 ± 0.29	6.52 ± 0.08
	0.7	10.11 ± 0.30	6.84 ± 0.05
	1.0	7.84 ± 0.25	5.45 ± 0.73
40	0.1	0.64 ± 0.14	2.51 ± 0.03
	0.5	9.60 ± 0.25	6.38 ± 0.06
	0.7	9.86 ± 0.05	6.65 ± 0.21
	1.0	7.00 ± 0.13	3.11 ± 0.01

Figura 1.6- Efeitos da concentração de quitosano proveniente de fungos e crustáceos (camarão) e da variação da temperatura nos valores de luminosidade (L) em sumos de fruta [29].

O mesmo estudo revelou também que para uma concentração de 1g/L de quitosano, não se verificava nenhum efeito evidente na diminuição da turbidez, o que pode indicar que haja uma saturação dos locais de adsorção do quitosano e, por isso, a concentração adequada de 0,7g/L para um aumento da clarificação dos sumos.

No caso dos sumos de fruta não pasteurizados, estabilizados por hiperpressão, pretende-se que o sumo mantenha a sua turbidez natural e, por isso, deve evitar-se a utilização de quitosano numa concentração que estabilize a clarificação.

Além da origem, é possível que outros factores tenham uma acção importante no poder antioxidante do quitosano. Um desses parâmetros é a massa molecular do polímero que, segundo Chien *et al.*, 2007 [5], vai afectar a actividade biológica desta molécula. Considera-se que o quitosano de baixo peso molecular (entre 5-20kDa) apresenta efeitos benéficos face à progressão de doenças,

nomeadamente a diabetes *mellitus*, porque a afinidade para com os lipopolissacáridos é superior face a do quitosano com elevado peso molecular (140kDa). Demonstrou-se ainda que o quitosano com baixo peso molecular tem uma maior acção bactericida e antioxidante.

O sumo de maçã apresenta um elevado valor nutricional e inibe essencialmente a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade [5]. O reforço dessas propriedades antioxidantes, quando se adiciona quitosano aos sumos, depende essencialmente do peso molecular do biopolímero. Diversos trabalhos confirmaram a acção antioxidante do quitosano no sumo de maçã, propiciando a inibição dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), superóxido e peróxido de hidrogénio, a par do efeito quelante do quitosano. Em todos os casos ocorreu uma percentagem de inibição dessas substâncias na ordem dos 90% para o quitosano de baixo peso molecular, contra percentagens inferiores para o quitosano com maior peso molecular (massa molecular média e alta). Esse efeito pode resultar de uma estrutura menos compactada do quitosano de baixo peso molecular e do efeito das ligações de hidrogénio intramoleculares serem menores, quando comparadas com as forças de ligação das moléculas de elevado peso molecular. Desta forma, para o quitosano de mais baixo peso molecular existe um menor enrolamento da cadeia, o que permite um acesso mais facilitado aos radicais livres, e com isso um maior grau de inibição [35]. Para o caso específico do radical superóxido, que reage com os grupos hidroxilo e amino livres do quitosano de baixo peso molecular, apresenta um efeito antioxidante superior ao de maior peso molecular (Figura 1.7).

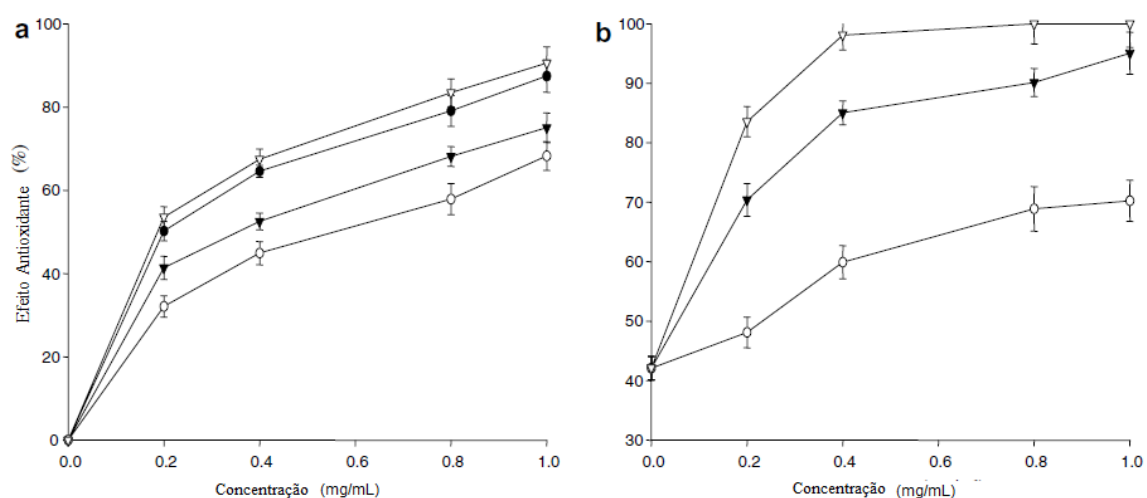


Figura 1.7-- Efeito do quitosano, com diferentes pesos moleculares, no radical superóxido, comparado com ácido ascórbico (a) e no sumo de maçã (b). Ácido ascórbico -●, quitosano com peso molecular elevado -○, com peso molecular médio -▼ e com peso molecular baixo-▽ [5].

Por outro lado, No *et al.*, (2007) [21] referem que os sumos de maçã, à semelhança de muitos outros, podem beneficiar de um aumento do período de conservação pela utilização deste biopolímero. A sua aplicação, numa forma solúvel em água (com 7% de ácido acético), revelou uma

acção mais eficiente na diminuição do escurecimento de sumos de maçã, uva, limão e laranja face a outros agentes nomeadamente gelatinas e mineral bentonito.

Uma maior turbidez e escurecimento enzimático podem ser normalmente evitados através da utilização de diferentes técnicas, nomeadamente filtração ou centrifugação. No entanto, também se verificou que uma adição do quitosano pode ser benéfica nesse tratamento. No *et al.*, (2007) [25] indicam ainda que uma concentração mínima deste composto (na ordem de 200ppm) pode levar à redução do escurecimento enzimático em sumos de maçã e pêra. Isso provavelmente porque a enzima que promove esse escurecimento, a polifenoloxidase, é inibida pelo quitosano, pois este ao ligar-se às partículas existentes em suspensão no sumo, impede a respectiva acção enzimática [22]. Essa reacção de escurecimento enzimático deve-se ao contacto iniciado pela polifenoloxidase com ácidos fenólicos, na presença de oxigénio. A mesma ocorre essencialmente devido à alteração da compartimentação celular originada com a maceração dos frutos, permitindo que os substratos entrem em contacto com essas oxidases [27]. Também Martín-Diana *et al.* (2009) [18] verificaram uma diminuição do escurecimento enzimático, neste caso em sumos de laranja, considerando a sua actividade antioxidante semelhante à dos compostos fenólicos, o que explica esta inibição oxidativa. Ainda nesse trabalho foi verificado um aumento da intensidade da cor, que é explicada pela diminuição do escurecimento, não diminuindo a luminosidade bem como a cor laranja forte típica do sumo conservado em boas condições.

Assim, a polifenoloxidase que contém um átomo de cobre no seu centro activo, vai formar quinonas reactivas (através da hidroxilação de monofenóis para dihidroxifenóis), que se polimerizam com polifenóis para formar compostos oxidados, as melanoidinas, que dão origem à cor castanha, com o conseqüente escurecimento dos sumos. Para os antioxidantes que apresentam pelo menos um grupo hidroxilo ou fenólico na sua estrutura molecular, a respectiva capacidade de inibição dos radicais livres depende da proporção do número desses grupos moleculares. Tendo o quitosano dois grupos hidroxilo e um grupo amina parcialmente acetilado, pode explicar a sua capacidade inibitória [35]. Estes autores propõem que o quitosano iniba esta reacção essencialmente mediante o bloqueio da ligação da enzima a esses compostos (no caso dos sumos) ou pela utilização de atmosferas modificadas e biofilmes (nas frutas intactas), que impedem a utilização do oxigénio, necessário para a reacção de escurecimento enzimático.

Uma vez que o quitosano é um composto policatiónico presente na natureza, essa sua eficácia como agente coagulante sobre partículas em suspensão, bem como o seu carácter não tóxico e biodegradável, levaram a que seja tido em conta como um agente alternativo de conservação de sumos de fruta. No entanto, é importante não esquecer que o quitosano apresenta reduzida solubilidade em água, e por isso é necessária a sua conjugação com ácido acético [4]. Como é possível verificar na figura 1.8 e já anteriormente tinha sido referido, quando comparado com outros agentes, nomeadamente as gelatinas e os bentonitos, em diferentes sumos este agente vai ter uma muito maior redução da absorvência e, com isto, uma clarificação muito mais acentuada [4].

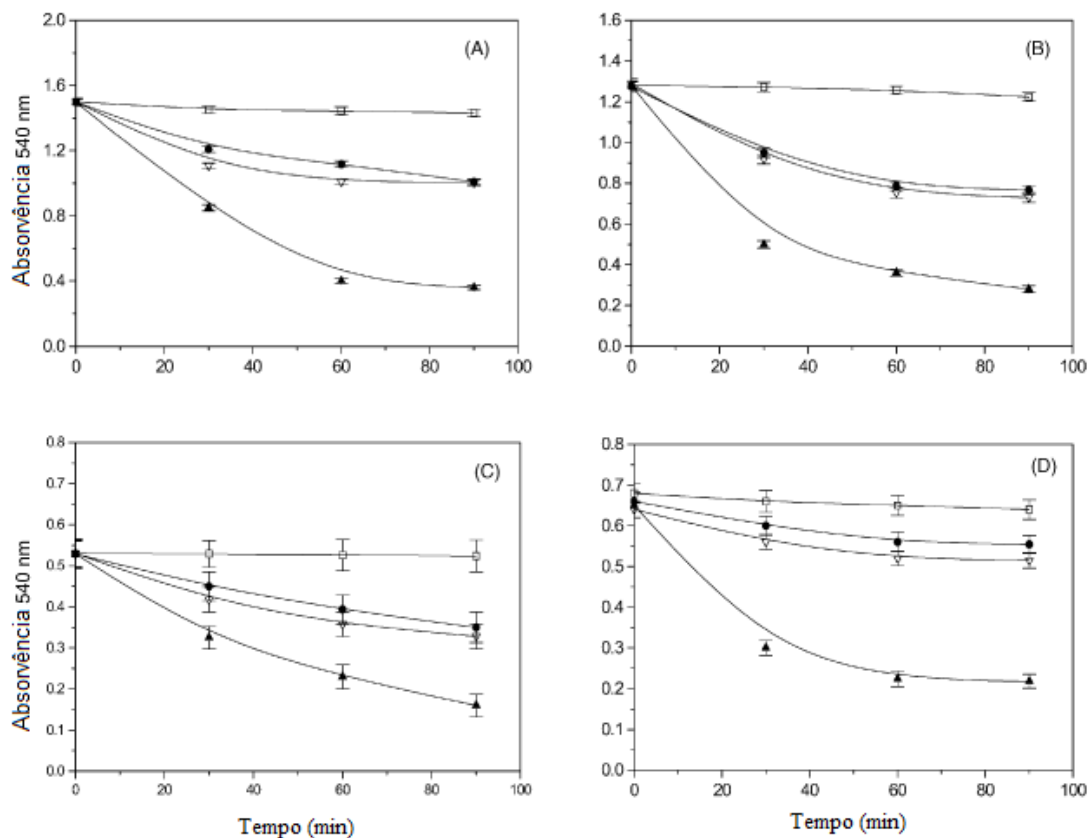


Figura 1.8- Efeito de agentes clarificantes na turbidez de sumo de maçã (A), uva (B), limão (C) e laranja (D). Controlo- □, Bentonito- ●, Gelatina- ○, Quitosano- ▼ [4].

Foi feita, além de uma análise espectrofotométrica, uma análise aos teores totais de proteínas, sólidos solúveis, à acidez e ao teor de açúcares, para determinar a acção destes agentes na diminuição do teor nutritivo dos sumos. Apenas o teor proteico diminuiu substancialmente, uma vez que, tendo o quitosano um teor catiónico em soluções ácidas, pode levar a uma maior quebra das ligações proteicas. No entanto, o teor proteico no sumo não é elevado, não sendo o teor de açúcares e ácidos orgânicos alterado.

Além desse efeito benéfico na alteração das características organolépticas do produto, a quitina e os seus derivados podem apresentar propriedades antimicrobianas inibindo o crescimento de microrganismos (como é o exemplo de fungos e bactérias).

### 1.6 Propriedades antimicrobianas do quitosano

Além das propriedades antioxidantes do quitosano, destacam-se ainda as suas características antimicrobianas. Nos efeitos inibidores em fungos e bactérias, a sua acção é mais imediata nos fungos [26]. Segundo Shahidi *et al.* (1999) [30], a actividade antimicrobiana está relacionada com um dos três grupos funcionais existentes na molécula de quitosano. Assim, a carga positiva existente no carbono 2 do monómero de glucosamina (a pH inferior a 6), faz com que a sua

solubilidade aumente, apresentando elevados valores de actividade antimicrobiana. Como o quitosano apresenta um  $pK_a$  próximo de 6.3, a quantidade de grupos amina carregados positivamente, vai aumentando consoante o decréscimo de pH, e diminuindo à medida que aumenta o pH. Neste contexto ocorre uma diminuição da solubilidade do quitosano e também a uma menor actividade antimicrobiana [16]. Essa estrutura polielectrolítica vai ser essencial para a actividade microbiana, pois uma elevada carga positiva leva a interações electrostáticas muito fortes [15]. Essa actividade surge da interacção entre as cargas positivas do quitosano com as membranas celulares microbianas que apresentam cargas negativas. Existe então formação de complexos polielectrolíticos que incrementam a permeabilidade da membrana, fazendo com que exista uma perda de componentes intracelulares e, conseqüentemente, a inibição da actividade microbiana. No entanto, essa acção vai sofrer influência de outros factores, extrínsecos, nomeadamente o grau de desacetilação, a massa molecular e também nutrientes, condições do meio, substratos químicos disponíveis aos microrganismos. No que concerne aos factores intrínsecos, as características de hidrofobicidade podem igualmente condicionar a acção do quitosano. Também podem ser associados factores como as concentrações das soluções utilizadas [8], o tempo de exposição dos microrganismos a essas soluções (além das membranas que variam de espécie para espécie). Colateralmente, também pode estar associado a factores intrínsecos aos microrganismos, como a idade das células e a espécie microbiana [15].

No conjunto alargado de acções do quitosano, considera-se também a existência de uma função activadora dos processos de defesa do organismo e inibidora de diversas enzimas. O quitosano vai desempenhar papéis de inactivação de processos de tradução proteica. Essa acção antimicrobiana verifica-se essencialmente em bactérias Gram-negativas, porque um quitosano de menor massa molecular, penetra mais facilmente na célula e com isto vai ter maior interferência no DNA [8]. Em bactérias Gram-positivas pensa-se que o efeito está associado à absorção de nutrientes por parte do microrganismo, e com isso a sua actuação vai ser melhor quanto maior for a massa molecular (criação de um maior filme a volta da bactéria que inibe o seu crescimento).

Liu *et al.* (2001) [17] verificaram que não eram necessárias concentrações muito elevadas deste agente para ocorrer uma importante acção antimicrobiana (Figura 1.9).

Bacteria	MIC (ppm)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100
<i>Bacillus cereus</i>	1000
<i>Corinebacterium michiganence</i>	10
<i>Erwinia sp.</i>	500
<i>Erwinia carotovora subsp.</i>	200
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700
<i>Micrococcus luteus</i>	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
<i>Xanthomonas campestris</i>	500
Fungi	
<i>Botrytis cinerea</i>	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Drechstera sorokiana</i>	10
<i>Micronectriella nivalis</i>	10
<i>Piricularia oryzae</i>	5000
<i>Rhizoctonia solani</i>	1000
<i>Trichophyton equinum</i>	2500

Figura 1.9- Actividade antimicrobiana do quitosano, expressa na concentração mínima inibitória do crescimento microbiana (MIC) para diversos fungos e bactérias [17].

Shahidi *et al.* (1999) [30] indicam que uma concentração superior a 0.005% (m/v) é suficiente para inactivar completamente a *Staphylococcus aureus*. Já para a *Bacillus cereus* esta concentração é ligeiramente maior (cerca de 0.02% (m/v)), e para a *E.coli* um valor oscilando em torno de 0,0075% (m/v). No entanto, também a inactivação microbiana pode estar associada à massa molecular do quitosano, pois um maior grau de desacetilação pode ser menos eficaz. As diferenças da actividade antibacteriana do quitosano na *E.coli* foram ainda estudadas por Liu *et al.* (2001) [16]. Estes autores observaram actividades distintas para quitosanos com diferentes massas moleculares, graus de desacetilação, concentração e valores de pH. O controlo do pH é essencial uma vez que só em condições ácidas (pH inferior a 6,5) é que o quitosano vai apresentar essa acção inibitória, devido ao aumento de solubilidade, bem como à exposição dos grupos amina. Relativamente à massa molecular, com o aumento desta, existe uma diminuição da inibição bacteriana por parte do quitosano. Esta acção pode estar directamente relacionada com um aumento das ligações cruzadas da estrutura molecular do quitosano de elevada massa molecular, apresentando ligações de hidrogénio intramoleculares muito fortes e impedindo os grupos amina de estarem disponíveis para atacar a superfície bacteriana. Já um aumento da desacetilação leva a uma maior exposição dos grupos amina, aumentando com isso a actividade antibactéria do quitosano. Relativamente ao factor concentração, regista-se um aumento da inibição do crescimento de *E.coli* directamente proporcional ao aumento da concentração.

Também a solubilidade do quitosano vai ser importante na acção antimicrobiana. Sendo o quitosano uma substância que apresenta uma reduzida solubilidade em água, é necessário proceder, em muitos casos, a modificações químicas, que podem incluir acilação, alquilação, quaternização e metalização, para aumentar essa solubilidade. Segundo Kong *et al.* (2010) [15] (os derivados de

quitosano, originados por quaternização, podem originar uma maior actividade antibacteriana. Assim, para o quitosano e os seus derivados, a alteração das características hidrófilas e hidrófobas pode afectar também a capacidade antimicrobiana.

A acção antifúngica do quitosano, assim como o seu modo de acção, ainda não é totalmente conhecida, no entanto Roller *et al.* (1999) [28] sugerem um efeito quelante, para impedir a disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento dos microrganismos. A sua acção depende essencialmente do tipo de fungos, podendo apresentar inibição em concentrações mínimas de 0.075 g/L e não evidenciar qualquer tipo de actividade quando em concentrações de 10 g/L para certos fungos filamentosos. Pensa-se que a acção fungicida do quitosano ocorra a nível nutricional, impedindo a disponibilidade de cálcio e de outros nutrientes. Também é considerada a hipótese de o quitosano criar distúrbios na parede celular fúngica. Esta acção aponta, essencialmente, para a existência de grupos reactivos no quitosano que podem reagir com grupos aniónicos da superfície da parede celular [28].

A função antifúngica do quitosano está associada à sua utilização como biofilmes, que inibem o crescimento de inúmeros tipos de fungos a uma concentração de 1mg/mL. Exceptuando-se neste caso os *Zygomycetes*, pois o maior constituinte da sua parede celular é o próprio quitosano [26]. Este polímero irá ter assim uma dupla função, que interfere no crescimento fúngico e com a activação de diversos processos de defesa, que incluem a acumulação de quitinases, síntese de inibidores de proteinases e ainda lenhificação e indução da síntese de calos quando aplicado em folhas de trigo com lesões. A sua acção está relacionada com a desorganização molecular em fungos fitopatogénicos, nomeadamente *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium sclerotiorum*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus niger* [8].

Por oposição a outros microrganismos, as bactérias lácticas apresentam um aumento da taxa de crescimento e desenvolvimento após adição de quitosano no meio de cultura [8], nomeadamente na produção de queijo mozzarella. Essa adição inibe compostos do grupo dos Coliformes e *Pseudomonas spp*, porém estimula a multiplicação de bactérias lácticas, e incrementa *shelf-life* neste tipo de produtos lácteos. As bactérias probióticas, com destaque para as *Bifidobacteria* e *Lactobacillus*, também apresentam um crescimento mais acentuado na presença de películas de quitosano (neste caso de baixa massa molecular), aumentando a sua viabilidade.

Com todas estas propriedades, o quitosano tem diversas aplicações, sendo uma delas a sua utilização em biofilmes edíveis para a protecção de frutos. Essa utilização pode prolongar o tempo de vida útil do produto, quer este esteja intacto, minimamente processado, congelado ou transformado. A sua utilização como biofilme visa essencialmente diminuir as perdas por transpiração bem como o atraso no amadurecimento dos frutos. Os filmes de quitosano são caracterizados pela elevada flexibilidade, resistência e elasticidade, sendo muito difíceis de quebrar. Estes apresentam valores variáveis de permeabilidade à água, o que permite uma maior conservação de produtos com elevado  $A_w$  (aspecto que se verifica nos frutos).

## 1.7 Valor nutricional do quitosano

Além das propriedades antioxidantes e antimicrobianas, o quitosano poderá conduzir a um valor nutricional acrescentado nos produtos onde foi aplicado. Segundo Shahidi *et al.* (1999) [30] a grande vantagem nutricional deste polissacárido é a sua acção na redução da hipercolesterolemia. Diversos estudos em animais concluíram que uma alimentação enriquecida em quitosano levava à diminuição dos valores de colesterol e triglicéridos no sêrum. Também em galinhas, foram detectados valores elevados de lipoproteínas de elevada densidade (HDL) quando a alimentação destas era enriquecida com quitosano. O efeito na hipocolesterolemia parece decorrer do facto deste polissacárido ser uma fibra, e como tal o organismo não ter capacidade para o digerir. A incapacidade de digestão do quitosano no tracto gastrointestinal, a elevada viscosidade, a natureza polimérica e a pouca solubilidade em água fazem com que esse efeito de hipocolesterolemia se acentue. Devido ao seu carácter iónico tem também capacidade para formar pontes iónicas (a pH ácidos), levando à quebra de ácidos gordos livres. O quitosano pode induzir a formação de micelas com o colesterol (endógeno ou colesterol proveniente da dieta) através dos fluidos alcalinos existentes no intestino delgado. Isso provoca a diminuição da absorção do colesterol e um aumento da concentração de ácido cólico no fígado. Esta acção vai induzir posteriormente, a diminuição da concentração de colesterol na corrente sanguínea. Os microrganismos existentes no intestino também têm a capacidade de secretar quitosanases que, ao digerir essas micelas, formam ácidos biliares e esteróis que, serão excretados nas fezes. [30].

## 1.8 Objectivos

Equacionando-se as propriedades do quitosano enquanto agente antioxidante e antimicrobiano, neste estudo infere-se a sua acção enquanto agente conservante do sumo de maçã não pasteurizado e estabilizado por hiperpressão. Efectua-se a sua adição em concentrações crescentes, evitando-se um aumento considerável da clarificação para não alterar as características nutricionais e físico-químicas do sumo de maçã.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Análises preliminares**

#### **2.1.1 Ensaio de solubilidade do quitosano em soluções aquosas de ácido ascórbico 1% e 0,5% e ácido acético 5%**

Prepararam-se soluções aquosas de ácido ascórbico 1% e 0,5% (v/v), e de ácido acético 5%, e aferiu-se o pH inicial das mesmas. Posteriormente, foram utilizadas para preparar diferentes soluções de quitosano com concentrações de 9g/L e 12,5g/L, respectivamente. O pH final foi ajustado para 3,5. As soluções foram conservadas a 4°C (durante 2 dias), verificando-se diariamente a cor, transparência e formação de precipitado. Seguidamente, essas soluções foram utilizadas para adição ao sumo de maçã não pasteurizado.

#### **2.1.2 Ensaio de solubilidade do quitosano em sumo de maçã**

Estudaram-se duas modalidades para a incorporação do quitosano ao sumo, adição em pó e adição em solução concentrada. Inicialmente, realizou-se um ensaio no qual foi adicionado quitosano em pó ao sumo de maçã (50mL); concentração final de 0,6g/L, 0,7g/L e 0,8g/L; como controlo utilizou-se sumo de maçã sem adição de quitosano. Noutro ensaio foram feitas soluções de 50mL de sumo, que além da adição de quitosano em pó (nas três concentrações determinadas), tinha também incorporação de ácido ascórbico (em pó), para ficar com uma concentração final de 1% (w/v). Posteriormente foi feita a adição de quitosano em solução (concentrações finais de 0,6g/L, 0,7g/L e 0,8g/L). Para tal, foi utilizada uma solução concentrada de 9 g/L de quitosano, inicialmente preparada em 1% e 0,5% (w/v) de ácido ascórbico. Todas as soluções foram colocadas a 4°C durante 15 dias, para análise da cor, cheiro, pH e precipitação.

## **2.2 Incorporação do quitosano nos sumos e avaliação da respectiva acção**

### **2.2.1 Matéria-prima**

O sumo de maçã utilizado neste trabalho foi cedido pela Frubaça-Cooperativa de Hortofruticultores CRL, cediada em Évora-de-Alcobaça, Leiria. Este sumo provém directamente da trituração da maçã, não apresentando adição de água, açúcar e quaisquer outros corantes ou conservantes, sendo o seu processamento caracterizado pelos seguintes passos:

1. Escolha da fruta
2. Lavagem
3. Separação automática de pedúnculo e caroço
4. Trituração
5. Homogeneização
6. Engarrafamento
7. Tratamento por hiperpressão

Para permitir um maior período de conservação este sumo foi estabilizado a frio por um tratamento por hiperpressão (4600 bar durante 115 segundos), após a embalagem do produto, levando a uma inativação dos microrganismos e impedindo a sua posterior contaminação. Após a elaboração e até chegar ao consumidor o sumo foi mantido a 4°C.

Para a produção do sumo de maçã foram utilizadas diferentes variedades de maçã produzidas no Oeste (*Granny Smith*, *Golden Delicious* e a maçã *Fuji*). A proporção com que foram utilizadas as diferentes variedades de maçãs, não é necessariamente sempre a mesma, variando de acordo com a colheita, condições climáticas, maturação e época do ano. Isso pode levar a variações de lote para lote em alguns parâmetros do sumo. Um dos exemplos é o pH que pode variar com a utilização de diferentes proporções de maçãs *Granny Smith*, *Golden Delicious* ou *Fuji*, que apresentam um pH de 3,56, 4,19 e 4,04, respectivamente [6].

### **2.2.2 Quitosano**

Para os diferentes ensaios utilizou-se quitosano de origem animal (proveniente do exoesqueleto de camarão) com baixo peso molecular (*Sigma-Aldrich*, Ref 448869) e um grau de desacetilação de 92,2%.

### **2.2.3 Tratamento**

Para estudar a influência do quitosano na conservação de sumos de maçã tratados por hiperpressão, foi feita a adição deste composto, em câmara de fluxo laminar: na forma de solução concentrada, 9 g/L de quitosano em ácido ascórbico 1%, ou em pó com adição, também em pó, de ácido ascórbico 0,5%, 0,06%, 0,07% e 0,08%. O estudo da adição em pó é muito importante, pois industrialmente é uma das formas mais práticas de adicionar este componente ao sumo durante a sua preparação.

Aplicaram-se três concentrações de quitosano, 0,6 0,7 e 0,8g/L evitando-se desta forma a clarificação e evolução de sabores associados ao quitosano no sumo de maçã.

O esquema dos ensaios (com n=3, com numeração indexada em cada tratamento) foi o seguinte:

## 1º ensaio

Tabela 2.1- Esquema representativo da estratégia utilizada para o primeiro ensaio.

Variáveis indexadas	Sumo	Água	Solução de ácido ascórbico 1%	Solução de ácido ascórbico 1% com quitosano			Ácido ascórbico em pó (Cf 0,5%)	Quitosano em pó		
				0,6 g/L	0,7 g/L	0,8 g/L		0,6 g/L	0,7 g/L	0,8 g/L
<b>B</b>	×									
<b>C<sub>n</sub></b> (n=1-3)	<b>C1</b>	×	×							
	<b>C2</b>	×		×						
	<b>C3</b>	×					×			
<b>A<sub>n</sub></b> (n=1-6)	<b>A1</b>	×			×					
	<b>A2</b>	×				×				
	<b>A3</b>	×					×			
	<b>A4</b>	×					×	×		
	<b>A5</b>	×					×		×	
	<b>A6</b>	×					×			×

Para o segundo ensaio a estratégia foi semelhante, tendo apenas sido alterada a quantidade de ácido ascórbico em pó a adicionar, de forma a ficar no sumo uma concentração final semelhante às das modalidades com o ácido ascórbico adicionado em solução.

## 2º ensaio

Tabela 2.2- Esquema representativo da estratégia utilizada para o segundo ensaio.

Variáveis indexadas	Sumo	Água	Solução de ácido ascórbico 1%	Solução de ácido ascórbico 1% com quitosano			Ácido ascórbico em pó (Cf 0,06; 0,07; 0,08%)	Quitosano em pó		
				0,6 g/L	0,7 g/L	0,8 g/L		0,6 g/L	0,7 g/L	0,8 g/L
<b>B</b>	×									
<b>C<sub>n</sub></b> (n=1-3)	<b>C1</b>	×	×							
	<b>C2</b>	×		×						
	<b>C3</b>	×					×			
<b>A<sub>n</sub></b> (n=1-6)	<b>A1</b>	×			×					
	<b>A2</b>	×				×				
	<b>A3</b>	×					×			
	<b>A4</b>	×					×	×		
	<b>A5</b>	×					×		×	
	<b>A6</b>	×					×			×

Para ambos os ensaios, na altura de preparação das diferentes modalidades de estudo, foram retiradas amostras para a determinação dos diferentes parâmetros a avaliar, bem como para a

caracterização do lote. Existiu sempre um controlo para a caracterização do lote (CL) que se caracterizava por ser apenas sumo de maçã embalado sem qualquer adição de quitosano e que pretendia avaliar o estado inicial do sumo para os diversos parâmetros analisados.

Posteriormente, foram retiradas amostras para as diferentes análises, aos 15, 21, 28 e 35 dias após o início do ensaio.

## **2.3 Avaliação do efeito da adição de quitosano ao sumo de maçã**

### **2.3.1 Determinação de sólidos solúveis totais**

O teor de sólidos solúveis totais é um indicador do estado de maturação dos frutos e pode ser determinado por refractometria. Os valores expressam-se em °Brix (grau brix) ou gramas de sacarose por 100g de peso fresco.

Para a determinação dos SST colocou-se uma amostra de sumo (aproximadamente 0,5ml) no leitor do refractómetro analógico manual (*Atago ATC-1E*), à temperatura ambiente, e procedeu-se à leitura do °Brix.

### **2.3.2 Determinação do pH**

Para a medição do pH foram retirados 10mL de amostra de sumo e colocados num copo de precipitação em agitação. Posteriormente, com o potenciómetro (*Hanna instruments, Jenway 350 pH meter*) correctamente calibrado, foi feita a leitura do pH a 25°C.

### **2.3.3 Determinação da acidez titulável**

A acidez titulável foi determinada com recurso à volumetria ácido-base e expressa em gramas de ácido málico por litro de sumo. Para tal, diluíram-se 20mL da amostra de sumo em 20mL de água destilada e procedeu-se à medição do pH inicial da amostra sob agitação. Seguidamente, procedeu-se à titulação com solução de hidróxido de sódio (0,1N), adicionando gota-a-gota, até que o pH atingisse e persistisse durante aproximadamente 10 segundos no valor de 8,20. Posteriormente procedeu-se ao cálculo da acidez titulável, utilizando um factor de correcção conhecido (0,67).

$$\text{Acidez titulável} = \text{Volume de NaOH adicionado} \times 0,67$$

### **2.3.4 Determinação da Cor**

A cor do sumo foi caracterizada com base nas coordenadas cromáticas, Luminosidade (L),

Croma (a e b) e Tonalidade. Para tal procedeu-se à calibração do colorímetro (*Minolta CR-300 chromameter, Data Processor 301*) com o padrão (placa de cerâmica branca). As leituras foram realizadas por aproximação do sensor à amostra, com 3 repetições para cada amostra. Através da utilização das coordenadas do modelo de CIELAB determinou-se o ângulo e caracterizou-se a cor da amostra.

Posteriormente, para determinar a tonalidade aplicaram-se as seguintes equações:

$$h^{\circ} = \frac{\left( \arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0;$$

$$h^{\circ} = 180 + \frac{\left( \arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* < 0;$$

$$h^{\circ} = 360 + \frac{\left( \arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0.$$

### 2.3.5 Determinação da turbidez

Efectou-se uma diluição de 1:10, com volume final de 50mL, das diferentes amostras e controlos. Foi calibrado o turbidímetro (*Merck Turbiquant 1500 IR*) com 3 soluções padrão e seguidamente foi lida a turbidez das amostras.

### 2.3.6 Determinação açúcares por HPLC

A metodologia para a extracção dos açúcares das diferentes amostras foi adaptada de Hudina and Stamper (2000) [13]. Colocaram-se 20mL de água desionizada fria em copos de precipitação de 50mL e foram adicionados 5mL de sumo de maçã. Estas etapas foram realizadas com os copos sempre mantidos em gelo.

Transferiram-se os 25mL da amostra para tubos de centrifuga e centrifugou-se a 15000xg, durante 15 min a 4°C (*Centrífuga Blofuge 28 RS Heraeus Sepatech*). O sobrenadante foi recolhido para um balão volumétrico e filtrado com seringas e filtros Millipore de 0,45 µm. Procedeu-se então à respectiva congelação (-20°C).

O método para análise das amostras por HPLC foi adaptado de Pais *et al.* (2008) [24]. Efectou-se uma solução padrão com sacarose, glucose, frutose e sorbitol, para proceder à construção da curva de calibração. Injectaram-se 30 µL num sistema HPLC (*Waters binary HPLC*),

equipado com um detector de Índice de Refracção (IR) (Waters 2414) com coluna de fase reversa *Sugar-Pak I* (300x6,5mm; *Waters*) em forno a 90°C. O eluente utilizado foi água pura com 50ppm de EDTA-Ca, com um fluxo de 0,5mL/min. Após descongelação e homogenização, procedeu-se à injeção (automática) de 30 µL da amostra.

### 2.3.7 Determinação compostos fenólicos

O método para a determinação de compostos fenólicos foi adaptado de *Vieira et al.* (2009) [32]. A curva padrão foi elaborada com soluções de ácido gálico (50, 100, 150, 250 e 500 mg/L) e a absorvência foi lida a um comprimento de onda de 760nm (*UV-visible recording spectrophotometer UV-160<sup>a</sup> Shimadzu*).

Para extrair os compostos fenólicos, colocou-se 1mL de sumo em 9mL de solução de acetona 80%, num banho de ultra-sons (*Sonope RK31 Badelin Electronic*), durante 15 minutos. Posteriormente, procedeu-se à centrifugação das amostras a 1000xg, durante 10 minutos a 5°C e foi recolhido o sobrenadante. Todos os extractos foram efectuados em triplicado.

Para quantificação de composto fenólicos, colocou-se num balão volumétrico de 10mL, 2,5mL de água desionizada e 0,1mL de uma diluição conhecida do extracto. Em seguida adicionou-se 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu à solução e deixou-se reagir durante 5 minutos. Colocou-se 1,5mL de carbonato de sódio a 20% no balão volumétrico e perpez-se o volume com água desionizada até 10mL. A leitura da absorvência foi efectuada duas horas depois durante as quais amostras permaneceram na ausência de luz. A absorvência das amostras foi efectuada a 760nm. Compararam-se as medições com as obtidas na curva padrão preparada com soluções de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100mL +/- desvio padrão de sumo de maçã.

### 2.3.8 Determinação de ácido ascórbico

A determinação de ácido ascórbico foi realizada de acordo com *Albuquerque et al.* (2005) [1]. Foi preparada uma solução de ácido metafosfórico 6% e 4mL de sumo foram adicionados a 6mL deste ácido.

Essa solução foi centrifugada a 15000xg, durante 15 minutos, a 4°C. Posteriormente procedeu-se à filtração com um filtro Millipore de 0,45µm. Até a análise por HPLC as amostras foram congeladas a -80°C. Posteriormente foram injectados 20µL num HPLC da *Beckman* (modelo 126) com coluna *Spherisorb ODS-2* da *Waters* (250x4,6mm) e detector a 254nm. Utilizou-se uma fase móvel aquosa acidificada a pH 2,2 (280mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-97% por Litro de água), com uma velocidade isocrática de 0,4mL/min à temperatura ambiente, Cada corrida demorou aproximadamente 13 minutos.

A identificação do ascorbato foi realizada com um padrão de ácido L-ascórbico de concentração conhecida, usando para quantificação a área dos picos nos cromatogramas.

### 2.3.9 Análises microbiológicas

Foram feitos três ensaios microbiológicos para verificar a existência de mesófilos e psicrófilos. Inicialmente, em câmara de fluxo laminar, foi retirado cerca de 1mL de amostra de sumo e foram feitas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 numa solução de água de peptona 0,1% (w/v), pH 7 para bactérias. Posteriormente foi inoculado 1mL de cada diluição em placas de petri com meio PCA (5g triptone, 2,5g extracto de levedura, 1g glucose, 15g agár, dissolvidos em 1L de água; pH final ajustado a 7) para a determinação de mesófilos e psicrófilos. As placas foram a incubar, dois dias a 30°C para quantificação de mesófilos e dez dias a 4°C para quantificação de psicrófilos. A contagem de unidades formadoras de colónias foi expressa em UFC/mL.

### 2.3.10 Análise sensorial

Para a análise sensorial utilizou-se um painel de provadores não treinado. Cada provador recebeu três amostras de sumo (aproximadamente 50mL por amostra) em copo de plástico, bolachas de água e sal e um copo de água para eliminar sabores entre as amostras (figura 2.1). Todas as amostras apresentavam um código aleatório de três dígitos e foram entregues segundo a seguinte ordem: primeiro o sumo de maçã sem adição de quitosano, posteriormente o sumo de maçã com adição de quitosano em solução de ácido ascórbico 1% com concentração final no sumo de 0,8g/L e por último o sumo com o ácido ascórbico e quitosano 0,8g/L adicionado em pó.

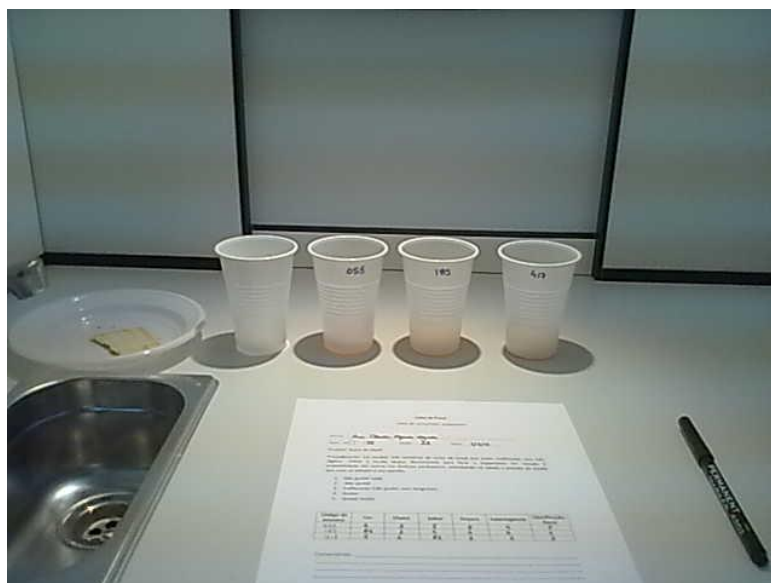


Figura 2.1- Cabine de provas para a análise sensorial dos sumos maçã.

Posteriormente, numa escala de 1 a 5 (em que 1 e 5 significavam “não gostei nada” e “gostei muito”, respectivamente) pediu-se aos provadores para fazer o julgamento da amostra em relação aos seguintes parâmetros: cor, cheiro, sabor, doçura e adstringência, e para atribuir uma avaliação para a classificação global (folha de prova em Anexo I).

### **2.3.11 Análise estatística**

Aplicou-se o teste ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) para avaliação de diferenças nos resultados. Com base nos resultados obtidos com o teste ANOVA aplicou-se o teste de Tukey para comparação de médias (considerando um intervalo de confiança de 95%). Letras diferentes indicam diferenças significativas para um grau de confiança de 95%.

Para estudo da análise sensorial procedeu-se a aplicação de uma análise multivariada com o programa Statistica 6.0 (Software Copyright Statsoft Inc.).

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Ensaio de solubilidade

Uma vez que o quitosano não é solúvel em soluções aquosas (23) foi necessário proceder à determinação da sua solubilidade em ácidos fracos, como o ácido ascórbico e o ácido acético.

Prepararam-se soluções de 9g/L de quitosano em ácido ascórbico 0.5% e 1% e 12,5g/L de quitosano em ácido acético 5%. O pH inicial destas soluções foi de 3,68 e 3,94 para as soluções em ácido ascórbico, e 3,08 para a solução em ácido acético. Ajustou-se o pH das mesmas para um valor final de 3,5. As soluções foram conservadas a 4°C durante 2 dias. Observou-se que, nas condições testadas, o quitosano se dissolve completamente após 10min de agitação vigorosa. Após 2 dias de armazenamento, as soluções apresentaram um índice de precipitação residual.

Estas soluções concentradas, preparadas 24 horas antes e conservadas a 4°C, foram posteriormente utilizadas para adicionar ao sumo e verificar se existiam alterações visuais significativas. Deste modo verificou-se, para o caso do ácido acético, a formação de um precipitado viscoso com difícil dissolução.



Figura 3.1.1- Da esquerda para a direita: amostras de sumo sem adição de solução e amostras de sumo com adição de 4 concentrações de quitosano em solução de ácido acético 5%: 0,3g/L, 0,5g/L, 0,8g/L e 1g/L, respectivamente.

Apesar do sumo já apresentar visualmente precipitado, com a adição da solução de quitosano em ácido acético observou-se uma clarificação do sumo, efeito que para um sumo de maçã com polpa não é desejado pelo consumidor (Figura 3.1.1).

Nos sumos com adição de quitosano em solução de ácido ascórbico essa clarificação não foi tão evidente, evoluindo um aspecto em tudo semelhante ao sumo existente no mercado (Figura 3.1.2).

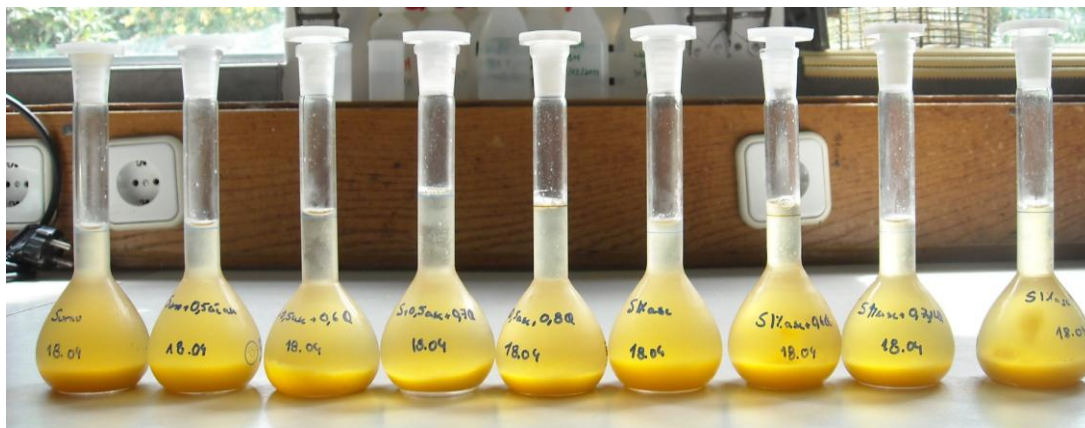


Figura 3.1.2- Solubilidade de solução de quitosano em ácido ascórbico 0,5 e 1% em sumo de maçã. As amostras correspondem, respectivamente, a um branco só com sumo, controlo com solução de ácido ascórbico 0,5% e 3 balões com solução de quitosano e ácido ascórbico 0,5% na concentração 0,6g/L, 0,7g/L e 0,8g/L e um controlo de ácido ascórbico 1% e mais 3 balões com concentrações de quitosano semelhantes.

O mesmo foi feito para a adição do quitosano em pó com igual adição de ácido ascórbico em pó, sendo os resultados semelhantes aos do ensaio de solubilidade do quitosano em solução.

### 3.2 Efeito da adição de quitosano em sumo de maçã

A adição das diferentes formas de quitosano foi acompanhada pela análise de diversos parâmetros que são essenciais para a comercialização e aceitação do sumo de maçã pelos consumidores. Neste contexto procedeu-se à análise de parâmetros físico-químicos (pH, a cor, acidez, turbidez), e do valor nutricional do sumo (teor de açúcares, compostos fenólicos e ácido ascórbico). Também foram tidos em conta valores microbiológicos, considerados essenciais à segurança do consumidor.

Após adição das soluções e do quitosano em pó verificou-se a formação de um precipitado em todas as amostras (bem como nos controlos e nos brancos), sendo que para as amostras em que não tinha sido adicionado nem ácido ascórbico, nem quitosano evoluem uma tonalidade acastanhada. Paralelamente, os controlos com ascórbico e as amostras com quitosano apresentaram uma tonalidade mais clara (amarela-alaranjada) (Anexo 2).

Uma vez que o sumo de maçã não pasteurizado estabilizado por hiperpressão tem um prazo de validade de aproximadamente 4 semanas (devendo ser conservado a 4°C), os ensaios decorreram durante 5 semanas após adição das diferentes formas de quitosano ao sumo, sendo que o sumo apresentava já uma semana desde a altura da confecção e embalagem.

Passadas essas 5 semanas, como adiante se verá, existiram parâmetros que apresentaram maior variação com adição de quitosano nas amostras, outros pelo contrário apresentaram uma maior estabilidade com a introdução da fibra ao sumo.

### 3.2.1 Efeito no pH

O pH foi um dos parâmetros que apresentou ligeira variação com a adição de ambas as formas de quitosano, sendo notada uma diminuição significativa de pH logo ao tempo zero para o primeiro ensaio, com as amostras que continham ácido ascórbico e quitosano em pó (Tabela 3.2.1.1). Tal ocorreu porque a concentração elevada de ácido ascórbico (0,5%, w/v), mesmo com pH a 3,5, provoca uma ligeira diminuição de pH. Ao longo das 5 semanas em todas as modalidades ocorreu uma quebra no pH, sendo essa diminuição menos notória em relação ao branco das amostras com quitosano adicionado em solução (A1 a A3) (Figura 3.2.1.1).

Tabela 3.2.1.1- Variação dos valores médios de pH para as diferentes modalidades no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de pH (a,b,c,d) e entre tratamentos (r,s,t,u,v). DP= Desvio Padrão

Tratamento	pH ± (DP)				
	Dia 1	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 35
CL	3,76 ±0,02				
B	3,67 <sub>a,s</sub> ±0,01	3,57 <sub>b,r</sub> ±0,01	3,53 <sub>c,r</sub> ±0,01	3,52 <sub>c,r</sub> ±0,01	3,52 <sub>c,r</sub> ±0,02
C1	3,71 <sub>a,r</sub> ±0,03	3,583 <sub>b,r</sub> ±0,01	3,53 <sub>c,r</sub> ±0,00	3,51 <sub>c,r</sub> ±0,01	3,49 <sub>d,s</sub> ±0,01
C2	3,70 <sub>a,r</sub> ±0,00	3,583 <sub>b,r</sub> ±0,01	3,53 <sub>c,r</sub> ±0,00	3,52 <sub>c,r</sub> ±0,01	3,50 <sub>c,r,s</sub> ±0,02
C3	3,53 <sub>a,u</sub> ±0,02	3,4 <sub>b,t</sub> ±0,02	3,34 <sub>c,t</sub> ±0,02	3,35 <sub>c,t</sub> ±0,02	3,32 <sub>c,v</sub> ±0,04
A1	3,71 <sub>a,r</sub> ±0,00	3,58 <sub>b,r</sub> ±0,01	3,52 <sub>c,r</sub> ±0,01	3,53 <sub>c,r</sub> ±0,00	3,50 <sub>c,r,s</sub> ±0,01
A2	3,71 <sub>a,r,s</sub> ±0,01	3,59 <sub>b,r</sub> ±0,00	3,53 <sub>c,r</sub> ±0,02	3,54 <sub>c,r</sub> ±0,00	3,51 <sub>d,r</sub> ±0,01
A3	3,72 <sub>a,r</sub> ±0,01	3,59 <sub>b,r</sub> ±0,01	3,53 <sub>c,r</sub> ±0,01	3,53 <sub>c,r</sub> ±0,01	3,53 <sub>c,r,s</sub> ±0,01
A4	3,57 <sub>a,t</sub> ±0,01	3,45 <sub>b,s</sub> ±0,01	3,397 <sub>c,s</sub> ±0,01	3,39 <sub>c,s</sub> ±0,00	3,36 <sub>d,u</sub> ±0,01
A5	3,58 <sub>a,t</sub> ±0,01	3,47 <sub>b,s</sub> ±0,01	3,4 <sub>c,s</sub> ±0,02	3,4 <sub>c,s</sub> ±0,00	3,37 <sub>d,t,u</sub> ±0,01
A6	3,58 <sub>a,t</sub> ±0,01	3,47 <sub>b,s</sub> ±0,00	3,41 <sub>c,s</sub> ±0,01	3,41 <sub>c,s</sub> ±0,01	3,39 <sub>c,t</sub> ±0,01

Neste primeiro ensaio detectaram-se diferenças significativas no pH ao longo do tempo, entre as amostras com adição de quitosano em solução e em pó.

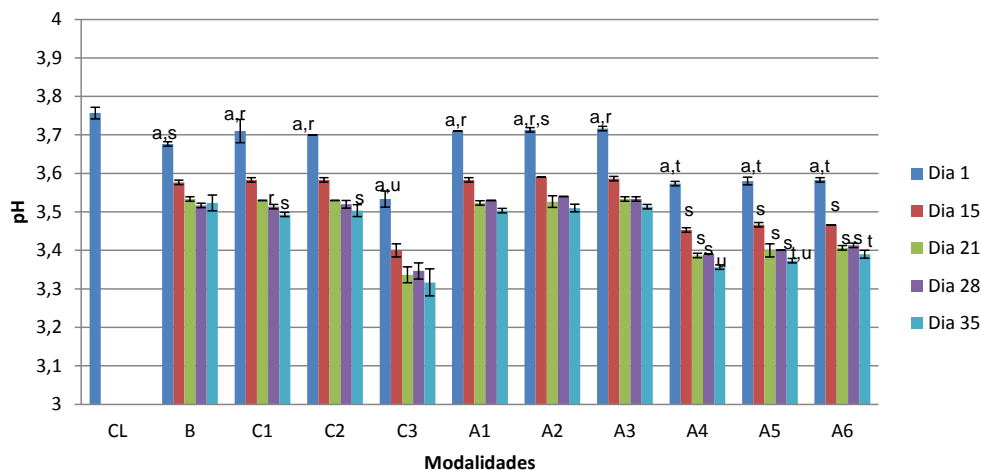


Figura 3.2.1.1- Variação do pH ao longo do tempo para as diferentes modalidades no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de pH (a) e entre tratamentos (r,s,t,u,v).

No segundo ensaio, a discrepância entre os valores de pH, obtidos nas diferentes semanas para as amostras com adição de quitosano em solução (A1 a A3) e as amostras em que foi adicionado em pó (A4 a A6) não foi tão elevada (Tabela 3.2.1.2). Neste caso, a concentração final de ácido ascórbico nas duas formas de adição similar. Após 5 semanas, a variação de pH também se manteve constante para praticamente todas as amostras, controlos e brancos, inclusive para as modalidades onde tinha sido adicionado quitosano em pó.

Tabela 3.2.1.2- Variação dos valores médios de pH no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de pH (a,b,c,d) e entre tratamentos (r,s,t). DP=Desvio Padrão

Tratamento	pH ± (DP)				
	Dia 1	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 35
CL	3,72 ±0,01				
B	3,73 <sup>a,r</sup> ±0,01	3,47 <sup>d,s</sup> ±0,01	3,50 <sup>c,s</sup> ±0,01	3,47 <sup>d,r,s,t</sup> ±0,00	3,55 <sup>b,r</sup> ±0,01
C1	3,71 <sup>a,r,s</sup> ±0,02	3,50 <sup>c,s,t</sup> ±0,01	3,49 <sup>c,s</sup> ±0,01	3,49 <sup>c,r,s</sup> ±0,01	3,55 <sup>b,r</sup> ±0,02
C2	3,72 <sup>a,r,s</sup> ±0,01	3,47 <sup>c,d,t</sup> ±0,01	3,49 <sup>c,s</sup> ±0,02	3,45 <sup>d,t,u</sup> ±0,01	3,51 <sup>b,s</sup> ±0,03
C3	3,69 <sup>a,s</sup> ±0,00	3,47 <sup>c,t</sup> ±0,01	3,46 <sup>c,t</sup> ±0,01	3,43 <sup>d,t,u</sup> ±0,01	3,47 <sup>b,t</sup> ±0,01
A1	3,70 <sup>a,r,s</sup> ±0,01	3,48 <sup>c,t</sup> ±0,00	3,49 <sup>b,c,s</sup> ±0,01	3,48 <sup>c,r,s,t</sup> ±0,01	3,51 <sup>b,s</sup> ±0,02
A2	3,69 <sup>a,s</sup> ±0,02	3,48 <sup>c,d,t</sup> ±0,01	3,50 <sup>b,c,r,s</sup> ±0,12	3,46 <sup>d,s,t</sup> ±0,01	3,52 <sup>b,r,s</sup> ±0,01
A3	3,69 <sup>a,s</sup> ±0,01	3,49 <sup>c,s</sup> ±0,02	3,49 <sup>c,s,t</sup> ±0,00	3,47 <sup>c,r,s,t</sup> ±0,01	3,53 <sup>b,r,s</sup> ±0,01
A4	3,70 <sup>a,r,s</sup> ±0,01	3,53 <sup>b,r</sup> ±0,01	3,5 <sup>c,r,s</sup> ±0,23	3,48 <sup>c,r,s,t</sup> ±0,01	3,54 <sup>b,r</sup> ±0,02
A5	3,70 <sup>a,r,s</sup> ±0,01	3,52 <sup>b,r,s</sup> ±0,01	3,53 <sup>b,r</sup> ±0,12	3,50 <sup>b,c,r</sup> ±0,01	3,49 <sup>c,t</sup> ±0,01
A6	3,71 <sup>a,r,s</sup> ±0,01	3,53 <sup>b,c,r</sup> ±0,01	3,51 <sup>c,d,r,s</sup> ±0,00	3,50 <sup>d,r</sup> ±0,00	3,55 <sup>b,r</sup> ±0,00

Ocorre uma alteração significativa de pH ao longo do tempo. Verifica-se na segunda semana (dia 15) uma diminuição acentuada em todas as modalidades (Figura 3.2.1.2). Nas restantes semanas essa variação não é tão acentuada. Também, não se verificam diferenças significativas entre as concentrações de quitosano utilizadas em ambos os ensaios (tanto em pó como em solução). Observou-se assim que de 0,6g/L para 0,8g/L a acção do quitosano no pH não ocorre.

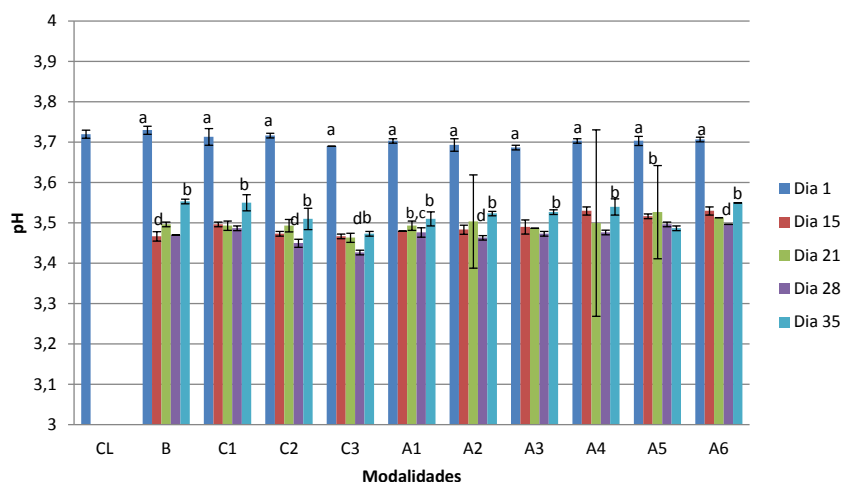


Figura 3.2.1.2- Variação do pH ao longo do tempo para as diferentes modalidades no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de pH (a,b,c,d).

### 3.2.2 Sólidos solúveis totais

Para os sólidos solúveis totais existem diferenças significativas, em ambos os ensaios, entre as modalidades A1 a A3, quando comparadas com as modalidades A4 a A6 ( $P \leq 0,05$ ). No primeiro ensaio, comparando os valores obtidos para a média do branco, com a média das restantes modalidades ao longo do tempo, verifica-se que nas amostras A4 a A6 e no respectivo controlo (C3), o valor de SST é mais próximo ao do sumo original (Tabela 3.2.2.1), exceptuam-se as duas últimas medições, onde o valor de SST foi inferior ao do branco. Para as restantes modalidades, o valor de SST ao longo do tempo foi sempre inferior ao branco. No segundo ensaio verifica-se a mesma tendência, embora as diferenças não sejam significativas (Tabela 3.2.2.2).

Tabela 3.2.2.1- Variação dos valores médios de sólidos solúveis totais no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de sólidos solúveis totais (a,b,c,) e entre tratamentos (r,s,t,u). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	Sólidos Solúveis Totais ± DP				
	Dia 1	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 35
CL	14 ±0,00				
B	13,93 <sub>a,b,r</sub> ±0,12	14 <sub>a,r</sub> ±0,00	13,93 <sub>a,b,r</sub> ±0,12	13,67 <sub>b,c,s</sub> ±0,23	13,33 <sub>c,t</sub> ±0,50
C1	12,8 <sub>a,u</sub> ±0,00	12,73 <sub>a,s</sub> ±0,12	12,73 <sub>a,s</sub> ±0,12	12,27 <sub>b,u</sub> ±0,12	12,07 <sub>b,v</sub> ±0,12
C2	13 <sub>a,s,u</sub> ±0,00	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	12,8 <sub>a,b,t</sub> ±0,00	12,33 <sub>b,v</sub> ±0,42
C3	14,27 <sub>a,r</sub> ±0,12	14,2 <sub>a,r</sub> ±0,20	14,27 <sub>a,r</sub> ±0,12	14 <sub>a,b,r,s</sub> ±0,00	13,93 <sub>b,u</sub> ±0,12
A1	13,2 <sub>a,s,u</sub> ±0,00	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13,07 <sub>a,t</sub> ±0,12	13,2 <sub>a,t</sub> ±0,00
A2	13,07 <sub>a,s,u</sub> ±0,12	12,87 <sub>a,s</sub> ±0,23	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13,13 <sub>a,t</sub> ±0,12	13 <sub>a,t</sub> ±0,00
A3	13 <sub>a,s,u</sub> ±0,00	12,93 <sub>a,s</sub> ±0,12	12,93 <sub>a,s</sub> ±0,12	13 <sub>a,t</sub> ±0,00	13 <sub>a,t</sub> ±0,00
A4	14,13 <sub>a,r</sub> ±0,12	14,13 <sub>a,r</sub> ±0,12	14,13 <sub>a,r</sub> ±0,12	14,2 <sub>a,r</sub> ±0,20	14,13 <sub>a,r,u</sub> ±0,12
A5	14,27 <sub>a,r</sub> ±0,12	14 <sub>a,r</sub> ±0,10	14,27 <sub>a,r</sub> ±0,12	14,2 <sub>a,r</sub> ±0,00	14,2 <sub>a,r,u</sub> ±0,00
A6	14,2 <sub>a,r</sub> ±0,00	14,13 <sub>a,r</sub> ±0,12	14,2 <sub>a,r</sub> ±0,00	14,13 <sub>a,r</sub> ±0,12	14,33 <sub>a,r</sub> ±0,12

Também para este caso, tal como para o pH, não existem diferenças acentuadas para as diferentes concentrações de quitosano adicionado. Perspectivando-se assim, mais uma vez, que o quitosano não provocou uma alteração significativa dos sólidos solúveis totais do sumo de maçã.

Tabela 3.2.2.2- Variação dos valores médios de sólidos solúveis totais no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de sólidos solúveis totais (a,b,c,) e entre tratamentos (r,s,t,u). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	Sólidos Solúveis Totais ± DP				
	Dia 1	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 35
CL	13,9 ±0,12				
B	13,93 <sub>a,r</sub> ±0,12	13,87 <sub>a,r</sub> ±0,12	13,8 <sub>a,r</sub> ±0,00	13,93 <sub>a,r</sub> ±0,12	13,87 <sub>a,r</sub> ±0,12
C1	13,2 <sub>a,s</sub> ±0,35	13,13 <sub>a,s</sub> ±0,42	12,87 <sub>a,b,s</sub> ±0,31	13,27 <sub>a,s</sub> ±0,70	12,7 <sub>b,u</sub> ±0,64
C2	13,07 <sub>a,s</sub> ±0,12	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	12,93 <sub>a,s</sub> ±0,12	13,07 <sub>a,s</sub> ±0,12	12,8 <sub>a,u</sub> ±0,20
C3	14 <sub>a,r</sub> ±0,00	13,93 <sub>a,r</sub> ±0,12	13,87 <sub>a,r</sub> ±0,23	13,87 <sub>a,r</sub> ±0,23	13,6 <sub>a,r,s</sub> ±0,40
A1	13,2 <sub>a,s</sub> ±0,00	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13,13 <sub>a,s,t</sub> ±0,12
A2	13,07 <sub>a,s</sub> ±0,12	13,07 <sub>a,s</sub> ±0,12	13,13 <sub>a,s</sub> ±0,12	13,07 <sub>a,s</sub> ±0,12	13 <sub>a,t,u</sub> ±0,00
A3	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	12,93 <sub>a,s</sub> ±0,12	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13 <sub>a,s</sub> ±0,00	13 <sub>a,t,u</sub> ±0,00
A4	14 <sub>a,r</sub> ±0,00	13,93 <sub>a,r</sub> ±0,12	13,87 <sub>a,r</sub> ±0,23	13,87 <sub>a,r</sub> ±0,23	13,33 <sub>b,s,t</sub> ±0,12
A5	13,87 <sub>a,b,r,s</sub> ±0,23	13,93 <sub>a,r</sub> ±0,12	13,93 <sub>a,r</sub> ±0,12	13,93 <sub>a,r</sub> ±0,12	13,47 <sub>b,r,s</sub> 0,31
A6	14 <sub>a,r</sub> ±0,00	14 <sub>a,r</sub> ±0,00	14 <sub>a,r</sub> ±0,00	14 <sub>a,r</sub> ±0,00	14 <sub>a,r</sub> ±0,00

Para todas as modalidades, a variação de sólidos solúveis totais ao longo das semanas não é significativa ( $P \leq 0.05$ ), exceptuando-se a última semana para as amostras C1, A4 e A5.

Para todas as amostras, a variação de sólidos solúveis totais foi pouco acentuada ao longo do ensaio, oscilando entre 12 e 14,4. Em geral, para este parâmetro existem diferenças de acordo com as variedades de maçã utilizada, sendo por exemplo cerca de 17,2 para Fuji, 13,0 para *Golden Delicious* e 13,0 para a *Granny Smith* [6]. O valor mais alto de sólidos solúveis totais referido para a maçã Reineta é de 15,0 e o menor para a *Granny Smith* de 10,8, apresentando a maior parte das variedades valores próximos de 13, por exemplo a *Starking* com 13,2, a *Galaxi* com 13,3 e a *Jonagored* com 13,7 [6]. A ligeira variação de SST para as modalidades com a adição do quitosano encontra-se ainda entre estes valores, verifica-se assim que para este produto, não promove, ao longo do tempo, uma alteração significativa dos valores de SST. Chartterjee *et al.* (2004) [4], verificaram que a adição de quitosano não altera significativamente os valores de SST do sumo de maçã, valor que neste caso corresponde 13,24.

### 3.2.3 Acidez titulável

Inicialmente verifica-se uma diferença significativa ( $P \leq 0.05$ ) na acidez titulável, em todas as modalidades com adição de quitosano em pó (A4 a A6) e respectivo controlo, relativamente às restantes modalidades (Tabela 3.2.3.1).

Tabela 3.2.3.1- Variação dos valores médios de acidez titulável (g de ácido málico/Litro de sumo) no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de acidez titulável (a,b,c) e entre tratamentos (r,s,t,u,v). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	Acidez Titulável ± DP			
	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 35
CL	9,53 ±0,03			
B	9,39 <sub>a,s,t</sub> ±0,21	10,16 <sub>a,t</sub> ±0,58	9,19 <sub>a,s,t,u</sub> ±0,16	9,92 <sub>a,t,u</sub> ±0,41
C1	8,45 <sub>b,s,t</sub> ±0,10	9,33 <sub>b,t</sub> ±0,23	8,04 <sub>b,u</sub> ±0,13	11,60 <sub>a,s,t</sub> ±1,63
C2	9,08 <sub>a,b,s,t</sub> ±0,50	9,62 <sub>a,b,t</sub> ±0,56	8,59 <sub>b,t,u</sub> ±0,43	10,18 <sub>a,t,u</sub> ±0,45
C3	14,19 <sub>a,r</sub> ±0,37	14,60 <sub>a,r</sub> ±0,10	11,89 <sub>b,r</sub> ±0,46	13,45 <sub>a,r</sub> ±0,70
A1	8,93 <sub>a,s,t</sub> ±0,25	9,58 <sub>a,t</sub> ±0,10	9,29 <sub>a,s,t,u</sub> ±0,61	8,98 <sub>a,u,v</sub> ±0,97
A2	7,74 <sub>b,t</sub> ±2,66	9,19 <sub>a,t</sub> ±0,16	8,12 <sub>a,b,u</sub> ±0,39	8,92 <sub>a,b,u,v</sub> ±0,61
A3	9,55 <sub>a,s</sub> ±0,87	9,46 <sub>a,t</sub> ±0,12	8,11 <sub>a,b,u</sub> ±0,41	7,95 <sub>b,v</sub> ±0,30
A4	12,93 <sub>a,r</sub> ±0,10	12,90 <sub>a,r,s</sub> ±0,21	10,29 <sub>b,r,s,t</sub> ±0,16	12,37 <sub>a,r,s</sub> ±0,24
A5	12,69 <sub>a,r</sub> ±0,14	12,76 <sub>a,s</sub> ±0,22	10,31 <sub>b,r,s</sub> ±0,12	12,13 <sub>a,r,s</sub> ±0,65
A6	13,53 <sub>a,r</sub> ±0,37	12,43 <sub>a,b,s</sub> ±0,19	10,43 <sub>c,r</sub> ±0,61	11,40 <sub>b,c,s,t</sub> ±0,80

Neste caso, o controlo das amostras em pó (C3) apresenta um valor elevado de acidez titulável devido à elevada concentração de ácido ascórbico adicionada (0,5 % (w/v)). Quando comparados com os resultados do branco (B) verifica-se também que todas as amostras em que a adição do quitosano era feita em solução de ácido ascórbico apresentam um menor valor na acidez titulável, exibindo diferenças significativas para as maiores concentrações de quitosano (Figura 3.2.3.1). Ainda para o primeiro ensaio, não se detectaram diferenças acentuadas entre as três concentrações de quitosano e em ambas as formas de adição do quitosano, verificando-se assim que para esta gama de concentrações o quitosano se comporta de forma semelhante na evolução da acidez titulável.

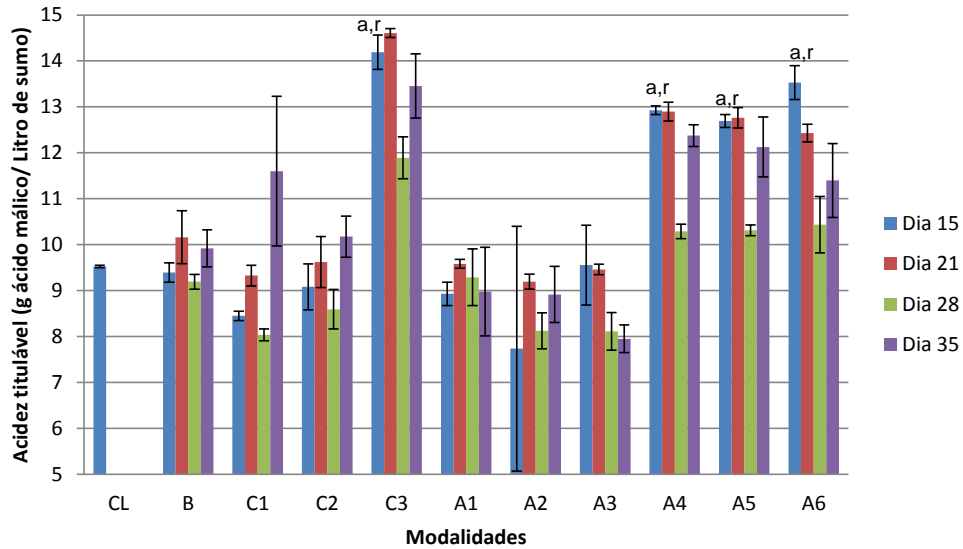


Figura 3.2.3.1- Variação da acidez titulável no 1ºensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de acidez titulável (a) e entre tratamentos (r).

No segundo ensaio a discrepância não é tão acentuada entre as diferentes modalidades, sendo o máximo da acidez titulável cerca de 11,07 g de ácido málico/Litro de sumo, por oposição aos quase 13,5g de ácido málico/Litro, determinados para C3 no primeiro ensaio (Tabela 3.2.3.2). Apesar das diferenças não serem muito acentuadas para A4 e A5, a acidez titulável apresenta valores ligeiramente superiores aos restantes nas duas últimas medições (Tabela 3.2.3.2). No entanto, é de notar ainda, que o lote do primeiro ensaio apresentou um valor de acidez titulável superior ao do segundo ensaio, sendo um dos factores que provocou um acréscimo da acidez titulável para todas as modalidades desse ensaio. Como já foi referido, a utilização de diferentes variedades de maçã para a produção de sumo poderá influenciar a evolução de diversos parâmetros, como é o caso da acidez titulável. Assim, de acordo com Domingos de Almeida (2007) [6], a acidez varia com a variedade utilizada, apresentando a maçã Reineta e *Granny Smith* maior acidez titulavel, com as *Golden Delicious* e *Starking* revelando uma tendência oposta. As diferenças de lote do primeiro para o segundo ensaio podem dever-se à utilização de uma maior quantidade de maçãs *Granny Smith* e *Golden Delicious*, respectivamente.

Tabela 3.2.3.2- Variação dos valores médios de acidez titulável no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de acidez titulável (a,b) e entre tratamentos (r,s,t). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	Acidez Titulável ± DP			
	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 35
CL	8,74 ±0,21			
B	8,68 <sub>a,b,r</sub> ±0,07	9,34 <sub>a,r</sub> ±0,21	8,44 <sub>b,r,s</sub> ±0,26	8,58 <sub>b,t</sub> ±0,36
C1	8,60 <sub>a,b,r</sub> ±0,38	8,92 <sub>a,b,r</sub> ±0,16	8,17 <sub>b,r,s</sub> ±0,36	9,33 <sub>a,t</sub> ±0,44
C2	8,21 <sub>b,r</sub> ±0,44	8,59 <sub>a,b,r</sub> ±0,17	8,20 <sub>b,r,s</sub> ±0,01	9,16 <sub>a,s,t</sub> ±0,70
C3	8,89 <sub>a,r</sub> ±0,35	9,34 <sub>a,r</sub> ±0,11	8,58 <sub>a,r,s</sub> ±0,38	9,23 <sub>a,s,t</sub> ±0,53
A1	8,46 <sub>a,b,r</sub> ±0,21	9,04 <sub>a,r</sub> ±0,11	8,20 <sub>b,r,s</sub> ±0,11	8,61 <sub>a,b,t</sub> ±0,49
A2	8,17 <sub>a,r</sub> ±0,50	8,71 <sub>a,r</sub> ±0,13	8,25 <sub>a,r,s</sub> ±0,13	8,46 <sub>a,t</sub> ±0,16
A3	8,42 <sub>a,b,r</sub> ±0,21	8,49 <sub>a,r</sub> ±0,26	7,65 <sub>b,s</sub> ±0,31	8,26 <sub>a,b,t</sub> ±0,22
A4	8,92 <sub>b,r</sub> ±0,26	9,04 <sub>b,r</sub> ±0,74	9,17 <sub>b,r</sub> ±0,54	10,21 <sub>a,r,s</sub> ±0,83
A5	8,38 <sub>b,r</sub> ±0,06	8,74 <sub>b,r</sub> ±0,12	9,04 <sub>b,r</sub> ±0,75	11,07 <sub>a,r</sub> ±0,50
A6	8,65 <sub>a,b,r</sub> ±0,10	8,91 <sub>a,b,r</sub> ±0,67	8,27 <sub>b,r,s</sub> ±0,17	9,08 <sub>a,t</sub> ±0,61

Tal como ocorreu para o primeiro ensaio, também neste caso se verificou, em praticamente todas as modalidades, um ligeiro aumento da acidez titulável ao longo do tempo. Este aumento foi consideravelmente superior na última semana para as amostras com menores concentrações de quitosano em pó (A4 e A5) (Figura 3.2.3.2). Assim, neste caso, e ao contrário do primeiro, detectou-se uma possível influência da concentração de quitosano no aumento da acidez titulável do sumo. Para as mesmas concentrações de quitosano (0,6g/L e 0,7g/L), quando adicionadas em solução essa progressão não se verificou.

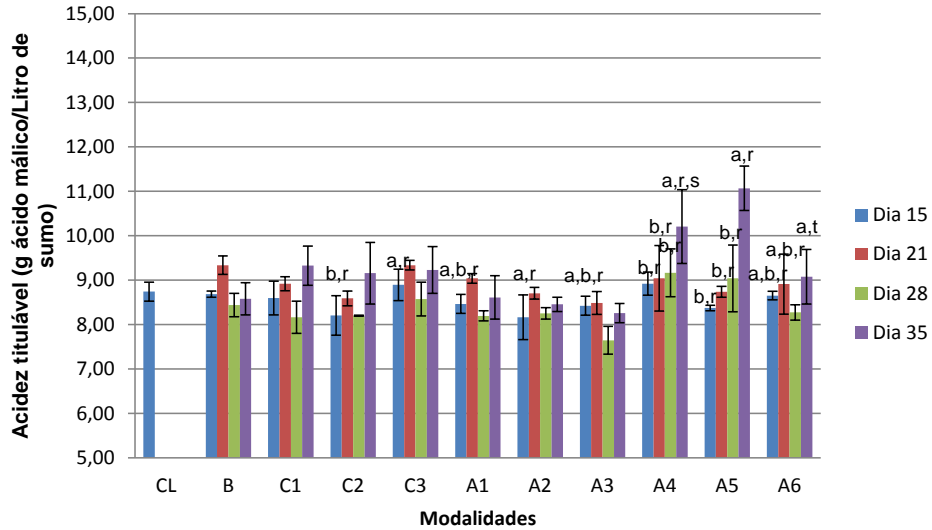


Figura 3.2.3.2- Variação da Acidez titulável no 2ºensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de acidez titulável (a,b,) e entre tratamentos (r,s,t).

### 3.2.4 Análise colorimétrica

A avaliação do efeito do quitosano na cor dos sumos foi por colorimetria. Para tal, além da caracterização do lote realizado no início do ensaio, foram feitas 4 leituras ao longo do tempo para cada modalidade. Nestas medições determinaram-se as coordenadas de Cielab (L, a e b) para se determinar a tonalidade da amostra, que é expressa em graus, e que pode ser facilmente convertida em cores através do diagrama de Cielab (Figura 3.2.4.1).

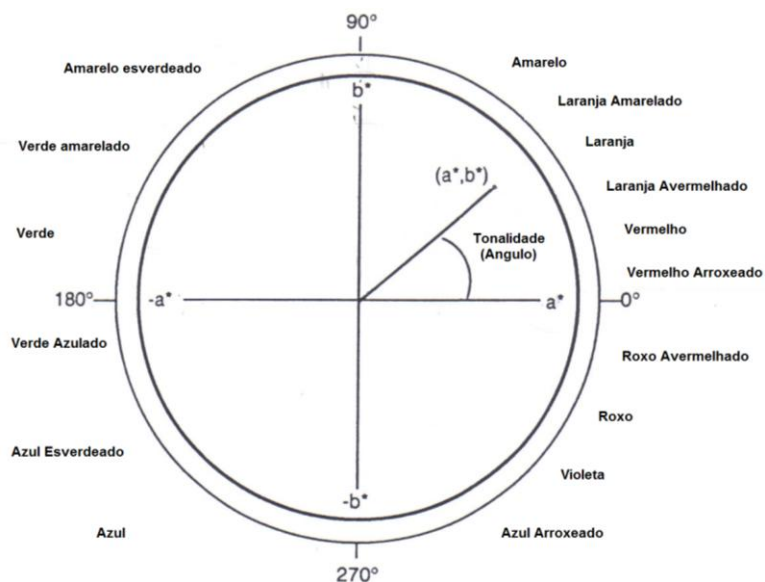


Figura 3.2.4.1- Diagrama de Cielab (adaptado de 33)

Inicialmente, na caracterização do lote, verificou-se que o sumo de maçã apresentava uma tonalidade de 112,31°, correspondendo esse valor, segundo o diagrama de Cielab, a uma cor próxima ao amarelo-esverdeado. No entanto, quando o sumo de maçã entrou em contacto com o ar atmosférico, oxidou-se rapidamente por acção da polifenoloxidase, acabando o sumo por adquirir uma cor laranja acastanhada (aspecto considerado desagradável pelo consumidor).

O processo de elaboração do sumo de maçã estabilizado por hiperpressão não leva adição de atmosfera modificada. Assim, durante o período de conservação o oxigénio existente nesse espaço acaba por provocar o acastanhamento do sumo, sem que isso signifique a perda de características nutricionais ou a existência de uma componente microbiana. O objectivo principal desta avaliação consistiu assim, em retardar ou evitar o escurecimento enzimático do sumo de maçã, mediante a adição do quitosano. Tendo em conta as propriedades antioxidantes do mesmo, pretendeu-se manter durante mais tempo a cor amarelada típica dos sumos, prolongando, o tempo de conservação e comercialização do produto.

Para o primeiro ensaio verificou-se que tanto o branco (Tabela 3.2.4.1), como o controlo onde apenas tinha sido adicionada água, apresentaram uma alteração acentuada da tonalidade, tendo estas adquirido valores inferiores a 100° (indicando a presença de uma cor alaranjada). Ambos os controlos com ácido ascórbico apresentaram uma tonalidade próxima à do lote (115° e 118°), revelando as amostras com quitosano adicionado um aumento da tonalidade amarelada/esverdeada (120° logo após o início do ensaio).

Tabela 3.2.4.1- Tonalidade média das amostras no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de tonalidade (a,b) e entre tratamentos (r,s,t). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	Tonalidade ± DP			
	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 35
CL	112,31 ±1,49			
B	76,28 <sub>a,s</sub> ±0,78	80,76 <sub>a,t</sub> ±2,02	81,81 <sub>a,s</sub> ±0,64	89,45 <sub>a,t</sub> ±0,61
C1	77,62 <sub>b,s</sub> ±0,15	84,77 <sub>a,b,t</sub> ±1,39	82,76 <sub>a,b,s</sub> ±0,95	88,37 <sub>a,t</sub> ±2,70
C2	115,72 <sub>a,r</sub> ±3,81	120,76 <sub>a,r</sub> ±4,61	112,42 <sub>a,r</sub> ±5,11	122,39 <sub>a,r,s</sub> ±5,08
C3	118,66 <sub>a,r</sub> ±2,81	123,50 <sub>a,r</sub> ±3,60	116,77 <sub>a,r</sub> ±3,46	124,09 <sub>a,r</sub> ±5,73
A1	119,24 <sub>a,r</sub> ±3,48	102,03 <sub>b,s</sub> ±18,22	115,48 <sub>a,r</sub> ±2,02	84,48 <sub>b,t</sub> ±1,42
A2	122,41 <sub>a,r</sub> ±2,86	116,53 <sub>a,r</sub> ±10,50	119,55 <sub>a,r</sub> ±2,72	87,40 <sub>b,t</sub> ±5,91
A3	124,34 <sub>a,r</sub> ±1,13	126,57 <sub>a,r</sub> ±3,19	118,77 <sub>a,b,r</sub> ±1,74	110,21 <sub>b,s</sub> ±12,93
A4	121,09 <sub>a,r</sub> ±1,74	123,62 <sub>a,r</sub> ±0,58	116,80 <sub>a,r</sub> ±1,41	123,15 <sub>a,r,s</sub> ±1,23
A5	122,55 <sub>a,r</sub> ±2,28	123,74 <sub>a,r</sub> ±2,29	118,19 <sub>a,r</sub> ±1,26	122,01 <sub>a,r,s</sub> ±0,34
A6	121,38 <sub>a,r</sub> ±2,96	123,16 <sub>a,r</sub> ±3,07	116,63 <sub>a,r</sub> ±3,00	120,57 <sub>a,r,s</sub> ±4,46

Ao longo do tempo, a maior parte das amostras não apresentou variações consideráveis na tonalidade, exceptuando-se as amostras em que foi adicionado um menor teor em quitosano (0,6 e 0,7g/L) em solução de ácido ascórbico (A1 e A2), que na última semana de ensaio apresentaram valores significativamente inferiores (Figura 3.2.4.2). Ambas as amostras apresentaram valores de tonalidade próximos de 85°, o que indica a cor acastanhada dos sumos de maçã. Já para as mesmas concentrações de quitosano, mas para a modalidade em pó (A4 e A5) essa diminuição abrupta não se verificou, mantendo-se os valores de tonalidade próximos de 120°.

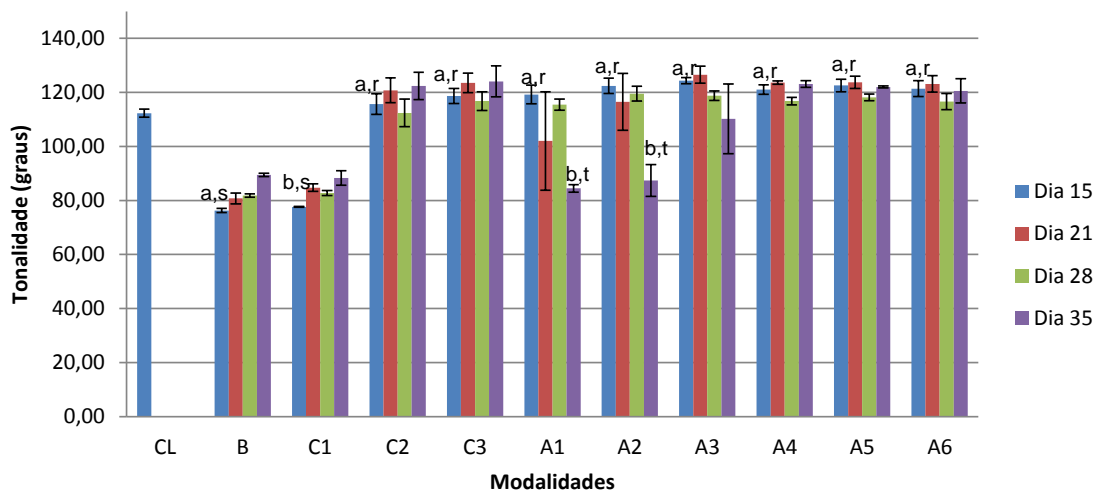


Figura 3.2.4.2- Variação da tonalidade das amostras ao longo do primeiro ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de tonalidade (a,b) e entre tratamentos (r,s,t).

No segundo ensaio, o lote também apresentou uma tonalidade próxima do amarelo-esverdeado (tendencialmente para a zona do verde no diagrama de Cielab) e as modalidades B e C1 apresentaram uma tonalidade alaranjada escura (Tabela 3.2.4.2).

Tabela 3.2.4.2- Tonalidade média das amostras no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de tonalidade (a,b) e entre tratamentos (r,s,t.). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	Tonalidade ± DP			
	Dia 15	Dia 21	Dia 28	Dia 35
CL	122,32 ±1,53			
B	83,79 <sub>a,s</sub> ±2,81	79,30 <sub>a,t</sub> ±2,03	79,84 <sub>a,s</sub> ±0,38	82,47 <sub>a,s</sub> ±2,39
C1	83,16 <sub>a,b,s</sub> ±0,88	79,96 <sub>b,t</sub> ±2,46	80,37 <sub>b,s</sub> ±0,38	85,38 <sub>a,s</sub> ±1,77
C2	127,81 <sub>a,r</sub> ±1,92	132,23 <sub>a,r</sub> ±3,66	128,29 <sub>a,r</sub> ±0,57	127,55 <sub>a,r</sub> ±1,56
C3	126,03 <sub>a,r</sub> ±3,21	129,52 <sub>a,r,s</sub> ±3,47	126,31 <sub>a,r</sub> ±3,45	125,19 <sub>a,r</sub> ±3,39
A1	128,52 <sub>a,r</sub> ±0,79	124,54 <sub>a,s</sub> ±2,69	128,59 <sub>a,r</sub> ±0,52	124,26 <sub>a,r</sub> ±4,66
A2	127,97 <sub>a,b,r</sub> ±1,73	131,97 <sub>a,r</sub> ±1,15	128,84 <sub>a,b,r</sub> ±0,59	125,42 <sub>b,r</sub> ±1,71
A3	129,99 <sub>a,b,r</sub> ±0,80	132,28 <sub>a,r</sub> ±3,37	130,91 <sub>a,b,r</sub> ±1,75	127,09 <sub>b,r</sub> ±0,60
A4	127,50 <sub>a,r</sub> ±0,70	126,99 <sub>a,r,s</sub> ±1,59	127,24 <sub>a,r</sub> ±1,43	126,49 <sub>a,r</sub> ±1,99
A5	127,59 <sub>a,r</sub> ±1,06	129,81 <sub>a,r</sub> ±1,59	128,41 <sub>a,r</sub> ±1,93	126,72 <sub>a,r</sub> ±2,91
A6	127,22 <sub>a,b,r</sub> ±0,95	131,75 <sub>a,r</sub> ±2,81	128,46 <sub>a,b,r</sub> ±0,86	126,97 <sub>b,r</sub> ±1,08

As restantes amostras tiveram uma tonalidade próxima de 120º, 130º, indicando uma forte inibição da polifenoloxidase. Comparando os controlos e as amostras com quitosano não existiram diferenças significativas, tal como ocorreu para o primeiro ensaio, verificando-se assim que a acção antioxidante do ácido ascórbico prevalece sobre a do quitosano (Figura 3.2.4.3).

Ao contrário do primeiro ensaio, em que as amostras A1 e A2 apresentaram uma alteração da cor, essencialmente na última semana, neste ensaio a tonalidade permaneceu constante, tanto para esta como para as restantes amostras ao longo das cinco semanas, o que indica não existirem diferenças significativas entre as concentrações de quitosano.

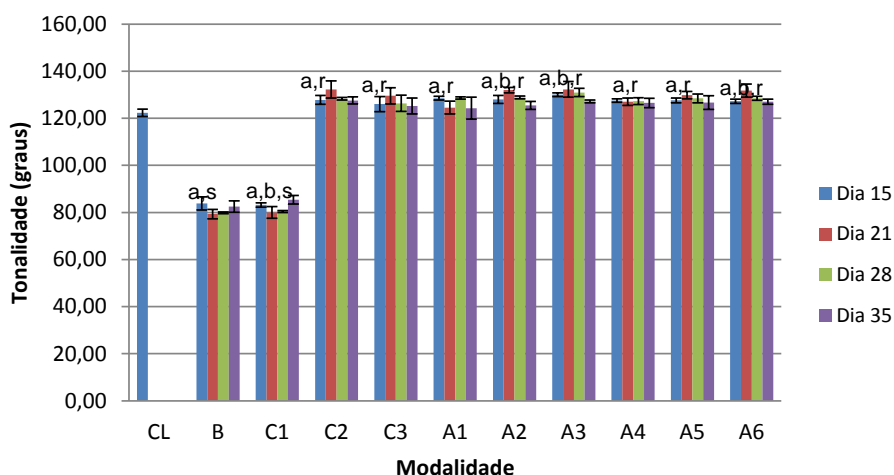


Figura 3.2.4.3- Variação da tonalidade da amostra ao longo do 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de tonalidade (a,b) e entre tratamentos (r,s).

De uma forma geral, verificou-se que a cor das amostras variou do amarelo para o laranja, de acordo com a exposição ao ar e com a adição de ácido ascórbico e quitosano. Não obstante, a cor do sumo também varia de acordo com as variedades de maçãs escolhidas para a produção do mesmo. Dentro das variedades produzidas na zona Oeste e utilizadas para a produção de sumo encontram-se a *Golden Delicious*, *Fuji* e *Granny Smith* com tonalidade correspondente a 109,25, 41,30 e 116,31 respectivamente [6]. Neste contexto, pode ocorrer uma ligeira alteração da cor do sumo, face a uma utilização preferencial de maçãs da variedade *Granny Smith*, relativamente às maçãs *Fuji*. As diferenças ao longo do tempo entre o sumo sem adição de quitosano e com adição de quitosano, decorre essencialmente da presença de antioxidantes (ácido ascórbico e o quitosano), inibidores da polifenoloxidase, responsável pela cor de sumos de fruta, em especial o da maçã.

### 3.2.5 Efeito na turbidez

A turbidez resulta da presença de partículas em suspensão que interferem com a passagem da luz através do fluido. No caso dos sumos essas partículas podem ser lípidos, proteínas, pectina ou celulose, que tiveram origem na ruptura das paredes celulares dos frutos aquando a maceração destes (30). Sendo o sumo de maçã em estudo proveniente da trituração das maçãs, sem qualquer adição de açúcar ou água, e sem tratamento de filtração ou clarificação, é de esperar que apresente turbidez elevada.

No primeiro ensaio o branco, a turbidez ao longo do tempo oscilou entre 114 e 133 NTU (*Nephelometric Turbidity Units*- Unidades de turbidez nefelométricas). Para as diferentes modalidades só o controlo com água (C1) e as amostras A1 e A3 apresentaram valores de turbidez superiores a 100NTU (Tabela 3.2.5.1).

Tabela 3.2.5.1- Valores médio de turbidez no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de Turbidez (a,b,c) e entre tratamentos (r,s,t,u). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	Turbidez ± DP		
	Dia 15	Dia 28	Dia 35
CL	84,67 ±0,3		
B	114,33 <sub>b,r</sub> ±3,1	114 <sub>b,r</sub> ±3,6	133,33 <sub>a,r</sub> ±7,8
C1	109 <sub>b,r</sub> ±3,0	112,33 <sub>b,r</sub> ±3,1	143 <sub>a,r</sub> ±15,6
C2	90,13 <sub>a,s</sub> ±2,1	72,43 <sub>b,t</sub> ±9,4	89,63 <sub>a,u</sub> ±9,6
C3	66,7 <sub>c,t</sub> ±1,1	78,43 <sub>b,t</sub> ±1,9	89 <sub>a,t,u</sub> ±10,0
A1	122,33 <sub>b,r</sub> ±2,1	96,37 <sub>c,s</sub> ±4,2	139 <sub>a,r</sub> ±2,0
A2	115,33 <sub>a,r</sub> ±2,9	94,57 <sub>b,s</sub> ±5,5	127 <sub>a,r,s</sub> ±8,5
A3	108,67 <sub>a,r</sub> ±1,5	82,3 <sub>b,s,t</sub> ±1,1	106,2 <sub>a,s</sub> ±11,2
A4	77,33 <sub>a,s,t</sub> ±1,3	76,7 <sub>a,t</sub> ±1,0	85,3 <sub>a,t,u</sub> ±3,4
A5	78,07 <sub>a,s</sub> ±1,9	76,43 <sub>a,t</sub> ±1,4	81,6 <sub>a,u</sub> ±3,5
A6	76,2 <sub>a,s,t</sub> ±0,1	77,27 <sub>a,t</sub> ±1,2	80,47 <sub>a,u</sub> ±3,3

As amostras com adição de quitosano em solução apresentaram valores de turbidez substancialmente superiores aos restantes, verificando-se uma turbidez na ordem de 110 a 140 NTU. Ao longo das cinco semanas de ensaio existiu um ligeiro aumento da turbidez para as amostras A1 a A3 (Figura 3.2.5.1). Já para as modalidades com adição de quitosano em pó as diferenças não foram significativas, evoluindo os valores de turbidez de forma semelhante ao longo do tempo.

Comparando as modalidades com adição de quitosano em solução (A1 a A3) com o respectivo controlo (C2), verificou-se um aumento significativo da turbidez decorrente da adição de quitosano. Entre as diferentes concentrações de quitosano observou-se uma certa diminuição da turbidez com o aumento da concentração de quitosano, que foi muito mais acentuada quando este foi adicionado em solução (Figura 3.2.5.1).

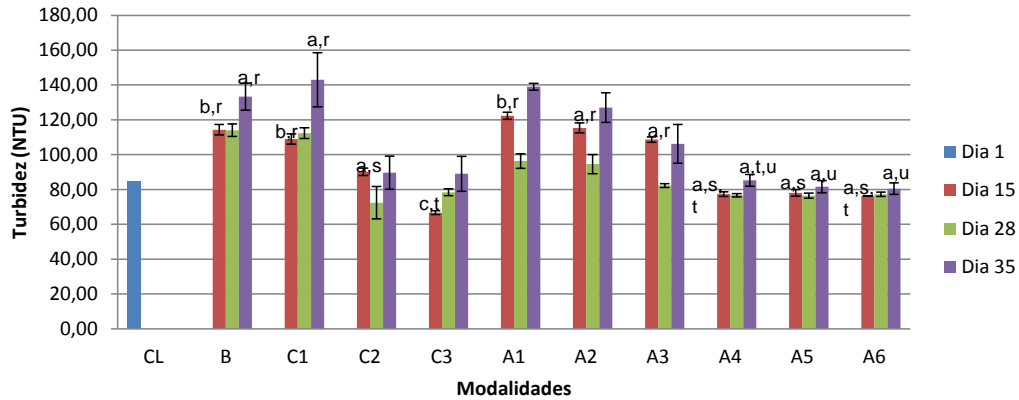


Figura 3.2.5.1- Variação da turbidez das amostras ao longo do 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de Turbidez (a,b,c) e entre tratamentos (r,s,t,u).

Para o segundo ensaio verificou-se um maior valor de turbidez para o lote, muito próximo de 100 (99,5 NTU). Também para as restantes modalidades a turbidez apresentou um valor elevado, que no caso das amostras B, C1 e A5 chegou mesmo a 140 NTU (tabela 3.2.5.2).

Tabela 3.2.5.2- Valores médio de turbidez no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de turbidez (a,b) e entre tratamentos (r,s,t,u). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	Turbidez ± DP	
	Dia 28	Dia 35
CL	99,5 ±3,5	
B	144,3 <sub>a,r</sub> ±6,5	152 <sub>a,s</sub> ±2,0
C1	141 <sub>a,r</sub> ±9,2	143,3 <sub>a,s,t</sub> ±1,5
C2	105,9 <sub>b,t</sub> ±15,0	174,7 <sub>a,r</sub> ±0,6
C3	107 <sub>a,t</sub> ±9,9	110,5 <sub>a,u</sub> ±17,9
A1	138,7 <sub>a,r</sub> ±16,2	123,3 <sub>a,s</sub> ±5,0
A2	137,7 <sub>a,r,s</sub> ±6,7	112,3 <sub>b,u</sub> ±3,8
A3	108,3 <sub>a,s,t</sub> ±11,8	96,7 <sub>a,u</sub> ±5,4
A4	138,3 <sub>a,r</sub> ±9,1	125,7 <sub>a,s</sub> ±24,2
A5	147 <sub>a,r</sub> ±19,8	122,3 <sub>a,t,u</sub> ±4,5
A6	139,3 <sub>a,r</sub> ±11,8	114 <sub>b,t,u</sub> ±8,0

Ao contrário do ensaio anterior, praticamente não existiram valores de turbidez abaixo de 100NTU, nem foi tão evidente a diferença entre o grupo de modalidades A1 a A3 e as modalidades A4 a A6 (Figura 3.2.5.2). Verifica-se sim, essencialmente na última semana, uma diminuição da turbidez com o aumento da concentração do quitosano. Observou-se ainda, uma diferença significativa entre ambas as modalidades com a concentração de quitosano 0,6g/L, sendo novamente muito mais acentuada nas modalidades com adição de quitosano em solução. A clarificação de sumo de maçã através da adição de quitosano em solução já tinha sido verificada por Chatterjee *et al.* (2004) [4], que para uma concentração de quitosano de 2% apresentou resultados significativos na redução da clarificação. Também Martin-Diana *et al.*, 2009 [18] verificaram uma alteração significativa da turbidez com a adição de quitosano. Nesse estudo verificou-se que para concentrações inferiores de quitosano existe um aumento da turbidez no sumo de laranja, acontecendo uma diminuição de turbidez para maiores concentrações de quitosano, o que apoia os resultados obtidos experimentalmente.

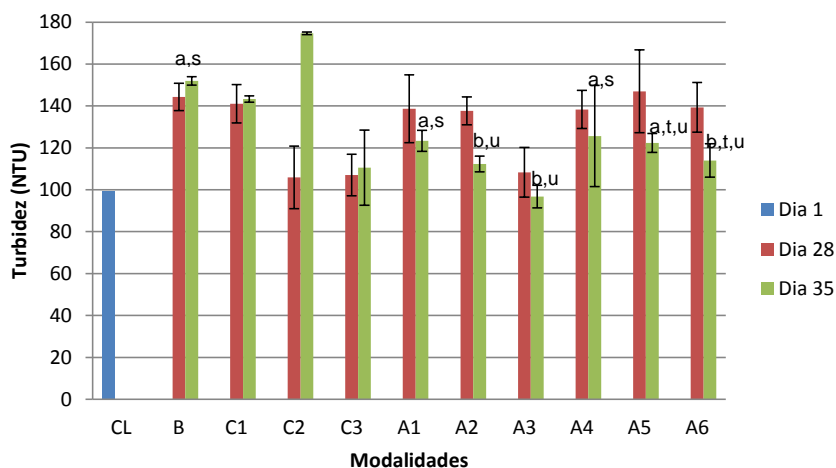


Figura 3.2.5.2- Variação da turbidez da amostra ao longo do 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de Turbidez (a,b) e entre tratamentos (r,s,t,u).

### 3.2.6 Teor de sacarose, glucose, frutose, sorbitol e açúcares totais.

Para a determinação dos diferentes açúcares existentes nas amostras de sumo foi necessário proceder à construção de uma curva de calibração para cada açúcar, nomeadamente sacarose, frutose, glucose e sorbitol. A partir de uma solução padrão concentrada contendo os quatro açúcares, fizeram-se 7 diluições e injectaram-se 30 µL no HPLC, de forma a obter as rectas de calibração que se apresenta na figura 3.2.6.1.

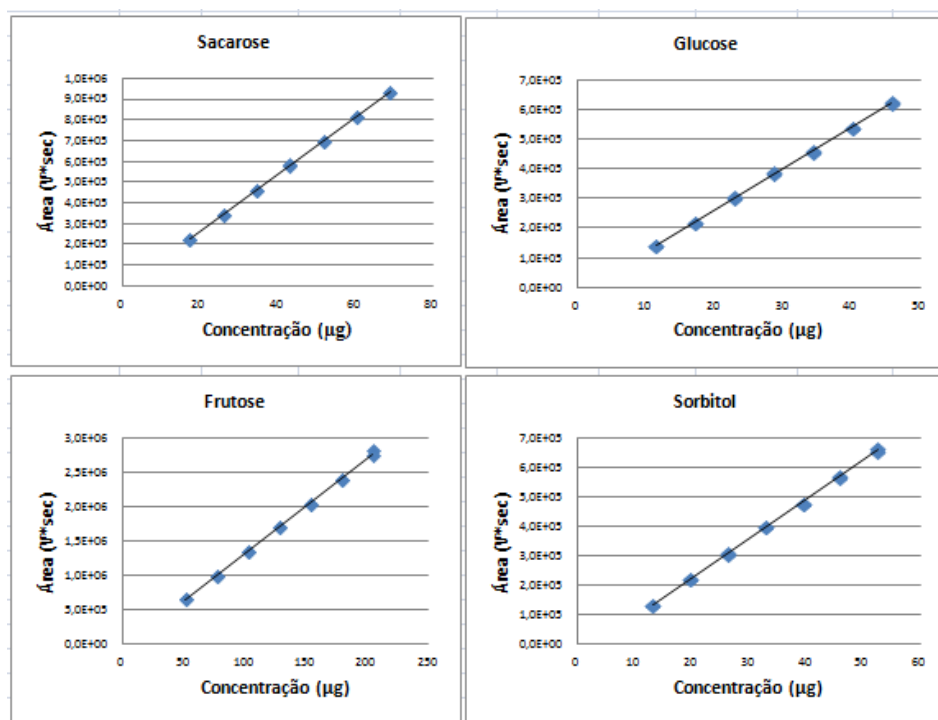


Figura 3.2.6.1- Curvas de calibração para os diferentes açúcares analisados no sumo (2 réplicas para cada concentração de padrão).

Posteriormente foi determinada a concentração dos diferentes açúcares nas amostras, utilizando-se a equação da recta obtida a partir da respectiva curva de calibração. Os valores de concentração obtidos foram corrigidos utilizando o factor de diluição correspondente e os resultados foram expressos em gramas de açúcar por 100mL de sumo.

O lote apresentou uma concentração de sacarose na ordem de 1,5g/100mL de sumo para o primeiro ensaio e aproximadamente 1g/100mL de sumo para o segundo ensaio (Tabela 3.2.6.1). Este parâmetro está directamente influenciado pelas variedades de maçãs utilizadas para sua elaboração. Segundo Drake e Eisel (2005) [7], o sumo de maçã produzido nos Estados Unidos da América sem qualquer adição de açúcar apresenta um teor em sacarose na ordem de 2,16g/mL. Fuleki *et al* 1994 [10] indicam que este tipo de sumo pode ter um conteúdo de sacarose que varia de 0,66g/mL a 2,93 g/100mL, consoante as maçãs sejam procedentes do Japão ou da França, apresentando o sumo de maçãs cultivadas em Espanha um teor de sacarose de 1,03 g/100mL. Verificou-se que para a primeira medição não existiram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre as diferentes modalidades e em ambos os ensaios. No entanto para o primeiro ensaio verificou-se uma diminuição significativa da sacarose ao longo do tempo para todas as modalidades, com excepção das amostras A4 a A6. A maior diminuição nos teores de sacarose ocorreu para as amostras em que não se adicionou quitosano (Figura 3.2.6.2). Também não se observaram diferenças significativas para as distintas concentrações de quitosano. Não obstante, comparando os valores destas com os dos respectivos controlos (C2 e C3), a adição de quitosano reduz a degradação da sacarose.

Tabela 3.2.6.1- Concentração média de sacarose (g/100mL de sumo) nas amostras correspondentes ao 1º e 2º ensaio. As çetras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de sacarose (a,b) e entre tratamentos (r,s,t,u,v). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	[Sacarose] ± DP			
	Dia 21- 1ºEnsaio	Dia 35-1ºEnsaio	Dia 21-2ºEnsaio	Dia 35-2ºEnsaio
CL	1,495 ±0,099		1,077 ±0,022	
B	1,321 <sub>a,r</sub> ±0,252	0,727 <sub>b,u,v</sub> ±0,118	0,949 <sub>a,r</sub> ±0,053	0,797 <sub>b,r</sub> ±0,029
C1	1,135 <sub>a,r</sub> ±0,155	0,310 <sub>b,v</sub> ±0,475	0,808 <sub>a,r</sub> ±0,118	0,635 <sub>b,r,s</sub> ±0,272
C2	1,116 <sub>a,r</sub> ±0,181	0,764 <sub>b,t,u</sub> ±0,104	0,843 <sub>a,r</sub> ±0,033	0,611 <sub>b,r,s</sub> ±0,082
C3	1,276 <sub>a,r</sub> ±0,078	0,844 <sub>b,s,t,u</sub> ±0,103	0,913 <sub>a,r</sub> ±0,038	0,669 <sub>b,r</sub> ±0,233
A1	1,1275 <sub>a,r</sub> ±0,066	0,984 <sub>b,r,s,t</sub> ±0,012	0,858 <sub>a,r</sub> ±0,052	0,612 <sub>b,r,s</sub> ±0,148
A2	1,165 <sub>a,r</sub> ±0,071	0,990 <sub>b,r,s,t</sub> ±0,210	0,817 <sub>a,r</sub> ±0,291	0,700 <sub>a,r</sub> ±0,205
A3	1,180 <sub>a,r</sub> ±0,012	1,016 <sub>b,r,s</sub> ±0,022	0,795 <sub>a,r</sub> ±0,422	0,751 <sub>a,r</sub> ±0,050
A4	1,251 <sub>a,r</sub> ±0,088	1,165 <sub>a,r</sub> ±0,042	0,791 <sub>a,r</sub> ±0,080	0,226 <sub>b,t</sub> ±0,124
A5	1,278 <sub>a,r</sub> ±0,132	1,095 <sub>a,r</sub> ±0,133	0,928 <sub>a,r</sub> ±0,043	0,433 <sub>b,s,t</sub> ±0,018
A6	1,289 <sub>a,r</sub> ±0,111	1,175 <sub>a,r</sub> ±0,039	0,955 <sub>a,r</sub> ±0,024	0,740 <sub>b,r</sub> ±0,038

Para o segundo ensaio todos as modalidades apresentaram um menor conteúdo de sacarose. Neste caso, ao contrário que no 1º ensaio, também existiu uma diminuição significativa de sacarose ao longo do ensaio para as modalidades A4 e A6 (Figura 3.2.6.3). Estes resultados parecem indicar que a combinação de uma elevada concentração de ácido ascórbico e quitosano reduzem a degradação da sacarose ao longo do tempo. No segundo ensaio observaram-se diferenças significativas nos teores de sacarose para as diferentes concentrações de quitosano adicionado em pó (A4 a A6). O aumento de 0,6 para 0,8g/L a de quitosano diminuiu a degradação de sacarose.

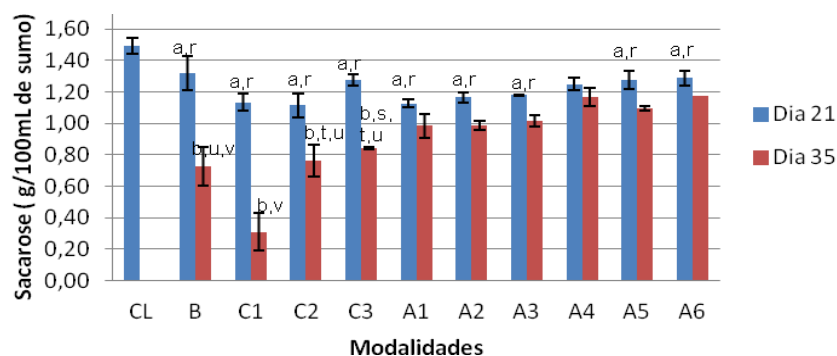


Figura 3.2.6.2- Variação da concentração de sacarose para as diferentes modalidades no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de sacarose (a,b) e entre tratamentos (r,s,t,u,v).

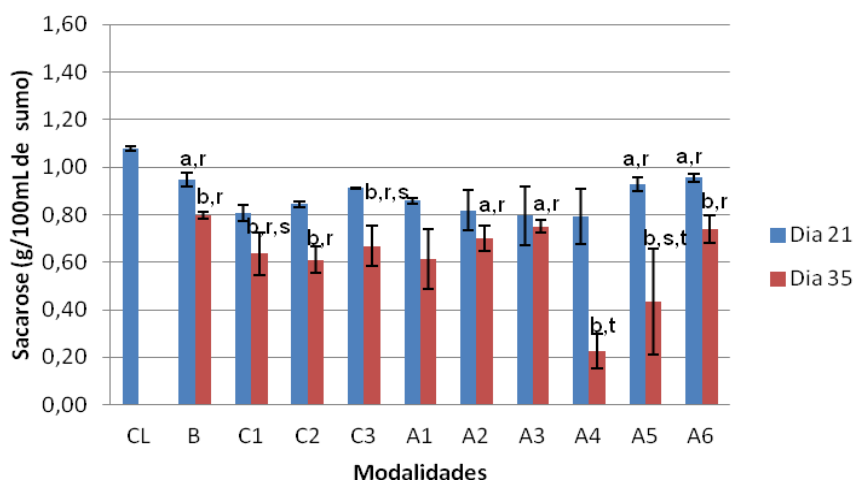


Figura 3.2.6.3- Variação da concentração de sacarose para as diferentes modalidades no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de sacarose (a,b) e entre tratamentos (r,s,t).

No caso da glucose, a variação na concentração para os diferentes ensaios e modalidades não é tão notória como para a sacarose (Tabela 3.2.6.2). Os dois lotes apresentam uma concentração que ronda os 3 g/100mL. Segundo Eisel e Drake (2005) [7], o sumo de maçã de variedades produzidas nos E.U.A apresenta um teor de glucose de 3g/100mL. Fuleki *et al* (1994) [10] referem um teor de 3,31g/100mL de glucose para o sumo de maçã produzido em Espanha, o que indica diferenças entre cultivares e variedades de maçãs. Os valores determinados para os dois lotes integram-se nesta gama de concentrações.

Tabela 3.2.6.2- Concentração média de glicose (g/100mL de sumo) no 1º e 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de glicose (a,b) e entre tratamentos (r,s). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	[Glucose] ± DP			
	Dia 21- 1º Ensaio	Dia 35- 1ºEnsaio	Dia 21- 1ºEnsaio	Dia 35- 1ºEnsaio
CL	3,006 ±0,099		2,992 ±0,022	
B	3,143 <sub>a,r</sub> ±0,252	2,929 <sub>a,r,s</sub> ±0,118	3,157 <sub>a,r</sub> ±0,053	3,138 <sub>a,r</sub> ±0,029
C1	2,754 <sub>a,r,s</sub> ±0,155	2,856 <sub>a,r,s</sub> ±0,475	2,781 <sub>a,r,s</sub> ±0,118	2,626 <sub>a,s</sub> ±0,272
C2	2,667 <sub>a,s</sub> ±0,181	2,672 <sub>a,s</sub> ±0,104	2,902 <sub>a,r,s</sub> ±0,033	2,612 <sub>b,s</sub> ±0,082
C3	2,915 <sub>a,r,s</sub> ±0,078	2,969 <sub>a,r,s</sub> ±0,103	3,128 <sub>a,r,s</sub> ±0,038	2,787 <sub>b,r,s</sub> ±0,233
A1	2,701 <sub>a,s</sub> ±0,066	2,748 <sub>a,r,s</sub> ±0,012	2,938 <sub>a,r,s</sub> ±0,052	2,630 <sub>b,s</sub> ±0,148
A2	2,784 <sub>a,r,s</sub> ±0,071	2,763 <sub>a,r,s</sub> ±0,210	2,798 <sub>a,r,s</sub> ±0,291	2,742 <sub>a,r,s</sub> ±0,205
A3	2,817 <sub>a,r,s</sub> ±0,012	2,863 <sub>a,r,s</sub> ±0,022	2,714 <sub>b,s</sub> ±0,422	3,019 <sub>a,r,s</sub> ±0,050
A4	2,873 <sub>b,r,s</sub> ±0,088	3,128 <sub>a,r</sub> ±0,042	3,033 <sub>a,r,s</sub> ±0,080	2,843 <sub>a,r,s</sub> ±0,124
A5	2,948 <sub>a,r,s</sub> ±0,132	2,937 <sub>a,r,s</sub> ±0,133	3,149 <sub>a,r</sub> ±0,043	3,128 <sub>a,r</sub> ±0,018
A6	2,961 <sub>a,r,s</sub> ±0,111	2,957 <sub>a,r,s</sub> ±0,039	3,188 <sub>a,r</sub> ±0,024	3,171 <sub>a,r</sub> ±0,038

Em geral, para o primeiro ensaio, não foram observadas diferenças significativas, tanto entre as modalidades como ao longo do tempo, oscilando os valores de glicose em torno de 2,8g/100mL de sumo (Figura 3.2.6.4).

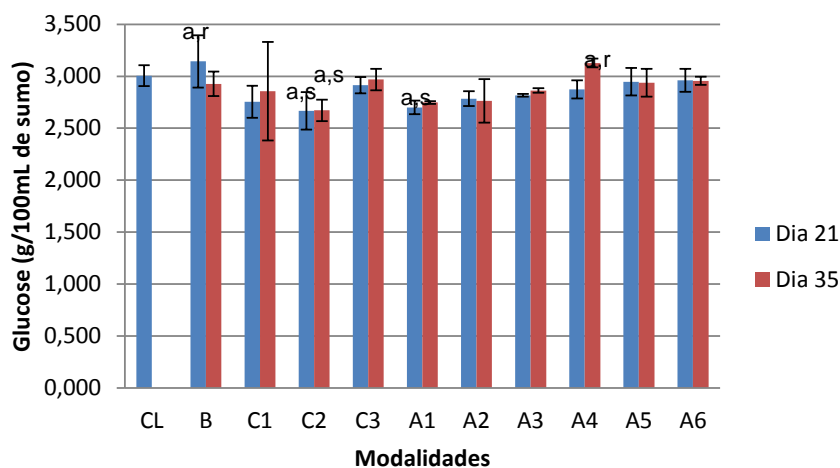


Figura 3.2.6.4- Variação da concentração de glicose para as diferentes modalidades no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de glicose (a,b) e entre tratamentos (r,s).

Contrariamente ao observado para a sacarose, o segundo ensaio apresentou resultados muito semelhantes aos do primeiro ensaio para as amostras A4 a A6, não indicando qualquer influência da concentração de ácido ascórbico ou do quitosano no conteúdo de glicose. Neste ensaio ocorreu apenas um caso isolado apontando um aumento significativo da concentração de glicose na última semana para a amostra A3 (Figura 3.2.6.5). No entanto, sendo o único caso que revelou uma alteração, e não existindo correlação com uma diminuição de sacarose, não é possível estabelecer uma interação com a concentração de quitosano.

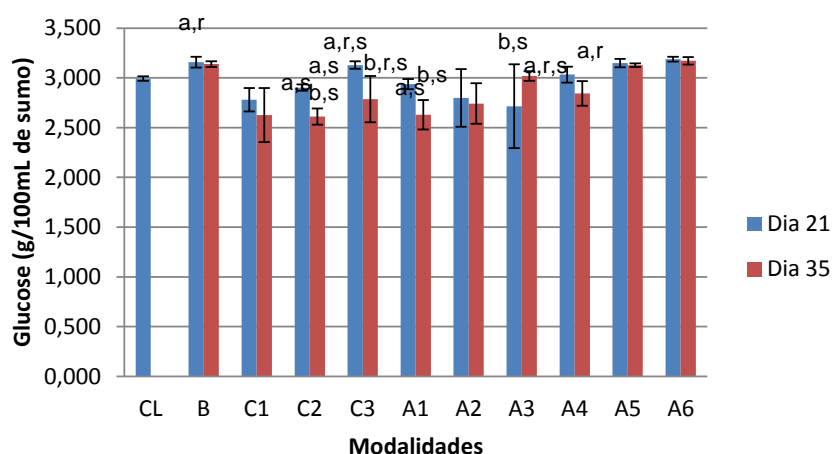


Figura 3.2.6.5- Variação da concentração de glicose para as diferentes modalidades no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de glicose (a,b) e entre tratamentos (r,s).

Sendo a frutose o açúcar presente em maior quantidade nas frutas, prevaleceu igualmente no sumo de maçã. Este sumo apresentou para os dois lotes uma concentração entre 7,3 e 7,4 g/100mL de sumo, (Tabela 3.2.6.3). Segundo Wosiacki *et al.* (2005) [38], as maçãs *Granny Smith* apresentaram um teor de 5,65 g/100mL e a *Fuji* apresenta um teor 8,67 g/100mL, já Fuleki *et al.* (1994) [10] apontam um valor de 5,86 g/100mL em sumo de maçãs cultivadas em Espanha tendo Drake e Eisele. (2005) [7] referido um valor de 5,67 g/100mL. Deste modo, os valores de frutose obtidos para os lotes são semelhantes aos obtidos por esses autores.

Para ambos os ensaios, não se encontram diferenças significativas ao longo do tempo para qualquer uma das modalidades, sendo a única exceção o branco do primeiro ensaio (Figura 3.2.6.6).

Tabela 3.2.6.3- Concentração média de frutose (g/100mL de sumo) no 1º e 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de frutose (a,b) e entre tratamentos (r,s,t). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	[Frutose] ± DP			
	Dia 21- 1ºEnsaio	Dia 35- 1º Ensaio	Dia 21- 2º Ensaio	Dia 35- 2º Ensaio
CL	7,443 ±0,246		7,318 ±0,053	
B	7,627 <sub>a,r</sub> ±0,597	6,880 <sub>b,r,s</sub> ±0,188	7,598 <sub>a,r</sub> ±0,105	7,518 <sub>a,r,s</sub> ±0,059
C1	6,683 <sub>a,r,s</sub> ±0,372	6,568 <sub>a,s</sub> ±0,973	6,700 <sub>a,r</sub> ±0,263	6,520 <sub>a,s,t</sub> ±0,592
C2	6,480 <sub>a,r,s</sub> ±0,441	6,515 <sub>a,s</sub> ±0,018	6,967 <sub>a,r,s</sub> ±0,078	6,278 <sub>a,t</sub> ±0,210
C3	7,125 <sub>a,r,s</sub> ±0,190	7,232 <sub>a,r,s</sub> ±0,221	7,699 <sub>a,r</sub> ±0,135	6,977 <sub>a,r,s,t</sub> ±0,478
A1	6,559 <sub>a,s</sub> ±0,163	6,573 <sub>a,s</sub> ±0,019	7,079 <sub>a,r,s</sub> ±0,117	6,283 <sub>a,t</sub> ±0,382
A2	6,765 <sub>a,r,s</sub> ±0,171	6,765 <sub>a,r,s</sub> ±0,678	6,734 <sub>a,r,s</sub> ±0,698	6,556 <sub>a,s,t</sub> ±0,489
A3	6,845 <sub>a,r,s</sub> ±0,026	6,859 <sub>a,r,s</sub> ±0,068	6,5296 <sub>a,s</sub> ±1,015	7,205 <sub>a,r,s,t</sub> ±0,106
A4	7,020 <sub>a,r,s</sub> ±0,215	7,569 <sub>a,r,s</sub> ±0,106	7,320 <sub>a,r,s</sub> ±0,177	6,846 <sub>a,r,s,t</sub> ±0,269
A5	7,201 <sub>a,r,s</sub> ±0,319	7,053 <sub>a,r,s</sub> ±0,324	7,577 <sub>a,r</sub> ±0,092	7,514 <sub>a,r,s</sub> ±0,046
A6	7,273 <sub>a,r,s</sub> ±0,266	7,138 <sub>a,r,s</sub> ±0,096	7,666 <sub>a,r</sub> ±0,048	7,597 <sub>a,r</sub> 0,072

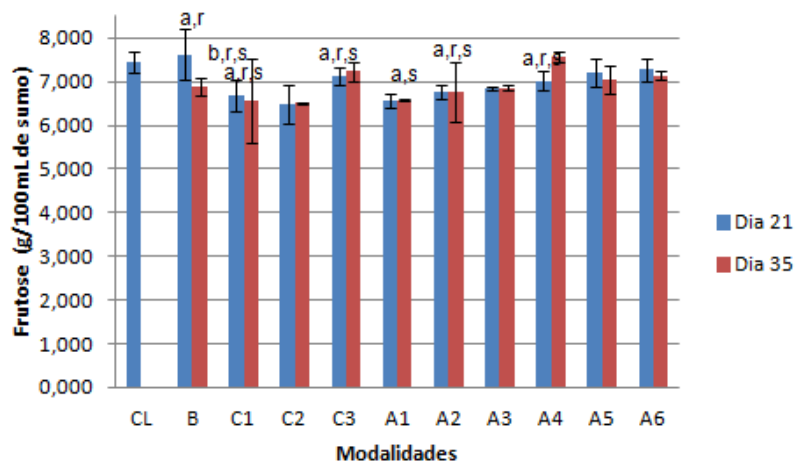


Figura 3.2.6.6- Variação da concentração de frutose para as diferentes modalidades no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de frutose (a,b) e entre tratamentos (r,s,t).

Comparando as modalidades com adição de quitosano com os respectivos controlos (C2 e C3), verificou-se um ligeiro incremento da concentração de frutose com o aumento da concentração do quitosano, aspecto que pode eventualmente justificar a diminuição observada para a sacarose.

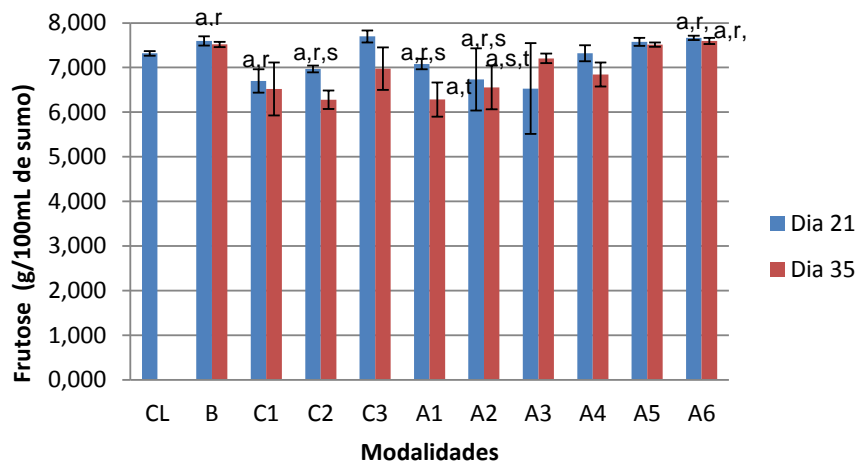


Figura 3.2.6.7- Variação da concentração de frutose para as diferentes modalidades no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de frutose (a,b) e entre tratamentos (r,s,t).

No entanto, estas diferenças não são significativas, motivo pelo qual não pode estabelecer-se uma correlação entre as diferentes concentrações de quitosano adicionado e os valores de açúcares encontrados. Os resultados obtidos sugerem que o quitosano adicionado aos sumos não produz nenhuma alteração indesejável nos respectivos parâmetros nutricionais, relativamente ao teor em açúcares

O sorbitol é um poliálcool existente nas frutas em geral, proveniente da hidrólise da glucose, e com um menor poder adoçante que esta. A caracterização do lote indicou a presença de concentrações na ordem de 0,542 e 0,480 g/100mL de sumo. Estes valores encontram-se dentro do esperado segundo o descrito na literatura. De facto, Drake e Eisele (2005) [7] apontam um valor de sorbitol para o sumo de maçã na ordem de 0,450 g/100mL e Fuleki *et al.* (1994) [10] um valor de 0,34 g/100mL. Para esta determinação existiram diferenças entre as modalidades com e sem quitosano e entre ambos os ensaios. Para todas as modalidades do 1º ensaio, não houve uma variação significativa da concentração de sorbitol ao longo do tempo (Tabela 3.2.6.4), e não foram observadas diferenças entre os controlos (C2 e C3) e as concentrações de quitosano.

Tabela 3.2.6.4- Concentração média de sorbitol (g/100mL de sumo) para as diferentes modalidades no 1º e 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de sorbitol (a,b) e entre tratamentos (r,s). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	[Sorbitol] ± DP			
	Dia 21- 1ºEnsaio	Dia 35- 1ºEnsaio	Dia 21- 2ºEnsaio	Dia 35- 2ºEnsaio
CL	0,542 ±0,031		0,480 ±0,004	
B	0,539 <sub>a,r</sub> ±0,045	0,491 <sub>b,r,s</sub> ±0,011	0,495 <sub>a,r</sub> ±0,006	0,484 <sub>a,r</sub> ±0,006
C1	0,467 <sub>a,s</sub> ±0,028	0,476 <sub>a,r,s</sub> ±0,069	0,431 <sub>a,r,s</sub> ±0,019	0,422 <sub>a,r,s</sub> ±0,041
C2	0,453 <sub>a,s</sub> ±0,032	0,453 <sub>a,s</sub> ±0,006	0,448 <sub>a,r,s</sub> ±0,004	0,398 <sub>b,s</sub> ±0,015
C3	0,5012 <sub>a,r,s</sub> ±0,016	0,505 <sub>a,r,s</sub> ±0,013	0,500 <sub>a,r</sub> ±0,009	0,450 <sub>b,r,s</sub> ±0,033
A1	0,454 <sub>a,s</sub> ±0,012	0,447 <sub>a,s</sub> ±0,002	0,456 <sub>a,r,s</sub> ±0,010	0,395 <sub>b,r,s</sub> ±0,024
A2	0,472 <sub>a,r,s</sub> ±0,012	0,448 <sub>a,s</sub> ±0,035	0,434 <sub>a,r,s</sub> ±0,047	0,414 <sub>a,r,s</sub> ±0,035
A3	0,477 <sub>a,r,s</sub> ±0,005	0,461 <sub>a,r,s</sub> ±0,003	0,418 <sub>b,s</sub> ±0,073	0,462 <sub>a,r,s</sub> ±0,011
A4	0,492 <sub>a,r,s</sub> ±0,018	0,522 <sub>a,r</sub> ±0,008	0,477 <sub>a,r</sub> ±0,012	0,438 <sub>a,r,s</sub> ±0,019
A5	0,505 <sub>a,r,s</sub> ±0,024	0,480 <sub>a,r,s</sub> ±0,025	0,498 <sub>a,r</sub> ±0,014	0,484 <sub>a,r</sub> ±0,005
A6	0,508 <sub>a,r,s</sub> ±0,020	0,490 <sub>a,r,s</sub> ±0,006	0,508 <sub>a,r</sub> ±0,010	0,485 <sub>b,r</sub> ±0,005

Já para o segundo ensaio todas as amostras apresentaram uma ligeira diminuição. Neste caso, prevalece um maior número de modalidades com diminuição significativa de sorbitol, nomeadamente nos dois controlos com ascórbico (C2 e C3) e também nas modalidades A1 e A6.

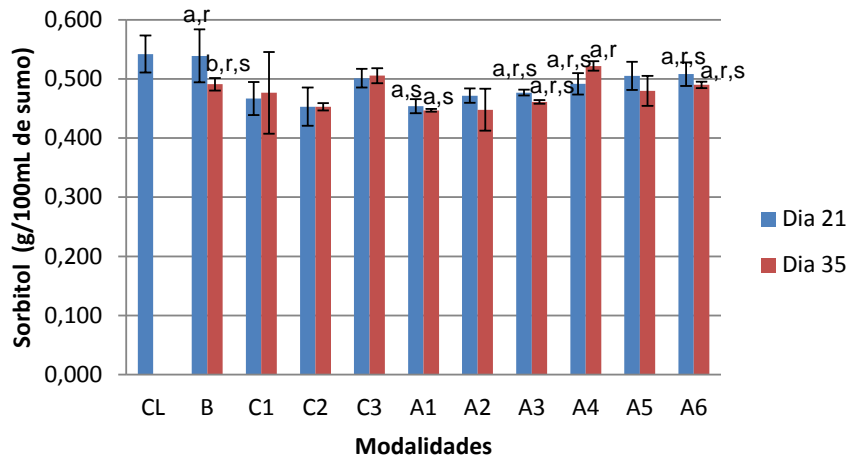


Figura 3.2.6.7- Variação da concentração de sorbitol para as diferentes modalidades no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de sorbitol (a,b) e entre tratamentos (r,s).

Para o primeiro ensaio, ainda que as modalidades A1 a A3 tenham apresentado de uma forma geral uma menor concentração de sorbitol que as amostras A4 a A6 (Figura 3.2.6.7), essa diferença não é significativa, não existindo também para este caso, como para a maior parte dos açúcares, diferenças entre as três concentrações de quitosano utilizadas.

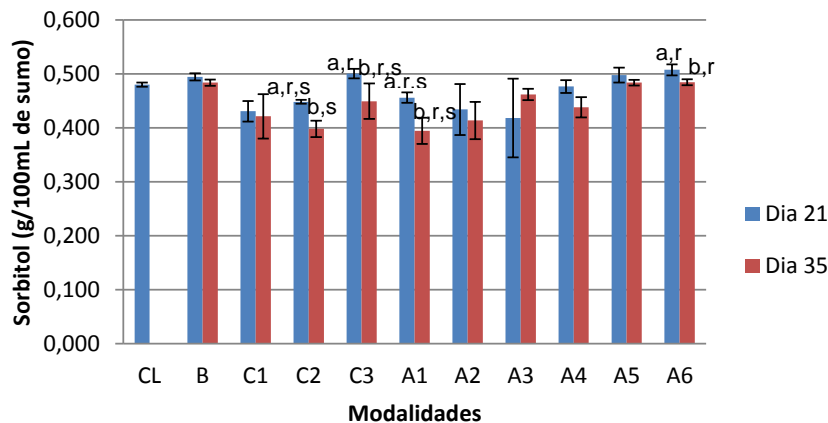


Figura 3.2.6.8- Variação da concentração de sorbitol para as diferentes modalidades no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de sorbitol (a,b) e entre tratamentos (r,s).

Também neste caso, tal como para a frutose, não se pode correlacionar a presença de quitosano com uma maior ou menor concentração de sorbitol. Contudo, a sua presença também não leva a diferenças significativas nos teores deste em relação ao sumo original (Figura 3.2.6.8).

Por último foi calculada a concentração total de açúcares existente no sumo de maçã. Também este teor foi calculado para as diferentes amostras nunca sendo inferior a 10g/100mL de amostra. O sumo de maçã analisado teve assim uma concentração média de açúcares de 12,0g/100mL para o 1º lote e 11,9g/100mL para o 2º lote. Conforme apontado por Wosiacki *et al.* (2005) [38] e Karadeniz e Eks (2002) [14], também estes valores se enquadravam para a *Granny Smith* e para a *Golden Delicious* (9,36 e 15,6 g/100mL, respectivamente) (Tabela 3.2.6.5).

Tabela 3.2.6.5- Determinação da concentração de açúcares totais (g/100mL de sumo) no 1º e 2º ensaios. AS letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de açúcares totais (a) e entre tratamentos (r,s,t). DP=Desvio Padrão.

Tratamento	[Açúcares Totais] ± DP			
	Dia 21- 1ºEnsaio	Dia 35- 1ºEnsaio	Dia 21- 2ºEnsaio	Dia 35- 2ºEnsaio
CL	12,49 ±0,42		11,87 ±0,09	
B	12,63 <sub>a,r</sub> ±1,00	11,03 <sub>a,r,s</sub> ±0,36	12,20 <sub>a,r</sub> ±0,14	11,94 <sub>a,r</sub> ±0,11
C1	11,04 <sub>a,r,s</sub> ±0,61	10,21 <sub>a,s</sub> ±1,53	10,72 <sub>a,r,s</sub> ±0,43	10,20 <sub>a,s,t</sub> ±0,94
C2	10,72 <sub>a,s</sub> ±0,73	10,40 <sub>a,s</sub> ±0,02	11,16 <sub>a,r,s</sub> ±0,13	9,90 <sub>a,t</sub> ±0,26
C3	11,82 <sub>a,r,s</sub> ±0,32	11,55 <sub>a,r,s</sub> ±0,32	12,24 <sub>a,r</sub> ±0,15	10,88 <sub>a,r,s,t</sub> ±0,81
A1	10,84 <sub>a,s</sub> ±0,27	10,75 <sub>a,s</sub> ±0,04	11,33 <sub>a,r</sub> ±0,19	9,92 <sub>a,t</sub> ±0,67
A2	11,18 <sub>a,r,s</sub> ±0,29	10,97 <sub>a,r,s</sub> ±0,99	10,78 <sub>a,r,s</sub> ±1,12	10,41 <sub>a,r,s,t</sub> ±0,78
A3	11,32 <sub>a,r,s</sub> ±0,05	11,20 <sub>a,r,s</sub> ±0,12	10,46 <sub>a,s</sub> ±1,63	11,44 <sub>a,r,s,t</sub> ±0,19
A4	11,64 <sub>a,r,s</sub> ±0,36	12,38 <sub>a,r</sub> ±0,12	11,62 <sub>a,r,s</sub> ±0,35	10,35 <sub>a,r,s,t</sub> ±0,48
A5	11,93 <sub>a,r,s</sub> ±0,53	11,57 <sub>a,r,s</sub> ±0,54	12,15 <sub>a,r</sub> ±0,17	11,56 <sub>a,r,s</sub> ±0,29
A6	12,03 <sub>a,r,s</sub> ±0,44	11,76 <sub>a,r,s</sub> ±0,15	12,32 <sub>a,r</sub> ±0,10	11,99 <sub>a,r</sub> ±0,06

No primeiro ensaio, não se verificou uma alteração significativa da concentração média de açúcares nas diferentes modalidades relativamente à caracterização do lote e ao branco (Figura 3.2.6.9). As amostras A4 a A6 apresentaram um aumento de teor de açúcar com o acréscimo da concentração de quitosano. No entanto, não sendo esse aumento significativo, nem se tendo verificado essa tendência para a última semana, não é possível estabelecer qualquer relação ente as diferentes concentrações de quitosano utilizado e a concentração de açúcares totais.

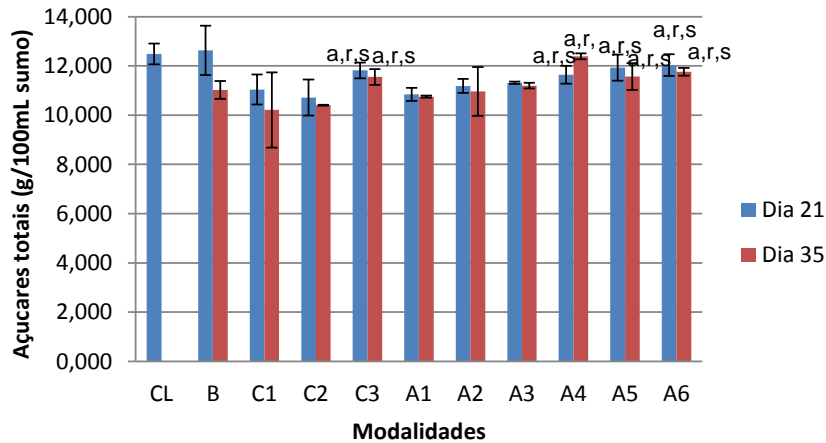


Figura 3.2.6.9- Variação da concentração de açúcares totais no 1º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de açúcares totais (a) e entre tratamentos (r,s).

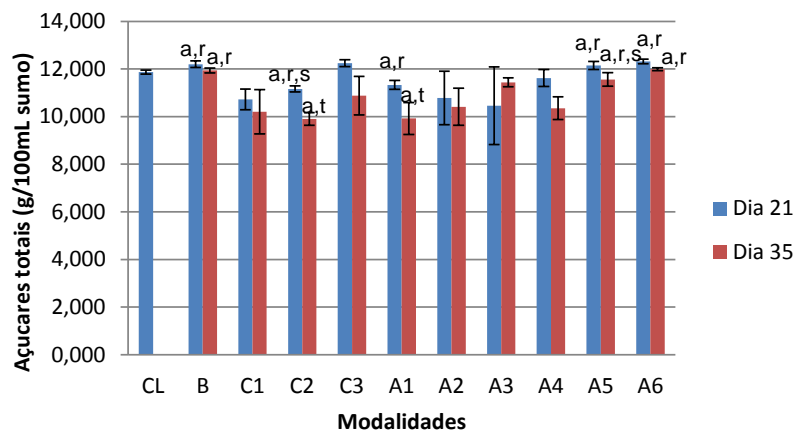


Figura 3.2.6.10- Variação da concentração de açúcares totais no 2º ensaio. As letras traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes valores de concentração de açúcares totais (a) e entre tratamentos (r,st).

Assim, a semelhança detectada para cada açúcar individualmente, face às diferentes concentrações e formas de quitosano não provocam uma variação acentuada da concentração de açúcares (Figura 3.2.6.9 e 3.2.6.10), podendo afirmar-se que a adição do quitosano não altera a qualidade nutricional do sumo de maçã.

### 3.2.7 Efeito no conteúdo de fenóis totais

Sendo o sumo de maçã proveniente inteiramente da fruta, sem qualquer tipo de adição de açúcar ou água, o seu teor em fenóis vai ser elevado. Apesar de existirem em concentrações muito baixas nos alimentos, os compostos fenólicos são essenciais para o organismo devido à sua acção

antioxidante. A concentração média de fenóis para o sumo de maçã foi 39,4 mg/L de sumo para o primeiro ensaio e 53,94 mg/L para o segundo (Tabela 3.2.6.1).

Tabela 3.2.7.1- Concentração de fenóis totais (g/100mL de sumo) no 1º e 2º ensaio.

Tratamento	[Fenóis Totais] ± DP			
	Dia 21- 1ºEnsaio	Dia 35- 1ºEnsaio	Dia 21- 2ºEnsaio	Dia 35- 2ºEnsaio
CL	39,4 ±0,00		53,9 ±0,00	
B	38,5 ±0,01	74,2 ±0,01	67,3 ±0,00	65,8 ±0,01
C1	38,8 ±0,01	76,7 ±0,00	65,8 ±0,03	70,3 ±0,00
C2	38,8 ±0,04	76,7 ±0,02	65,8 ±0,01	70,3 ±0,01
C3	409,7 ±0,05	424,5 ±0,07	65,8 ±0,05	70,3 ±0,01
A1	52,4 ±0,02	79,4 ±0,00	53,9 ±0,03	66,4 ±0,01
A2	59,7 ±0,01	53,9 ±0,05	67,3 ±0,03	109,7 ±0,03
A3	76,1 ±0,01	85,2 ±0,01	74,8 ±0,01	101,2 ±0,01
A4	320,0 ±0,02	365,8 ±0,02	76,1 ±0,01	77,6 ±0,03
A5	365,8 ±0,09	367,9 ±0,11	82,1 ±0,00	138,8 ±0,00
A6	367,3 ±0,01	330,6 ±0,02	159,4 ±0,15	105,2 ±0,01

No primeiro ensaio verificou-se uma concentração anormal de fenóis para as amostras que apresentavam adição do quitosano e ácido ascórbico em pó. Estes dados sugerem que o ácido ascórbico poderia interferir no método utilizado para a quantificação de fenóis, dando origem a falsos positivos. Deste modo, e tendo em conta a elevada concentração de ácido ascórbico presente nestas amostras, tornou-se impossível para o primeiro ensaio a determinação da influência do quitosano nas amostras em pó (Figura 3.2.7.1). No entanto, comparando as amostras com adição de quitosano em solução (A1 a A3) com o respectivo controlo (C2), verificou-se um aumento no conteúdo de compostos fenólicos com o incremento da concentração de quitosano.

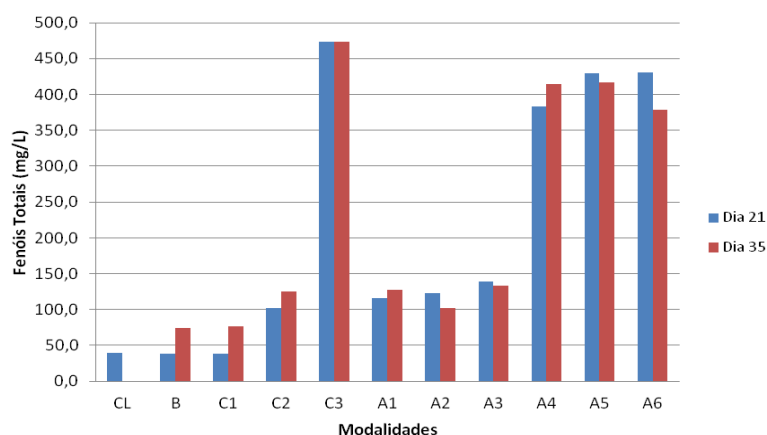


Figura 3.2.7.1- Variação da concentração de fenóis totais no 1º ensaio.

Para o segundo ensaio a disparidade de valores não foi tão acentuada, existindo ainda valores mais elevados de fenóis para todas as amostras que continham ácido ascórbico, incluindo os controlos (Tabela 3.2.7.1). Posteriormente, os ensaios realizados com soluções diluídas de ácido ascórbico, permitiram comprovar que o ácido ascórbico presente nas amostras interfere com o método, dando erros (por excesso). Assim, foi calculado um factor de correcção e o mesmo foi aplicado aos resultados (Figura 3.2.7.2).

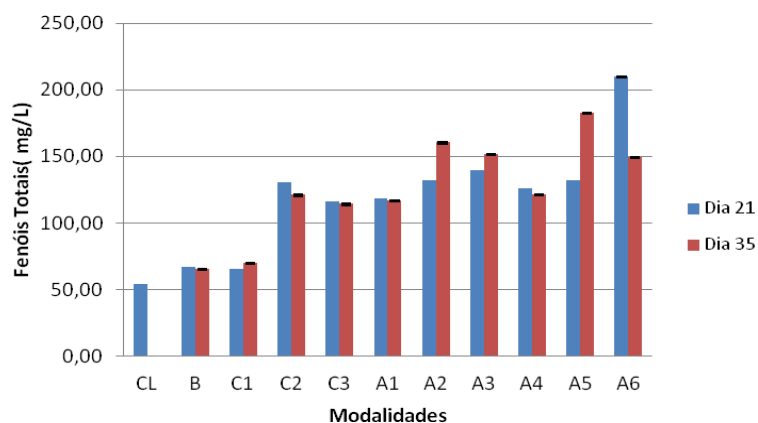


Figura 3.2.7.2- Variação da concentração de fenóis totais no 2º ensaio.

Tal como foi observado no 1º ensaio, comparando as amostras com adição de quitosano com os respectivos controlos, verificou-se uma tendência crescente na concentração de fenóis com o aumento da concentração de quitosano (Figura 3.2.7.2). Em geral, os resultados obtidos parecem indicar que a presença do quitosano nos sumos não exerce um efeito negativo sobre os compostos fenólicos.

### 3.2.8 Efeito no conteúdo de ácido ascórbico

O ácido ascórbico é também um nutriente essencial na alimentação humana, tendo, entre outros, um papel relevante na protecção antioxidante. O sumo de maçã não é naturalmente muito rico nesta vitamina, motivo pelo qual face à necessidade de dissolver o quitosano num ácido orgânico fraco, se decidiu utilizar o ácido ascórbico. Assim acrescentou-se o valor nutricional do sumo de maçã.

Para determinar a concentração de ácido ascórbico existente nas amostras foi necessário proceder à construção de uma curva de calibração. Em consonância, injectaram-se 7 diluições de uma solução padrão de ácido ascórbico de concentração perfeitamente conhecida, para obter a respectiva recta de calibração (Figura 3.2.8.1).

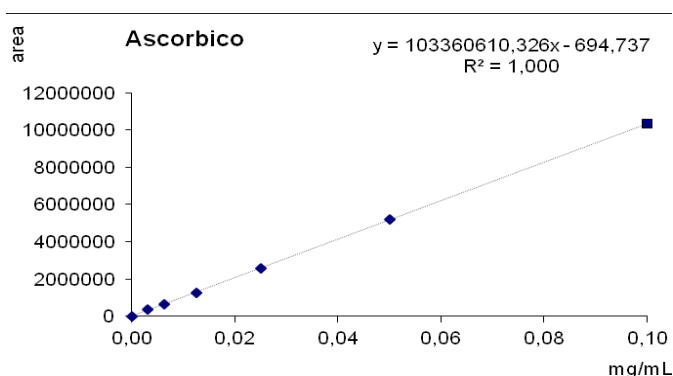


Figura 3.2.8.1- Curva de calibração para a determinação da quantificação de ácido ascórbico.

Posteriormente foi determinada a concentração de ácido ascórbico nas diferentes amostras, utilizando a equação da recta obtida a partir da curva de calibração. Conforme esperado, as concentrações de ácido ascórbico determinadas para ambos os lotes (0,053 e 0,133 mg/100mL) foram muito baixas (Tabela 3.2.8.1 e 3.2.8.2).

Para o primeiro ensaio, encontraram-se valores consideravelmente elevados de ácido ascórbico para as modalidades A4 a A6 e respectivo controlo C3, pois a quantidade de ácido ascórbico adicionada no início do ensaio foi muito elevada face à adicionada em solução (A1 a A3). Estes valores são muito superiores aos da dose diária recomendada, que se encontram entre 100 a 200 mg, não sendo, conseqüentemente, considerados aceitáveis. Já para as modalidades A1 a A3 esse valor nunca ultrapassa as 30 mg/100mL, sendo esses teores aceitáveis. No entanto é de destacar que, para todas as amostras existe uma diminuição considerável da concentração de ácido ascórbico na última semana (Tabela 3.2.8.1).

Tabela 3.2.8.1- Concentração média de ácido ascórbico (mg/100mL de sumo) no 1º ensaio.

Tratamento	[Ácido Ascórbico] ± DP		
	Dia 1	Dia 21	Dia 35
CL	0,0529 ±0,0002		
B	0,0514 ±0,0003	0,0581 ±0,0003	0,0466 ±0,0001
C1	0,0809 ±0,0002	23,8383 ±0,2379	0,0303 ±0,0001
C2	23,3613 ±0,0093	19,1536 ±0,0235	5,7691 ±0,0177
C3	159,9401 ±0,2725	171,7168 ±0,1736	9,3963 ±0,0027
A1	21,5131 ±0,0010	11,0064 ±0,0137	0,5115 ±0,0065
A2	25,6144 ±0,0116	11,0733 ±0,0329	2,6816 ±0,0025
A3	28,7175 ±0,0215	18,5501 ±0,0074	6,5044 ±0,0076
A4	164,4756 ±0,1027	158,7077 ±0,0317	139,2190 ±0,0583
A5	163,8057 ±0,0037	158,1326 ±0,0022	135,2261 ±0,0732
A6	173,6258 ±0,2425	150,6373 ±0,2336	145,1224 ±0,0753

No segundo ensaio não se verificou a disparidade de resultados observada para o primeiro ensaio, uma vez que a quantidade de ácido ascórbico adicionado as amostras era semelhante para ambas as formas de adição de quitosano. Também para o segundo ensaio se verificou, na última semana, uma diminuição acentuada da concentração de ácido ascórbico, nas amostras com quitosano. Para a 1ª leitura, o incremento da concentração de ácido ascórbico decorre com o aumento da concentração de quitosano (A1 a A3 e A4 a A6) e deve-se ao maior volume de solução mãe de quitosano e ácido ascórbico a 1% adicionado, para alcançar concentrações de quitosano de 0,6 g/L para 0,8 g/L. No entanto, comparando os valores iniciais com os valores obtidos na última semana, pode verificar-se que a degradação do ácido ascórbico é menor quanto maior é a concentração de quitosano (Tabela 3.2.8.2).

Tabela 3.2.8.2- Concentração média de ácido ascórbico (mg/100mL de sumo) no 2º ensaio.

Tratamento	[Ácido Ascórbico] ± DP		
	Dia 1	Dia 21	Dia 35
CL	0,133 ±0,0000		
B	0,0982 ±0,0009	0,0560 ±0,0003	0,1515 ±0,0014
C1	0,0851 ±0,0005	0,0682 ±0,0001	0,0374 ±0,0001
C2	8,2770 ±0,1159	9,9140 ±0,0022	7,1009 ±0,0099
C3	8,0622 ±0,0030	7,0643 ±0,0110	8,0086 ±0,0301
A1	8,8533 ±0,0299	3,3722 ±0,0105	1,1166 ±0,0058
A2	9,2830 ±0,0048	7,6926 ±0,0032	3,2624 ±0,0002
A3	33,7831 ±0,2828	10,5665 ±0,0018	8,8930 ±0,0003
A4	7,9620 ±0,0027	1,8488 ±0,0216	4,7053 ±0,0279
A5	13,8848 ±0,0071	2,7538 ±0,0217	4,0692 ±0,0474
A6	17,8542 ±0,0254	4,6432 ±0,0046	5,8376 ±0,0278

### 3.2.9 Análises microbiológicas

Um dos parâmetros mais importantes para a segurança alimentar está relacionado com a presença de microrganismos. Apesar do sumo de maçã sofrer um tratamento de higienização por hiperpressão, que leva à inactivação de microrganismos, é necessário um controlo adequado e rigoroso para que não possa prevalecer qualquer tipo de contaminação microbiológica que ponha em causa a saúde do consumidor.

Para avaliar a qualidade microbiológica das diferentes modalidades de sumo de maçã, foram determinados os valores correspondentes a bactérias psicrofílicas e mesófilas. Verificou-se a existência de um elevado número de microrganismos psicrofílicos, em ambos os ensaios, e ao longo do tempo essencialmente para o branco e o controlo com água (C1), tendo para a última medição do primeiro ensaio, resultados incontáveis (Tabela 3.2.9.1). Para o primeiro ensaio, verificaram-se inicialmente contagens mais reduzidas para as modalidades A1 a A3 e também para A4, sendo esta última a única que se mantém ao longo do tempo com uma carga microbiana mais reduzida. Comparando as amostras com diferentes concentrações de quitosano e os respectivos controlos, verificou-se uma redução da carga bacteriana conforme aumenta a concentração de quitosano.

Para a primeira determinação do segundo ensaio, as modalidades A5 e A6 foram as que apresentaram uma carga microbiana mais reduzida. A acção antibacteriana é mais evidente nas contagens da 5ª semana, particularmente para as modalidades A1 a A3.

Tabela 3.2.9.1- Determinação da carga microbiana em UFC/mL de sumo nos 1º e 2º ensaio. As amostras foram retiradas após 3 e 5 semanas do início de cada ensaio.

Tratamento	Dia 21- 1ºEnsaio		Dia 35- 1ºEnsaio		Dia 21- 2ºEnsaio		Dia 35- 2ºEnsaio	
	Psicrófilos	Mesófilos	Psicrófilos	Mesófilos	Psicrófilos	Mesófilos	Psicrófilos	Mesófilos
<b>B</b>	4,53x10 <sup>5</sup>	1,90 x10 <sup>2</sup>	Incontáveis	4,90 x10 <sup>2</sup>	3,50 x10 <sup>3</sup>	5,00 x10 <sup>1</sup>	1,65 x10 <sup>5</sup>	4,70 x10 <sup>4</sup>
<b>C1</b>	8,23 x10 <sup>5</sup>	2,10 x10 <sup>2</sup>	Incontáveis	4,36 x10 <sup>3</sup>	2,86 x10 <sup>5</sup>	1,10 x10 <sup>2</sup>	7,90 x10 <sup>5</sup>	4,50 x10 <sup>2</sup>
<b>C2</b>	1,31 x10 <sup>4</sup>	2,70 x10 <sup>2</sup>	8,92 x10 <sup>5</sup>	1,20 x10 <sup>2</sup>	5,00 x10 <sup>2</sup>	1,13 x10 <sup>3</sup>	4,39 x10 <sup>5</sup>	1,70 x10 <sup>2</sup>
<b>C3</b>	1,16 x10 <sup>5</sup>	6,00 x10 <sup>1</sup>	2,72 x10 <sup>5</sup>	8,00 x10 <sup>1</sup>	1,74 x10 <sup>4</sup>	1,40 x10 <sup>2</sup>	7,88 x10 <sup>4</sup>	1,50 x10 <sup>2</sup>
<b>A1</b>	3,90 x10 <sup>3</sup>	1,70 x10 <sup>2</sup>	2,98 x10 <sup>4</sup>	1,70 x10 <sup>2</sup>	1,50 x10 <sup>4</sup>	3,10 x10 <sup>2</sup>	0,00	0,00
<b>A2</b>	1,07 x10 <sup>3</sup>	1,60 x10 <sup>2</sup>	1,23 x10 <sup>5</sup>	6,90 x10 <sup>2</sup>	0,00	5,00 x10 <sup>1</sup>	0,00	3,00 x10 <sup>2</sup>
<b>A3</b>	8,50 x10 <sup>3</sup>	1,60 x10 <sup>2</sup>	2,02 x10 <sup>5</sup>	8,00 x10 <sup>1</sup>	3,70 x10 <sup>4</sup>	8,00 x10 <sup>1</sup>	4,60 x10 <sup>4</sup>	5,00 x10 <sup>1</sup>
<b>A4</b>	5,55 x10 <sup>3</sup>	1,20 x10 <sup>2</sup>	4,00 x10 <sup>3</sup>	1,70 x10 <sup>2</sup>	4,00 x10 <sup>4</sup>	4,20 x10 <sup>1</sup>	5,80 x10 <sup>4</sup>	3,00 x10 <sup>1</sup>
<b>A5</b>	2,29 x10 <sup>4</sup>	1,20 x10 <sup>2</sup>	3,77 x10 <sup>5</sup>	2,60 x10 <sup>2</sup>	4,86 x10 <sup>2</sup>	6,00 x10 <sup>1</sup>	5,40 x10 <sup>4</sup>	1,00 x10 <sup>2</sup>
<b>A6</b>	2,02 x10 <sup>3</sup>	1,10 x10 <sup>2</sup>	1,40 x10 <sup>4</sup>	4,60 x10 <sup>2</sup>	2,00 x10 <sup>2</sup>	4,00 x10 <sup>1</sup>	3,18 x10 <sup>5</sup>	5,80 x10 <sup>2</sup>

No caso dos microrganismos mesófilos, a carga microbiana nunca foi tão elevada, não existindo uma diferença muito acentuada entre modalidades. No primeiro ensaio todas as modalidades apresentaram valores muito próximos, destacando-se apenas a modalidade C3 na primeira determinação e a C3 e A3 para o final do ensaio, com contagens de mesófilos inferiores às restantes modalidades. No segundo ensaio verificou-se uma contaminação por mesófilos mais reduzida que no primeiro ensaio, apresentando as modalidades B, A2, A3, A4, A5 e A6 contagens inferiores às restantes. No final do ensaio o branco apresenta um aumento elevado no número de UFC/mL de sumo, mantendo-se com contagem reduzida as modalidades A3 e A4.

Contrariamente ao observado para microrganismos psicrófilos, no caso dos mesofilos não se observou nenhum efeito claro do quitosano sobre o crescimento bacteriano.

### 3.2.10 Análise sensorial

Por último, foi realizado um ensaio de análise sensorial com um painel não treinado de 16 provadores. Para tal, apresentaram-se 3 amostras de sumo ao painel, que deviam ser pontuadas mediante avaliação dos seguintes parâmetros: cor, aroma, sabor, adstringência, doçura e, finalmente, uma classificação geral. Essas três amostras foram entregues e pontuadas da seguinte forma,

primeiro a amostra de sumo normal, a seguir a amostra de sumo com solução de ácido ascórbico e quitosano 0,8g/L e por último a amostra com adição de ácido ascórbico e quitosano 0,8g/L em pó. A classificação foi efectuada dando pontuação 5 às amostras que mais gostavam e 1 às amostras que não gostavam nada.

Uma vez que o painel não era treinado e continha provadores com idades compreendidas entre os 22 aos 62 anos, existiu alguma discrepância na análise dos sumos. Enquanto alguns dos provadores apreciaram as amostras de sumo mais doces, favorecendo assim a pontuação para a doçura, outros consideraram esse parâmetro exagerado, pontuando negativamente a amostra mais doce.

Para a maioria dos parâmetros, obteve-se uma classificação positiva por parte dos provadores, sendo o único parâmetro com uma média negativa a adstringência para a amostra de sumo com solução de quitosano 0,8g/L, cuja média foi 2,625 (para pontuar positivamente o sumo teria de apresentar uma classificação de pelo menos 3 pontos) (Figura 3.2.10.1).

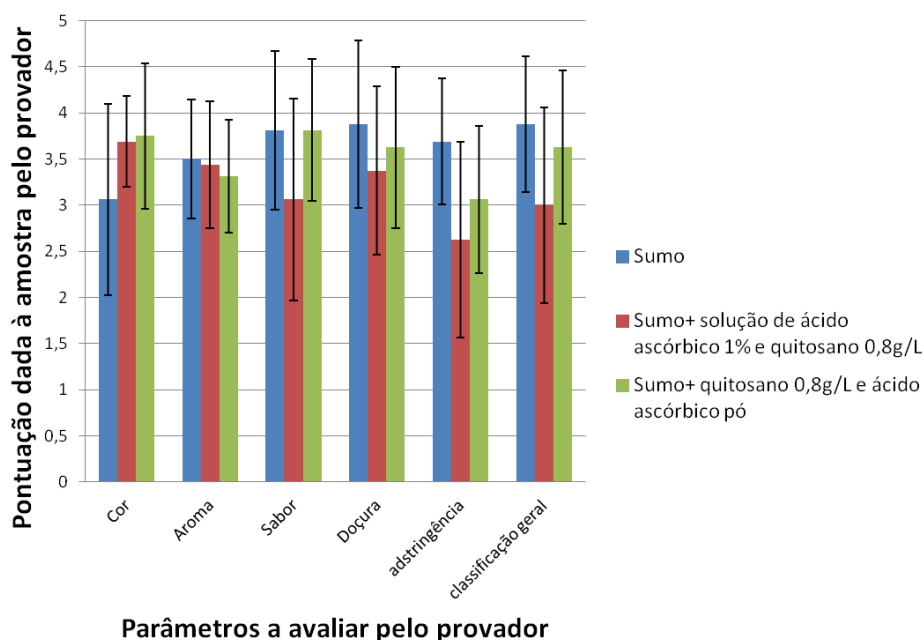


Figura 3.2.10.1- Resultados da análise sensorial do sumo de maçã.

De todos as amostras, a que obteve uma menor pontuação, de uma forma geral, foi aquela que sofreu com adição do quitosano em solução, sendo caracterizada essencialmente por uma adstringência muito marcada que inibia outros parâmetros como a doçura e o sabor. Neste caso deu origem a uma classificação mais baixa que as restantes amostras. Apenas obteve uma melhor classificação que o sumo de maçã sem qualquer adição de quitosano na cor, assim como aconteceu com o sumo com adição de quitosano em pó, tendo em todos os outros parâmetros uma classificação inferior aos outros sumos.

O sumo com adição de quitosano em pó apresentou resultados muito mais semelhantes aos do sumo sem qualquer adição, tendo tido melhores resultados na cor e no sabor uma mesma classificação intermédia. O parâmetro que apresentou uma menor classificação no sumo com adição de quitosano em pó foi a adstringência, que alguns provadores consideraram um pouco elevada.

Fazendo uma análise multivariada das variáveis é possível agrupar os diversos parâmetros em 3 clusters diferentes, que se formam uma vez que apresentam correlações significativas entre si. Assim, através do diagrama de variáveis verificou-se com uma probabilidade de 99% que o aroma e a adstringência se opõem ao parâmetro da cor e que este se opõe com uma probabilidade de 74,91% ao cluster que engloba as variáveis de doçura, sabor e classificação geral do sumo (Figura 3.2.10.2).

Através do dendograma é possível verificar que as variáveis mais distantes são a cor e a adstringência, sendo as mais próximas o sabor e a classificação geral seguindo-se a doçura e posteriormente o aroma (Figura 3.2.10.3).

Ambas as análises permitem inferir que os provadores vão reagir da mesma forma ao sabor e classificação geral, assim como à doçura. Assim, para o sumo sem quitosano, verificou-se uma classificação geral de 3,875, o que indica que também o sabor e a doçura apresentaram uma avaliação na ordem de 3,875. Para os sumos com quitosano essa classificação geral foi menor, sendo mais próxima da do sumo normal o sumo com quitosano em pó e posteriormente o sumo com quitosano em solução. A cor opõe-se a estes parâmetros, tendo os sumos com quitosano uma avaliação mais positiva que o sumo normal.

Estes dados apoiam a percepção obtida pela Figura 3.2.10.3, que indicam que, para o sumo normal este apresentou uma melhor classificação geral que os restantes sumos e também uma pontuação elevada para o sabor e doçura. Já para a cor o sumo normal apresenta uma menor pontuação quando comparado com os outros. O sumo com adição de quitosano em pó revelou uma evolução semelhante nos três parâmetros, e apresentando uma elevada pontuação na cor, demonstrou uma menor pontuação para o aroma e adstringência.

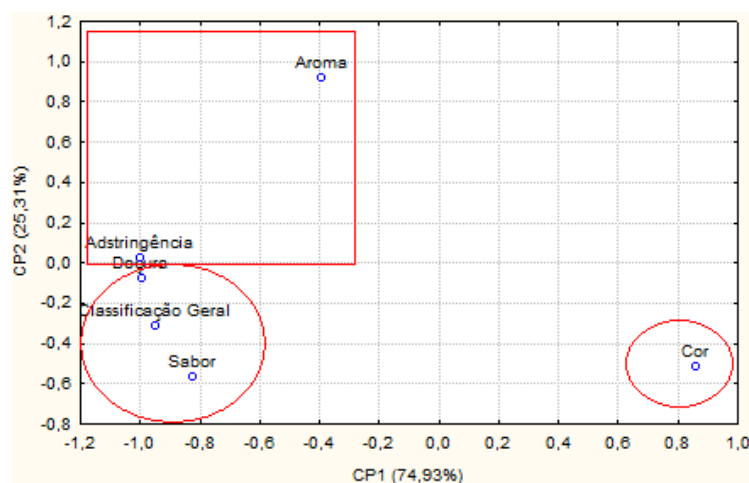


Figura 3.2.10.2- Análise estatística dos parâmetros sensoriais do sumo de maçã.

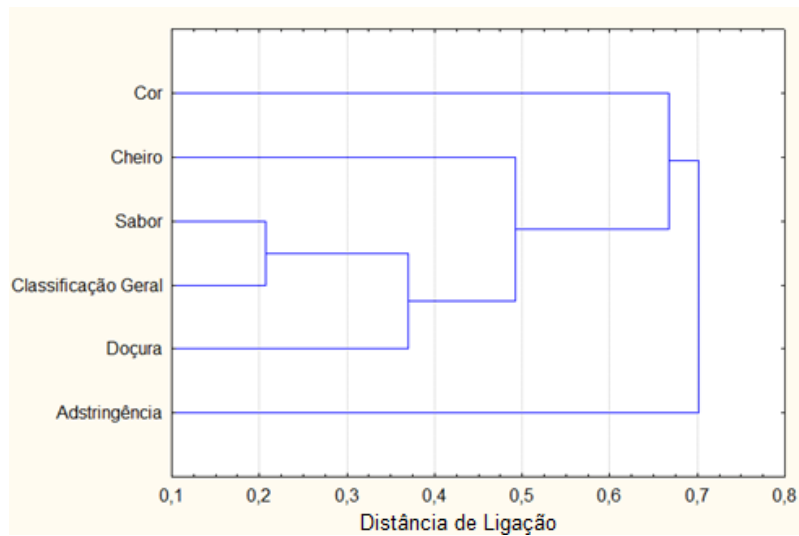


Figura 3.2.10.3- Dendrograma dos parâmetros sensoriais do sumo de maçã.

De uma forma geral, os sumos consideram-se aceitáveis em todos os parâmetros, contrariando apenas essa tendência, o sumo com adição de quitosano em solução, com uma classificação negativa a nível da adstringência. Os bons resultados obtidos para a amostra com adição de quitosano em pó, cujos resultados são de uma forma geral semelhantes aos do sumo normal, indicam uma forte possibilidade de aceitação dessa fórmula pelo consumidor.

#### 4. Conclusão e Perspectivas Futuras

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar a eficiência do quitosano no aumento do tempo de conservação de sumo de maçã não pasteurizado, considerando paralelamente a redução do escurecimento enzimático. As análises colorimétricas permitiram detectar, uma redução acentuada do escurecimento enzimático nas amostras com adição de quitosano, tanto em solução como em pó, mantendo-se sempre o sumo com uma tonalidade mais próxima do amarelo que os sumos sem qualquer adição de quitosano, os quais adquiriram rapidamente uma tonalidade mais alaranjada. Embora no primeiro ensaio as duas concentrações mais baixas do quitosano em solução tenham apresentado diferenças significativas na sua tonalidade, o mesmo não se verificou para o segundo ensaio, dificultando-se assim uma distinção significativa entre as diferentes concentrações de quitosano. Adicionalmente, para a maioria dos parâmetros estudados não se detectou uma diferença acentuada entre as concentrações de quitosano, e até mesmo entre as diferentes modalidades de adição deste. Sugere-se assim que ambas as formas de adição, bem como as diferentes concentrações utilizadas, apresentam uma acção semelhante.

Também para a turbidez e sólidos solúveis totais, a caracterização do lote acaba por apresentar valores semelhantes aos das diferentes modalidades testadas. Conclui-se portanto, uma vez mais que o quitosano não exerce uma forte influência na alteração das características naturais do sumo ao longo do tempo.

No caso do pH e da acidez titulável, existem ligeiras diferenças entre as modalidades e o lote. Para a acidez titulável, a presença tanto de solução de quitosano como do respectivo pó, vão levar a um aumento dos valores deste parâmetro para as diferentes modalidades. Já o pH vai diminuir quando comparado com o lote. Isto prende-se essencialmente com a utilização de ácido ascórbico, que apesar de necessário para a dissolução do quitosano no sumo, vai levar tanto a um decréscimo do valor do pH, como ao conseqüente aumento da acidez titulável. Não obstante, apesar de existirem efectivamente diferenças entre essas modalidades e o lote, ainda assim tal não prejudica as características gerais do sumo.

Ao longo do tempo, para as diferentes determinações, as variações não são de forma geral acentuadas, não ocorrendo uma diferença significativa entre o sumo de maçã com e sem quitosano. Conclui-se assim que na gama de concentrações estudadas, não se verifica um acréscimo do tempo de conservação do sumo de maçã não pasteurizado. Este efeito é também verificado através das análises microbiológicas, que apesar de ter revelado valores de mesófilos ligeiramente inferiores para as amostras com quitosano comparativamente ao sumo normal, não exerceu nenhum efeito claro sobre o crescimento deste tipo de microrganismos. Cabe destacar, que para as bactérias psicrófilas esta situação foi ligeiramente diferente, observando-se após 5 semanas de armazenamento uma menor contaminação em amostras com quitosano. Assim, pode concluir-se que, nas condições estudadas, o quitosano evidenciou uma maior eficácia antibacteriana sobre psicrófilos comparativamente aos mesófilos. Tendo em conta que os sumos devem ser armazenados a temperaturas de refrigeração, esta propriedade do quitosano é de grande importância e deve ser estudada em maior profundidade.

Em relação aos parâmetros nutricionais analisados, comprovou-se que a adição de quitosano não provoca efeitos minimizadores da qualidade nutricional do sumo de maçã. No caso particular dos açúcares, a influência do quitosano não é acentuada quando comparada com os valores originais de açúcares presentes no sumo natural. Um efeito semelhante foi observado para os compostos fenólicos e o ácido ascórbico. Em geral, conclui-se que a adição de quitosano não exerce nenhum efeito negativo nos parâmetros nutricionais do sumo de maçã.

Através da análise sensorial verificou-se uma aceitabilidade geral dos sumos, apresentando os mesmos após adição do quitosano em pó uma classificação mais próxima do sumo de maçã normal. Ainda assim, a adstringência provocada pela adição de ácido ascórbico foi muitas vezes considerada um factor negativo no sumo, particularmente no caso da adição de solução de quitosano (que foi depreciativa face às restantes).

Considera-se essencial, numa perspectiva futura, ampliar a gama de concentrações de quitosano a aplicar, sendo importante estudar concentrações mais elevadas para se poder, eventualmente, verificar uma acção microbiológica realmente eficaz. Outro factor importante a investigar é a solubilidade do quitosano em diferentes ácidos, pois a acção do ácido ascórbico mostrou-se nalguns casos acentuada, não permitindo uma percepção real do efeito do quitosano em relação a alguns parâmetros. No entanto é fundamental ter em conta que, para os sumos de fruta não pasteurizados é muito importante a não clarificação dos mesmos, processo que é favorecido pela adição de certos ácidos e de elevadas quantidades de quitosano. Assim também este é um dos grandes problemas a resolver na aplicação do quitosano neste tipo de bebida. A forma de adição, apesar de na maior parte das vezes não apresentar diferenças, deve também ser estudada em diferentes concentrações, pois numa gama mais alargada de concentrações podem verificar-se diferenças significativas. Também seria interessante estudar quitosanos de diferentes origens, como o quitosano de origem fúngica, o qual poderá apresentar vantagens no aumento de período de conservação em sumos quando comparado com o quitosano de origem animal. De uma forma geral, considera-se importante prosseguir o estudo da utilização do quitosano como um agente conservante de origem natural, pois permite manter grande parte das características essenciais de um sumo de maçã de qualidade e tem um potencial antimicrobiano elevado, podendo, nas proporções correctas, acrescentar valor ao produto.

## 5. Bibliografia

1. Albuquerque B., Lidon F., Leitão E., 2005. Ascorbic Acid Quantification in Melon Samples- The Importance of the Extraction Medium for HPLC Analysis. *Gen. Appl, Plant Physiology* 31 (3-4): 247-251.
2. Alkint C., Wadsö L., Sjöholm I., 2004. Effects of Modified Atmosphere on Shelf-life of Carrot Juice. *Food Control* 15: 131–137.
3. Bayındırlı A., Alpas H, Bozoğlu F., Hızal M., 2006. Efficiency of High Pressure Treatment on Inactivation of Pathogenic Microorganisms and Enzymes in Apple, Orange, Apricot and Sour Cherry Juices. *Food Control* 17: 52-58.
4. Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B.P., Guha A.K., 2004. Clarification of Fruit Juice with Chitosan. *Process Biochemistry* 39: 2229–2232.
5. Chien P., Sheu F., Huang W., Su M., 2007. Effect of Molecular Weight of Chitosans on Their Antioxidative Activities in Apple Juice. *Food Chemistry* 102: 1192–1198.
6. Domingos de Almeida P., Pintado M., 2007. Caracterização Nutritiva e Funcional de Variedades de Maçã de Alcobaça- Relatório Final.
7. Eisele T. A., Drake S. T., 2005. The Partial Compositional Characteristics of Apple Juice from 175 Apple Varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 213-221.
8. Fai A. E., Stamford T. C., Stamford T. L., 2008. Potencial Biotecnológico de Quitosana em Sistemas de Conservação de Alimentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 9 (5): 435-451.
9. FAS/USDA Horticultural & Tropical Products Division. World Apple Juice Situation: Global Apple Juice Production Continues To Set New Record.
10. Fuleki T., Pelavo E., Palabay R. B., 1994. Sugar Composition of Varietal Juices Produced from Fresh and Stored Apples. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1266-1275.
11. Gabinete de Planeamento e Política Agro-Alimentar, Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e Pescas, 2004. Anuário 2004 Vegetal- Crop Production Yearbook. N°7427/96, Lisboa.
12. <http://www.maca.pt/custompages/showpage.aspx?pageid=6d43e16a-2df5-4bf0-abf6-8825d319d410&m=b50> (consultado a 9-08-2011)
13. Hudina M., Stamper F., 2000. Sugar and Organic Acids Contents of European (*Pyrus communis* L.) and Asian (*Pyrus serotina* Rehd.) pear cultivars. *Acta Aliment*, 29: 217-230 *Acta Horticulturae*.
14. Karadeniz F., Eks A., 2002. Sugar Composition of Apple Juices. *Eur Food Res Technol*, 215:145-148.
15. Kong M., Chen X. G., Xing K., Park H. J., 2010. Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review. *Internacional Journal of Food Microbiology* 144: 51-63.
16. Liu X., Guan Y., Yang., Yao K., 2001. Antibacterial Action of Chitosan an Carboxymethylater Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 79: 1324–1335.

17. López-Nicolás J., Núñez-Delicado E., Sánchez-Ferrer A., García-Carmona F., 2007. Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chemistry*, 101: 1164–1171.
18. Martín-Diana A., Rico D., Barat J.M., Barry-Ryan C., 2009. Orange Juices Enriched with Chitosan: Optimization for Extending the Shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 590–600.
19. Moura C., Muszinski P., Schmidt C., Almeida J., Pinto L., 2006. Quitina e Quitosana Produzidas a partir de Resíduos de Camarão e Siri: Avaliação do Processo em Escala Piloto. *Vetor*, Rio Grande, 16 (1/2): 37-45
20. Neto R. S. C., Faria J. A. F., 1999. Factors of influence in the quality of Orange juice. *UNICAMP/FEA, Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 19 (1): 153-161.
21. No H.K., Meyers S.P., Prinyawiwatkul W., Xu Z., 2007. Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf-life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*, 72 (5): 87-100.
22. Nogueira A., Santos L. D., Wiecheteck F., 2003. Processing Effects On The Content Of Phenol Compounds In Apple Juice. *Publ. UEPG Ciências Exatas Terra*: 7-14.
23. Özuglu H., Bayındırlı A., 2002. Inhibition of Enzymatic Browning in Cloudy Apple Juice with Selected Antibrowning Agents. *Food Control* 13: 213–221
24. Pais I.P, Ramos A. P., Barreiro M.G., Silva M.J. 2008. Sugar variation in 'Rocha' pears and *Penicillium expansum* reduction by *Aureobasidium pullulans*. *Acta Horticulturae* 800, 929-934.
25. Pinto L. F., 2005. Síntese e Estudo de Derivados do Quitosano Com Potencial Interesse Biológico e Ambiental.
26. Rabea E., Badawy M., Steves C., Smaghe G., Steurbaut W., 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules American Chemical Society*, 4 (6): 1457:1465.
27. Rocha A., Morais A., 1999. Polyphenoloxidase Activity and Total Phenolic Content as Related to Browning of Minimally Processed 'Jonagored' Apple. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 120-126.
28. Roller S., Covill N., 1999. The Antifungal Properties of Chitosan in Laboratory Media and Apple Juice. *International Journal of Food Microbiology* 47: 67-77.
29. Rungsardthong V., Wongvuttanakul N., Kongpien N., Chotiwaranon P., 2006. Application of Fungal Chitosan for Clarification of Apple Juice Process *Biochemistry* 41: 589–593.
30. Shahidi F., Arachchi J. K. V., Jeon Y., 1999. Food Applications of Chitin and Chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 10: 37-51.
31. Teixeira S. H, Tolentino M. C., Demiate I.M, Wosiacki G., Nogueira A., 2007. Influence of Enzymatic Browning on the Ionic Profile of Apple Juice *Publ. UEPG Ciências Exatas Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*, Ponta Grossa, 13 (2): 55-61.
32. Vieira F., Borges G., Copetti, C., Gonzaga L., Nunes E., Fett R., 2009. Activity and Contents of Polyphenolic Antioxidants in the Whole Fruit, Flesh and Peel of Three Apple Cultivars.

Archivos Latino Americanos de Nutricion, Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 59 (1): 101-106.

33. Voss D. H., 1992. Relating Colorimetric Measurement of Plant Color to the Royal Horticultural Society Colour Chart. HortScience 27 (12): 1256-1259
34. Weemaes C., Ludikhuyze L., Van Den Broek I., Hendrickx M., 1998. High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases. Journal of Food Science 63 (5): 1-5.
35. Wenjun L., Xuan J., Peihua X., Shiming C., 2002. Inhibitory Effects of Chitosan on Superoxide Anion Radicals and Lipid Free Radicals. Chinese Science Bulletin 47 (11): 887-889.
36. Will F., Roth M., Olk M., Ludwig M., Dietrich H., 2008. Processing and Analytical Characterization of Pulp-enriched Cloudy Apple Juices. LWT- Food Science and Technology 41: 2057-2063
37. World Health Organization- Food and Agriculture of the United Nations, 2000. Codex General Standard for Fruit Juices and Nectars. Rome.
38. Wosiacki G., Silva N. C., Nogueira A., Denardi F., 2005. The Apple and its Fructose Content Cultivar Sansa- A Case Study. Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng, 11, 27-39

## **6.Anexos**

## Anexo I

### Folha de Prova

Teste de consumidor (subjectivo)

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo : M  F  Idade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Produto: Sumo de Maçã

Procedimento: Irá receber três amostras de sumo de maçã que estão codificadas com três dígitos. Utilize a escala abaixo discriminada para fazer o julgamento em relação à aceitabilidade dos sumos nos diversos parâmetros, assinalando na tabela a posição da escala que mais se adequa à sua opinião.

- 1- Não gostei nada
- 2- Não gostei
- 3- Indiferente (não gostei nem desgostei)
- 4- Gostei
- 5- Gostei muito

Código da amostra	Cor	Aroma	Sabor	Doçura	Adstringência	Classificação Geral

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Obrigado pela sua participação.

## Anexo II



Figura 6.1- Modalidades B (Sumo) e C1 (Sumo + água destilada) 1 dia após o início do ensaio.



Figura 6.2- Modalidades C2 (Sumo + solução de ácido ascórbico 1%) e A1 (Sumo + solução de ácido ascórbico 1% + quitosano 0,6 g/L) 1 dia após o início do ensaio.



Figura 6.3- Modalidades C3 (Sumo + ácido ascórbico em pó 0,08%) e A1 (Sumo + ácido ascórbico em pó 0,08%+ quitosano 0,6 g/L) 1 dia após o início do ensaio.