



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ANA LAURA TIBÉRIO DE JESUS**

Processamento de Polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) por  
Tecnologia de Alta Pressão Isostática

Açaí pulp (*Euterpe oleracea* Martius) processing by high isostatic  
pressure technology

**CAMPINAS**

**2017**

**ANA LAURA TIBÉRIO DE JESUS**

Processamento de Polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) por Tecnologia de Alta Pressão Isostática

Açaí pulp (*Euterpe oleracea* Martius) processing by high isostatic pressure technology

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Alimentos.

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of PhD in Food Technology.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cristianini

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA LAURA TIBÉRIO DE JESUS, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO CRISTIANINI.

**CAMPINAS**

**2017**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2015/01570-0  
**ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8325-2526>

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

J499p Jesus, Ana Laura Tiberio de, 1981-  
Processamento de polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) por tecnologia de alta pressão isostática / Ana Laura Tiberio de Jesus. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marcelo Cristianini.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Açaí. 2. Alta pressão isostática. 3. Peroxidase. 4. Polifenoloxidase. 5. Antocianinas. I. Cristianini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Açaí pulp (*Euterpe oleracea* Martius) processing by high isostatic pressure technology

**Palavras-chave em inglês:**

Açaí

High isostatic pressure

Peroxidase

Polyphenoloxidase

Anthocyanins

**Área de concentração:** Tecnologia de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Tecnologia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Marcelo Cristianini [Orientador]

Adriano Gomes da Cruz

Dirce Yorika Kabuki

Karen Signore Pereira

Ruann Janser Soares de Castro

**Data de defesa:** 01-12-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Tecnologia de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Marcelo Cristianini**

DTA / FEA / UNICAMP

Orientador

**Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz**

Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)

Membro Titular

**Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki**

DCA / FEA / UNICAMP

Membro Titular

**Profa. Dra. Karen Signori Pereira**

UFRJ / Escola de Química/Centro de Tecnologia

Membro Titular

**Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro**

DCA / FEA / UNICAMP

Membro Titular

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## DEDICATÓRIA

*Dedico mais esta conquista a Deus em primeiro lugar, Maria (minha mãe do céu sempre passando na frente) aos meus pais Jaime e Cida, aos meus irmãos Jaime Filho (Jaiminho) e Lauro (Tico), à minha Tia Ana Maria e à minha querida vó Laura, por estarem sempre ao meu lado me apoiando em minhas escolhas e enchendo minha vida de muito amor.*

*"Nunca deixe ninguém dizer que você não pode fazer alguma coisa. Se você tem um sonho, tem que correr atrás dele. As pessoas não conseguem vencer e dizem que você também não vai vencer. Se você quer alguma coisa, corre atrás." **À procura da felicidade.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me guiar pelos caminhos certos e abençoar minha vida. À Maria (mãe do céu) por me socorrer sempre nos momentos de angústia e desânimo.

Aos meus pais, Jaime e Cida, que sempre me incentivaram a estudar e tiveram sempre muito amor e paciência, sendo meus exemplos de vida. Meu pai o homem mais honesto e direito que eu conheço. Minha mãe a mulher mais digna e incansável que existe, sempre nos confortando com suas orações. Todas as minhas conquistas são mérito de vocês e tudo que eu fizer não será a metade do que vocês já fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Jaiminho (só fui para área acadêmica pois queria seguir seus passos rss) e Tico (meu engenheiro favorito e meu amorzinho), agradeço por todo o amor, compreensão, ajuda em todos os momentos e por serem meus exemplos de profissionais. Sou fã de vocês.

À minha querida vó Laura, por todo amor, paciência, apoio, ajuda, orações e torcida. À minha amada Tia Ana (fofinha rss), por estar sempre presente em minha vida, incentivando, apoiando e ajudando em momentos difíceis e alegrando a casa.

Aos meus primos Oswaldinho e Sueli, juntamente com os priminhos Taynah, Elisa e Davi, por terem me recebido tão bem aqui em Campinas logo que eu cheguei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Cristianini, por ter me dado essa oportunidade, ter confiado no meu trabalho e pelo exemplo de profissional (as vezes durão mas com um bom coração rss).

Ao Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz (“Boss”) pelas correções do boneco, paciência, confiança e amizade desde a época do mestrado.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki, Profa. Dra. Karen Signori Pereira, Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro, Prof. Dr. Alfredo de Almeida Vitali, Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Júnior e Profa. Dra. Priscilla Efraim pelas valiosas contribuições e sugestões na correção da tese.

À Ana Maria, técnica do laboratório, por toda a ajuda, atenção durante todos os momentos no laboratório e carinho trazendo sempre um “agrado” no nosso café da tarde. À Alice técnica do laboratório de embalagens.

À Profa. Dra. Marise pela atenção e empenho na concessão da bolsa CAPES.

Ao Prof. Dr. Anderson de Souza Sant’Ana (DCA/UNICAMP) pela ajuda na parte de microbiologia preditiva.

A todos os provadores pela paciência e disposição para a realização dos testes sensorias, sem os quais não seria possível a realização do estudo.

À Aline e Ju, técnicas do laboratório de microbiologia e de instrumentação, pela paciência e ajuda nos momentos de dúvidas e a todos os técnicos e funcionários do DTA e DEPAN pelo apoio.

Aos meus queridos amigos do Laboratório: Thiago (valeu pela ajuda em reologia rss), Lelê (fera no HIP), Bruno, Miguel, Luma, Ricardo, Laura, Jhosy, Paula e Bruna pelo apoio, companheirismo e amizade.

À secretária da SPG/FEA, Andrea, pela paciência e auxílios diversos.

Aos funcionários do DTA/FEA, José Roberto, Adauto, Sandra, Leila e a secretária Cláudia pela disposição e auxílios diversos.

Ao meu querido amigo Daniel Vagner (Dan) pelo carinho, conselhos e momentos de descontração.

Aos amigos da FEA pelos auxílios diversos, incentivo, apoio e amizade que foram essenciais: Vanessa, Márcio Schmiele, Aline Tribst.

Aos amigos que fiz em Campinas os quais confirmam que a vida ainda é espaço para boas surpresas e muitas risadas: Lud, Livia Reis, Geina e Érick.

Às minhas queridas amigas do “apê do sucesso” Glau e Amanda que tornaram a convivência mais agradável nessa caminhada. Muito obrigada pelo carinho, companheirismo e amizade que vou levar para sempre.

Ao CCQA/ITAL pela colaboração com as análises físico-químicas.

Ao Prof. Dr. Mário Maróstica e Nathália Medina (DEPAN/FEA) pela colaboração nas análises de antocianinas, fenólicos totais e antioxidantes.

À Universidade Federal do Ceará, à UNICAMP, seus professores e funcionários pela colaboração para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida e FAPESP pelo auxílio financeiro e bolsa de estudo.

À Fundação André Tosello pelas culturas de micro-organismos e informações fornecidas.

A todos que incentivaram ou contribuíram de alguma forma para o ingresso, durante a jornada ou para que fosse possível chegar ao fim.

Muito obrigada!

*“Tudo posso naquele que me fortalece”.*

*Filipenses 4:1*

## RESUMO

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma fruta altamente perecível que necessita de tratamentos que prolonguem sua vida de prateleira, inativando as enzimas naturalmente presentes e micro-organismos deteriorantes e patogênicos. O processamento de alimentos utilizando uma tecnologia emergente não térmica (alta pressão) surge como uma alternativa aos processos tradicionais de pasteurização, pelas vantagens que apresenta ao minimizar perdas sensoriais e nutricionais. Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar o efeito da tecnologia de alta pressão isostática (API) na inativação das principais enzimas presentes na polpa do açaí (polifenoloxidase e peroxidase), bem como na inativação de um micro-organismo deteriorante (*Lactobacillus fructivorans*), um esporulado (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) e uma cepa de *Escherichia coli*, permitindo estabelecer parâmetros de processo adequados para garantir a segurança microbiológica e preservando as propriedades funcionais e sensoriais do fruto. Foram utilizadas pressões de 400, 500 e 600 MPa, tempos de 5 e 15 min e temperaturas de 25 e 65 °C. As análises realizadas foram de atividade enzimática, cor, microbiológicas, sensorial, antocianinas, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e reológicas. Os resultados demonstraram que a enzima peroxidase é termorresistente e barorresistente em polpa de açaí nas condições estudadas, contrariamente à polifenoloxidase, que apresentou maior inativação (71,7 %) na condição de 600 MPa/15 min/65 °C. O processamento por API foi comparado a um processo térmico convencional (85 °C/1 min), onde foi observada inativação parcial das duas enzimas, mas com alteração da cor do produto ( $\Delta E = 4,22$ ) como perceptível ao olho humano. Para *Escherichia coli*, a API permitiu a inativação > 6,1 ciclos log em todas as condições estudadas. Para *Alicyclobacillus acidoterrestris*, foi determinado um tratamento a 600 MPa/65 °C (5, 10, 15, 20 e 25 min) resultando em um valor de 4 reduções decimais de 13,5 min. Foram então selecionadas duas melhores condições 600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/65 °C, que juntamente com a amostra controle e a pasteurizada foram submetidas à avaliação durante a estocagem a 5 °C. Para o grupo de micro-organismos (aeróbios mesófilos, aeróbios psicotróficos e bactérias lácticas), verificou-se que após o processamento por API (600 MPa/5 min/65 °C) as contagens permaneceram em valores abaixo de 2 log UFC/mL durante os 28 dias. Em nenhuma das amostras de polpa foi detectada a presença de *Salmonella* sp, o que indica que o produto permaneceu de acordo com os padrões legais vigentes. Para as amostras

processadas por API e a pasteurizada, os valores de contagem de micro-organismos permaneceram abaixo do limite máximo permitido pela legislação durante os 28 dias. Os resultados da análise sensorial mostraram que o tratamento por API influenciou na percepção da textura das amostras de açaí (textura mais consistente) e durante as análises reológicas pôde-se perceber que as mesmas apresentaram um aumento de viscosidade aparente. Em polpas de açaí pressurizadas, a extração das antocianinas aumentou em média 37%, em relação a amostra controle, para ambos os processos de API. Em oposição, o tratamento térmico reduziu o teor desse pigmento em 16,3% em comparação com a amostra *in natura*. Para fenólicos totais, ambos os processos a 600 MPa tanto a 25°C como a 65°C quando comparados à amostra *in natura*, aumentaram a extração em 11,44% e 10,25%, respectivamente. A API também foi capaz de manter a atividade antioxidante para as polpas processadas a 600 MPa por 5 min a 25 e 65°C. Diante dos resultados, conclui-se que o processamento de API se mostrou como uma alternativa para tratamentos térmicos de pasteurização, gerando um produto seguro microbiologicamente, com preservação de suas características nutricionais e sensoriais.

**Palavras-chave:** açaí, alta pressão isostática, polifenoloxidase, peroxidase, antocianinas, inativação bacteriana

## ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) is a highly perishable fruit which needs treatments that prolong its shelf life, inactivating enzymes naturally present and spoilage and pathogenic microorganisms. Food processing using an emerging non-thermal technology (high pressure) could be an alternative to conventional pasteurization processes for thermosensitive products with the advantages of minimizing sensorial and nutritional losses. In this context, this study aimed to evaluate the effect of high isostatic pressure technology (HIP) on the inactivation of the main enzymes present in açai pulp (polyphenol oxidase and peroxidase), as well as inactivation of a spoilage microorganism (*Lactobacillus fructivorans*), a strain of *Escherichia coli* and a sporulated microorganism (*Alicyclobacillus acidoterrestris*), allowing to establish adequate process parameters to ensure the microbiological safety of the product and preserve the functional and sensory properties of fruit. Pressures of 400, 500 and 600 MPa, processing times of 5 and 15 minutes and temperatures of 25 and 65 °C were used. The analyzes were enzymatic activity, color, microbiological, sensorial, anthocyanins, total phenolic compounds, antioxidant activity and rheological. The results showed that peroxidase enzyme is heat-resistant and baro-resistant in açai pulp under the conditions studied, in opposition, polyphenoloxidase, presented the highest inactivation (71.7%) at 600 MPa / 15 min / 65 ° C. The HIP process was compared to a conventional thermal process (85 °C/1 min), where partial inactivation of the two enzymes was observed, but with noticeable change in the color ( $\Delta E = 4.22$ ). For *Escherichia coli*, the HIP allowed the inactivation > 6.1 log cycles in all conditions studied. For *Alicyclobacillus acidoterrestris*, a treatment at 600 MPa/65°C (5, 10, 15, 20 and 25 min) was determined resulting in a value of 4 decimal reductions of 13.5 min. Two conditions were selected, 600 MPa/5 min/25 °C and 600 MPa/5 min/65 °C and together with the control and pasteurized samples they were evaluated during storage at 5 °C. For the group of microorganisms (mesophilic aerobes, psychotropic aerobes and lactic acid bacteria), it was found that after processing by HIP (600 MPa / 5min / 65°C) the counts remained below 2 log CFU/mL during 28 days. No presence of *Salmonella* sp was detected in any sample, which indicates that the product remained in accordance with current legal standards. For both, the API and pasteurized samples, the microorganism count values remained below the maximum allowable limit required by the legislation for 28 days. The results of the sensory analysis showed that API process influenced the texture perception of açai samples (a

more consistent texture) and during rheological analysis it was observed that samples processed by HIP showed an increase in apparent viscosity. In pressurized açai pulps, the extraction of anthocyanins increased 37%, compared to control sample, for both HIP processes. In contrast, the heat treatment reduced the pigment content by 16.3% compared to the in natura sample. For total phenolics, both processes at 600 MPa at 25°C and 65°C when compared to the in natura sample, increased the extraction by 11.44% and 10.25%, respectively. The API was also able to maintain the antioxidant activity for the pulps processed at 600 MPa for 5 min at 25 and 65 ° C. In view of the results, it was concluded that the HIP processing was shown as an alternative for thermal treatments of pasteurization, generating a safe microbiological product, with preservation of its nutritional and sensorial characteristics.

**Key-words:** açai, high isostatic pressure, polyphenol oxidase, peroxidase, anthocyanins, bacterial inactivation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fluxograma geral do processamento (industrial) do fruto do açaizeiro para obtenção de açaí do tipo A, B ou C congelado.....	28
<b>Figura 2:</b> Fluxograma das análises realizadas na polpa de açaí.....	47
<b>Figura 3:</b> Curva de sobrevivência de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em polpa de açaí a 65 °C em combinação com alta pressão (600 MPa) .....	64
<b>Figura 4:</b> Efeito da alta pressão isostática na inativação de <i>Lactobacillus fructivorans</i> CCT 0850 em polpa de açaí processada por API.....	70
<b>Figura 5:</b> Atividade da POD (grupo A e B) e da PPO (grupo C e D) de açaí após processamento por API a 25 °C e 65 °C.....	73
<b>Figura 6:</b> Atividade da POD e PPO de açaí após processamento térmico a 85 °C por 1 minuto.....	74
<b>Figura 7:</b> Atividade da POD (grupo A) e da PPO (grupo B) de açaí após processamento por API combinado com temperatura de 80 °C por 2 e 5 minutos.....	76
<b>Figura 8:</b> Aparência visual da polpa de açaí após processamento térmico e por alta pressão isostática.....	80
<b>Figura 9:</b> Atividade da POD (grupo A) e da PPO (grupo B) de açaí após processamento (0 h) e após 24 h de estocagem refrigerada (5 ± 2 °C) por API a 25 °C e 65 °C.....	83
<b>Figura 10:</b> Perfil dos participantes da pesquisa de análise sensorial de polpa de açaí processada por API.....	87
<b>Figura 11:</b> Intenção de compra das amostras de polpa de açaí.....	89
<b>Figura 12:</b> Mapa de preferência interno das amostras de polpa de açaí.....	91
<b>Figura 13:</b> Ideal de cor das amostras de polpa de açaí.....	92

<b>Figura 14:</b> Representação das amostras e dos atributos na primeira e segunda dimensões da análise de componentes principais (ACP) realizada nos dados de <i>free listing</i> .....	97
<b>Figura 15:</b> Efeito da API no teor de antocianinas monoméricas em polpa de açaí após 24 h do processamento.....	100
<b>Figura 16:</b> Efeito da API no teor de compostos fenólicos totais em polpa de açaí após 24 h do processamento.....	102
<b>Figura 17:</b> Capacidade antioxidante das amostras de polpa de açaí pelo método FRAP e ORAC.....	104
<b>Figura 18:</b> Distribuição de tamanho de partícula (DTP) e os diâmetros médio de partículas (D [4,3] e D [3,2]) de polpa de açaí.....	105
<b>Figura 19:</b> Diâmetro médio das partículas (D [4,3] e D [3,2]) de polpa açaí.....	106
<b>Figura 20:</b> Comportamento ao fluxo de polpa açaí processada por API e processo térmico.....	106
<b>Figura 21:</b> Tixotropia de polpa de açaí processada por API e processo térmico.....	111

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição físico-química da polpa de açaí segundo dados da literatura.....	24
<b>Tabela 2:</b> Contribuição do consumo de açaí para as necessidades diárias de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn.....	25
<b>Tabela 3:</b> Efeito da Alta Pressão em vegetais sob diferentes tipos de enzimas.....	38
<b>Tabela 4:</b> Desenho experimental.....	49
<b>Tabela 5:</b> Composição físico-química da polpa de açaí utilizada no estudo.....	62
<b>Tabela 6:</b> Média das contagens de <i>E.coli</i> em polpa de açaí após processamento por API.....	69
<b>Tabela 7:</b> Efeito da API e do processamento térmico na cor da polpa de açaí.....	77
<b>Tabela 8:</b> Efeito da API na cor da polpa de açaí após processamento (0 h) e após 24 h de estocagem a 5°C.....	84
<b>Tabela 9:</b> Contagens microbiológicas em polpa de açaí armazenada sob refrigeração a 5 °C.....	86
<b>Tabela 10:</b> Resultado do teste de aceitação sensorial.....	88
<b>Tabela 11:</b> Índices calculados para os 10 termos descritores e número total de entrevistados (n = 118) .....	95
<b>Tabela 12:</b> Parâmetros de comportamento ao fluxo de polpa de açaí e outros produtos vegetais a uma temperatura similar.....	107
<b>Tabela 13:</b> Parâmetros de comportamento ao fluxo da polpa açaí processada por API e processo térmico.....	108
<b>Tabela 14:</b> Parâmetros do modelo Figoni-Shoemaker em polpa processada por API e processo térmico.....	111

## SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta E$ : diferença total de cor

$^{\circ}C$ : graus Celsius

$\mu L$ : microlitros

$\mu mol TE/g$ : micromol de trolox equivalente por grama

$a^*$ : coordenada vermelho/verde (+a indica vermelho e -a indica verde)

AAPH: Dicloridrato de 2,2-azobis(2-metilpropionamida)

AAT: *Alicyclobacillus acidoterrestris*

ACP: análise de componentes principais

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

AOCS: American Oil Chemists' Society

AP: Alta pressão

APH: Alta pressão hidrostática

API: Alta pressão isostática

$b^*$  = coordenada amarelo / azul (+b indica amarelo e -b indica azul)

C3G: Cianidina-3-glicosídeo

Ca: cálcio

D: Tempo de redução decimal

DPA: ácido dipicolínico

DTP: distribuição de tamanho de partícula

*E. coli*: *Escherichia coli*

FDA: Food and Drug Administration

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

g: gramas

h: hora

ISS: Índice de Saliência de Smith

$L^*$ : Luminosidade

L: litros

LOX: lipoxigenase

mg GAE: miligrama de ácido gálico

mg: miligramas

min: minutos

mL: mililitros

mm: milímetro

mM: milimolar

MPa: Megapascal

ms: matéria seca

nm: nanômetro

ORAC: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*  
PDA: ágar batata dextrose  
PG: poligalacturonase  
PM: peso molecular  
PME: pectinametilesterase  
POD: peroxidase  
ppb: partes por bilhão  
PPO: polifenoloxidase  
R<sup>2</sup>: coeficiente de correlação  
RMSE: Root Mean Square Error  
s: segundos  
TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido  
TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina  
UFC/mL: unidades formadoras de colônia por mililitro  
VRBG: violeta red bile glucose  
 $\omega$ : ômega

## SUMÁRIO

1. Introdução geral .....	20
2. Objetivos .....	23
3. Revisão Bibliográfica .....	24
3.1. Açai .....	24
3.1.1. Características gerais .....	24
3.1.2. Antocianinas .....	26
3.1.3. Processamento .....	27
3.2. Alta Pressão Isostática (API) .....	30
3.3. Mercado de produtos e equipamentos de alta pressão isostática .....	32
3.4. Efeito da alta pressão isostática sobre enzimas .....	33
3.5. Efeito da alta pressão isostática sobre compostos bioativos .....	38
3.6. Efeito da alta pressão isostática sobre as características sensorias e nutricionais .....	42
3.7. Efeito da alta pressão isostática na inativação microbiana .....	44
4. Material e Métodos .....	46
4.1. Polpa de açai .....	46
4.2. Caracterização físico-química da polpa de açai .....	48
4.3. Desenho experimental e processamento por alta pressão isostática .....	48
4.4. Processamento térmico .....	49
4.5. Processamento combinado de alta pressão isostática e alta temperatura .....	50
4.6. Extração e atividade enzimática .....	50
4.7. Determinação instrumental de cor .....	51
4.8. Estabilidade durante armazenamento .....	52
4.9. Avaliação da inativação de micro-organismos em polpa de açai .....	52
4.9.1. Preparação das amostras para os ensaios de inativação microbiana .....	52
4.9.2. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (AAT) .....	52
4.9.2.1. Preparo da suspensão de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	52
4.9.2.2. Contagem de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	53
4.9.3. <i>Escherichia coli</i> .....	53
4.9.3.1. Ativação da cultura estoque de <i>E. coli</i> .....	54
4.9.3.1. Contagem de <i>E.coli</i> .....	54
4.9.4. <i>Lactobacillus fructivorans</i> .....	54

4.9.4.1. Ativação da cultura estoque de <i>Lactobacillus fructivorans</i> .....	54
4.9.4.2. Contagem de <i>Lactobacillus fructivorans</i> .....	55
4.9.5. Contagens microbiológicas em polpa de açaí armazenada sob refrigeração .	55
4.10. Análise sensorial .....	55
4.10.1. Teste de aceitação .....	55
4.10.2. <i>Free listing</i> .....	56
4.11. Extração dos compostos bioativos .....	57
4.12. Antocianinas.....	57
4.13. Compostos fenólicos totais.....	58
4.14. Atividade antioxidante. ....	58
4.14.1. ORAC ( <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> ) .....	59
4.14.2. FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	59
4.15. Análise de distribuição de tamanho de partículas (DTP).....	59
4.16. Análises reológicas .....	60
4.17. Análise dos dados .....	61
5. Resultados e Discussão .....	61
5.1. Caracterização físico-química da polpa de açaí.....	61
5.2. Avaliação da inativação de micro-organismos em polpa de açaí.....	64
5.2.1. Inativação de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	64
5.2.2. Inativação de <i>E.coli</i> .....	68
5.2.3. Inativação de <i>Lactobacillus fructivorans</i> .....	69
5.3. Efeito da API e do tratamento térmico na atividade das enzimas POD e PPO ..	70
5.4. Efeito da API e do tratamento térmico na determinação instrumental de cor.....	76
5.5. Acompanhamento da estabilidade durante armazenamento .....	81
5.5.1. Atividade enzimática.....	81
5.5.2. Determinação instrumental de cor.....	83
5.5.3. Contagens microbiológicas em polpa de açaí armazenada sob refrigeração .	84
5.6. Análise sensorial .....	86
5.6.1. Teste de aceitação .....	87
5.6.2. <i>Free listing</i> .....	92
5.7. Análise de compostos bioativos .....	97
5.7.1. Antocianinas.....	98
5.7.2. Compostos fenólicos totais.....	100
5.8. Atividade antioxidante .....	102

5.9. Análise de distribuição de tamanho de partículas (DTP).....	104
5.10. Comportamento reológico .....	106
5.10.1. Comportamento ao fluxo de polpa de açaí.....	106
5.10.2. Propriedades dependentes do tempo .....	110
6. Conclusões Gerais .....	112
Sugestões de Trabalhos Futuros .....	115
Referências Bibliográficas.....	116
Anexos .....	155

## 1. Introdução geral

A palmeira do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) pertence à família *Arecaceae* e é conhecida popularmente como palmeira do gênero *Euterpe*. Nativa das regiões de várzea da Amazônia, essa palmeira é considerada uma das mais produtivas desse ecossistema e dela se pode extrair o fruto (o açaí propriamente dito) e o palmito de açaí. O açaizeiro produz o fruto durante todo o ano, porém, o pico de produção acontece nos meses de julho a dezembro (ROGEZ, et al., 2012).

O açaí na forma de polpa faz parte da alimentação diária da população da região Norte do Brasil. No entanto, tem sido observado um aumento da demanda no mercado nacional e internacional, despertando grande interesse em investimentos e pesquisas sobre o assunto (ROGEZ, 2000; YAMAGUCHI et al., 2015;). Este aumento pode ser atribuído às propriedades nutricionais do açaí, pois este é um alimento rico em proteínas, fibras, vitamina E, lipídeos poli-insaturados e minerais como manganês, cobre, boro, cálcio e cromo. Além disso, este fruto possui um elevado teor de compostos bioativos como os polifenóis, entre eles as antocianinas, que são compostos benéficos à saúde e que dão coloração ao fruto (TONON; BRABET; HUBINGER, 2010). As antocianinas possuem propriedades antioxidantes, farmacológicas e medicinais, incluindo anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, prevenindo a oxidação de proteínas de baixa densidade, enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas. Favorecem ainda a circulação sanguínea e protegem o organismo contra a arteriosclerose (ROGEZ, 2000; WANG et al., 2008; MENEZES et al., 2008; POJER et al., 2013; BI et al., 2014).

De forma geral, os constituintes do açaí, em especial os polifenóis, possuem baixa estabilidade e são facilmente degradados por enzimas e temperaturas elevadas, que comprometem seu valor nutricional e alteram a coloração da polpa. O fruto deve ser processado dentro de 24 horas após a colheita (TONON et al., 2009). Segundo Rogez (2000), mesmo sob refrigeração, o tempo máximo de conservação da polpa *in natura* é de apenas 12 horas. Além da degradação dos polifenóis, outro fator que permite a rápida deterioração da polpa é a elevada carga microbiana do fruto decorrente de falhas higiênicas nas etapas de colheita, transporte e processamento. A presença das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) que são conhecidas como enzimas oxidativas de compostos fenólicos, também são responsáveis pelas alterações de cor da polpa de açaí, o que pode provocar a rejeição do produto pelo consumidor.

As peroxidases e as polifenoloxidasas pertencem ao grupo das enzimas oxidoredutases. A atuação da POD nos alimentos é relativamente complexa, produzindo peróxidos e conduzindo indiretamente à oxidação dos lipídeos e portanto, às alterações sensoriais negativas, à desnaturação das membranas biológicas e à degradação de macromoléculas como clorofilas, antocianinas ou outros pigmentos.

As PPO fazem parte de um grande grupo de enzimas conhecidas como oxidoredutases. É uma enzima cúprica que catalisa a hidroxilação de monofenóis em o-difenóis e a oxidação de o-difenóis em o-quinonas na presença de oxigênio molecular (ROBINSON; ESKIN, 1991). Juntamente com as PPO, que catalisam a oxidação dos compostos polifenólicos como as antocianinas, as POD são responsáveis pelo escurecimento enzimático (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). No caso do açaí, quando há mudança de cor do vermelho/roxo para o marrom, muito provavelmente essa mudança está associada à atividade dessas enzimas (ROGEZ, 2000).

Desta forma, torna-se imprescindível a pesquisa e a implementação de tecnologias que sejam efetivas na inativação de células vegetativas microbianas e de enzimas responsáveis pela deterioração e perdas sensoriais da polpa de açaí, aumentando o tempo de prateleira e buscando preservar ao máximo sua qualidade durante a comercialização.

Atualmente, a conservação da polpa de açaí é feita pelo processo de pasteurização seguido de congelamento a -20 °C. Essa pasteurização é realizada industrialmente com temperaturas entre 80 e 85 °C, por 30 a 60 segundos e em decorrência da viscosidade da polpa de açaí é geralmente realizada em pasteurizadores do tipo tubular (EMBRAPA, 2005). Porém, um problema às vezes encontrado, principalmente na população do norte do Brasil, é a resistência em consumir polpa pasteurizada. Essa resistência é justificada pelas alterações indesejáveis de sabor, cor e aroma após o processo térmico. Além disso, alguns estudos relatam que temperaturas elevadas podem reduzir o valor nutricional e a funcionalidade dos compostos bioativos presentes no açaí (BUTZ; TAUSCHER, 2002; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009).

A tecnologia de alta pressão isostática (API), considerada uma tecnologia emergente, é um processo que consiste em submeter o produto a altas pressões (acima de 100 MPa) com o objetivo de inativar micro-organismos e enzimas. Por se tratar de uma tecnologia de conservação de alimentos não térmica, pode contribuir

para manter as características de polpas de frutas semelhantes à polpa *in natura* (HENDRICKX et al., 1998). A vantagem do processamento a alta pressão é que, ao mesmo tempo em que é capaz de reduzir/eliminar as atividades microbiana e enzimática, preserva moléculas pequenas como vitaminas e compostos voláteis, responsáveis por sabor, aroma e valor nutricional dos alimentos (CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003).

Nesse contexto, a API tem sido empregada para a inativação de enzimas em polpas, purês e sucos de frutas. Embora possa ocorrer a ativação enzimática em decorrência do processamento por API, o processo de inativação enzimática é muito mais recorrente, desde que os parâmetros de processo sejam apropriados.

Para o caso de enzimas barorresistentes, assim como para micro-organismos esporulados, é interessante combinar o tratamento por API com outros métodos de inativação, como por exemplo, tratamentos térmicos brandos (WEEMAES et al., 1998a). O estudo da inativação de PPO por meio de API já foi realizado para diversas frutas. PPO de maçã, uva, abacate e pera, de forma geral, apresentaram redução da atividade em temperatura ambiente a partir de 600, 700, 800 e 900 MPa, respectivamente (WEEMAES et al., 1998b). Por outro lado, a inativação de PODs geralmente é possível combinando o uso de altas pressões e temperaturas moderadas (acima de 50°C). A POD é considerada uma das enzimas mais resistentes ao processo térmico e ao processamento por API, sendo muitas vezes utilizada como parâmetro de eficiência de processo (MÜTFÜGIL, 1985).

Contudo, as enzimas presentes em vegetais apresentam grandes variações em sua atividade e resistência ao processo de API, tornando impossível generalizar e prever seu comportamento após processamento (BUCKOW; WEISS; KNORR, 2009). Sendo assim é necessário realizar pesquisas para cada tipo de matriz e condição de processo.

Na literatura científica não foram encontrados até o momento estudos relativos à inativação enzimática de POD e PPO em polpa de açaí por API com pressões acima de 500 MPa em associação com temperaturas maiores que 35 °C. Também não foram encontrados estudos que tenham avaliado a cor e a atividade dessas enzimas após 24 h de estocagem sob refrigeração, bem como a aceitação do produto pelo consumidor.

Ao mesmo tempo, não foi encontrado até o momento, um padrão definido na literatura de binômio tempo/temperatura de pasteurização para otimização do

processo térmico da polpa de açaí capaz de inativar enzimas e micro-organismos a níveis aceitáveis, mantendo ao máximo as características sensoriais (principalmente sabor e cor) e nutricionais do produto. Deste modo, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar o efeito do processamento por API sobre a atividade das enzimas PPO e POD, sobre a cor da polpa de açaí, comparando os resultados com um controle, representado pela polpa *in natura* (não processada) e armazenada nas mesmas condições e com amostras de polpa processadas por processo convencional de pasteurização térmica (85 °C/1 min). Além disso, foram realizadas análises reológicas e sensoriais, bem como ensaios para verificar a capacidade antioxidante, o teor de antocianinas e compostos fenólicos totais.

## 2. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar o efeito do processo de alta pressão isostática (API) sobre os micro-organismos, enzimas e os constituintes presentes na polpa de açaí.

De forma mais específica, este projeto propôs:

1. Avaliar o efeito do processamento por API sobre a atividade das enzimas PPO e POD e na cor da polpa de açaí, comparando os resultados com amostras controle representadas pela polpa *in natura* (não processada) e amostras de polpa processadas por processo convencional de pasteurização térmica (85 °C/1 min).

2. Avaliar a inativação microbiana após processamento por alta pressão isostática de um micro-organismo deteriorante (*Lactobacillus fructivorans*), um deteriorante termorresistente esporulado (*Alicyclobacillus acidoterrestris*), uma cepa de *Escherichia coli* e dos micro-organismos comumente presentes em polpa de frutas.

3. Avaliar a influência do processamento por alta pressão isostática sobre as características sensoriais, reológicas, compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante de polpa de açaí.

4. Avaliar a estabilidade da polpa processada por API durante o armazenamento refrigerado.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Açaí

##### 3.1.1. Características gerais

A polpa de açaí é obtida a partir parte comestível dos frutos das palmeiras do gênero *Euterpe*. Na região amazônica, a polpa é obtida a partir dos frutos dos açazeiros das espécies *Euterpe oleracea* Martius e *Euterpe precatória* Martius (açazeiro de terra firme). Já na região da Mata Atlântica e cerrado, pode-se obter a partir dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius) (ROGEZ, 2000).

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Martius) é uma palmeira tropical que pode atingir acima de 25 m de altura e apresentar em torno de 20 estirpes (caules) (PALACIO, 2008). Seus frutos são utilizados na produção da polpa de açaí, um alimento muito consumido pela população brasileira, especialmente no norte e nordeste. No entanto, um crescimento da demanda no mercado nacional tem sido observado, despertando grande interesse em investimentos e pesquisas sobre o assunto. Este aumento pode ser atribuído às propriedades nutricionais e ao valor calórico do açaí, pois este é um alimento rico em lipídeos, fibras, proteínas e minerais como manganês, magnésio, ferro, cobre, boro, cálcio, zinco e cromo (ROGEZ, 2000).

Na **Tabela 1** são apresentados alguns valores da composição físico-química de açaí encontrados na literatura.

**Tabela 1:** Composição físico-química da polpa de açaí segundo dados da literatura.

Composição	ROGEZ, 2000**	CARNEIRO, 2000*	SOUTO, 2001*	ALEXANDRE et al., 2004*	MENEZES, 2005**
Lipídeos totais (1)	52,64	7,19	7,64	6,75	42,73
Fibras brutas (1)	25,22	2,38	6,71	4,37	-
Proteínas (1)	10,05	1,4	1,75	1,5	11,45
Cinzas (2)	3,5	0,42	0,2-9	0,43	3,92
Sólidos totais (%)	15,0	14,97	18,76	13,99	15,48
pH	5,80	5,10	-	5,2	4,75
Energia (Kcal/100g)	66,3	-	-	-	-
Sódio (2)	56,4	-	-	-	-
Potássio (2)	932,0	-	-	-	-
Cálcio (2)	284,0	-	-	-	-
Magnésio (2)	174,0	-	-	-	-
Ferro (2)	1,5	-	-	-	-
Cobre(2)	1,7	-	-	-	-
Zinco (2)	7,0	-	-	-	-
Fósforo (2)	124,0	-	-	-	-
$\alpha$ -Tocoferol (2)	45,0	-	-	-	-
Cálcio (2)	286,0	-	-	-	-

\* matéria úmida; \*\* matéria seca ; (1) g/100 g; (2) mg/100 g

Dos constituintes presentes no açaí, a fração lipídica, que está presente na polpa na forma de uma emulsão estável, é composta por 73,9% de ácidos graxos insaturados, dentre eles, ácido oleico (56,2%), ácido linoleico (11,5%) e linolênico (0,8%). Os principais ácidos graxos saturados são os ácidos palmítico (24,1%) e esteárico (1,6%), totalizando cerca de 28% de ácidos graxos saturados (NASCIMENTO et al., 2008; ROGEZ, 2000;). Além disso, o açaí possui altas quantidades de vitamina E (tocoferóis) (45 mg / 100 g em base seca), com valores máximos de 78% do total de esteróis encontrados no açaí (ROGEZ, 2000).

A respeito do valor nutricional das polpas de açaí para elementos químicos essenciais, a **Tabela 2** mostra que as concentrações são significativas no suprimento das necessidades diárias preconizadas de acordo com o gênero e a idade (MEEK, et al., 2010; IOM, 2001) considerando que o consumo médio nacional de açaí na forma de polpa esteja ao redor de 300 mL/dia (POF, 2011) e assumindo um teor médio de sólidos totais de 12%.

**Tabela 2.** Contribuição do consumo de açaí para as necessidades diárias de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn.

	<b>Homem</b> <b>19 – 70 anos</b>	<b>Mulher</b> <b>19-70 anos</b>
<b>Manganês (Mg)</b>	635%	811%
<b>Cobre (Cu)</b>	75%	75%
<b>Ferro (Fe)</b>	73%	32%
<b>Magnésio (Mn)</b>	24%	32%
<b>Cálcio (Ca)</b>	17%	14%
<b>Zinco (Zn)</b>	11%	15%

Adaptada de Santos (2014).

Os valores foram calculados para a média de consumo nacional. Os valores são expressos como porcentagem da Ingestão Diária Adequada Recomendada.

O açaí mostrou ser uma fonte de aquisição bastante importante de elementos essenciais, mesmo considerando a média de consumo nacional, que é menor do que a da Região Norte (SANTOS, 2014).

Em termos nutricionais, destaque deve ser dado ao elemento cálcio (Ca), cuja necessidade de ingestão diária é uma das maiores entre os elementos químicos essenciais devido ao seu papel estrutural no organismo como principal constituinte da massa óssea e outras atividades metabólicas (EMKEY; EMKEY, 2013).

### **3.1.2. Antocianinas**

Além dos macronutrientes, o açaí apresenta quantidades apreciáveis de antocianinas (flavonóides pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos), que possuem importantes propriedades funcionais, exercendo função antioxidante e contribuindo para a coloração característica do açaí (ROSSO, 2006; ROGEZ, 2000).

As antocianinas são pigmentos naturais solúveis em água e que pertencem ao grupo dos flavonóides (WU et al., 2011). Elas estão localizadas nos vacúolos das células vegetais e são responsáveis pela coloração presente em grande quantidade de vegetais, flores e frutas (GRIGORAS et al., 2012)

As antocianinas apresentam uma grande diversidade estrutural, sendo que mais de 540 antocianinas diferentes já foram identificadas na natureza, sendo seis as mais comuns: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (WROLSTAD et al., 2005; DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2003).

As antocianinas não são nutrientes essenciais, e nenhum distúrbio de deficiência tem sido associado à falta de consumo de antocianinas. O valor das antocianinas e outros compostos bioativos dietéticos pode ser o seu potencial para promover a manutenção da saúde ao longo da vida (SANTOS, 2014).

Atualmente não existe uma referência para ingestão diária recomendada (IDR) para antocianinas e muitos outros compostos bioativos alimentares nos Estados Unidos, no Canadá ou na União Européia (WALLACE; GIUSTI, 2015). A China atualmente definiu um nível específico proposto de 50 mg / d para antocianinas (CHINESE NUTRITION SOCIETY, 2013).

O efeito protetor das antocianinas tem sido relacionado ao seu poder antioxidante, pois os compostos fenólicos possuem a capacidade de doar hidrogênios ou elétrons aos radicais (FERREIRA et al., 2010). O consumo regular desta substância está relacionado à diversos efeitos como prevenção de várias doenças degenerativas, retardamento do envelhecimento, aumento da vida das células, das defesas imunitárias, melhoria da circulação sanguínea, proteção do organismo contra o acúmulo de lipídeos nas artérias, retardamento da perda de visão e diminuição dos

efeitos da doença de Alzheimer (SOUZA et al., 2012; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; MERTENS-TALCOTT et al., 2008; ROGEZ, 2000).

As antocianinas são instáveis, susceptíveis a degradação e apresentam maior estabilidade em condições ácidas. Vários fatores demonstraram que afetam a estabilidade das antocianinas. Além das influências relacionadas à estrutura, vários parâmetros exógenos como temperatura, luz e oxigênio, especialmente o pH e a presença de copigmentos são os fatores mais determinantes da estabilidade das antocianinas (PATRAS et al., 2010; MARKAKIS, 1982).

Não só a estrutura da antocianina inclui várias posições reativas, mas também a matriz circundante na baga ou no suco possui numerosos parceiros de reações (ANDERSEN; JORDHEIM, 2014). Isso leva a uma variedade de possíveis reações durante o processamento de suco. O termo estabilidade de antocianina pode ser diferenciado em três rotas gerais de modificação: polimerização, clivagem e derivação. Considerando que a clivagem da antocianina leva a compostos incolores, a polimerização é acompanhada por escurecimento. As reações de derivação podem resultar em várias moléculas coloridas (WEBER; LARSEN, 2017).

A degradação térmica das antocianinas é um grande problema para a indústria alimentícia. Temperaturas elevadas, como as utilizadas durante a pasteurização, podem afetar a estabilidade das antocianinas levando a polimerização, que causa o indesejável escurecimento em produtos alimentícios, comprometendo a qualidade (MARKAKIS, 1982). Com a degradação, as frutas vermelhas perdem sua cor atraente, sendo essa uma propriedade sensorial importante na determinação da qualidade do produto. Diante disso, minimizar as perdas desses pigmentos durante o processamento pode garantindo a qualidade do produto final (SHAO-QIAN et al., 2011).

Por outro lado, o armazenamento congelado prolongado pode levar a uma diminuição lenta mas considerável das antocianinas (WEBER; LARSEN, 2017). Poiana et al. (2010) monitoraram a concentração de antocianinas ao longo de dez meses a -18 ° C e observaram perdas de 13% em mirtilos, 19% em amoras e 16% em framboesas.

### **3.1.3. Processamento**

As etapas de processamento para obtenção da polpa de açaí são: separação de materiais estranhos; seleção dos frutos sadios e maduros; higienização; repouso

em água morna (aproximadamente 40°C) durante 30 minutos, para o amolecimento da polpa e casca e o despulpamento.

Segundo Rogez (2000), o processamento dos frutos permite a obtenção de volumes variáveis de açaí, de acordo com a quantidade de água adicionada durante o despulpamento. Desta forma, o açaí é classificado segundo a Instrução Normativa nº1 de 07/01/2000 como:

- Polpa de açaí: polpa extraída do açaí por meios mecânicos, sem filtração e sem adição de água, podendo ser submetida a processo físico de conservação;
- Açaí grosso ou especial (tipo A): polpa extraída com adição de água e submetida à filtração, com conteúdo de sólidos totais acima de 14% e com aparência muito viscosa;
- Açaí médio ou regular (tipo B): polpa extraída com adição de água e submetida à filtração, com teor de sólidos totais entre 11 e 14% e com aparência viscosa;
- Açaí fino ou popular (tipo C): polpa extraída com adição de água e submetida à filtração, com teor de sólidos totais entre 8 e 11% e com aparência pouco viscosa (BRASIL, 2000).

A **Figura 1** apresenta o fluxograma que resume as etapas de obtenção dos produtos de açaí do tipo A, B ou C de forma industrial, processo no qual também estão incluídas as etapas de pasteurização e congelamento.



**Figura 1:** Fluxograma geral do processamento (industrial) do fruto do açaizeiro para obtenção de açaí do tipo A, B ou C congelado.

Segundo a legislação brasileira, o açaí deve possuir no mínimo 5 g de proteína/100 g de matéria seca, 20 g de lipídeos totais/100 g de matéria seca, e 51 g de carboidratos totais/100 g de matéria seca (BRASIL, 2000).

A etapa realizada posteriormente ao despulpamento depende da finalidade do produto, sendo designados processos que garantam a conservação do produto e posterior comercialização (ROGEZ, 2000; FADDEN, 2005; SCHULTZ, 2008).

Em trabalho realizado por Carneiro (2000) e Alexandre; Cunha; Hubinger (2004), a conservação da polpa de açaí foi realizada por um tratamento térmico (70 °C/3 min e 82,5 °C/1 min, respectivamente), que, segundo os autores pode ser mais brando se utilizada a teoria de barreiras, com a redução do pH a 3,5 (0,5% p/p de ácido cítrico), da atividade de água pela adição de sacarose. Contudo, o método industrial mais utilizado é a pasteurização (80 a 85 °C por 30 a 60 s) seguida de congelamento a -18 °C.

Sousa et al. (2006) testaram a pasteurização caseira de açaí comercializado nas feiras de Manaus/AM e avaliaram o efeito na contagem microbiológica e nas características sensoriais e físico-químicas do açaí. As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno (1 L) e imersas em água a 90 °C por 10 min ou a 100 °C por 5 min. Em seguida, foram congeladas e armazenadas a -18 °C. Os resultados demonstraram a eficácia de todos os processos térmicos realizados, em virtude da ausência de micro-organismos, mesmo após 120 dias de armazenamento. Entretanto, observou-se que o processamento a 100 °C /5 minutos alterou negativamente o sabor e o aroma da polpa, além de desestabilizar a emulsão lipídica, causando uma coloração esverdeada na superfície da polpa.

Rogez (2000) avaliou a pasteurização do tipo *high temperature short time* (HTST) em açaí. Na polpa de açaí acidificada (pH de 3,75) e pasteurizada em temperatura de 82,5 °C / 60 s, houve a eliminação dos bolores e leveduras, redução de 5,4 ciclos log da contaminação bacteriana inicial ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>), total inativação de polifenoloxidase e redução de apenas 15% das antocianinas. Na pasteurização sem acidificação, a redução da contaminação microbiana foi igualmente significativa, porém, a inativação enzimática não foi tão eficiente, necessitando de 90 °C/20 min para inativar totalmente as enzimas.

Schultz (2008) estudou o efeito da pasteurização de juçara (*E. edulis*) em escala industrial (85 °C/21 s) e obteve resultados contrários à Rogez (2000) em relação à preservação de antocianinas. Os resultados indicaram que a polpa

pasteurizada apresentava teor maior de antocianinas que a amostra *in natura*. O autor concluiu que apesar de causar uma redução no teor de antocianinas, a pasteurização garante maior estabilidade ao produto, pois elimina a oxidação enzimática que gera uma maior perda em comparação com a amostra não processada termicamente.

Na polpa de açaí a degradação de antocianinas é o efeito mais comum em tratamentos térmicos. Em experimento de pasteurização (82,5 °C/1 min) de açaí (*E. oleracea*), foi constatada degradação de 5 a 30% no teor de antocianinas. Segundo Rogez (2000), a perda de antocianinas em polpa de açaí *in natura* durante um período de até 60 dias de congelamento (-20 °C) situa-se entre 5 e 60%, pois mesmo sob congelamento as enzimas peroxidase e polifenoloxidase mantêm uma atividade residual de 60 a 90%.

Conforme exposto nos trabalhos encontrados na literatura, tanto o tratamento térmico quanto o congelamento apresentam desafios tecnológicos importantes a serem considerados. Primeiramente, o binômio tempo e temperatura utilizado na pasteurização é um fator de fundamental importância, pois temperaturas e tempos abusivos podem causar alterações indesejáveis no sabor e aroma (BUTZ; TAUSCHER, 2002). Desta forma, o binômio escolhido para a pasteurização deve ser capaz de inativar o micro-organismo alvo, porém, preservando as características físicas, químicas, nutricionais e sensoriais do produto (ROSENTHAL et al, 2002). Na literatura não são encontrados estudos que objetivaram otimizar a inativação microbiana com a mínima degradação dos compostos, em especial as antocianinas. Por sua vez, o congelamento apresenta alto custo ao produto e não garante efetivamente a estabilidade dos constituintes do açaí (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004; ROGEZ, 2000).

### **3.2. Alta Pressão Isostática (API)**

A alta pressão isostática (API) também conhecida como alta pressão hidrostática (APH) ou simplesmente alta pressão (AP), é uma tecnologia emergente não térmica que consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de um vaso pressurizado, utilizando um meio (em geral água potável, mas podendo ser outros fluidos pouco compressíveis como etanol ou propileno glicol) que transfira a pressão ao produto. Dentro desse vaso, o alimento sólido ou líquido, geralmente embalado, é submetido a altas pressões, que podem variar de 100 a 1200 MPa. É possível fazer o controle de temperatura do processo, sendo que alguns equipamentos atingem

temperaturas superiores a 130 °C. O tempo de processo pode variar de poucos minutos até horas, dependendo do objetivo do mesmo.

A aplicação da API se baseia em dois princípios físicos (isostático e de *Le Chatelier*). Pelo princípio isostático (teoria de Pascal) a pressão é transmitida instantânea e uniformemente, independentemente do tamanho e forma do produto, diferentemente da transferência de calor, processo no qual o volume e as características físico-químicas do produto interferem no tempo de aquecimento (HAYASHI, 1989; TAUSCHER, 1995). O princípio de *Le Chatelier* determina que qualquer fenômeno, transição de fase, mudança de conformação molecular ou reação química, acompanhado por uma redução de volume, é favorecido pelo aumento de pressão, e vice-versa. No caso de uma reação química ou físico-química, a pressurização altera o equilíbrio na direção do sistema de menor volume (CHEFTEL, 1995; TORREZAN, 2003). Outro fato importante da API é que a pressurização leva a um aquecimento adiabático da amostra no período de compressão (aquecimento de  $\pm 3$  °C para cada 100 MPa) e um resfriamento da mesma ordem, no momento de descompressão do produto (KNORR, 1993). Este parâmetro deve ser considerado na escolha da temperatura inicial do alimento a ser processado, ou seja, para realizar um processo a uma determinada temperatura, é preciso previamente equilibrar a temperatura do alimento a ser tratado na ordem de 3 °C menor para cada 100 MPa que se pretende aplicar. Como exemplo, se é desejado aplicar um processo de 500 MPa/ 5 minutos / 40 °C, o alimento deve ser colocado no equipamento a 25 °C, pois o aquecimento adiabático resultante da subida da pressão de 0,1 MPa para 500 MPa promoverá um aumento de temperatura do produto de aproximadamente 15 °C.

O processo tem pouco efeito sobre moléculas pequenas e não cliva ligações covalentes, o que faz com que o mesmo seja capaz de inativar micro-organismos e enzimas com menores danos às características físicas, sensoriais e nutricionais dos alimentos. Desta forma, o processamento por API leva à obtenção de produtos com características muito similares ao alimento *in natura* (POLYEDRA; STOFOROS; TAOUKIS, 2003; CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003). Um profundo conhecimento do processo e do alimento é essencial para a produção de alimentos processados por alta pressão com qualidade, pois a efetividade do tratamento é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento (pH, atividade de água, atmosfera, composição, integridade celular do alimento, entre outros) bem como pelas condições de processo aplicadas (taxa de compressão e descompressão, tempo,

pressão, temperatura e número de ciclos de processo) (SMELT; HELLEMONS; PATTERSON, 2002).

O processamento de alimentos por alta pressão teve início com o trabalho de Hite em 1899, com o objetivo de promover a conservação de leite. Hite mostrou que o leite cru poderia ser consumido em até quatro dias após o tratamento com 600 MPa por 1 hora em temperatura ambiente (SMELT, 1998; FARKAS; HOOVER, 2000). Tais resultados impulsionaram as investigações da aplicação do processo para conservação de frutas e legumes (HITE; GIDDINGS; WEAKLY, 1914). Ao longo dos anos, os sólidos resultados de pesquisa associado ao desenvolvimento de equipamentos tornou a tecnologia apta para implantação industrial, sendo que em 1990, no Japão, foi lançado o primeiro alimento comercial tratado por alta pressão (geléia de frutas).

Os primeiros alimentos processados comercialmente por API foram alimentos ácidos (maioria derivados de frutas). Devido à elevada acidez, este tipo de produto necessita de tratamento mais brando, podendo utilizar a alta pressão em temperatura ambiente ou inferiores. Atualmente, a alta pressão já tem sido utilizada para processar alimentos não ácidos, uma vez que o desenvolvimento dos equipamentos permite hoje que a tecnologia seja associada a processos com altas temperaturas, com a vantagem de promover menores danos ao alimento quando comparado aos resultados obtidos quando apenas o processamento térmico é aplicado.

### **3.3. Mercado de produtos e equipamentos de alta pressão isostática**

Por volta de 1990, a empresa japonesa Meidi-Ya lançou no mercado os primeiros produtos comerciais processados por alta pressão. Os produtos processados foram geléias de morango, maçã e kiwi embaladas em copos de plástico (HORI et al., 1992; DUMOULIN, 1998). As geléias embaladas foram processadas em um equipamento com capacidade para 50 L (Mitsubishi Heavy Industry - Japão), prensa isostática a frio, pressão de 400 MPa durante 20 min. Este processo demonstrou proporcionar esterilidade comercial a um produto ácido, mantendo a fruta fresca e com boas qualidades sensoriais (TONELLO, 2011).

Em 1994, a companhia francesa Ulti se tornou a pioneira europeia no uso da tecnologia de alta pressão lançando sucos cítricos embalados em garrafas de polietileno e pasteurizados a 400 MPa. Em 1997, a companhia americana Fresherized Foods (antiga Avomex) – hoje a maior indústria de produtos tratados por API em

número de equipamentos e volume de produção – iniciou no México a produção de produtos de abacate os quais eram exportados para os Estados Unidos para uso em redes de “food service” (TONELLO, 2011).

Atualmente, o processamento de alimentos por API já é aplicado em escala comercial para pasteurização de uma grande variedade de produtos alimentícios, como pescados, carnes, sucos e produtos à base de abacate. Ainda assim, o mercado de produtos processados por API é dominado pelos produtos derivados de vegetais (MARKETS and MARKETS, 2013; MATSER et al., 2004) e seu maior mercado consumidor está na América do Norte.

O custo de equipamentos comerciais de alta pressão que possuem volumes de câmara de 30 até 600 L podem variar de USD\$500.000 a USD\$2,5 milhões, dependendo da capacidade do equipamento e do grau de automação. Desta forma, a amortização do equipamento é responsável por cerca de 60% do custo de processamento. Já em relação ao custo de produção, em 2008 variava em torno de USD\$ 0,8/kg a USD\$ 2,2/kg, incluindo custo e depreciação do equipamento (TONELLO, 2011). Embora, atualmente, o custo global da API seja superior ao dos processos convencionais de conservação, isto é frequentemente compensado pela qualidade superior dos produtos resultantes.

### **3.4. Efeito da alta pressão isostática sobre enzimas**

Enzimas são catalisadores biológicos fundamentais responsáveis pela regulação biológica e pelo metabolismo (CHEN et al., 2017). Nos vegetais, elas desempenham um papel importante na determinação dos atributos de qualidade como textura, sabor, cor, valor nutricional e propriedades sensoriais. Após a colheita, as enzimas endógenas permanecem ativas e continuam sua atividade enzimática durante a estocagem, afetando a qualidade desses vegetais (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Em termos de alteração de cor e sabor, as enzimas mais importantes são a polifenoloxidase (PPO), clorofilase, peroxidase (POD) e lipoxigenase (LOX). Já as pectinases, celulasas e hemicelulasas podem causar degradação da textura dos alimentos. A tiaminase e enzimas oxidativas tais como ácido ascórbico oxidase, PPO e POD podem causar a perda de valor nutricional (WHITAKER, 1991).

Para aumentar a palatabilidade e prolongar a vida útil de polpas de frutas, tratamentos mecânicos (ex: esmagamento, mistura, corte) e processos de

conservação (ex: branqueamento, pasteurização, congelamento) são realizados. Os tratamentos mecânicos causam rompimento das células, facilitando o contato entre enzimas, substratos e outras biomoléculas (ex: cofatores, coenzimas, ativadores e inibidores) e, conseqüentemente, acelerando as reações catalisadas por enzimas que prejudicam a qualidade global desses alimentos (OEY, 2010). Assim, um adequado processamento de alimentos envolve a aplicação de tecnologias que permitam o controle da atividade de enzimas endógenas relacionadas à degradação da qualidade de vegetais (OEY, 2010).

Resultados prévios publicados sobre o processamento por API em produtos de frutas mostraram que o processo pode levar à inativação, ativação e/ou estabilização de uma enzima, dependendo das condições de processamento (tempo, pressão, temperatura) e do meio (pH, concentração de substrato, tipo e origem da enzima e do tipo de fruta) (CANO; DE ANCOS; SÁNCHEZ-MORENO, 2005). De forma geral, a inativação enzimática requer o uso de pressões mais elevadas do que a inativação microbiana de células vegetativas (SAN MARTÍN; BARBOSA-CÁNOVAS; SWANSON, 2002).

Para uma enzima exercer atividade biológica, ela precisa que a sua conformação tridimensional seja preservada, de forma a garantir a manutenção do seu sítio ativo. Pequenas mudanças no sítio ativo podem levar a uma perda da atividade enzimática. Assim, a desnaturação proteica leva a mudanças conformacionais que podem mudar a funcionalidade da enzima (por exemplo, aumento ou perda da atividade biológica e mudanças na especificidade pelo substrato) (HENDRICKX et al., 1998). Segundo Hendrickx et al. (1998), a API pode inativar ou ativar enzimas devido às alterações nas estruturas terciárias e quaternárias das proteínas, que são mantidas por interações hidrofóbicas, iônicas e por ligações não covalentes. Em pressões muito altas, as estruturas secundárias, mantidas por pontes de hidrogênio e de dissulfeto, também podem ser afetadas, levando à desnaturação irreversível da proteína. Por outro lado, as estruturas primárias (ligações covalentes) praticamente não são afetadas pela aplicação de pressão (TEDFORD; SMITH; SCHASCHKE, 1999; HAYAKAWA; LINKO; LINKO, 1996).

A desnaturação proteica induzida por temperatura difere da induzida por alta pressão. Em termos de estrutura molecular, o efeito da alta pressão em enzimas pode ser explicado pelas alterações nas estruturas quaternárias, terciárias e secundárias, que afetam diretamente a configuração do sistema ativo das enzimas, induzindo

exposição de aminoácidos hidrofóbicos, exposição de grupos SH devido ao desdobramento da proteína, uma redução no teor total de SH devido à nova formação de ligações dissulfeto e mudanças na composição da  $\alpha$ -hélice, da  $\beta$ -folha e da rotação  $\beta$ -rotação devido a alterações da estrutura secundária (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009; CHAKRABORTY et al., 2014) .

Alguns estudos relatam que pressões relativamente baixas (~100 MPa) são capazes de promover a ativação de algumas enzimas (ASAKA et al., 1994; HENDRICKX et al., 1998). Estudos realizados por Puppo et al. (2004) mostraram que em pressões acima de 200 MPa, muitas proteínas tendem a sofrer desdobramentos e, posteriormente, podem ocorrer re-associações de subunidades dissociadas, resultando na mudança de conformação da estrutura e ativação da enzima (PUPPO et al., 2004). Por outro lado, pressões muito maiores (600 MPa) geralmente induzem à inativação enzimática (TRIBST et al., 2016)

A inativação enzimática por alta pressão não é previsível, sendo que, para uma mesma condição de processo, pode ocorrer a inativação para uma enzima quando presente em um alimento e ativação quando presente em outro. Algumas enzimas podem ser inativadas com a utilização de pressões e temperaturas muito baixas e um tempo curto de processo, enquanto outras enzimas podem ainda ter bastante atividade após a pressurização por longos tempos à altíssimas pressões. Além disso, diferentes condições de processo induzem a diferentes modificações na atividade enzimática. As possíveis explicações para essa variação de atividade de enzimas processadas por alta pressão envolvem diferenças nas mudanças conformacionais na estrutura das proteínas induzidas pelo processo e também mudanças na interação enzima-substrato e alterações na membrana das células (LUDIKHUYZE et al., 2002).

Em termos industriais, alguns estudos sugerem a combinação de altas pressões e temperatura moderadas para efetuar a inativação de algumas enzimas barorresistentes como a peroxidase (POD) presentes em produtos de origem vegetal. Essa enzima é considerada uma das mais resistentes ao processo térmico e ao tratamento por alta pressão, sendo muitas vezes utilizada como parâmetro de eficiência de processo (MÜFTÜGIL, 1985).

Além da peroxidase, a polifenoxidase (PPO) é outra enzima oxidativa importante no que diz respeito à estabilização de produtos vegetais, uma vez que a mesma oxida compostos fenólicos levando à formação de pigmentos escuros como as melanoidinas, que descaracterizam os produtos levando à rejeição sensorial dos

mesmos (ZABETAKIS; LECLERC; KAJDA, 2000). Quando o processo de produção do vegetal envolve etapas de alteração mecânica (esmagamento, corte, descascamento, fatiamento), a barreira fisiológica entre a parede celular e a membrana é destruída. Isto facilita o contato da enzima com os compostos fenólicos do vacúolo promovendo a oxidação dos mesmos (WALKER, 1995; VALERO VARON; GARCIA-CARMONA, 1988).

Menezes et al. (2008) verificaram que a API desempenhou efeitos diferentes sobre a atividade da enzima peroxidase (POD) em polpa de açaí. A POD não teve sua atividade reduzida ( $90,74 \pm 11,26\%$ ) em processos de 300 MPa/25 °C/15 min, porém, de uma maneira geral, a sua atividade foi aumentada, chegando a uma ativação máxima de 32,98%, quando tratada a 500 MPa, a 25 °C, por 5 min. Nesse mesmo estudo, a atividade de PPO foi reduzida entre 65 e 85% quando processada a 300 MPa/ 5 e 15 min sob temperaturas de 25 e 35 °C. Porém, a 500 MPa/ 25 °C houve aumento da atividade de 183% e 160%, para processos de 5 e 15 minutos, respectivamente.

De forma similar, García-Palazon et al. (2004), estudaram a inativação da POD de morangos sob diferentes pressões (400, 600 e 800 MPa), tempo (0, 5, 10 e 15 min) e temperaturas (18 – 22 °C) e constataram baixa redução na atividade enzimática. Terefe et al. (2009) utilizando temperaturas elevadas, conseguiram inativar apenas 58% de POD após API (600 MPa/10 min). Anese et al. (1995) estudaram a inativação da POD extraída de cenouras e maçãs processadas por alta pressão em diferentes condições de pressão (100 a 900 MPa/1 min/20 °C) e pH (4,5 a 7,0), demonstrando que não há relação entre a intensidade da pressão aplicada e a inativação enzimática.

A PPO é mais sensível à temperatura e à pressão (HENDRICKX et al., 1998; CANO; HERNÁNDEZ; DE ANCOS, 1997) quando comparada com a POD, uma vez que o processo promove uma maior alteração estrutural e, conseqüentemente, modificações na atividade enzimática. Outros estudos também reportaram aumento da atividade enzimática de PPO (MATSER et al., 2000; ANESE, 1995). Em cogumelos, Matser et al. (2000) descreveram aumento de atividade de PPO quando processados a 600 MPa/5 min/ 25 °C.

Anese et al. (1995), também descreveram aumento de 230% na atividade de PPO extraídas de maçã e cenoura quando processadas a 200 MPa/1 min/20 °C. Nesse estudo, os autores justificaram que os efeitos de ativação observados para

tratamentos a pressão moderada podem ser atribuídos à configuração reversível e/ou mudanças na conformação da enzima e/ou do substrato.

Basak; Ramaswamy (1996) afirmaram que existe uma influência direta do pH na atividade de enzimas deteriorantes quando expostas à alta pressão, sendo que, quanto menor o pH da amostra, maior a inativação da enzima devido a protonação da mesma. Weemaes et al. (1999), mostraram que a inativação da PPO por pressão pode ser aumentada em valores de pH mais baixo e por componentes tais como cloreto de sódio e EDTA. Já alguns autores afirmam que quanto maior a quantidade de sólidos solúveis totais da amostra, menores são as taxas de inativação enzimática devido ao efeito de proteção estérica das mesmas (OGAWA et al., 1990; VERSTEEG et al., 1980).

Com relação às pectinametilesterase (PME), alguns estudos relatam que são enzimas resistentes ao tratamento por alta pressão, sendo que a completa inativação somente é possível quando submetidas às elevadas pressões, não convenientes para uso industrial. As consequências da atividade de PME são a redução da turbidez e a separação de fases, que representam os principais defeitos de qualidade em sucos cítricos (GOODNER; BRADDOCK; PARISH, 1998).

Hsu (2008) em seu estudo com suco de tomate, relatou um exemplo de inativação / ativação enzimática de PME. Nesse estudo foram utilizadas pressões variando entre 100 e 500 MPa e temperaturas de 4, 25 e 50 ° C por 10 min. Os resultados mostraram que a ativação da enzima foi evidente no suco de tomate as pressões de 300-500 MPa. Ao contrário de outros pesquisadores, a PME apresentou a menor atividade residual quando o suco de tomate foi processado a baixa pressão (200 MPa/25 °C/ 10 min). Neste estudo, os autores afirmam que a ativação da PME em pressões mais elevadas pode ser atribuída a configuração reversível e/ou a mudanças de conformação das moléculas da enzima e/ou do substrato.

A inativação enzimática por API também é reportada na literatura para diversas frutas: morango (SULAIMAN; SILVA, 2013; GARCIA-PALAZON et al., 2004), banana (PALOU et al., 2000) e framboesa (GARCIA-PALAZON et al., 2004). Contudo, as enzimas presentes nos vegetais apresentam grandes variações na atividade enzimática e resistências diversas ao processo de API (**Tabela 3**), tornando impossível generalizar e prever o comportamento das enzimas após o processamento (BUCKOW; WEISS; KNORR, 2009) e, portanto, explicitando a necessidade de realizar pesquisas para cada tipo de vegetal e condições de processo.

**Tabela 3: Efeito da Alta Pressão em vegetais sob diferentes tipos de enzimas.**

Enzima*	Produto	Processo	Efeito	Referência
PME	Suco de tomate	200 MPa/10 min/25 °C	27,8% de inativação	HSU (2008)
PG	Suco de tomate	500 MPa/10 min/25 °C	90% de inativação	HSU (2008)
POD	Morango	600 MPa/10 min/60 °C	58% de inativação	TEREFE et al. (2009)
PPO	Morango	600 MPa/10 min/60 °C	78% de inativação	TEREFE et al. (2009)
POD	Polpa de açaí	500 MPa/5 min/25 °C	32,98% de ativação	MENEZES et al. (2008)
PPO	Polpa de açaí	500 MPa/5 min/35 °C	53,75% de inativação	MENEZES et al. (2008)
POD	Purê de abacaxi	200 MPa/20 min/30 °C	30% de inativação	CHAKRABORTY et al. (2015)
POD	Purê de abacaxi	600 MPa/20 min/30 °C	47% de inativação	CHAKRABORTY et al. (2015)
POD	Purê de abacaxi	600 MPa/20 min/70°C	96% de inativação	CHAKRABORTY et al. (2015)
PPO	Abacate	800 MPa/10 min/25 °C	Inativação	WEEMAES et al.(1998)
PPO	Pera	900 MPa/10 min/25 °C	Inativação	WEEMAES et al.(1998)
PPO	Morango	800 MPa/15 min/22 °C	35% de inativação	GARCÍA-PALAZON et al. (2004)
PPO	Cogumelos frescos	600 MPa/5 min/25°C	87,5% de ativação	MATSER et al. (2000)
PPO	Purê de abacaxi	600 MPa/20 min/30 °C	45% de inativação	CHAKRABORTY et al. (2015)
POD	Cenoura	900 MPa/1 min/20 °C	100% de inativação (pH 5,0 e 6,0)	ANESE (1995)
PPO	Maça	200 MPa/1 min/20 °C	230% de ativação (pH 4,5)	ANESE (1995)
PPO	Purê de abóbora	300 MPa/1 min/70 °C	12% de ativação	GARCÍA-PARRA et al.(2016)
PPO	Purê de abóbora	900 MPa/1 min/70 °C	60% de inativação	GARCÍA-PARRA et al.(2016)

\*PPO(polifenoloxidase). POD (peroxidase). PG (poligalacturonase). PME (pectinametilsterase)

### 3.5. Efeito da alta pressão isostática sobre compostos bioativos

As frutas e os legumes são alimentos ricos em compostos bioativos, especialmente fenólicos, antocianinas e vitaminas. Os compostos fenólicos são relacionados à redução da ocorrência de doenças cardíacas coronarianas e doenças degenerativas (SOUZA et al., 2012; HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011; MERTENS-TALCOTT et al., 2008) devido ao potencial antioxidante dos mesmos.

Desta forma, a sua manutenção nos alimentos vegetais processados é altamente desejável.

O efeito do processamento por API sobre flavonóides, carotenóides e polifenóis tem sido estudado por vários pesquisadores em diferentes tipos de alimentos à base de vegetais (CANO; DE ANCOS; SANCHEZ-MORENO, 2005; OEY et al., 2008). De forma geral, sabe-se que a API promove poucas alterações em compostos de baixa massa molecular, como pigmentos e compostos fenólicos (RASTOGI et al., 2007; CARBONELL-CAPELLA et al., 2013). Entretanto, os efeitos descritos na literatura da API sobre os compostos bioativos reportados variam consideravelmente em função do tempo, temperatura, pressão e da matriz vegetal (KEENAN et al., 2012).

Alguns autores relataram que a concentração de compostos fenólicos totais, antocianinas, vitamina C e atividade antioxidante aumentaram após o processamento por API (BARBA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2012b; GARCÍA-PARRA et al., 2011; PLAZA et al., 2011; PATRAS et al., 2009; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2005; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2001), porém, outros relatam a redução deste compostos (PATRAS et al., 2009; PLAZA et al., 2006) e ainda há estudos que mostram não haver qualquer diferença entre a composição de frutas frescas e processadas por API (PATRAS et al., 2009; SUTHANTHANGJAI; KAJDA; ZABETAKIS, 2005). A falta de homogeneidade entre as respostas é resultado das muitas variáveis de processo, como estágio de maturação do fruto, etapas de pré-processamento, nível de desaeração das amostras, concentração e forma de quantificação dos compostos bioativos, entre outros. Além disso, quando se avalia a concentração de compostos bioativos em alimentos processados por API durante a estocagem, é preciso considerar que a estabilidade destes compostos é fortemente afetada por fatores exógenos, tais como o oxigênio, luz, e especialmente, pH e temperatura (FERRARI; MARESCA; CICCARONE, 2010). Assim, diferentes condições de estocagem podem ter efeito muito maior sobre os compostos do que os efeitos inerentes ao processamento por API.

Além disso, a maioria dos estudos apenas quantificou o efeito do processamento em algumas condições sobre os compostos bioativos, sem a realização de ensaios cinéticos mais aprofundados para explicar a sequência de modificações que levam ao aumento ou redução da concentração de tais compostos.

Em termos de compostos fenólicos, alguns autores reportaram um aumento na concentração total de flavononas (15,46%) após o tratamento por API em suco de

laranja processado a 400 MPa/40 °C/1 min (PLAZA et al., 2011) e em suco de mirtilo processado a 200 - 600 MPa/5 -15 min/20 - 42 °C – aumento de até 27% (BARBA, ESTEVE E FRÍGOLA, 2013). Barba et al. (2012a), compararam os efeitos da API (100 a 400 MPa / 20 a 42 °C / 2 a 9 min) e dos processos térmicos (90 °C durante 15 ou 21 s e 98 °C durante 15 ou 21 s) em uma bebida mista de laranja e leite. Os autores constataram que os níveis de compostos fenólicos totais foram maiores nas amostras processadas por API, atingindo um aumento máximo de 22% (100 MPa/7 min), enquanto a concentração nas amostras processadas termicamente aumentou entre 8-17%, em comparação com as amostras não processadas. Plaza et al. (2011) também encontraram um aumento na concentração total de carotenóides (45,19%) em suco de laranja após a API (400 MPa/40 °C/1 min).

O aumento no conteúdo de compostos fenólicos normalmente é relacionado à maior extração de alguns dos componentes antioxidantes das células vegetais pelo processamento por alta pressão (CARBONELL-CAPELLA et al., 2013; BARBA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2012b), que promove uma descompartmentalização da matriz celular do vegetal, onde os compostos se encontram alojados (BUTZ et al., 2002; OEY et al., 2008). Além disso, a maior retenção e concentração de compostos fenólicos após o processamento de frutas também pode ser atribuída à inativação, ainda que parcial, de enzimas oxidativas, especialmente a peroxidase e a polifenoloxidase, que levam à oxidação destes compostos e, conseqüentemente, à perda de atividade biológica deles. Tal inativação pode ser atingida em processos que combinam a aplicação de pressão e temperaturas elevadas durante o processamento (SULAIMAN; SILVA, 2013; MENEZES et al., 2008), com conseqüente maior estabilidade dos compostos fenólicos durante a estocagem (CARBONELL-CAPELLA et al., 2013).

Por outro lado, outros autores reportaram que a API pode apresentar efeitos indesejáveis aos compostos fenólicos, dependendo das condições de processo. Segundo Ferrari; Maresca; Ciccarone (2010), pressões elevadas (400 a 600 MPa) ou tempos longos de processamento causaram redução na concentração de compostos fenólicos (antocianinas) em suco de romã, quando processados a 25 °C. Quando a temperatura foi ajustada para 50 °C houve maior concentração desses compostos. Os autores afirmam que a temperatura (25°C) e a pressão utilizadas nesse experimento não foram suficientes para inativar enzimas responsáveis pela degradação de pigmentos naturais (antocianinas). Por conseqüente, a atividade residual das enzimas oxidativas, juntamente com uma pequena concentração de oxigênio dissolvido

puderam levar à degradação das antocianinas durante o armazenamento de sucos processado por API (SUTHNTHANGJAI; KAJDA; ZABETAKIS, 2005). Similarmente, resultados obtidos por Zabetakis; Leclerc; Kajda (2000) mostraram que apesar do processo de API (200-800 MPa/18-22 °C/15 min) não resultar em perdas imediatas na concentração de antocianinas em morangos após o processamento, perdas similares à amostra não processada (20-60%) foram observadas após 9 dias de estocagem refrigerada. Isto foi atribuído à atividade residual de enzimas oxidativas. Os autores também concluíram que as condições de estocagem são importantes para a degradação de pigmentos como antocianinas, já que em temperaturas de armazenamento mais elevadas (20 e 30 °C) foram observadas as maiores atividades das enzimas oxidativas PPO e POD.

Por outro lado, Plaza et al. (2011) observaram maior concentração de flavononas em amostras de suco de laranja processadas por API (400 MPa/40°C/1 min) em comparação às amostras processadas termicamente (70 °C/30 s) após 20 dias de armazenamento a 4 °C. Isso indica que, mesmo apresentando perdas, o processo de API foi melhor do que o processamento térmico em relação à manutenção dos compostos bioativos de sucos de frutas.

Em estudo realizado por Indrawati; Van Loey; Hendrickx (2004), o efeito combinado de pressão, temperatura e tempo (100 a 800 MPa/30 a 65°C / 0 a 90 min), sobre a capacidade antioxidante de suco de laranja e cenoura apresentou resultados divergentes em relação aos vegetais. Os autores observaram que a capacidade antioxidante de suco de laranja diminuiu ligeiramente após o processamento por API (100 a 800 MPa). Por outro lado, em suco de cenoura, houve aumento da capacidade antioxidante após processo realizado sob as mesmas condições. Tais resultados evidenciam que o efeito da API sobre a capacidade antioxidante varia conforme a matriz vegetal.

Em relação aos carotenóides, estudos reportaram um aumento na extração dos mesmos durante processamento por API (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2005; SÁNCHEZ-MORENO; PLAZA; DE ANCOS et al., 2005; DE ANCOS et al., 2002). Os carotenóides estão localizados em organelas subcelulares (plastídios), em cloroplastos e cromoplastos, principalmente associados com macromoléculas tais como proteínas e lipídeos de membrana (CLINTON, 1998; SCHIEBER; CARLE, 2005). Sabe-se que o processamento de API afeta as membranas celulares em vegetais (SMELT, 1998), o que justifica maior extratibilidade de carotenóides, devido

a uma melhor liberação destes compostos bioativos a partir da matriz vegetal (PLAZA et al., 2011).

Estudos sobre os efeitos da API na biodisponibilidade de compostos bioativos de frutas e vegetais são escassos. Em relação aos carotenóides presentes em vegetais, geralmente sua biodisponibilidade é baixa (ERDMAN, 1999). No entanto, MCINERNEY et al. (2007) verificaram que o processamento de feijão verde a uma pressão de 600 MPa resultou num aumento significativo na disponibilidade de luteína em comparação com amostras não tratadas ou aquelas processadas em pressão inferior (400 MPa). O rompimento de estruturas celulares em grãos por exposição a altas pressões poderia ter contribuído para a liberação de luteína dentro da matriz de tecido de planta, durante o processo de digestão *in vitro*. Porém, processos de API têm muito pouco impacto sobre a disponibilidade em outras matrizes vegetais como, por exemplo, em carotenóides de cenoura ou brócolis. Cenouras e brócolis são vegetais substancialmente mais firmes do que feijão verde, e por isso podem necessitar de pressões mais elevadas, a fim de melhorar a biodisponibilidade dos seus constituintes bioativos (MCINERNEY et al., 2007). Do ponto de vista da saúde humana, os efeitos da API na biodisponibilidade de luteína seriam considerados mínimos. Além das propriedades de matriz alimentar, vários fatores extrínsecos, incluindo interações com outros carotenóides, bem como componentes da dieta, principalmente lipídeos e polissacarídeos não amiláceos, também têm uma grande influência sobre a biodisponibilidade de carotenóides quando processados por API (BROWN et al., 2004; YEUM; RUSSELL, 2002; VAN HET HOF et al., 2000; CASTENMILLER et al., 1999).

Os dados aqui demonstrados evidenciam a falta de homogeneidade entre os resultados obtidos após processamento por API sobre compostos bioativos. Estudos mais robustos precisam ser conduzidos para explicitar melhor o efeito da API sobre compostos bioativos e esclarecer em quais condições o processo pode ser utilizado para aumento da biodisponibilidade de tais compostos, o que pode ser um atributo adicional de benefícios para os alimentos processados por esta tecnologia.

### **3.6. Efeito da alta pressão isostática sobre as características sensoriais e nutricionais**

Características como cor, sabor, textura, aparência e valor nutricional, são atributos considerados de grande importância para o consumidor com relação a frutas

e vegetais. Nesse contexto, a alta pressão isostática desponta como uma excelente opção para processamento desses produtos devido às alterações mínimas nas características acima mencionadas. Diferentemente do processamento térmico, a API promove manutenção das ligações covalentes e tem efeitos mínimos sobre moléculas de baixa massa molecular, que são muitas vezes responsáveis pela cor e sabor dos alimentos (BERMÚDEZ-AGUIRRE; BARBOSA-CÁNOVAS, 2011; FARKAS; HOOVER, 2000; BARBOSA-CÁNOVAS; RODRÍGUES, 2002).

Segundo Polydera; Stoforos; Taoukis (2005) em termos nutricionais, a API destaca-se como capaz de preservar mais vitamina C do que um processo térmico que apresente uma capacidade de inativação microbiológica. Os mesmos autores observaram maior retenção de ácido ascórbico quando o suco de laranja foi processado por API (600 MPa/40 °C/4 min) em comparação com tratamento térmico (80 °C/60 s). No suco de laranja processado por API, a retenção de ácido ascórbico (Vitamina C) após estocagem do suco durante 1 mês a 5°C foi de 84%, em contraste com o tratamento térmico que apresentou uma retenção de ácido ascórbico igual a 72%. Uma possível explicação para as baixas taxas de degradação de ácido ascórbico durante o armazenamento do suco processado por API foi atribuída a uma possível disponibilização (por hidratação ou complexação por agentes quelantes) de íons metálicos no processo (por exemplo, ferro, cobre), dificultando a catálise da degradação do ácido ascórbico (CHEAH E LEDWARD, 1995, 1997). A degradação de peróxidos por aplicação de alta pressão também pode ser uma possível razão para o retardamento da degradação do ácido ascórbico após tratamento API em suco de laranja (POLYDERA; STOFOROS; TAOUKIS, 2005; CHEAH; LEDWARD, 1995;).

Em relação à alteração de cor dos produtos processados por API, os principais fatores a serem considerados é presença de oxigênio, temperatura e pH de estocagem (POLYDERA; STOFOROS; TAOUKIS, 2005) ou seja, condições que permitam a ação de enzimas oxidativas residuais durante o armazenamento e processamento (AHMED; RAMASWAMY, 2006). Os produtos com um pH elevado, tais como melão (pH = 7,0), podem requerer temperaturas elevadas além de alta pressão para inativar enzimas e manter a cor (WOLBANG; FITOS; TREEBY, 2008).

### 3.7. Efeito da alta pressão isostática na inativação microbiana

O efeito da alta pressão isostática para inativação microbiana vem sendo comprovado como uma alternativa em substituição ao tratamento térmico, disponibilizando alimentos microbiologicamente seguros (PATTERSON, 2005).

A inativação microbiana é conferida durante a pressurização por alterações na membrana celular, modificações na morfologia celular por compressão de vacúolos e citoesqueleto e inativação de enzimas importantes no metabolismo microbiano (PATTERSON, 2005). Porém, a eficácia do tratamento depende principalmente da pressão aplicada e do tempo de retenção, bem como da resistência dos micro-organismos e a matriz do alimento (MOR-MUR; YUSTE, 2005).

De forma geral, a barorresistência dos micro-organismos é determinada pela sua complexidade, sendo que quanto mais complexo sua estrutura menor a barorresistência. Desta forma, é relatado na literatura maior resistência de bactérias esporuladas em relação às vegetativas, sendo no caso dos micro-organismos esporulados é necessário combinar a pressurização com temperaturas mais elevadas (MOR-MUR; YUSTE, 2005).

Dentre as bactérias nas suas formas vegetativas, as Gram-positivas possuem uma parede relativamente simples em estrutura, composta por várias camadas de peptidoglicano ligado uns aos outros por ligações cruzadas formando uma rede rígida e forte. Além disso, eles possuem ligações químicas com ácidos teicóicos. Já as Gram-negativas possuem uma quantidade muito menor de peptidoglicano do que as Gram-positivas. Isso faz com que sua parede celular não seja tão espessa e forte quanto a das outras supracitadas, mas sua estrutura é mais complexa devido ao fato da existência de uma membrana de lipoproteínas, polissacarídeos e fosfolipídios, que envolve sua parede celular. Portanto, as Gram-positivas geralmente são mais resistentes à pressão que as bactérias Gram-negativas (SMELT, 1998; MOR-MUR; YUSTE, 2005).

Quanto aos protozoários, não foram encontrados na literatura estudos com *Trypanosoma cruzi*, protozoário encontrado em polpa de açaí e causador da doença de Chagas. Porém, é relatado que seres eucariotos possuem menor barorresistência do que procariotos (< 400 MPa), por serem organismos mais complexos (COLLINS et al., 2005; LINDSAY et al., 2006). Desta forma, a manutenção da estabilidade de polpas de fruta conferida pela inativação de bactérias, fungos e leveduras durante o processo de API deveriam garantir também a eliminação do *Trypanosoma cruzi*.

Para as bactérias na forma vegetativa, estudos têm demonstrado que a inativação das mesmas pela API confere estabilidade a diversos produtos durante a estocagem. Em purê de nectarina foi relatada redução total de psicotróficos, mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras após processamento 450 MPa/10°C/10 min e 600 MPa/10 °C/5 e 10 min (GARCÍA-PARRA et al., 2011). Em suco de damasco, laranja e cereja ácida os processos a 250 MPa/30 °C/5, 10 e 20 min foram insuficientes na inativação de *S. aureus* e *E. coli* O157:H7, porém a 350 MPa/5 min/40°C ocorreu completa inativação (8 ciclos log) (BAYINDIRLI et al., 2006). Polydera; Stoforos; Taoukis (2003) avaliaram a estabilidade de sucos de laranja submetidos à alta pressão (500 MPa/35 °C/5 min) e à pasteurização convencional utilizada pela indústria (80 °C/30 s) e não foi relatado crescimento microbiano em nenhuma das amostras.

Em um trabalho realizado por Lavinias et al. (2008), em suco de caju processado por alta pressão hidrostática, os resultados indicaram que o tratamento de API foi efetivo na inativação de *E. coli* inoculada e da microbiota natural do suco de caju *in natura*. Os fungos filamentosos e as leveduras foram mais sensíveis do que as bactérias e a inativação de *E. coli* obedeceu a uma cinética de primeira ordem.

Para as bactérias esporuladas é comum combinar o processo de API com temperaturas mais altas, devido à sua maior barorresistência. Em suco de tomate, o processamento a 600 MPa/75 °C/10 min foi suficiente para inativar esporos de *Bacillus coagulans*. Os autores concluíram, ainda, que os esporos são mais sensíveis à temperatura quando submetidos à API do que somente utilizando temperatura (DARYAEI; BALASUBRAMANIAM, 2013). Esta conclusão também foi verificada por Silva; Tan; Farid (2012), no qual os valores de D (tempo necessário para reduzir 1 ciclo log a uma pressão fixa) para *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja foram reduzidos com o aumento de temperatura, quando pressurizados a 200 MPa ( $D_{45\text{ °C}}=43,9$  min  $D_{65\text{ °C}} = 5,0$  min).

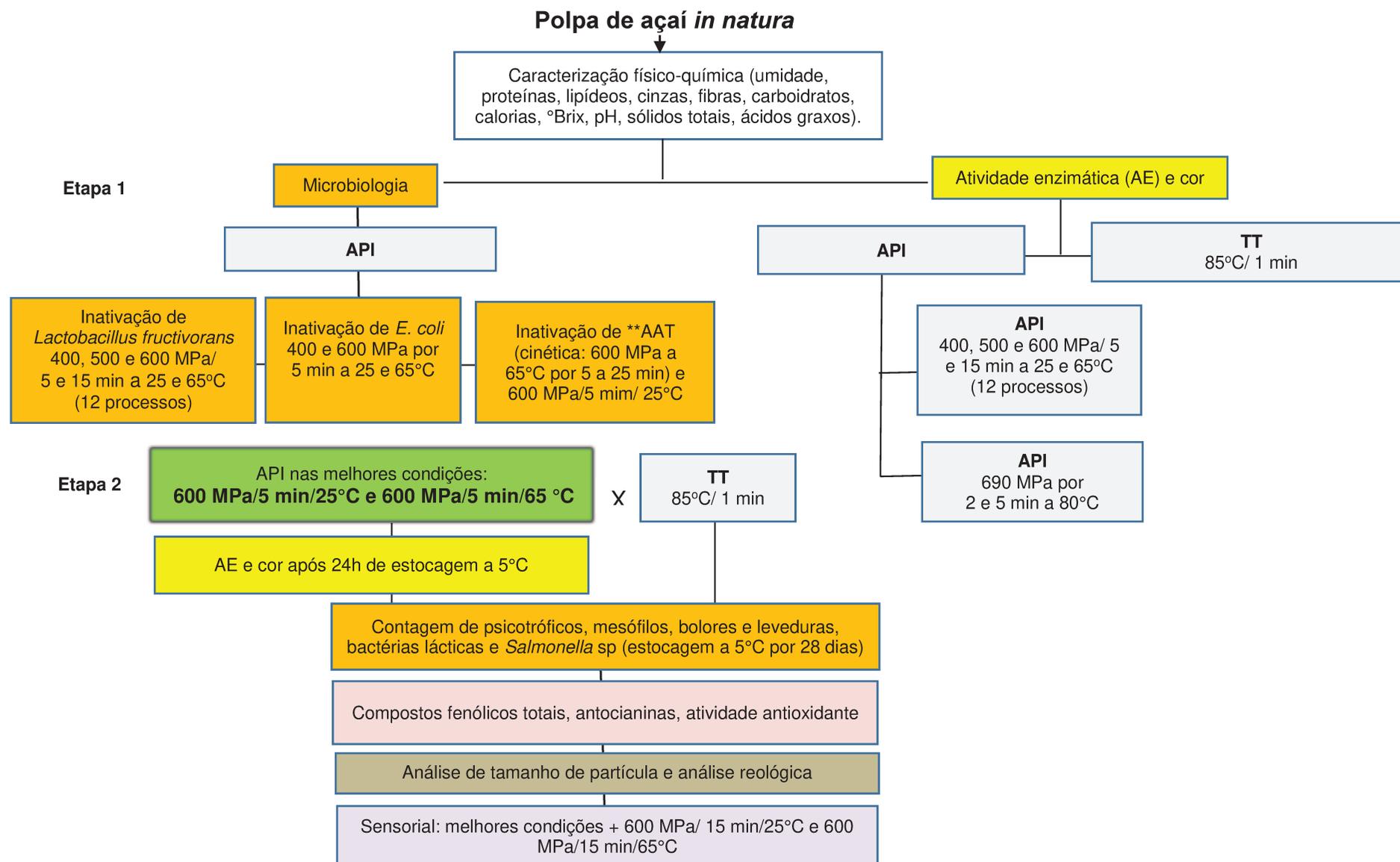
De acordo com os resultados encontrados na literatura, a API é eficaz na inativação de células vegetativas e esporos. Contudo, a barorresistência dos microorganismos varia de acordo com a cepa microbiana, pressão, tempo, temperatura e a matriz, sendo necessário realizar testes específicos para determinar o tratamento mais adequado para cada matriz vegetal.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Polpa de açaí

As amostras de polpas de açaí do tipo B (açaí médio com 11%p/p de sódios totais) foram adquiridas de uma indústria de polpas da região de Castanhal (Pará-Brasil) sem nenhum tipo de conservador químico ou processamento térmico, sendo todas do mesmo lote e foram mantidas congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 24 h até o momento do processamento. Antes do congelamento, todas as amostras foram embaladas em um laminado multicamada flexível especial, composto por polietileno de baixa densidade (PEBD) co-extrusado com etileno vinil álcool (EVOH) e carvão ativado, além de uma camada interna pigmentada de preto (Dixie-Toga Ltda., São Paulo-SP/Brasil). Neste sistema de embalagem, a poliolefina possibilita a termossoldagem da embalagem, o copolímero EVOH tem como função a barreira ao oxigênio e a camada interna escura protege a polpa contra radiação ultravioleta e luz visível. A embalagem utilizada tinha as seguintes características: espessura de  $78\ \mu\text{m}$  e taxa de permeabilidade ao oxigênio de  $1,38\ \text{TPO}_2\ (\text{cm}^3\ \cdot\ \text{m}^{-2}\ \cdot\ \text{dia}^{-1})$  [1 atm –  $23\ ^{\circ}\text{C}$  – 75% U.R.].

A **Figura 2** apresenta o fluxograma de todas análises realizadas na polpa de açaí, bem como todas as condições de processo utilizadas em cada uma dessas análises.



**Figura 2:** Fluxograma das análises realizadas na polpa de açaí. Obs: Todas as análises foram comparadas com uma amostra controle (sem processamento).  
\*\*AAT: *Alicyclobacillus acidoterrestris*. AE: atividade enzimática.

## **4.2. Caracterização físico-química da polpa de açaí**

As análises para caracterização da polpa de açaí foram realizadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas-SP/Brasil). Para o teor de umidade e voláteis, a amostra foi previamente evaporada em banho-maria e posteriormente seca em estufa a vácuo (2 horas a 70°C), e depois levada à mesma estufa até peso constante (AOAC, 2012). O teor de sólidos totais foi determinado segundo AOAC (2000), método 920.151 item 37.1.12.

A determinação de cinzas e de fibra alimentar total foram realizadas segundo AOAC (2012), métodos 925.51 e 985.29, respectivamente. Os teores de lipídeos totais foram mensurados segundo método do Instituto Adolfo Lutz (2005). A determinação de nitrogênio total foi baseada no método de Kjeldahl tradicional (920.152) (AOAC, 2012). O teor proteico bruto da polpa foi calculado pelo produto da quantidade de nitrogênio total (g) utilizando o fator de conversão de 5,75 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

O teor de carboidrato foi obtido pela diferença entre o somatório dos níveis de proteína, lipídeos, umidade, cinzas e fibras (CECCHI, 2003). O pH foi verificado através de um pHmetro (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Switzerland) inserindo o eletrodo diretamente na amostra. A determinação da concentração de sólidos solúveis (°Brix) foi realizada utilizando-se refratômetro de bancada (marca Reichert /r<sup>2</sup> mini) a 20 °C (AOAC, 2012). O valor calórico expresso em kcal/100g foi calculado considerando-se 4 kcal/g para proteína e carboidratos e 9 kcal/g para lipídeos (KALIL, 1975; PASSMORE; NICOL; RAO, 1975; USDA, 1963). A composição em ácidos graxos foi determinada de acordo com AOCS (2014), AOAC (2010a) (método 996.06) e Hartman; Lago (1973).

## **4.3. Desenho experimental e processamento por alta pressão isostática**

Para os ensaios de API foi utilizado um equipamento de alta pressão (QFP 2L - 700 Avure Technologies, OH, USA) com uma câmara de 2 L de volume, trabalho com pressão máxima de 690 MPa e temperatura controlada de 10 a 90 °C. A temperatura da câmara foi medida por termopares do tipo K inserido na câmara, um localizado no topo e outro no meio. A pressão foi capturada por um transdutor de pressão. O tempo de compressão para atingir 400, 500 e 600 MPa foi de cerca de 85 s, 90 s e 124 s, respectivamente e a descompressão foi praticamente 2 segundos. As

polpas de açaí (50 g) embaladas foram seladas a vácuo. Os processos foram realizados segundo o desenho experimental sumarizado na **Tabela 4**, totalizando 12 processos e mais a amostra controle (não processada). As condições foram selecionadas a partir de estudos preliminares (planejamento experimental) com a polpa de açaí que demonstraram que pressões abaixo de 400 MPa não possuem efeitos significativos de inativação das enzimas POD e PPO a 25 °C. Após o processo, todas as amostras foram mantidas em banho de gelo até o momento da análise.

**Tabela 4:** Desenho experimental

Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
400	25	5
400	25	15
400	65	5
400	65	15
500	25	5
500	25	15
500	65	5
500	65	15
600	25	5
600	25	15
600	65	5
600	65	15

#### 4.4. Processamento térmico

O processamento térmico foi realizado a uma temperatura de 85 °C por 1 minuto seguindo metodologia proposta por Sulaiman et al. (2015). Esses parâmetros foram escolhidos pois, segundo Rogez (2000), a PPO de açaí pode regenerar parcialmente durante a armazenagem a 4°C por 10 dias se a temperatura de pasteurização for inferior a 85 °C. A inativação térmica da polpa de açaí foi determinada utilizando um banho ultra termostático a 85°C (modelo 115, FANEM, São Paulo - Brasil) com monitoramento contínuo de temperatura através de termopar tipo

T e um aquisitor de dados (Data Logger Almemo® Ahlborn, modelo 2890-9). Os dados de temperatura foram coletados por um software supervisor (LabVIEW), responsável pela aquisição de dados do termopar e pela interface homem-aquisitor de dados de comunicação com o usuário, permitindo a visualização e interpretação dos dados em tempo real.

Porções de 50 g de polpa foram embaladas a vácuo no mesmo tipo de embalagem utilizada para os tratamentos de API (PEBD/EVOH – 78 µm de espessura) e com área de superfície de 105 x115 mm, de modo que a temperatura da polpa pudesse ser considerada aproximadamente uniforme no interior da mesma. O termopar tipo T foi colocado no centro da embalagem e as amostras de polpa foram totalmente submersas no banho de água durante o tempo de processamento pré-especificado. Após o processamento, as amostras foram imediatamente mergulhadas em banho de gelo-água antes da extração e análise da atividade enzimática.

#### **4.5. Processamento combinado de alta pressão isostática e alta temperatura**

O efeito da API combinado com temperatura elevada (80 °C) também foi avaliado, considerando que as enzimas estudadas podem ser termorresistentes e barorresistentes em algumas matrizes vegetais. Os processos realizados incluíram tratamentos a 690 MPa (maior pressão de trabalho do equipamento) por 2 e 5 min a 80 °C.

#### **4.6. Extração e atividade enzimática**

Para análise da atividade enzimática, primeiramente foi feita a extração das enzimas segundo Cano; Hernández; De Ancos (1997) com modificações. Porções de 10 g de polpa de açaí foram misturadas com 50 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, contendo polivinilpirrolidona (PVPP) a 0,5%. A solução foi homogeneizada em misturador de alto cisalhamento (ULTRA-Turrax®, modelo T-25D, IKA®, Alemanha) a 15.000 rpm durante 2 minutos. A amostra homogeneizada foi então centrifugada a 4 °C/ 15.300 x g / 15 minutos (Centrífuga Allegra™ 25® Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e, em seguida, o sobrenadante, contendo a PPO e a POD (extrato bruto) foi filtrado em papel qualitativo Watmann nº 1, obtendo-se o extrato enzimático que foi utilizado para determinar a atividade das enzimas.

Para a atividade da POD foram utilizados 100 µL do extrato enzimático e uma mistura reacional composta de 2,7 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,5)

com 200 µL de peróxido de hidrogênio 30% (0,1% em água destilada) como fonte de oxigênio e 500 µL de guaiacol (0,05% em água destilada) como acceptor de hidrogênio.

Para a atividade da PPO foram utilizados 100 µL do extrato enzimático e uma mistura composta de 0,7 mL de catecol (0,2M em água destilada) e 2,3 mL de tampão fosfato de sódio (pH 6,5/ 0,1M).

As atividades das enzimas POD e PPO foram determinadas em espectrofotômetro (Beckman Couter™, DU 800 UV-VIS, EUA) utilizando cubetas de quartzo. As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 485 e 420 nm, a 25 °C, por 5 e 3 minutos, respectivamente. A atividade enzimática foi calculada segundo Tribst et al, (2016), com base na inclinação da porção linear da curva de  $\Delta A_{420}$  para PPO e  $\Delta A_{485}$  para POD plotada em função do tempo. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa como a quantidade de enzima que causa um aumento na absorbância de 0,001 por minuto nas condições de ensaio, de acordo com a **Equação 1**. Uma amostra controle (amostra não processada) foi usada para fins comparativos. A atividade enzimática relativa (AER) foi calculada considerando a atividade da amostra controle como 100%, de acordo com a **Equação 2**.

$$\text{Atividade enzimática (U)} = \frac{(\text{inclinação} \times \text{fator de diluição})}{0,001} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Atividade enzimática relativa (AER)} = \frac{(\text{atividade enzimática depois\_API})}{(\text{atividade enzimática controle})} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

#### 4.7. Determinação instrumental de cor

A cor instrumental (transmitância) das amostras de polpa foi medida por um espectrofotômetro (Hunter Lab, UltraScan PRO, EUA) utilizando o iluminante primário D65 como descrito por Sentandreu et al. (2011). Foram analisadas as componentes  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (tonalidade vermelho-verde),  $b^*$  (tonalidade amarelo-azul) e  $\Delta E$  (**Equação 3**) que significa a diferença total de cor de uma amostra em relação ao padrão, segundo técnica CIELab. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  e  $b_0^*$  são as médias dos valores da amostra não processada (controle).

#### **4.8. Estabilidade durante armazenamento**

Para se verificar a inativação/ativação das enzimas estudadas após 24 h de estocagem refrigerada, a partir dos resultados apresentados, foram escolhidas duas condições para as análises de estocagem (600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/65 °C), utilizando a maior pressão e menor tempo de processo desse estudo. Todos os tratamentos foram realizados em triplicada e, em seguida, três lotes de amostra foram armazenados nas mesmas condições a  $5 \pm 2$  °C em estufa BOD no escuro. As amostras foram analisadas após 0 e 24 h de armazenamento. As amostras referentes a cada tratamento foram coletadas, uma por vez, para a realização das determinações.

#### **4.9. Avaliação da inativação de micro-organismos em polpa de açaí**

##### **4.9.1. Preparação das amostras para os ensaios de inativação microbiana**

Para os testes de inativação microbiana, a polpa do açaí *in natura* foi embalada a vácuo e esterilizada (121 °C/15 min) em autoclave para inativar a microbiota natural da polpa. Todas as cepas de micro-organismos utilizadas nesse estudo foram doadas pela Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil).

##### **4.9.2. *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AAT)**

A cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CCT 7547 foi cultivada a 45 °C durante 3 dias em meios de ágar batata dextrose (PDA) (Kasvi - Itália) ajustados a pH 4,0 com ácido tartárico (esterilizado por filtração) a 10% (p/v) (0,1 g / mL) (EVELYN; SILVA, 2016).

##### **4.9.2.1. Preparo da suspensão de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris***

AAT foi incubada em PDA a 45 °C durante 3 dias para obter uma cultura de estoque. As células da cultura de estoque foram cultivadas em PDA em placas de Petri e incubadas a 45 °C durante 18 dias. Depois de atingir mais de 80% da esporulação, confirmada por microscopia após a coloração com verde de malaquita, os esporos foram coletados com um *swab* estéril e suspensos em água destilada estéril (SILVA; TAN; FARID, 2012). O grupo de esporos recolhidos de diferentes placas foi centrifugado a 4000 x g durante 20 min a 4 °C, lavado e centrifugado por

duas vezes com água destilada estéril e, finalmente, ressuspensão em tampão fosfato (pH 7,2) e armazenado a 4°C até o momento da análise.

#### **4.9.2.2. Contagem de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris***

A contagem de esporos de AAT seguiu a metodologia proposta por Silva, Tan; Farid (2012). Para a inativação de AAT, foram inoculados 3 mL da suspensão de esporos ( $10^7$  UFC/mL) em 27 mL de polpa, obtendo-se uma contagem inicial de  $10^6$  UFC/mL. Para determinar a concentração de esporos (N) na polpa de açaí não processada e processada, 0,1 mL da suspensão/açaí foi diluída em série em solução de água peptonada 0,1% (p/v) em tubos de ensaio. Cada diluição foi misturada com vortex para assegurar uma concentração uniforme de esporos nos tubos de diluições. As diluições foram aquecidas a 80°C durante 10 minutos para eliminar quaisquer células vegetativas restantes e 0,1 mL de cada diluição foi inoculada em placas de PDA acidificadas (pH 4,0) e incubadas a 45°C durante 3 dias (SILVA; TAN; FARID, 2012).

Após a incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas para as diluições onde o número de colônias estava entre 25 e 250 UFC e então as contagens médias foram calculadas. A concentração de esporos na polpa do açaí (N) foi expressa como UFC/ mL de polpa.

Na primeira etapa da pesquisa (testes preliminares), foi observado que para o micro-organismo esporulado *Alicyclobacillus acidoterrestris*, combinar o processo de API com temperaturas mais altas resultou em maiores taxas de inativação de esporos. Assim, as condições de processo escolhidas para inativação dos esporos de AAT foram baseadas no uso de temperatura (65°C) e alta pressão (600 MPa). Para se obter uma curva de inativação para esse micro-organismo por API, os parâmetros de processo escolhidos foram: 600 MPa a 65°C por 5, 10, 15, 20 e 25 minutos

#### **4.9.3. *Escherichia coli***

As condições de processo escolhidas para inativação da cultura patogênica de *E. coli* foram 400 MPa/5min/25°C, 400 MPa/5min/65°C, 600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/ 65 °C, ou seja, a menor e a maior pressão desse estudo, pelo tempo de 5 minutos, nas temperaturas de 25 °C e 65 °C.

#### **4.9.3.1. Ativação da cultura estoque de *E. coli***

A partir dessa cultura estoque, 18 horas antes de cada ensaio, repiques foram feitos em frascos tipo *shot* contendo 50 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI – Kasvi-Itália) e incubados em estufa a 37 °C por 18 h. Após o crescimento, a suspensão de bactérias foi centrifugada a 4000 x g por 15 min a 4 °C e depois lavada duas vezes em solução salina (0,85% p/v) tamponada. O precipitado bacteriano foi ressuspendido em 1 mL de BHI com 20% de glicerol. A concentração bacteriana foi ajustada para 10<sup>8</sup> UFC/mL (0,5 na escala de McFarland) utilizando espectrofotômetro a 600 nm (SILVA et al.,2010).

#### **4.9.3.1. Contagem de *E.coli***

A cultura utilizada nesse estudo foi uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229. Para inativação de *E.coli*, 3 mL de uma suspensão de células (10<sup>8</sup> UFC/mL) foi inoculada em 27 mL de polpa de açaí obtendo assim uma contagem inicial de 10<sup>7</sup>UFC/mL. As amostras foram processadas e para a contagem de *E. coli*, 1 mL foi adicionado a 9 mL de solução estéril de água peptonada a 0,1%(p/v). As diluições decimais seriadas também foram em solução peptonada 0,1%(p/v). A contagem foi realizada por plaqueamento em superfície e em duplicata, utilizando meio de cultura agar violeta red bile glucose (VRBG) (Kasvi- Itália). As placas de VRBG foram incubadas a 35 ± 2 °C durante 72 h (Ariedfjohan et al., 2004).

#### **4.9.4. *Lactobacillus fructivorans***

Para definir as melhores condições de processo para o acompanhamento da estabilidade durante armazenamento refrigerado da polpa de açaí, também foram realizados estudos de inativação microbiana de uma cepa de lactobacilo, uma vez que a contagem de bactérias lácticas na polpa *in natura* foram de 2,3 x 10<sup>4</sup> UFC/mL (4,4 log) de açaí, demonstrando que esse micro-organismo poder ser um deteriorante durante o período de estocagem do produto.

#### **4.9.4.1. Ativação da cultura estoque de *Lactobacillus fructivorans***

Vinte e quatro horas antes de cada ensaio, repiques foram feitos em frascos tipo *shot* contendo 50 mL de caldo *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS – Acumedia ®, Lansing, Michigan) e incubados em estufa a 35 °C por 24 horas. Após o crescimento, a suspensão de bactérias foi centrifugada a 4000 x g por 15 min a 4 °C e depois lavada

duas vezes em solução salina (0,85% p/v) tamponada. O precipitado bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de BHI com 20% de glicerol. A concentração bacteriana foi ajustada para  $10^9$  bactérias conforme a escala de McFarland utilizando espectrofotômetro a 600 nm (SILVA et al.,2010).

#### **4.9.4.2. Contagem de *Lactobacillus fructivorans***

Para esse estudo, as 12 condições do delineamento experimental (**Tabela 4**) foram utilizadas. A cultura utilizada nesse estudo a cepa de *Lactobacillus fructivorans* CCT 0850. Para inativação de *L. fructivorans*, 0,3 mL de uma suspensão de células ( $10^9$  UFC/mL) foi inoculada em 30 mL de polpa de açaí obtendo assim uma contagem inicial de  $10^7$ UFC/mL. Para a contagem nas amostras processadas, 1 mL foi adicionado a 9 mL de solução estéril de água peptonada a 0,1%. As diluições decimais seriadas também foram em solução peptonada 0,1%. A contagem foi realizada por plaqueamento em profundidade em agar MRS (Acumedia®, Lansing, Michigan) com sobrecamada e as placas incubadas a 30°C por 48 horas (CASTRO et al.,2009).

#### **4.9.5. Contagens microbiológicas em polpa de açaí armazenada sob refrigeração**

Foram realizadas durante a estocagem da polpa de açaí, análises microbiológicas de coliformes (35°C e 45°C) e *Salmonella* sp, conforme regulamentado pela RDC nº 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Além de contagem de bolores e leveduras, micro-organismos mesófilos aeróbios, psicotróficos e bactérias lácticas.

As análises de bolores e leveduras, micro-organismos mesófilos aeróbios, psicotróficos e bactérias lácticas foram realizadas de acordo com SILVA et al. 2010 (metodologias descritas pela APHA- *American Public Health Association*, 2001). A análise de *Salmonella* sp foi realizada segundo metodologia da AOAC, (2010b) (método 2004.3).

### **4.10. Análise sensorial**

#### **4.10.1. Teste de aceitação**

O teste de aceitação foi realizado após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Número do CAAE: 58564116.3.0000.5404). A análise sensorial de aceitação da polpa de açaí foi realizada com duas amostras processadas por API (600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5

min/65 °C), uma amostra *in natura* (controle) e uma pasteurizada (85 °C/1 min). Porém, a fim de se verificar se o tempo de processo poderia influenciar na percepção do consumidor, foram acrescentados mais dois processos: 600 MPa/15 min/25 °C e 600 MPa/15 min/65 °C, totalizando 6 amostras. 118 consumidores avaliaram 5 atributos (aparência, aroma, sabor, textura e impressão global), utilizando uma escala hedônica híbrida de 9 cm, sendo os extremos da escala: “1- desgostei extremamente” e “9- gostei extremamente”. Os consumidores também avaliaram a intenção de compra com uma escala variando de “certamente não compraria” a “certamente compraria”, e a escala do ideal de cor (MEILGAARD et al., 2004). Juntamente com a ficha de avaliação (**Anexo 1**) os provadores foram convidados a preencher um questionário para avaliação do perfil do consumidor de polpa de açaí (**Anexo 2**).

#### **4.10.2. Free listing**

Os participantes receberam as seis amostras de polpa de açaí utilizadas no teste de aceitação e, para cada amostra, na ordem em que foram oferecidas, foi solicitado que eles observassem a cor e a aparência, avaliassem o aroma e degustassem o produto. Posteriormente, foi solicitado uma descrição dos atributos sensoriais que melhor representassem as amostras de acordo com critérios pessoais com o preenchimento de uma ficha com suas respostas (**Anexo 3**). O número de atributos para descrever cada amostra não foi limitado, porém, foi orientado que os participantes evitassem termos afetivos e fossem específicos na descrição. Não houve tempo pré determinado para a realização do teste. A metodologia teve a participação de 118 pessoas, consumidores de polpa de açaí e sem alergia ao produto. Eles foram recrutados aleatoriamente na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os testes foram realizados em um ambiente com temperatura controlada (20 °C). Foram servidos 15 g de polpa de açaí em copos plásticos codificados com três dígitos e em temperatura de 5 °C ( $\pm 2$  °C). Antes que a metodologia fosse aplicada, todos os participantes leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**Anexo 4**). Após a conclusão dos testes foi realizada uma pré-seleção dos termos citados para evitar a superposição e termos similares se juntarem. Posteriormente, foram selecionados somente os termos mais citados pelos consumidores.

A análise dos dados foi realizada com base no índice de saliência proposta por Smith; Borgatti (1997). Este índice considera o número de entrevistados que

mencionou o atributo, a posição média do atributo no processo de *free listing* e o comprimento da lista de entrevistados, usando a seguinte fórmula:

$$S_j = \left( \left( \sum_{i=1}^{F_j} (L_i - R_{ij} + 1) / L_i \right) / N \right)$$

Onde:  $S_j$  índice de saliência para o atributo =  $j$ ,  $F_j$  = número de entrevistados que mencionou o atributo  $j$ ,  $L_i$  = comprimento da lista de entrevistados  $i$ ,  $R_{ij}$  = classificação dada pelo entrevistado  $i$  ao atributo  $j$ , e  $N$  = número total de entrevistados.

Além disso, a análise de componentes principais (ACP) foi realizada utilizando os valores de índice de saliência de Smith obtidos para cada amostra, devido à natureza paramétrica dos dados.

#### 4.11. Extração dos compostos bioativos

A extração para determinação de antocianinas, fenólicos totais e atividade antioxidante foram planejadas de forma a verificar o efeito do tratamento térmico sob pressão (processo). Dessa forma, evitou-se variações de temperatura, tempo de extração e utilização de diferentes solventes, para que as diferenças encontradas entre as amostras fossem majoritariamente influenciadas pelo efeito dos distintos processamentos. A água foi utilizada como solvente (extrato aquoso), uma vez que já é utilizada na fabricação das polpas e foi acidificada com ácido fórmico (1%) com o objetivo de estabilizar as antocianinas (fenólicos majoritários da polpa do açaí) (BATISTA et al., 2017).

Os extratos aquosos foram obtidos a partir da diluição das polpas em água destilada acidificada, depois foram homogeneizados e centrifugados à 4000 rpm, 4°C por 10 min. A extração foi a mesma para todas as análises para efeitos de comparação.

Todas as leituras de absorvância e fluorescência foram determinadas em um leitor de microplacas Biotherk HT, Biotek (Winooski, EUA) com software de análise de dados Gen5™ 2.0.

#### 4.12. Antocianinas

A determinação de antocianinas monoméricas foi realizada utilizando um protocolo de pH diferencial espectrofotométrico (WROLSTAD et al, 2005). Os extratos

foram diluídos usando tampão de cloreto de potássio 0,025 mol L<sup>-1</sup> (pH 1,0) de acordo com a absorvância da amostra (0,4 - 0,6 a 520 nm) e em tampão de acetato de sódio 0,4 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,5) usando as mesmas proporções (1:4 de fator de diluição). Após a adição de 250 µL na microplaca, a absorvância foi lida a 520 e 700 nm. A absorvância (A) foi calculada usando **Equação (4)**:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5} \quad \text{(Equação 4)}$$

O teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>) foi expresso em mg equivalentes de cianidina-3-O-glicosídeo (PM=449,2) usando a **Equação (5)**:

$$C(\text{mgC}_{3\text{G}} 100\text{g}^{-1}) = A.PM.FD/.e.L \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde C= concentração; C<sub>3G</sub>= cianidina-3-O-glicosídeo; e=absortividade molar da antocianina predominante na amostra (26900 mol L<sup>-1</sup>); L=comprimento (cm); PM= peso molecular (449,2); FD= fator de diluição.

#### 4.13. Compostos fenólicos totais.

O teor dos compostos fenólicos foi determinado pela capacidade redutora verificada pelo método Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). A reação colorimétrica foi conduzida a partir de uma solução contendo água deionizada, reagente Folin- Ciocalteu (Sigma-Aldrich), carbonato de sódio (20% p/v) (Êxodo – Brasil) e o extrato na proporção de 16:1:2:1 (BATISTA et al., 2016). A reação foi conduzida por 120 minutos no escuro à temperatura ambiente e a absorvância lida a 765 nm. Os resultados foram expressos como mg de ácido gálico (Dinâmica – Brasil) equivalente por 100 g de polpa.

#### 4.14. Atividade antioxidante.

A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando os métodos ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio) e FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) segundo Batista et al. (2016) com algumas adaptações.

#### **4.14.1. ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)**

O método ORAC (DAVALOS; GOMEZ-CORDOVES; BARTOLOME, 2004) foi realizado adicionando os extratos das amostras diluídos em tampão fosfato (pH 7,4) ou soluções padrões, fluoresceína diluída em tampão fosfato (Labsynth – Brasil) e AAPH [Dicloridrato de 2,2-azobis(2-metilpropionamidina)] (Sigma-Aldrich) na proporção de 1: 6: 3, respectivamente, e foram utilizadas microplacas pretas. Trolox (Sigma-Aldrich) foi usado como padrão e o leitor de microplacas com filtros fluorescentes configurou-se da seguinte forma: comprimento de onda de excitação, 485 nm; Comprimento de onda de emissão, 520 nm. Os valores de ORAC foram expressos como micromol de trolox equivalente por grama ( $\mu\text{mol TE/g}$  de amostra).

#### **4.14.2. FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)**

A capacidade de redução férrica dos extratos foi determinada, utilizando o método FRAP de acordo com Rufino et al. (2010). O reagente FRAP foi preparado no escuro, utilizando tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mM em uma solução de HCl 40 mM e  $\text{FeCl}_3$  20 mM (proporções de 10: 1: 1). As amostras ou soluções padrões, água e reagente FRAP foram misturados e incubados em banho-maria durante 30 minutos a 37 °C. As amostras e a curva padrão de trolox foram lidas a 595 nm.

#### **4.15. Análise de distribuição de tamanho de partículas (DTP)**

Esta análise foi realizada por dispersão de luz usando um difratômetro a laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra, unidade de amostragem Hydro 2000S, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). A amostra foi adicionada lentamente, como gotículas, a um compartimento preenchido com água destilada (à temperatura ambiente), até que a obscuridade fosse de cerca de 10. Ambos, o volume da partícula e o cálculo da área da superfície da partícula foram utilizados para obter o diâmetro médio volumétrico  $D[4,3]$  (**Equação 6**) e diâmetro médio da área superficial  $D[3,2]$  (**Equação 7**), respectivamente. Considerando que as partículas não são esferas ideais e o  $D[3,2]$  é mais influenciado pelas partículas menores, enquanto o  $D[4,3]$  é mais influenciado pelas maiores, a avaliação de ambos é considerada importante (LOPEZ-SANCHEZ et al., 2011a; BENGTTSSON; TORNBERG, 2011). Essas análises foram realizadas após um dia de processo, em triplicata de amostra.

$$D[4,3] = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \quad \text{(Equação 6)}$$

$$D[3,2] = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde,  $n_i$  é o número de gotículas de diâmetro  $d_i$ .

#### 4.16. Análises reológicas

Um reômetro de tensão controlada ( $\sigma$ ) (AR 2000ex, TA Instruments, Newcastle, EUA) foi utilizado para avaliar as características de escoamento das amostras. A geometria utilizada foi uma placa-placa serrilhada (40 mm de diâmetro). A distância entre as placas foi de 1300  $\mu\text{m}$ . Durante as análises, a temperatura da amostra foi mantida constante a 25 °C usando um sistema Peltier. As análises foram realizadas um dia após os processos e cada amostra foi analisada em triplicata.

Um protocolo foi utilizado para avaliar as características dependentes do tempo e do estado estacionário. Primeiro, as amostras foram mantidas em repouso durante 5 minutos antes do cisalhamento. Depois disso, a amostra foi cisalhada a uma taxa de cisalhamento constante (300  $\text{s}^{-1}$ ) durante 300 s, enquanto a tensão de cisalhamento foi medida para a avaliação do comportamento dependente do tempo (tixotrópico). Finalmente, o comportamento de fluxo em estado estacionário foi analisado com uma taxa de cisalhamento decrescente (300  $\text{s}^{-1}$  a 0,1  $\text{s}^{-1}$ ).

A diminuição da tensão de cisalhamento durante a segunda parte do protocolo foi avaliada utilizando o modelo Figoni e Shoemaker (FIGONI; SHOEMAKER, 1983; **Equação 8**). O terceiro passo do protocolo foi utilizado para avaliar o comportamento do fluxo usando o modelo Hershel-Bulckey (**Equação 9**).

$$\sigma = \sigma_e + (\sigma_i - \sigma_e) \cdot \exp(-k_{FS} \cdot t) \quad \text{(Equação 8)}$$

$$\sigma = \sigma_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{(Equação 9)}$$

Onde:  $\sigma$  = tensão de cisalhamento (Pa);  $\sigma_e$  = tensão de cisalhamento de equilíbrio;  $\sigma_i$  = tensão de cisalhamento inicial;  $K_{Fs}$  = constante de redução de tensão;  $t$  = tempo de cisalhamento;  $\sigma_0$  = tensão residual;  $k$  = índice de consistência (Pa.sn),  $\dot{\gamma}$  = taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ ),  $n$  = índice de comportamento ao fluxo.

Os parâmetros da **Equação 8** e **Equação 9** foram obtidos por regressão linear ou não linear com o software Curve Expert Professional (v.1.6.3, <http://www.curveexpert.net/>, EUA) em um nível confiança de 95%.

#### 4.17. Análise dos dados

Os processos foram realizados com três repetições. Para a atividade enzimática as leituras foram feitas em quadruplicata, e em três repetições para avaliação de cor. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar os efeitos dos diferentes processos e o teste de Tukey para determinar as diferenças entre eles ao nível de confiança de 95%. Para isso foi utilizado o software Minitab<sup>TM</sup> 16.1.1 da Minitab Inc. (EUA) e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Os dados da análise sensorial em relação à aceitação global foram também analisados por análise estatística multivariada de Mapa de Preferência Interno (MDPREF), realizado através do software estatístico XLSTAT 2017 (Addinsoft, Paris, França).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Caracterização físico-química da polpa de açaí

A **Tabela 5** apresenta a composição média da polpa açaí que apresentou 88,70 g de umidade em 100 g de polpa e em relação à matéria seca (ms), para cada 100 g: 9,13 g de proteína, 50,88 g de lipídeos, 16,63 g de carboidratos e 19,73 g de fibra alimentar.

Em relação à quantidade de sólidos totais, a polpa de açaí utilizada foi caracterizada como açaí médio (tipo B) com 11,30% e 3,2 °Brix. Esse valor está de acordo com o valor encontrado por Alexandre; Cunha; Hubinger (2004) para polpa média,  $3,2 \pm 0,10$  °Brix.

**Tabela 5:** Composição físico-química da polpa de açaí utilizada no estudo

Composição	Resultados	
	*/100g de polpa	/100g de matéria seca
Umidade e voláteis (g)	*88,70±0,25**	-
Cinzas (g)	*0,41±0,01**	3,63
Lipídeos totais (g)	*5,75±0,03**	50,88
Proteína (Nx5,75) (g)	*1,03±0,01**	9,13
Fibra alimentar (g)	*2,23±0,01**	19,73
Carboidratos (g)	*1,88±0,22**	16,63
Calorias (Kcal)	*64±1,2**	-
pH	4,78±0,01**	-
Sólidos totais (%)	*11,30±0,71**	-
°Brix	3,2±0,26**	-
<b>Ácidos graxos (g)</b>		
Saturados	*1,34	24,32
Monoinsaturados:	*3,47	63,14
ômega 9	*3,29	59,79
ômega 7	*0,18	3,35
Poli-insaturados:	*0,69	12,54
ômega 3	*0,04	0,76
ômega 6	*0,65	11,78
Trans	*0,00	0

\*g/100 g de polpa

\*\*Resultados expressos como média ± desvio padrão.

O açaí é um alimento altamente calórico devido ao alto percentual de lipídeos, seu principal componente em termos quantitativos, com teores variando de 45,85% a 52,64% da matéria seca (ROGEZ, 2000). Os lipídeos aparecem como compostos majoritários na polpa (50,88 g/100 g ms). Em relação aos ácidos graxos, as maiores quantidades encontradas são de ácidos graxos monoinsaturados (3,47 g/100 g de polpa) sendo o maior representante o ácido oleico (18:1 ou  $\omega$ 9) com 3,29 g/100 g de polpa ou 59,79 g/100 g ms. O valor encontrado neste estudo foi ligeiramente maior aos resultados encontrados por Nascimento et al. (2008) e Rogez (2000) em frutos de açaí (52 g/100 g ms e 54,90 g/100 g ms, respectivamente). Para os ácidos graxos poli-insaturados (ácidos graxos essenciais) a maior quantidade é representada pela ácido linoleico (18:2 ou  $\omega$ 6) com 0,65 g/100 g de polpa e o  $\alpha$ -linolênico (18:3 ou  $\omega$ 3) com 0,04g/100g de polpa. A legislação brasileira referente a lipídeos totais em polpa de açaí estabelece um teor mínimo de 20 g e máximo de 60 g/100 g ms, ou seja, o açaí utilizado nesse estudo está de acordo com Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000 (Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de açaí) (BRASIL, 2000).

O valor energético é parcialmente responsável pelo êxito do consumo do açaí entre os jovens e atletas da região sul e sudeste do Brasil e segundo os dados aqui apresentados (**Tabela 5**), 100 g de açaí fornecem aproximadamente 64 Kcal. Estes valores estão de acordo com Rogez (2000) que afirma que o açaí médio, com 12,5% de sólidos totais, tem um valor energético de 65,5 Kcal/100 g de produto.

Na composição do açaí, as fibras alimentares aparecem em quantidade como segundo maior componente em porcentagem, logo após os lipídeos. Segundo Rogez (2000), a concentração de fibras alimentares totais é notadamente elevada, cerca de 25%, quantidade maior que a encontrada em nosso estudo (19,73 g/100 g ms). Essa quantidade pode variar em função de vários fatores como, por exemplo, o desenvolvimento de mecanismos de adaptação morfológica e anatômica das espécies de açaí, em função das características ambientais, mudanças climáticas, solos, prática de manejo, regime de inundações periódicas nas áreas de várzea (Yuyama et al., 2011).

Comparado aos padrões de identidade exigidos pela Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2000), os 9,13 g de proteínas/100 g ms encontrados na polpa estão acima do limite mínimo de 5 g de proteínas/100 g ms, portanto, enquadrando-se dentro dos padrões vigentes.

Pode-se concluir que o açaí tem muitas propriedades essenciais importantes na nutrição humana sendo uma fonte de energia, ácidos graxos, minerais e fibras e por esta razão é considerado um alimento funcional, auxiliando na prevenção de várias doenças degenerativas (PACHECO-PALENCIA; TALCOTT, 2010; ROSSO et al., 2008; YUYAMA et al., 2011).

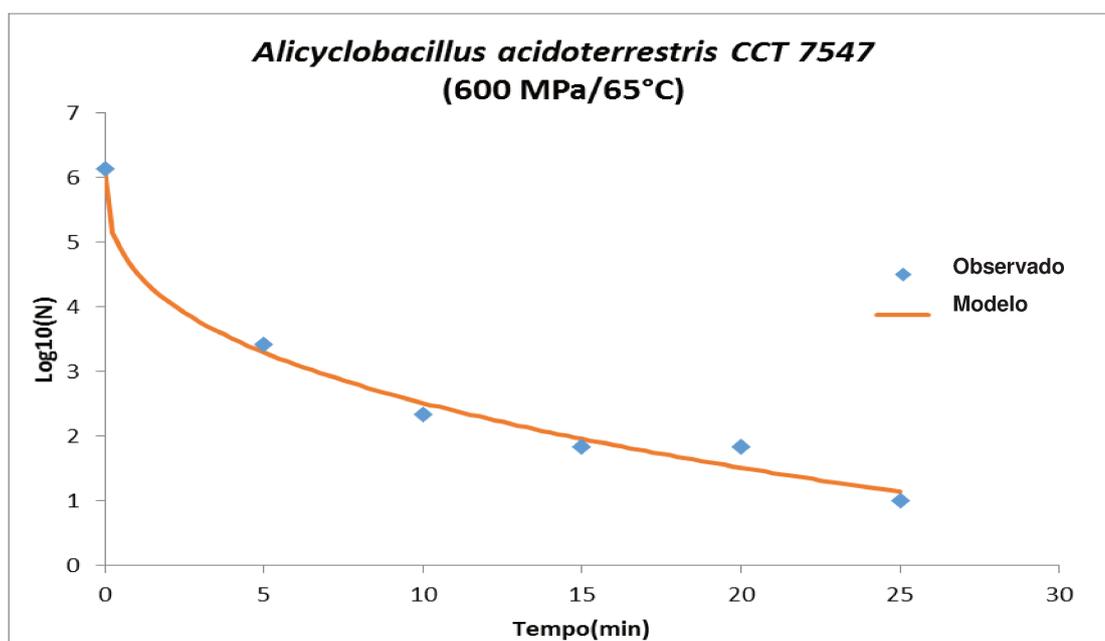
A polpa de açaí apresentou pH igual a 4,78, valores dentro dos padrões estabelecidos pelo MAPA, que dispõe uma margem de pH de 4,0 a 6,2 (BRASIL, 2000). Isso demonstra as boas condições físico-químicas da matéria-prima utilizada nesse estudo, porém, nesse caso, por ser considerada um alimento de baixa acidez (pH > 4,6), segundo Franco; Landgraf (1996), coloca-se entre os sujeitos à multiplicação microbiana, tanto de espécies patogênicas quanto de deteriorantes. A baixa acidez da polpa de açaí reforça também a necessidade do processamento por API.

## 5.2. Avaliação da inativação de micro-organismos em polpa de açaí

### 5.2.1. Inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

A **Figura 3** apresenta a cinética de inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AAT) na polpa de açaí processada por API e mostra a paridade dos dados observados e preditos. O modelo de Weibull (PELEG; COLE, 1998; WEIBULL, 1951) foi o modelo matemático capaz de descrever o perfil de inativação de AAT por API.

Este modelo foi gerado a partir do software GlnaFIT 1.6 no Excel. Entre muitos, esse modelo supõe que a população de células ou esporos têm diferentes resistências ao calor e a curva de sobrevivência é uma distribuição letal cumulativa. Os modelos cinéticos comumente são usados para descrever o comportamento de um micro-organismo alvo ao longo do processo de inativação.



**Figura 3-** Curva de sobrevivência de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em polpa de açaí a 65 °C em combinação com alta pressão (600 MPa)

A **Equação 10** foi utilizada para descrever a distribuição de Weibull (MAFART et al., 2002). Para comparação do modelo obtido, os seguintes critérios estatísticos foram considerados: coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e o erro quadrático médio (RMSE).

$$N/N_0 = \exp \left( - \left( \frac{t}{\alpha} \right)^\beta \right)$$

(Equação 10)

Onde:

$N_0$  = concentração inicial de esporos / mL;

$N$  = concentração de sobreviventes / mL (após tratamento durante  $t$  minutos)

$t$  = tempo (minutos ou segundos)

$\alpha$  = parâmetro de escala (minutos ou segundos)

$\beta$  = parâmetro de forma da curva de sobrevivência, usado como índice de desempenho (adimensional)

Na **Equação 10**,  $N$  é o número de micro-organismos que sobrevivem ao tratamento (UFC / mL);  $N_0$  é o número inicial da população microbiana e  $t$  é o tempo de tratamento em minutos ou segundos. Os parâmetros  $\beta$  e  $\alpha$  são, respectivamente, os parâmetros de forma e escala da curva. Quando  $\beta < 1$ , a curva de sobrevivência é para cima côncava, quando  $\beta > 1$ , é para baixo côncava, e quando  $\beta = 1$ , é uma linha reta em uma escala logarítmica. O valor de  $\alpha$  pode ser considerado como uma medida da resistência microbiana ao tratamento (parâmetro cinético); assim quanto maior o seu valor, maior a resistência do micro-organismo alvo. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) geralmente é aplicado ao comparar modelos com diferentes números de parâmetros.

O erro quadrático médio (RMSE), que mede o desvio médio entre os valores observados e ajustados, é dado pela **Equação 11**. Os valores do RMSE que se aproximam de zero indicam um ajuste mais próximo dos dados do modelo (BUZRUL; ALPAS, 2004).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(\text{ajustado} - \text{observado})^2}{n - m}} \quad \text{(Equação 11)}$$

Onde:  $n$  é o número de observações e  $m$  é o número de parâmetros a serem estimados.

Os resultados encontrados foram  $\alpha = 0,26$  min,  $\beta = 0,35$  e o tempo de redução de quatro ciclos log (4D) obtido pelo modelo foi de 13,5 min. O valor de  $R^2$  encontrado no modelo foi 0,9888 e o RMSE igual a 0,2503, sendo que, modelos com  $R^2$  mais próximos de 1 e RMSE menores indicam a existência de um ajuste estatístico adequado (SHALINI et al., 2008; SANT'ANNA et al., 2010). Assim como em nosso estudo, Buzrul; Alpas; Bozoglu (2005) também utilizaram o modelo de Weibull para

descrever a inativação de AAT por API (450 MPa) a 35 °C, 45 °C e 50 °C e obtiveram em média RMSE de 0,31 e R<sup>2</sup> de 0,96.

O  $\beta$  encontrado em nosso estudo (0,35) possui um valor  $<1$ , ou seja, a curva que mostra a inativação possui uma concavidade para cima, evidenciando o que alguns autores chamam de efeito de cauda ("*tailing phenomena*"), que a existência de uma fração resistente (e outra lábil) na inativação dos esporos de AAT.

Em trabalho realizado por Evelyn; Silva (2015) utilizando purê de morango processado por API, os autores conseguiram bons resultados de inativação de ascósporos de *Byssochlamys nivea*, porém, encontraram valores de  $\beta$  entre 0,46 e 0,66 ( $\leq 1$ ), indicando uma concavidade ascendente. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos com outros micro-organismos, obtendo também inativação não linear e mostrando que o modelo Weibull foi capaz de prever os resultados da inativação (VAN BOEKEL, 2009; WANG et al., 2009; SERMENT-MORENO et al., 2014; EVELYN; SILVA, 2015a).

O modelo de Weibull também foi o que melhor descreveu a inativação por alta pressão (600 MPa) juntamente com temperaturas de 50 °C a 75 °C de ascósporos de *Neosartorya fischeri* em suco de maçã (EVELYN et al., 2016).

*Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria não-patogênica e formadora de esporos (DEINHARD et al., 1987; WISOTZKEY et al., 1992), que tem sido associada a vários incidentes de deterioração em sucos de maçã e laranja durante a vida de prateleira. As perdas econômicas podem ser graves uma vez que este micro-organismo não produz gás e a deterioração é difícil de ser detectada antes do consumo. A deterioração é caracterizada por um mau gosto/aroma detectado em concentrações muito baixas como ppb de guaiacol (ou bromofenol), que podem ser produzidas a partir de  $10^5$  e  $10^6$  células/mL (PETTIPHER et al., 1997).

Uma das características mais distintivas de *Alicyclobacillus spp.* é a presença de ácidos graxos  $\omega$ -alíclicos como o principal componente da membrana. Estudos demonstraram que esses ácidos graxos cuidadosamente contribuem para a resistência ao calor do micro-organismo quando uma camada protetora com fortes ligações hidrofóbicas é formada. Em um ambiente de extrema acidez e de alta temperatura, essas ligações estabilizam e reduzem a permeabilidade da membrana (JENSEN, 1999; KANNENBERG; BLUME; PORALLA, 1984). Em relação a resistência térmica, estudos relatam valor  $D_{95^\circ\text{C}}$  de processamento térmico de endosporos de diferentes cepas de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas variando entre 1,5 e 8,7 min

(EIROA; JUNQUEIRA; SCHIMDT, 1999; EVELYN; SILVA, 2016; SILVA; GIBBS, 2001).

Com base nos estudos de inativação microbiana, duas condições foram escolhidas para prosseguir com as análises durante a estocagem refrigerada (600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/65 °C). Também foi analisada a inativação de AAT a 600 MPa/5 min a 25°C e os resultados demonstraram redução de 1,2 ciclos log de esporos. Já para 600 MPa/5 min/65 °C foram obtidos 2,72 ciclos log de redução. A partir dos resultados podemos observar que mesmo usando API foi necessário aumentar a temperatura de processo para conseguir melhores taxas de inativação de esporos de AAT. Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Silva; Tan; Farid (2012) em suco de laranja. Os autores conseguiram aumentar a taxa de inativação de esporos de 1 ciclo log para 2 ciclos log quando aumentaram a temperatura de processo de 45 °C para 65 °C e a pressão de 200 MPa para 600 MPa (ambos os processos por 10 min).

O mecanismo de inativação de esporos por API não é completamente conhecido. Porém, alguns estudos relataram que os esporos germinam primeiro sob certas condições de temperatura/pressão, perdendo sua resistência e assim são prontamente inativados por API. Sob pressões muito altas (400 e 800 MPa), existe uma germinação induzida de esporos, acompanhada da liberação de ácido dipicolínico (DPA) com cálcio (Ca) (WUYTACK; BOVEN; MICHIELS, 1998; RENDUELES et al., 2011). Segundo Black et al. (2007), a liberação de Ca-DPA leva à lise do córtex, possivelmente devido aos efeitos nos canais de DPA na membrana interna ou na própria membrana do esporo. Após a germinação, os esporos são muito mais sensíveis a agentes como o calor, o pH e a pressão comparados ao estado de dormência (HONGKANG; MITTAL, 2008).

Até o momento não foram encontrados na literatura estudos de inativação de AAT por API em polpa de açaí, no entanto, no trabalho realizado por Pavan (2010) utilizando suco de açaí, foi detectada a presença de guaiacol. A presença deste composto foi relacionada à deterioração do produto, principalmente por *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Os resultados sugeriram que a deterioração pode ter ocorrido no suco ou na fruta antes do processamento, já que as temperaturas elevadas e a umidade relativa da área de colheita / produção podem favorecer o crescimento microbiano.

Os esporos deste micro-organismo são resistentes à pasteurização, podendo crescer em uma ampla gama de temperaturas produzindo *off-flavors* (EISELE; SEMON, 2005; PEREZ-CACHO et al., 2007).

Como a concentração de esporos inicial encontrada na polpa de açaí foi de 6,13 log UFC/mL e a API reduziu a contagem de esporos para valores abaixo de 5 log UFC/mL (redução de 1,2 ciclos log a 600 MPa/5 min/25°C e 2,72 ciclos log a 600 MPa/5 min/65 °C), podemos dizer que os resultados de redução encontrados em nosso estudo são vantajosos, uma vez que concentrações abaixo desse valor podem ser encontradas nos sucos/polpas, mas estes não apresentam características de deterioração pois AAT produz guaiacol (substância que caracteriza odor de deterioração do produto) a partir de concentrações acima de 5 log UFC / mL de esporos (PERRIPHER et al., 1997; GOCMEN et al., 2005).

### 5.2.2. Inativação de *E.coli*

Entre os micro-organismos estudados, *E. coli* foi o menos resistente a API na polpa do açaí. Como observa-se na **Tabela 6**, os resultados mostraram que houve uma redução > 6,1 ciclos log em todas as condições aqui estudadas, demonstrando que este micro-organismo foi inativado facilmente após o processamento por API mesmo na menor condição de processo (400 MPa/5 min/25 °C).

Alguns estudos relataram que as bactérias Gram negativas são menos resistentes aos efeitos da API do que as Gram positivas (a parede celular é mais resistente) (WUYTACK et al., 2002).

Resultados semelhantes foram encontrados por Torres et al (2015) em um estudo com *E. coli* O157: H7 em suco de laranja, no qual foi relatado a redução de 6,5 ciclos log quando o suco foi processado a 400 MPa / 3 min / 25 °C.

Ramaswamy; Riahi; Idziak (2003) estudaram a inativação de *E. coli* em suco de maçã e verificaram que esse micro-organismo é extremamente sensível ao tratamento por alta pressão, sendo um pulso de pressão de 400 MPa/25 °C capaz de inativar toda a população ( $10^8$  CFU / mL) de *E.coli*.

*E. coli* é uma bactéria Gram negativa comumente encontrada nos intestinos de animais e humanos, sendo considerada o indicador mais específico de contaminação fecal e a possível presença de agentes patogênicos nos alimentos (MOHAMMAD, 2005).

**Tabela 6:** Média das contagens de *E.coli* em polpa de açaí após processamento por API

<b>Amostra</b>	<b><i>E.coli</i> (Log UFC/mL)</b>
Controle	7,10±0,14*
400 MPa/5 min/25 °C	<1,0**
600 MPa/5 min/25 °C	<1,0**
400 MPa/5 min/65 °C	<1,0**
600 MPa/5 min/65 °C	<1,0**

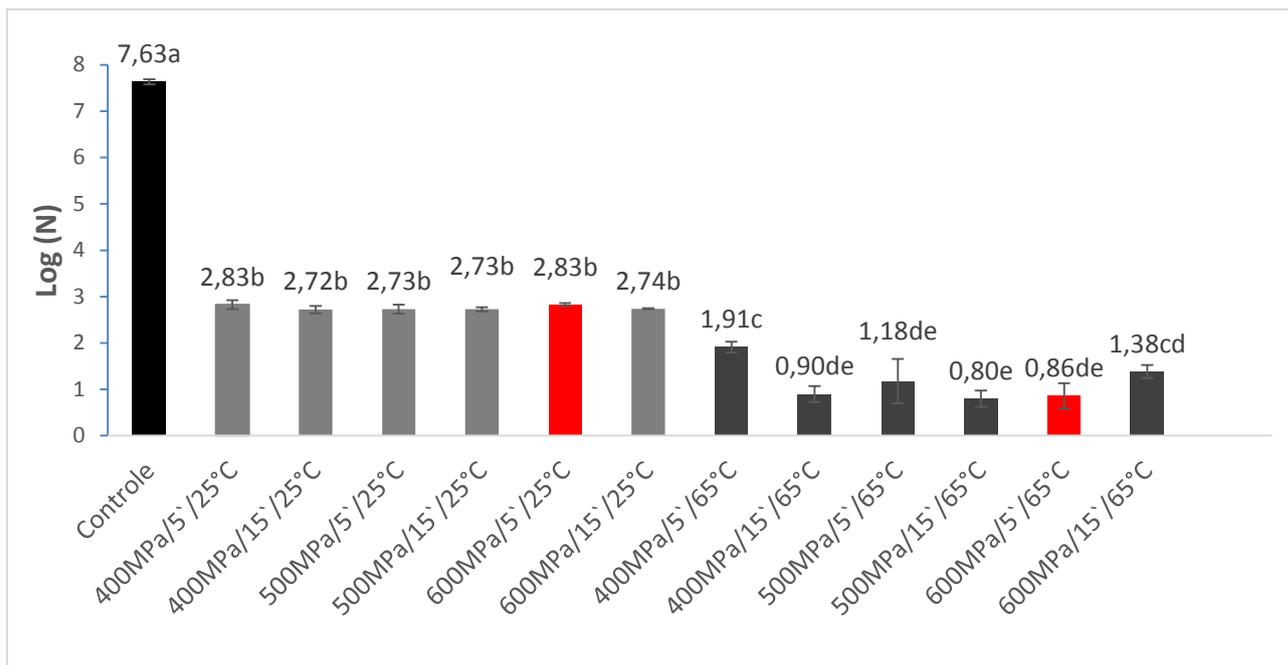
\*\* Valores abaixo do limite de detecção do método (<1,0 Log UFC/mL). \* Valor expresso como média ± desvio padrão

### 5.2.3. Inativação de *Lactobacillus fructivorans*

A **Figura 4** apresenta os resultados de inativação de *L. fructivorans*, em popa de açaí processada por API e, como se pode observar, todos os processos avaliados apresentaram resultados de inativação de até 4,8 ciclos log de UFC/mL. Nos processos a 25 °C, o tempo de processo e a pressão não influenciaram na taxa de inativação. Quanto à temperatura, observa-se que quando a temperatura é ajustada de 25 °C para 65 °C, maiores taxas de inativação são obtidas. Nos processos escolhidos para as análises de estocagem, 600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/65 °C, foram obtidos 4,8 e 6,7 ciclos log de redução, respectivamente.

O micro-organismo *L. fructivorans* mostrou sensibilidade considerável ao tratamento por API, obtendo taxas de inativação superiores a 5 ciclos logarítmicos a uma pressão de 400 MPa quando processado a 65°C/ 5 mim.

Além das leveduras, as bactérias do gênero *Lactobacillus* são encontradas frequentemente como contaminantes de diversos produtos alimentícios e em especial em produtos derivados de frutas. *L. fructivorans* são classificadas como homofermentativas e heterofermentativas com base nos produtos da fermentação do ácido láctico. Eles são ainda classificados em bactérias tolerantes ao álcool (WADA; MIZOGUCHI, 2007). Lactobacilos heterofermentativos, de forma geral, apresentam maior resistência ao tratamento térmico que espécies homofermentativas (WADA; MIZOGUCHI, 2007).



**Figura 4-** Efeito da alta pressão isostática na inativação de *Lactobacillus fructivorans* CCT 0850 em polpa de açai processada por API. Letras diferentes nas barras representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Barras em vermelho representam as condições que foram selecionadas para acompanhamento da estabilidade durante armazenamento refrigerado.

As melhores condições encontradas no presente estudo e que prosseguiram para as análises durante estocagem, foram definidas analisando a inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* nas condições de 600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/65 °C e a inativação de *L. fructivorans* (4,8 e 6,7 ciclos log de redução, respectivamente, nas duas condições acima citadas).

### 5.3. Efeito da API e do tratamento térmico na atividade das enzimas POD e PPO

A **Figura 5** apresenta as atividades da POD e PPO em polpa de açai submetida a alta pressão a 400, 500 e 600 MPa durante 5 e 15 min a 25 °C e 65 °C. Os resultados foram expressos como atividade enzimática relativa (AER) segundo a **Equação 2**, considerando as amostras não processadas (controle) como 100% de atividade (indicado pela linha pontilhada nos gráficos).

Os resultados para enzima POD (**Figura 5-A e 5-B**) demonstraram que essa enzima é termorresistente a 65°C e barorresistente em polpa de açai. Em nenhuma faixa de pressão/tempo/temperatura utilizados nesse estudo foi possível conseguir inativações significativas para essa enzima ( $p > 0,05$ ). Os resultados a 65°C (**Figura 5-B**) mostraram ativação da POD, exceto a 400 MPa/15 min/65 °C. A maior ativação foi

a 500 MPa/5 min/65 °C chegando a um aumento na atividade de  $25,0 \pm 0,3\%$  ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. A API combinada com calor (65 °C) pode romper a estrutura das células e levar a um maior contato da enzima com outros componentes da célula, além de alterar a conformação da enzima, conduzindo assim a um aumento na atividade enzimática (SULAIMAN; SILVA, 2013).

O fenômeno de ativação/inativação enzimática sob pressão é bem complexo, porém, alguns autores afirmam que a ativação enzimática normalmente ocorre devido as interações entre os constituintes dos alimentos e a liberação de enzimas e substratos das membranas vegetais sob pressão ( RASTOGI et al., 2007; HUANG et al., 2013). Além disso, o processo também pode ativar isoenzimas latentes (GUERRERO-BELTRÁN et al., 2005) devido à mudanças na conformação enzimática que possivelmente expõem novos sítios ativos, levando a um aumento da atividade enzimática (HUANG et al., 2013).

Menezes et al. (2008) verificaram que a API desempenhou efeitos diferentes sobre a atividade da enzima POD em polpa de açaí. A POD teve sua atividade levemente reduzida em 9,26% em processos de 300 MPa/15 min/25 °C, porém, de uma maneira geral, a sua atividade foi aumentada, chegando a uma ativação máxima de 32,98%, quando tratada a 500 MPa/5 min/25 °C.

Na **Figura 5-C**, observa-se que para os processos a 500 MPa/5 min, 600 MPa/5 min, 400 MPa/15 min e 600 MPa/15 min, todos a 25 °C, houve aumento da atividade da enzima PPO em  $35,7 \pm 7,5\%$ ,  $29,8 \pm 1,4\%$ ,  $24,6 \pm 3,5\%$  e  $25,7 \pm 2,1\%$ , respectivamente. A menor atividade relativa dessa enzima foi obtida quando a polpa foi processada a 400 MPa/5 min ( $104,1 \pm 2,6\%$  de AR) não diferindo estatisticamente do controle ( $p > 0,05$ ).

Buckow; Weiss; Knorr (2009) observaram uma ativação máxima de 65% da PPO no suco de maçã na faixa de 200 a 500 MPa à temperatura ambiente. Em suco de pêssigo após processamento por API (400 MPa/15 min/25 °C) Rao et al. (2014) observaram um aumento de 7% na atividade da PPO. Os autores explicaram seus resultados afirmando que pode ocorrer a ativação da forma latente da PPO.

Dalmadi et al. (2006) relataram 95% de inativação das PPOs de morango a 25°C quando utilizaram pressões de 800 MPa/15 min.

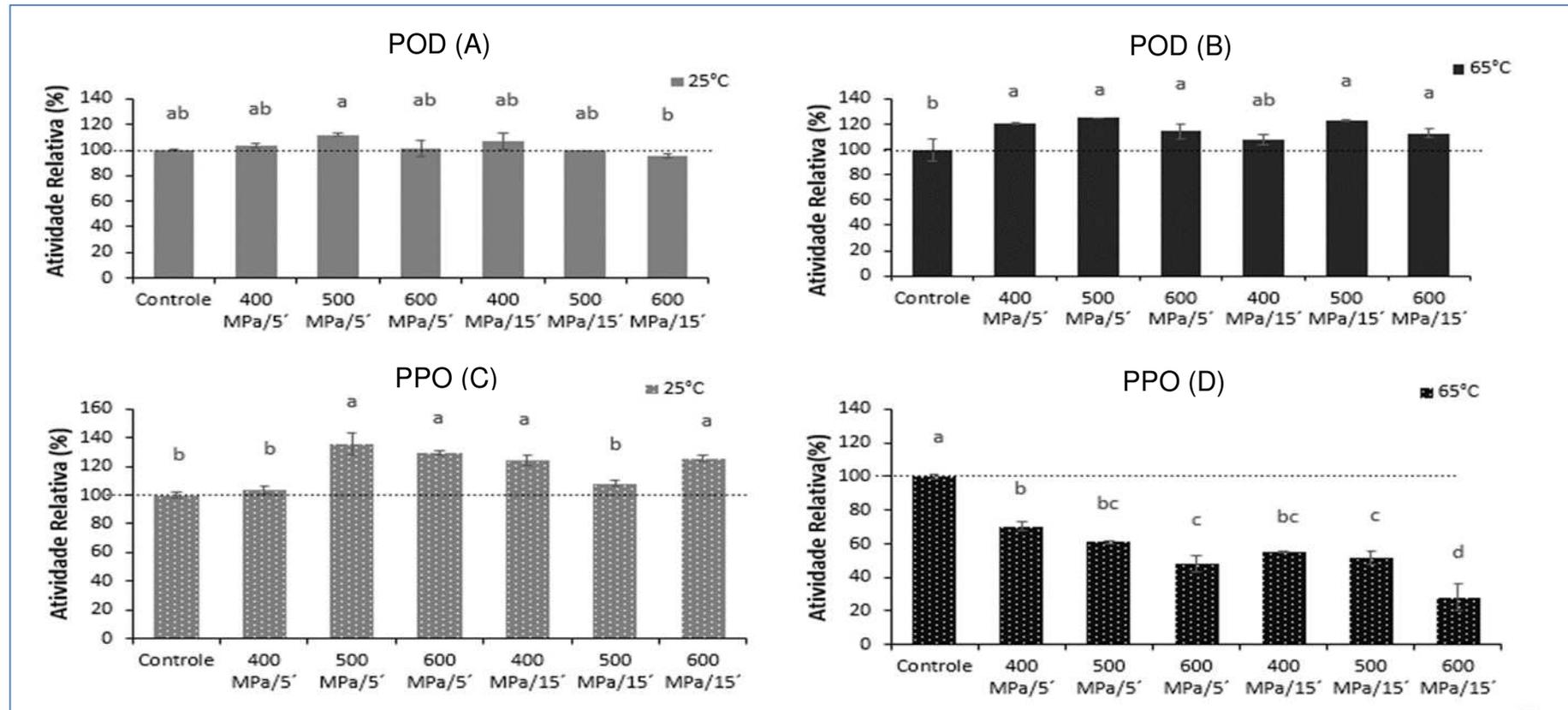
Para a PPO, os resultados dos processos de API combinado com temperatura de 65°C (**Figura 5-D**), mostraram uma sinergia na inativação da enzima, e quanto maior a pressão, maior é o efeito. O tempo de processo só foi relevante para uma

maior inativação quando a polpa foi processada a 600 MPa ( $p < 0,05$ ). Nos processos à 65 °C, 400 MPa/5 min, 500 MPa/5 min, 600 MPa/5 min, 400 MPa/15 min, 500 MPa/15 min e 600 MPa/15 min, foram encontradas inativações de 29,7%, 39,1%, 51,5%, 44,8%, 48,4% e 71,7%, respectivamente.

Resultados similares foram obtidos por Sulaiman et al. (2013) para atividade da PPO, quando processaram purê de morango a 600 MPa/5 min à temperatura ambiente e entre 29 e 71 °C. Os autores conseguiram reduzir a atividade residual da PPO de 65% para 9% quando aumentaram a temperatura de processo de 34 °C para 71 °C, ou seja, foi necessário o uso de pressão e temperatura elevada para reduzir a atividade da enzima.

Alguns estudos relataram que a PPO é mais sensível à temperatura e à pressão (CANO; HERNANDEZ; ANCOS, 1997; HENDRICKX et al., 1998) quando comparada com a POD, havendo maior alteração estrutural e, conseqüentemente, modificações na atividade enzimática. Conforme ocorreu em nosso estudo e segundo Menezes et al. (2008) e Sulaiman; Silva (2013), o aumento da atividade de PPO sob determinadas pressões pode ser revertido com o aumento da temperatura de processo, causando redução na atividade destas enzimas.

Ludikhuyze et al. (2001) afirmam que sob o ambiente de alta pressão, o mecanismo de inativação enzimática pode ser hipotetizado semelhante à desnaturação proteica, onde a aplicação de pressão pode induzir de maneira reversível ou irreversível e parcial ou completo o desdobramento da estrutura nativa da enzima. Isto conduz eventualmente a uma mudança na atividade enzimática pois a sua especificidade está relacionada com a estrutura do seu sítio ativo (CHAKRABORTY et al., 2014).

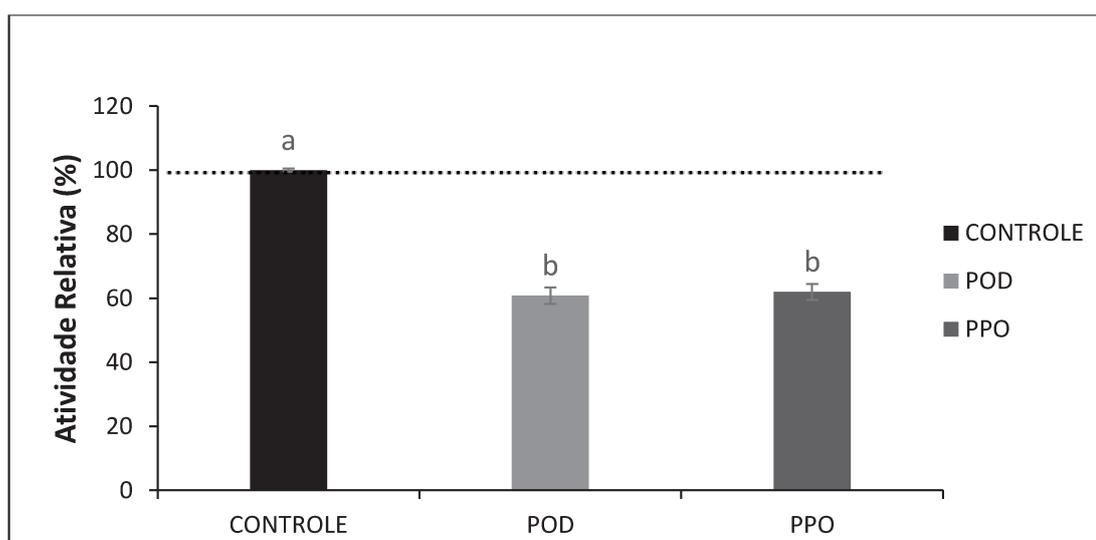


**Figura 5:** Atividade da POD (grupo A e B) e da PPO (grupo C e D) em polpa de açai após processamento por API a 25 °C e 65 °C. A linha pontilhada representa a atividade enzimática relativa da amostra controle. As barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes nas barras dentro do mesmo grupo representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Os resultados para inativação térmica (**Figura 6**) mostraram inativação parcial das duas enzimas estudadas. A POD obteve uma atividade relativa de 60,8% (39,2% de inativação) e a PPO apresentou atividade relativa de 62% (38% de inativação). Rogez (2000) avaliou a pasteurização em polpa de açaí e verificou que as duas enzimas (PPO e POD) só são totalmente inativadas em condições elevadas de tratamento térmico (90 °C/20 min), enquanto que em processos mais brandos (82,5 °C/1 min) foi necessário a acidificação a pH 3,75 para se obter o mesmo resultado. O mesmo autor relatou para a POD um valor de  $D_{100^{\circ}\text{C}} = 2$  min e  $Z = 51$  °C e para PPO,  $D_{100^{\circ}\text{C}} = 0,4$  min e  $Z = 35$  °C.

Liu et al. (2014) estudaram a inativação de PPO e POD em néctar de manga e verificaram a completa inativação das enzimas em todas as amostras tratadas a 110 °C/8,6 s e não foi detectada qualquer atividade durante o armazenamento a 4 °C e 25 °C por 16 semanas. Marszałek; Mitek; Skąpska (2015) conseguiram inativar 97,7% e 99,5%, respectivamente, das PPO e POD em purê de morango quando utilizaram tratamento térmico a 90 °C por 15 min.

Fortea et al. (2009) estudando a inativação térmica de PPO e POD em uva, descreveram que ambas mostraram termoestabilidade semelhante, perdendo mais de 90% de atividade inicial apenas após 5 minutos de tratamento a 78 °C e 75 °C, respectivamente. Em geral, a exposição de PPO às temperaturas de 70 e 90 °C reduz a sua atividade catalítica, mas o tempo necessário para a inativação depende do produto (CHUTINTRASRI; NOOMHORM, 2006).



**Figura 6:** Atividade da POD e PPO de açaí após processamento térmico 85 °C por 1 minuto. As barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes nas barras representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Com a finalidade de aumentar a inativação das enzimas POD e PPO, tratamentos combinados de alta pressão e de calor (80 °C) foram aplicados nas amostras de polpa de açaí. Os processos realizados foram a 690 MPa por 2 e 5 min a 80°C.

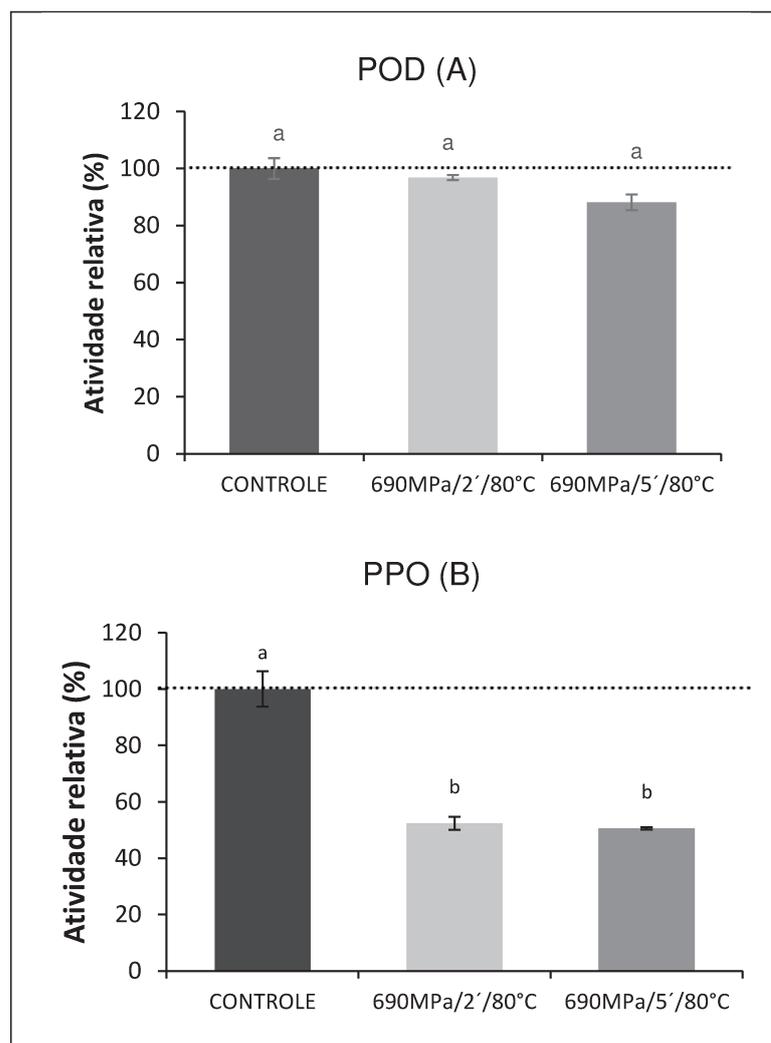
A temperatura de 80 °C foi escolhida pois segundo Emprapa, 2005, industrialmente a pasteurização de polpa de açaí é realizada com temperaturas entre 80 e 85 °C e os tempos de processo foram escolhidos a partir de dados da literatura. Quanto a pressão, 690 MPa é a maior pressão do equipamento utilizado.

Os resultados da atividade da POD (**Figura 7-A**) mostraram termorresistência e barorresistência nas duas condições de processo. Mesmo aliando alta pressão com temperatura elevada, a enzima apresentou estabilidade, diferentemente do observado para a PPO (**Figura 7-B**).

Segundo Sulaiman; Silva (2013), a pressão pode ter um efeito protetivo em relação a inativação pela temperatura, ou então o processamento por API pode ter causado uma liberação aumentada de POD ligadas à membrana, neutralizando o efeito de inativação do calor. Esse fenômeno foi explicado por esses autores que observaram o efeito protetor da pressurização contra a inativação da temperatura de PPO em purê de morango dentro do domínio pressão/tempo/temperatura de 200 a 600 MPa/5 min/ 50 °C a 71 °C.

A **Figura 7-B** mostra que os processos 690 MPa/2 min/80 °C e 690 MPa/5 min/80 °C inativaram, respectivamente,  $47,6 \pm 2,3\%$  e  $49,4 \pm 0,5\%$  da PPO.

A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que, de forma geral, a API mesmo combinada com temperatura (65°C e 80°C) resultou em menores taxas de inativação, com exceção da PPO, pois o tratamento a 600 MPa/15 min/65°C resultou em aproximadamente 70% de inativação. No caso da enzima POD, o tratamento térmico (85°C/ 1 min) foi o mais efetivo na inativação da enzima. No entanto, é importante a avaliação do efeito global (atividade enzimática, cor) dos tratamentos sobre a qualidade do produto final e estes não devem ser avaliados de forma isolada, o que reforça a relevância do tratamento por API em polpa de açaí.



**Figura 7:** Atividade da POD (grupo A) e da PPO (grupo B) de açai após processamento por API combinado com temperatura de 80 °C por 2 e 5 minutos. A linha pontilhada representa a atividade enzimática relativa da amostra controle logo após processamento. As barras de erro representam o erro padrão. Letras diferentes nas barras dentro do mesmo grupo representam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

#### 5.4. Efeito da API e do tratamento térmico na determinação instrumental de cor

A cor é uma importante característica de qualidade e um importante índice que afeta a percepção sensorial e a aceitação pelos consumidores de alimentos (MEDINA-MEZA et al., 2015). A **Tabela 7** apresenta os resultados de análise de cor após processamento térmico e por API e a **Figura 8** apresenta os resultados de aparência dessas amostras.

A percepção da cor é o resultado de três parâmetros ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) que são difíceis de interpretar de forma independente. Sendo assim, um dos melhores

parâmetros para descrever a variação de cor é a diferença total de cor ( $\Delta E$ ), uma vez que é a combinação dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

A diferença total de cor ( $\Delta E$ ) foi avaliada segundo Choi et al. (2002), onde os autores relataram que apenas valores de  $\Delta E$  maiores que 2,0 correspondem a alterações de cor visualmente perceptíveis ao olho humano entre duas amostras.

Apesar das altas taxas de inativação enzimática obtidas pelo processamento térmico em comparação ao uso da API, o estudo de cor (**Tabela 6**) demonstrou que o processo térmico altera a coloração da polpa de açaí (de violácea para marrom) fazendo com que haja um aumento nos componentes  $a^*$  e  $b^*$ , uma diminuição da luminosidade e um  $\Delta E = 4,22$ , que significa a diferença total de cor da amostra “bem visível” ao olho humano em relação ao padrão (CHOI; KIM; LEE, 2002; FRANCIS; CLYDESDALE, 1975).

**Tabela 7:** Efeito da API e do processamento térmico na cor da polpa de açaí

Amostras	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
Controle	28,05±0,99 a	3,99±0,07 d	1,87±0,53 cdef	-
400MPa/5min/25°C	27,68±0,15 abc	4,56±0,07 c	1,71±0,14 ef	0,62
500MPa/5min/25°C	27,81±0,15 abc	4,67±0,29 bc	1,76±0,07 ef	0,63
600MPa/5min/25°C	27,91±0,12 ab	4,57±0,18 c	1,65±0,26 f	0,58
400MPa/15min/25°C	27,94± 0,17 ab	4,76±0,11 bc	1,80±0,17 def	0,68
500MPa/15min/25°C	27,87± 0,18 abc	4,6 ±0,08 c	1,71±0,15 ef	0,57
600MPa/15min/25°C	28,29±0,29 a	4,86±0,18 bc	1,97±0,15 bcdef	0,91
400MPa/5min/65°C	26,98±1,14 c	5,04±0,39 b	2,09±0,25 abcde	2,46
500MPa/5min/65°C	27,4± 0,72 abc	4,90±0,29 bc	2,22±0,31 abcd	1,60
600MPa/5min/65°C	27,95±0,28 ab	4,81±0,24 bc	2,33±0,26 ab	1,13
400MPa/15min/65°C	27,99±0,34 a	4,82±0,21 bc	2,30±0,22 abc	1,12
500MPa/15min/65°C	27,86±0,12 abc	4,89±0,15 bc	2,35±0,30 ab	1,32
600MPa/15min/65°C	27,91±0,14 ab	4,85±0,10 bc	2,31±0,18 abc	1,19
85°C/1min	27,04±0,96 bc	5,61±0,32 a	2,47±0,30 a	4,22

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística significativa entre as amostras ( $p>0,05$ ).

Como observa-se na **Figura 8-B**, a amostra processada termicamente, quando comparada ao controle (**Figura 8-A**), perdeu a cor violácea e adquiriu uma coloração

marrom, o que sensorialmente pode afetar a aceitação do produto pelo consumidor. O processamento térmico é a tecnologia mais amplamente utilizada na indústria alimentar, que garante a segurança microbiológica dos produtos e pode inativar enzimas. As frutas são alimentos altamente perecíveis e são processadas termicamente para ajudar a sua preservação, porém, o tratamento térmico pode trazer impactos indesejáveis sobre compostos bioativos e sobre parâmetros sensoriais como cor, consistência e sabor (Butz; Tauscher, 2002), especialmente quando mal dimensionado.

Os resultados mostraram que para os processos de alta pressão a 25°C não houve diferença ( $p > 0,05$ ) em relação a amostra controle para  $L^*$  (luminosidade) e  $b^*$  (tonalidade amarelo-azul), porém, houve aumento do componente  $a^*$  (tonalidade vermelho-verde). Em relação ao  $\Delta E$ , esses processos apresentaram valores que estão na faixa não perceptível (0,58 – 0,91).

Para os processos de API a 65°C, os resultados mostraram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na luminosidade quando a amostra foi processada a 400 MPa/5 min/65 °C e um  $\Delta E = 2,46$  (perceptível). A diminuição de  $L^*$  é indicativo de escurecimento, o qual tem sido relacionado com escurecimento enzimático por enzimas oxidativas, tais como PPO (PLAZA et al., 2003). Essa amostra foi a que permaneceu com maior atividade relativa ( $70,3 \pm 2,8\%$ ) da PPO após processamento por API. Para todas as outras amostras foi observado um aumento do componente  $a^*$  e  $\Delta E$  permaneceu abaixo de 2,0 (1,12 - 1,60), o que evidencia que a API juntamente com temperatura de 65°C manteve a cor das amostras onde a atividade relativa da PPO permaneceu abaixo de 61%, não apresentaram alterações de cor perceptíveis a olho nu.

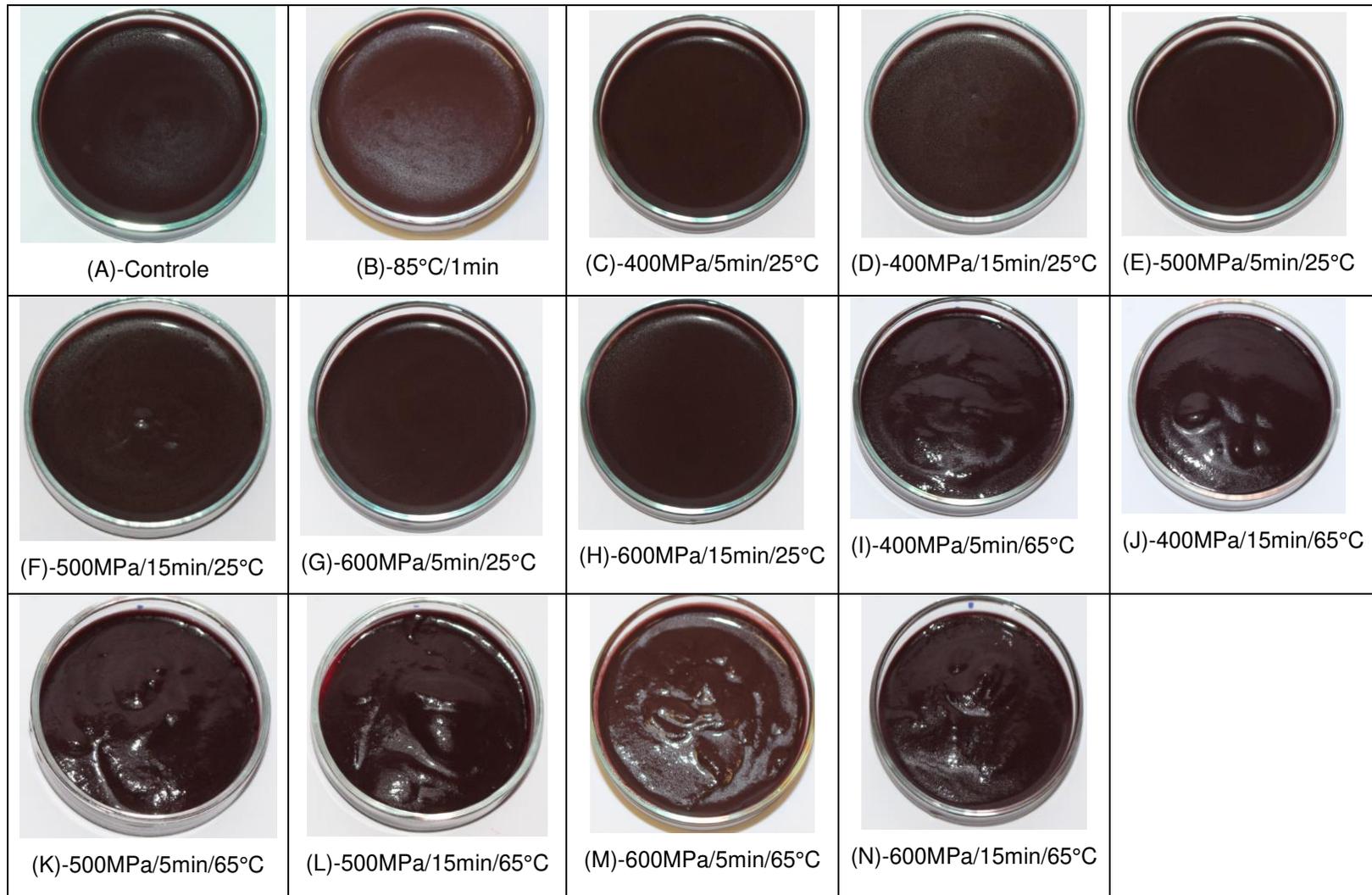
Comparando os resultados de alteração de cor da polpa de açaí após processamento por API e processamento térmico podemos observar a mudança de cor como sendo resultado do uso de elevadas temperaturas ( $\geq 80$  °C) que podem degradar as antocianinas. Ainda, observou-se que a API não altera de forma perceptível a cor do produto final na maior parte das condições de processo utilizadas nesse estudo. Produtos contendo altos teores de antocianinas, como é o caso do açaí, durante o processamento e estocagem são susceptíveis à deterioração na cor resultante de efeitos combinados da degradação de antocianinas e à formação de pigmentos escuros (SKREDE et al., 1992).

A degradação de cor visual e o teor antocianinas são acelerados com o aumento da temperatura. Em purê de ameixa, García-Parra et al. (2014) também observaram mudança de cor após tratamento térmico a 85°C/5min.

Para os processos a 690 MPa/2 min/80 °C e 690 MPa/5 min/80 °C, apesar dos resultados obtidos apresentarem boas taxas de inativação, a análise de cor demonstrou que altas temperaturas provocam uma alteração de cor visível ao olho humano. Para os dados de cor, todos os parâmetros L\*, a\* e b\*, aumentaram ( $p < 0,05$ ) para ambos os processos, apresentando diferenças significativas entre as amostras controle e processadas. A polpa perdeu sua cor violácea e adquiriu uma coloração marrom e, adicionalmente, houve separação de fases, evidenciado pelo aparecimento de gotículas de gordura na superfície da polpa. Sousa et al. (2006) avaliaram a pasteurização de açaí e observaram que o processamento a 100°C/5min alterou negativamente o sabor e o aroma da polpa, além de desestabilizar a emulsão lipídica. Embora a polpa utilizada neste estudo tenha sido processada a 80°C juntamente com API, a temperatura de processo e o tempo de 5 minutos podem ter influenciado nesses resultados.

A 690 MPa/2 min/80 °C e 690 MPa/5 min/80 °C observou-se um  $\Delta E = 2,11$  e  $4,34$ , respectivamente, valores considerados perceptíveis pelos consumidores. Esses resultados estão de acordo com García-Parra et al. (2014) que reportaram  $\Delta E = 4,99$  em purê de ameixa processada a 600 MPa/80 °C por aproximadamente 140 segundos.

Em polpa de açaí, a alteração de cor não depende apenas da degradação por tratamento térmico das antocianinas, mas também devido ao escurecimento enzimático (ROGEZ, 2000). Embora a atividade da POD possa ser parcialmente responsável pelas reações de escurecimento que ocorrem em frutas e vegetais, pode ocorrer na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que geralmente é encontrado em concentrações muito baixas em células vegetais, já a PPO catalisa duas reações: a hidroxilação de monofenóis em difenóis e a oxidação de difenóis em quinonas. (UNDERHILL; CRITCHLEY, 1995; RICHARD-FORGET; GAUILLARD, 1997; VELJOVIC-JOVANOVIC; NOCTOR; FOYER, 2002; DEGL'INNOCENTI et al, 2005). Até o momento não foi encontrado na literatura científica publicações sobre tratamentos de preservação da polpa de açaí por API com análise de cor.



**Figura 8:** Aparência da polpa de açaí após processamento térmico e por alta pressão isostática.

## 5.5. Acompanhamento da estabilidade durante armazenamento

### 5.5.1. Atividade enzimática

Na **Figura 9** são apresentados os resultados de atividade enzimática da amostra controle e das duas condições escolhidas para as análises de estocagem, 600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/65 °C. Estes processos foram escolhidos pois foram capazes de inativar mais de 4,7 ciclos log de *L. fructivorans*, e assim capazes de promover estabilidade microbiológica à polpa durante estocagem. Processos a 600 MPa por alguns minutos (1 a 2 min) à temperatura ambiente foram considerados semelhantes à pasteurização térmica de sucos ou polpas de frutas (MÚJICA-PAZ, et al., 2011; RASTOGI et al., 2007). Além disso, o FDA recomenda o uso de pressão elevada (mínimo de 580 MPa) para pasteurização de alimentos de baixa acidez, com o objetivo de inativar alguns micro-organismos patógenos. No entanto, o tempo do processo não foi estabelecido pela FDA (FDA, 2010), então, a pressão em torno de 600 MPa pode ser considerada adequada para alimentos para fins comerciais.

Os resultados para enzima POD (**Figura 9-A**) confirmaram que em nenhuma faixa de pressão/tempo/temperatura utilizada nesse estudo foi possível conseguir inativações para essa enzima ( $p > 0,05$ ). Os resultados após 24 h de estocagem a 5 °C mostraram que a atividade da enzima não apresentou aumento ( $p > 0,05$ ) tanto para a amostra controle quanto para as amostras processadas por API.

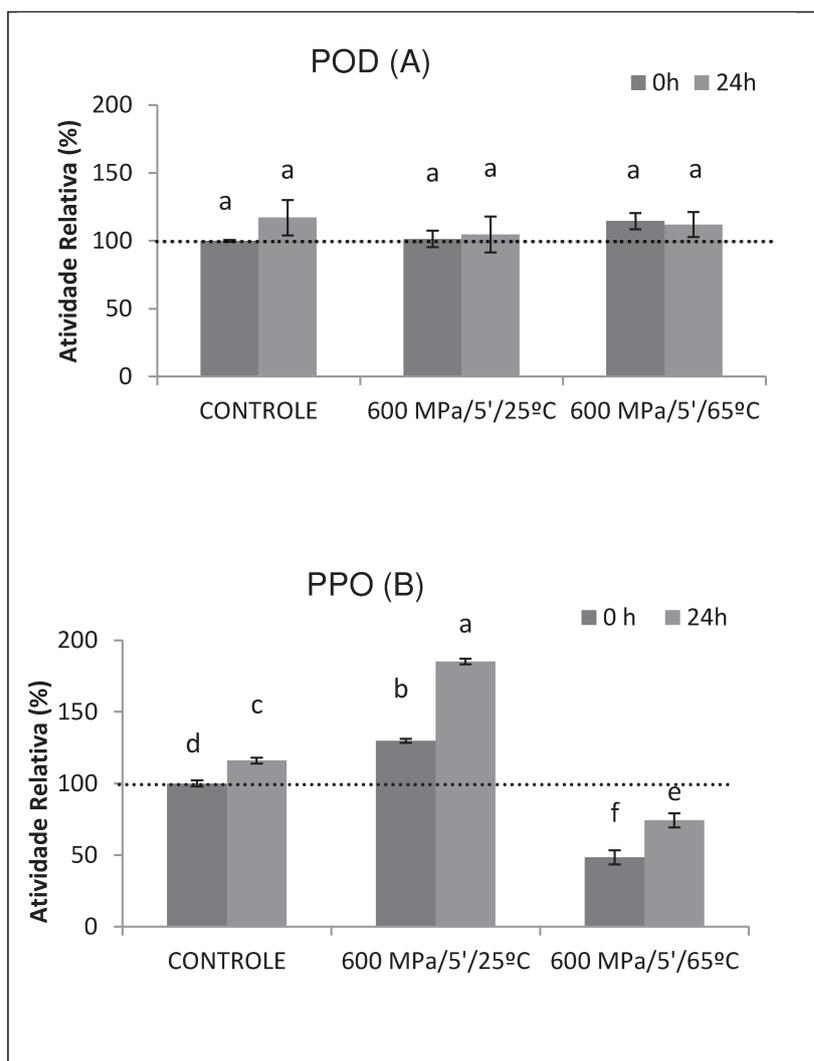
Na **Figura 9-B** observa-se que durante a estocagem refrigerada houve um aumento na atividade relativa da PPO tanto para o controle (aumento de 15,9%) quanto para as amostras processadas por API, chegando a valores de atividade relativa de 185,2% após processo a 600 MPa/5 min/25 °C.

O processo a 600 MPa juntamente com a temperatura de 65 °C tiveram um efeito positivo na inativação da PPO após 5 minutos de processo, obtendo assim valores de atividade relativa de 48,5%. Porém, durante a estocagem por 24 h a 5 °C houve aumento na atividade relativa da PPO para 74,4% em relação ao tempo 0h dessa amostra, mostrando que a inativação dessa enzima é parcialmente reversível após 24h. Segundo Silva; Weber (1993), a reativação da enzima sob o domínio de alta pressão é possível se a extensão de sua inativação está dentro de um valor limiar de compressibilidade que permite a reversibilidade. Este valor limiar é uma função da natureza da enzima e seu meio circundante.

Um estudo realizado com purê de ameixa reportou a ativação da PPO em 33% e 40% quando pressurizado a 400 e 600 MPa/7 min/10 °C, respectivamente, e estas

atividades foram mantidas após 20 dias de armazenamento a 4°C (GONZÁLEZ-CEBRINO et al., 2012).

Assim, pode-se concluir que a POD é mais barorresistente do que a PPO nas mesmas condições de processo para polpa de açaí, possivelmente devido às diferentes conformações estruturais destas enzimas presentes nesta polpa. De modo geral, a API favorece a diminuição do volume de reação, conduzindo assim a alterações na conformação das enzimas (Hendrickx et al., 1998). Estas alterações podem expor mais ou menos sítios ativos com o conseqüente aumento ou diminuição na atividade da enzima (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009). Por conseqüente, a API afeta de forma diferente as enzimas oxidativas do açaí.



**Figura 9:** Atividade da POD (grupo A) e da PPO (grupo B) de açai após processamento (0 h) e após 24h de estocagem refrigerada ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por API a  $25^\circ\text{C}$  e  $65^\circ\text{C}$ . A linha pontilhada representa a atividade enzimática relativa da amostra controle logo após processamento (0 h). As barras de erro representam o erro padrão calculado na média de três repetições. Letras diferentes nas barras dentro do mesmo grupo representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.2. Determinação instrumental de cor

A **Tabela 8** apresenta os resultados de cor (parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) logo após o processamento por API e após 24 h de estocagem refrigerada. Como foi relatado nesse estudo, logo após o processamento por API a 600 MPa/5 min a 25 e  $65^\circ\text{C}$ , a diferença total de cor permanece com valores não perceptíveis (0,66 e 0,90). Os parâmetros  $L^*$  e  $a^*$  não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as amostras controles e as processadas por API quando analisados no mesmo dia de estocagem, porém, após 24 h, observou-se um aumento do  $\Delta E$ , atingindo valores entre 3,33 e 3,71 (perceptível). Esse aumento de diferença total de cor em relação ao

padrão aumentou durante a estocagem provavelmente devido a não inativação da POD e inativação parcial da PPO após processamento por API. Resultados similares foram encontrados por Tribst et al. (2016) em purê de batata doce pressurizado a 600 MPa/25 °C por 5 e 30 min. Os autores reportaram maior escurecimento das amostras após 24 h quando as enzimas oxidativas não foram inativadas por API. García-Parra et al. (2014) afirmaram que purês de ameixa após processamento por API com maior atividade de PPO também apresentaram valores menores de L\*, ou seja, evidenciando um escurecimento da amostra.

**Tabela 8:** Efeito da API na cor da polpa de açaí após processamento (0 h) e após 24 h de estocagem a 5 °C.

Amostras	L*	a*	b*	ΔE
Controle (0h)	29,52±0,11 a	2,77±0,20 b	-0,42±0,16 d	X
600 MPa/5min/25°C (0h)	29,17±0,10 ab	2,51±0,11 b	0,09±0,17 c	0,66
600 MPa/5min/65°C (0h)	29,25±0,15 ab	2,79±0,09 b	0,44±0,01 c	0,90
Controle (24h)	28,71±0,45 bc	4,66±0,19 a	3,62±0,21 a	3,33
600 MPa/5min/25°C (24h)	28,32±0,66 c	4,59±0,33 a	2,24±0,18 b	3,44
600 MPa/5min/65°C (24h)	28,60±0,11 c	4,78±0,20 a	2,56±0,05 b	3,71

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ).

### 5.5.3. Contagens microbiológicas em polpa de açaí armazenada sob refrigeração

A partir das melhores condições de processamento encontradas nesse estudo (600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/65 °C), foram realizadas durante a estocagem análises microbiológicas de coliformes (35 °C e 45 °C) e *Salmonella* sp., conforme regulamentado pela RDC n° 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Além de contagem de bolores e leveduras, micro-organismos mesófilos aeróbios, psicotróficos e bactérias lácticas.

Na **Tabela 9** são apresentados os resultados das contagens microbiológicas de polpa de açaí armazenada sob refrigeração. Pode-se observar que para os micro-organismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicotróficos, e bactérias lácticas, a amostra controle (não processada) apresentou elevada quantidade dos micro-organismos avaliados (acima de  $4,74 \pm 0,27$  log UFC/mL), porém, a legislação brasileira não define limites específicos para esses micro-organismos em polpas de frutas. A quantificação é realizada apenas para se verificar falhas no processamento e/ou nas boas práticas de fabricação. Para esse mesmo grupo de três micro-organismos citados, verificou-

se que após o processamento por API (600 MPa/5 min/65 °C), as contagens permaneceram em valores abaixo de 2 log UFC/mL durante 28 dias de estocagem a 5 °C. Em purê de nectarina foi relatada redução total de psicotróficos, mesófilos aeróbios, bolores e leveduras após processamento 450 MPa/10 °C/10 min e 600 MPa/10 °C/5 e 10 min (GARCÍA-PARRA et al., 2011).

A Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001), que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, estabelece como tolerância para coliformes termotolerantes em polpas de frutas congeladas, submetidas ou não a tratamento térmico, o valor de  $10^2/g$ . O parâmetro para coliformes totais não é empregado, porém, este ensaio foi realizado por ser indicativo da qualidade higiênico-sanitária do produto, refletindo as condições da matéria-prima. Segundo os dados encontrados, nenhuma das amostras de polpa de açaí analisadas excedeu ao máximo permitido, sendo que o NMP/mL variou de <3 a 9,2 para coliformes totais (controle no dia 0) e para coliformes termotolerantes foi ausência para 100% das amostras. Portanto, todos os processos e a amostra controle analisados estavam de acordo com a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 – ANVISA (BRASIL, 2001).

Em nenhuma das amostras de polpa foi detectada a presença de *Salmonella* sp, portanto, para este parâmetro, as amostras analisadas estavam de acordo com os padrões legais vigentes.

A Instrução Normativa nº 01 de 07 de janeiro de 2000, do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2000), regulamenta os padrões de identidade e qualidade para polpa de açaí. Para bolores e leveduras, o produto não pode ultrapassar o máximo de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g (3,69 log UFC/mL ou g) de polpa *in natura*, seja congelada ou não, e o limite de  $2,0 \times 10^3$  UFC/g (3,30 log UFC/mL ou g) para polpa conservada quimicamente e/ou que sofreu tratamento térmico. Segundo esse parâmetro todas as amostras processadas e o controle inicialmente estavam dentro do limite. A partir da segunda semana de estocagem refrigerada a amostra controle estava imprópria para o consumo com valores de  $5,74 \pm 1,05$  log UFC/mL. Para as amostras processadas por API e a pasteurizada (85 °C/1 min), os valores permaneceram abaixo do limite exigido pela legislação durante os 28 dias de estocagem.

Na contagem de bactérias lácticas, o controle apresentou uma contagem inicial elevada ( $4,74 \pm 0,27$  log UFC/mL) sugerindo que a matéria prima poderia estar em

processo de fermentação, sendo que esse processo acentuou a partir da primeira semana de estocagem. Isso foi evidenciado pelo aroma frutado e de produto fermentado que exalava das placas de contagem durante as análises.

**Tabela 9** - Contagens microbiológicas em polpa de açaí armazenada sob refrigeração a 5 °C

Amostra	Dias de estocagem	Aeróbios psicotróficos (Log UFC/mL)	Aeróbios mesófilos (Log UFC/mL)	Bolores e leveduras (Log UFC/mL)	Bactérias lácticas (Log UFC/mL)	Salmonella sp em 25 g
Controle	0	5,21±0,36a	4,98±0,40b	3,15±0,21b	4,74±0,27c	Ausência
	7	2,83±0,49b	3,00±0,00c	2,70±0,00b	5,27±0,50c	-
	14	**5,17±0,34a	4,56±0,16b	5,74±1,05a	**6,63±0,02b	-
	21	5,68±0,06a	5,55±0,39ab	6,65±0,08a	**7,35±0,16b	-
	28	6,30±0,79a	6,25±0,23a	7,25±0,30a	8,51±0,08a	Ausência
85°C/1 min	0	<1,00±0,00*c	2,66±0,06b	<1,00±0,00*b	3,19±0,98a	Ausência
	7	<1,00±0,00*c	2,36±0,18b	<1,00±0,00*b	2,39±0,24a	-
	14	2,00±0,43b	2,33±0,29b	<1,00±0,00*b	2,34±0,34a	-
	21	3,13±0,25a	3,34±0,10a	1,15±0,21a	3,49±0,23a	-
	28	<1,00±0,00*c	2,55±0,04b	<1,00±0,00*b	2,53±0,02a	Ausência
600 MPa/ 5 min/25 °C	0	<1,00±0,00*b	2,82±0,08b	<1,00±0,00*b	2,84±0,01b	Ausência
	7	<1,00±0,00b	2,72±0,18b	<1,00±0,00*b	2,77±0,00b	-
	14	1,15±1,63ab	2,71±0,02b	<1,00±0,00*b	2,82±0,09b	-
	21	3,77±0,21a	4,18±0,13a	1,76±0,08a	4,14±0,06a	-
	28	2,24±0,09ab	2,77±0,02b	<1,00±0,00*b	2,69±0,41b	Ausência
600 MPa/ 5 min/65 °C	0	<1,00±0,00*a	1,00±0,00*a	<1,00±0,00*a	1,44±0,37a	Ausência
	7	<1,00±0,00*a	1,25±0,32a	<1,00±0,00*a	1,85±0,21a	-
	14	<1,00±0,00*a	1,35±0,07a	<1,00±0,00*a	0,95±0,07a	-
	21	1,80±1,56a	1,70±0,99a	<1,00±0,00*a	1,81±1,14a	-
	28	1,85±1,10a	1,15±0,21a	<1,00±0,00*a	1,35±0,49a	Ausência

Valores de expressos como média ± desvio padrão durante estocagem por 28 dias a 5 °C.

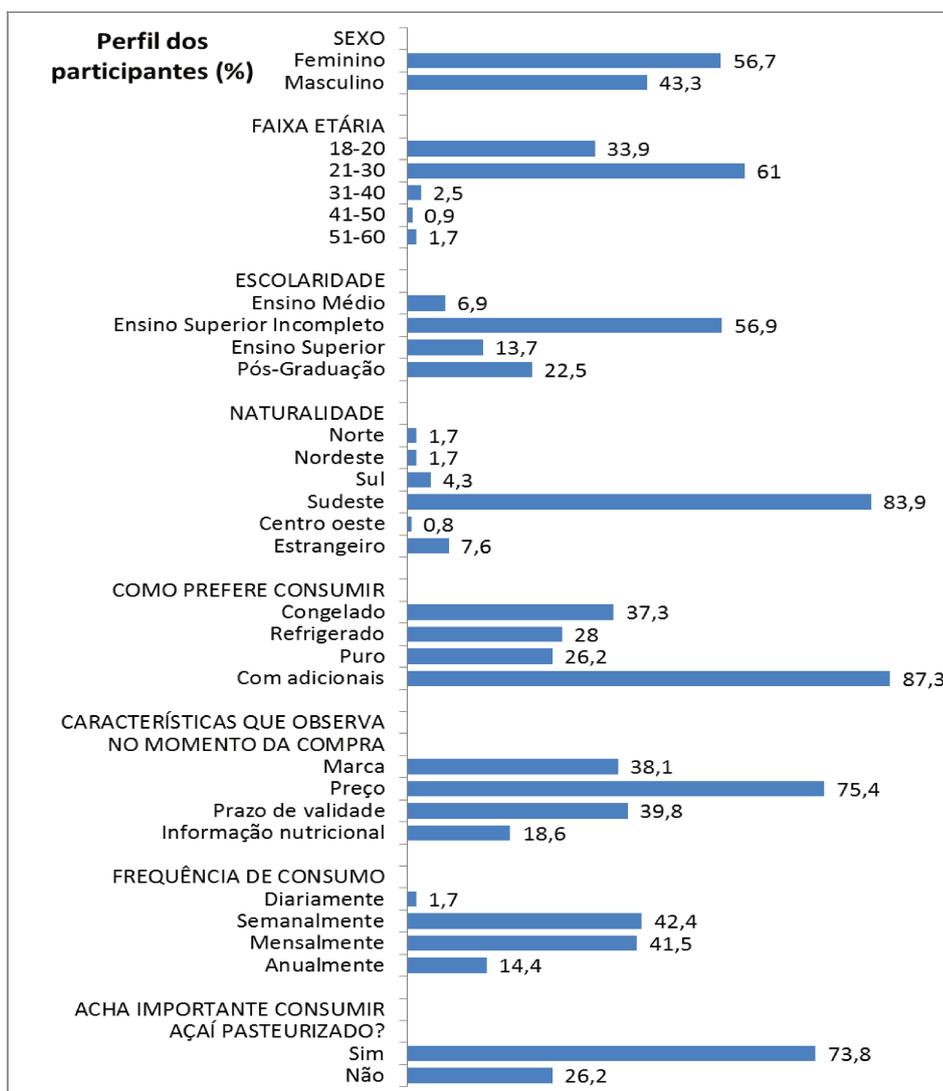
a,b,c,d,e. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente, considerando diferentes dias de armazenamento para o mesmo processo ( $p>0,05$ ).

\* Valores abaixo do limite de detecção do método (<1,0 Log UFC/mL). \*\* placas com colônias de fungo, odor frutado e fermentado

## 5.6. Análise sensorial

O perfil dos participantes da pesquisa foi apresentado na **Figura 10**. Entre os participantes, 56,7% eram do sexo feminino, 61% estavam na faixa etária entre 21 e 30 anos e 56,9% apresentavam ensino superior incompleto. A grande maioria dos participantes (83,9%) era da região sudeste e costuma consumir açaí juntamente com outros alimentos, tais como xarope de guaraná, cereais e frutas (87,3%). Quanto a

informação sobre a importância do consumo de açaí pasteurizado, 73% dos participantes disseram saber da importância desse processo e o critério mais importante no momento da compra seria o preço (75,4%) da polpa.



**Figura 10:** Perfil dos participantes da pesquisa de análise sensorial de polpa de açaí processada por API

### 5.6.1. Teste de aceitação

Os resultados do teste de aceitação sensorial (**Tabela 10**), realizado com 118 consumidores de polpa de açaí, demonstraram que a amostra processada por API a temperatura ambiente (25 °C) e no menor tempo de processo (600 MPa/5 min/25 °C), apresentou uma maior nota de aceitação (5,03) em relação a amostra que sofreu processo térmico (85 °C/1 min), mas sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle e aos outros processos de API. Essa maior aceitação está provavelmente relacionada com a textura e a aparência, pois as notas desses dois atributos foram as

maiores para essa amostra. No questionário recebido pelos consumidores essa amostra também foi a mais citada em relação aos atributos de textura, sendo atribuída a ela uma característica mais consistente.

A amostra que obteve pior aceitação, nota 3,18 para impressão global, foi a amostra processada por tratamento térmico (85 °C/1 min). A baixa aceitação dessa amostra provavelmente foi causada pelo atributo de sabor, pois a mesma apresentou uma média muito baixa para esse atributo (2,48). No teste de *free listing* os consumidores atribuíram para essa amostra algumas características como: sabor amargo, sabor de terra, sabor adstringente e separação de gordura. Na aparência, era possível observar a separação da fase lipídica da polpa, provavelmente devido ao tratamento com alta temperatura (85 °C). Sousa et al. (2006) avaliaram a pasteurização de açaí e observaram que o processamento a 100 °C/5 min alterou negativamente o sabor e o aroma da polpa, além de desestabilizar a emulsão lipídica.

Em relação aos atributos avaliados de impressão global, aparência e aroma, as amostras processadas por API não diferiram ( $p>0,05$ ) do controle e um aumento no tempo de processo de 5 para 15 min não influenciou ( $p>0,05$ ) a percepção do consumidor tanto nos processos a 25 °C como a 65 °C.

**Tabela 10** – Resultado do teste de aceitação sensorial

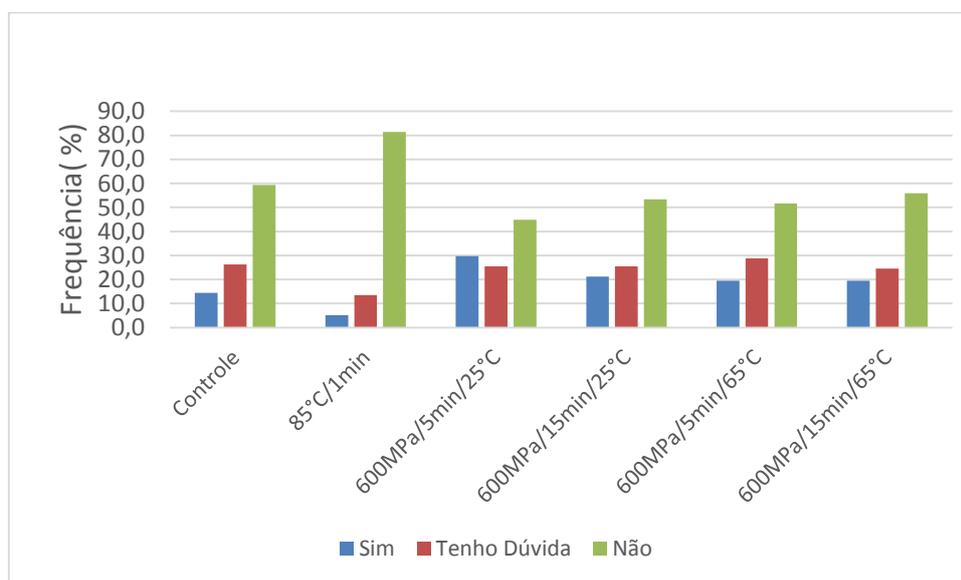
Amostras	Impressão Global	Aparência	Aroma	Sabor	Textura
Controle	4,32 <sup>a</sup>	5,43 <sup>a</sup>	5,54 <sup>a</sup>	3,66 <sup>b</sup>	4,33 <sup>b</sup>
85°C/1min	3,18 <sup>b</sup>	4,68 <sup>b</sup>	4,80 <sup>b</sup>	2,48 <sup>c</sup>	3,92 <sup>b</sup>
600 MPa/5 min/25 °C	5,03 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>	5,99 <sup>a</sup>	4,56 <sup>a</sup>	5,23 <sup>a</sup>
600 MPa/15 min/25 °C	4,67 <sup>a</sup>	5,51 <sup>a</sup>	5,80 <sup>a</sup>	4,16 <sup>ab</sup>	4,60 <sup>ab</sup>
600 MPa/5 min/65 °C	4,55 <sup>a</sup>	5,53 <sup>a</sup>	6,16 <sup>a</sup>	4,34 <sup>ab</sup>	4,39 <sup>b</sup>
600 MPa/15 min/65 °C	4,60 <sup>a</sup>	5,84 <sup>a</sup>	6,08 <sup>a</sup>	4,31 <sup>ab</sup>	4,63 <sup>ab</sup>

a,b,c,d,e. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $p>0,05$ ).

Para os resultados obtidos no teste de intenção de compra (**Figura 11**), 81,4% dos consumidores disseram “Não” (“certamente não comprariam” ou “provavelmente não comprariam”) a amostra processada por tratamento térmico, enquanto para a amostra processada por API (600 MPa/5 min/25 °C), 29,7% dos consumidores disseram “Sim” (que “certamente comprariam” ou “provavelmente comprariam”). Vinte

e cinco por cento (25%) dos consumidores ficaram em dúvida se comprariam a amostra mais aceita, pois alegaram características como: falta de açúcar e sabor amargo, já que as amostras foram servidas *in natura*. Isso evidencia que o consumidor do sul/sudeste (88,2%), que correspondem a maioria dos consumidores que participaram da pesquisa, preferem consumir polpa de açaí juntamente com outros acompanhamentos como frutas e xarope de guaraná, ou seja, um açaí mais doce.

Dependendo da região brasileira (Rio de Janeiro e São Paulo), o produto à base de açaí é preparado adicionando açúcar e extrato de guaraná (*Paullinia cupana var. sorbilis*) (KLEIN et al., 2012). Entretanto, a concentração de extrato de guaraná também influencia a doçura final. Em nosso estudo não foram adicionados açúcar e xarope de guaraná, pois poderiam influenciar na percepção de sabor. Em estudo realizado por Montenegro; Pereira; Melo (2013), em açaí adicionado de xarope de guarana, os autores relataram que muitos provadores sentiram um forte amargor nas amostras do açaí. Esse amargor foi explicado pela presença de cafeína, presente em guaraná, que possui um sabor amargo e característico.



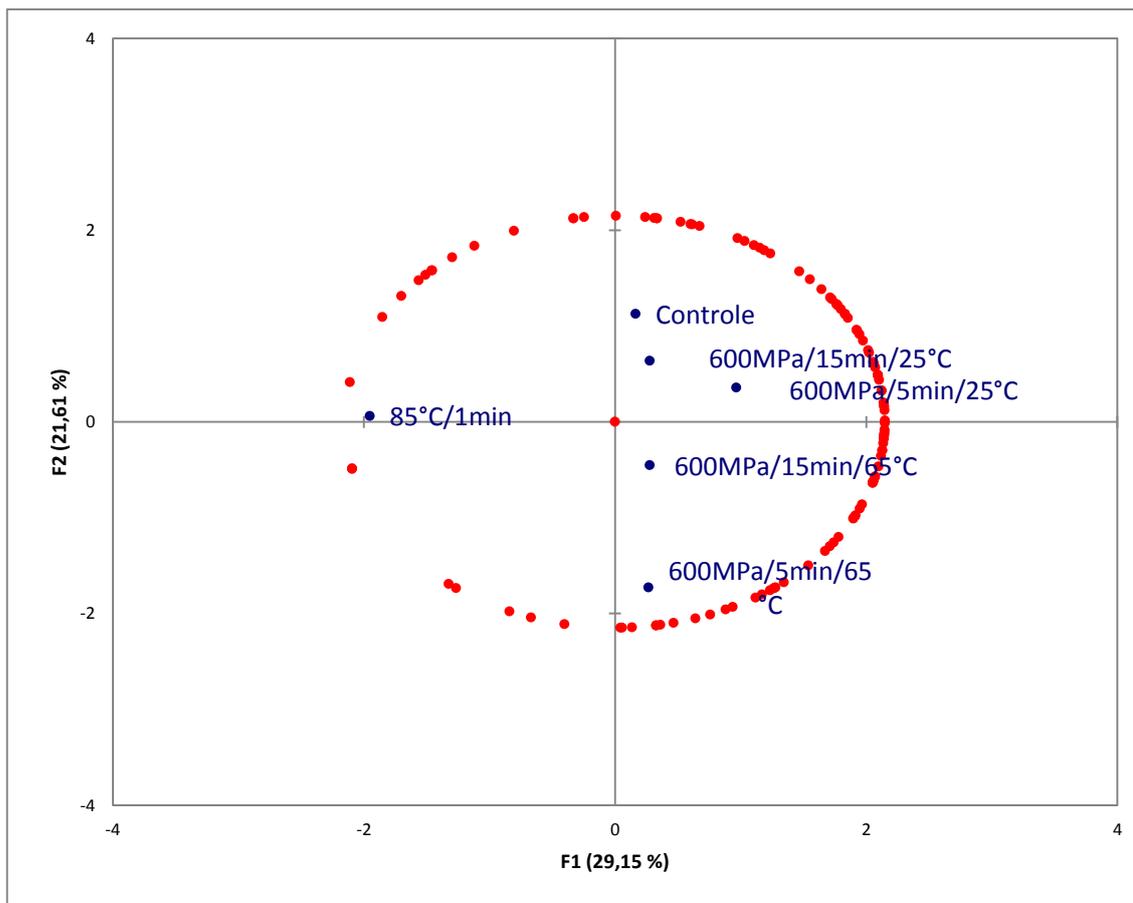
**Figura 11:** Intenção de compra das amostras de polpa de açaí

Em um trabalho realizado por Alexandre et al. (2004), os autores verificaram que a amostra de açaí pasteurizada termicamente e sem adição de sacarose foi a menos aceita pela maioria dos consumidores em relação a amostra com 40% e 25% de sacarose, apresentando notas inferiores a 4,5 nos atributos de aroma, sabor e impressão global.

Para o atributo aroma todas as amostras processadas por API apresentaram notas superiores ao tratamento térmico (**Tabela 10**). Em relação ao sabor, o processo a 600 MPa/5 min/25 °C apresentou nota 4,56 que foi superior ao controle e ao tratamento térmico. Os resultados aqui encontrados estão de acordo com os resultados encontrados por Liu et al. (2016) em suco de pepino. Os autores avaliaram amostras processadas por API (500 MPa/5 min/20 °C) e compararam com tratamento térmico (110 °C/8,6 s). O suco tratado por API mostrou pontuações mais altas para aceitabilidade geral do que o suco tratado termicamente. Com base nos resultados encontrados podemos concluir que a API pode ser usada como alternativa para produzir polpa de açaí com boa aceitação sensorial.

Aliada à análise de variância e testes de médias, o mapa de preferência interno pode complementar a análise de aceitação de um produto, permitindo conhecer a preferência individual dos consumidores ou grupo de consumidores em relação ao conjunto total deles, algo que não é possível quando se faz uma análise através das médias de avaliação. O mapa de preferência é gerado a partir das respostas dos consumidores com relação à impressão global sobre o produto (CADENA; BOLINI, 2011).

Observando as dimensões 1 e 2 (F1 e F2) do gráfico do mapa de preferência interno (**Figura 12**), elas explicaram 50,76% da variação em aceitação do consumidor de polpa de açaí, com 29,15% e 21,61% na primeira (F1) e na segunda (F2) dimensão, respectivamente. A maioria dos consumidores (pontos vermelhos) está localizada no lado direito do mapa fornecendo evidencia que o controle e todos tratamentos por API foram preferidos pela maioria dos consumidores pois esses estão alocados na proximidade da maioria desses pontos. A amostra controle e as 600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/15 min/25 °C são as mais próximas entre si e estão localizadas positivamente nas duas dimensões do gráfico. No lado oposto está a amostra processada termicamente (85 °C/1 min) que está localizada negativamente na dimensão 1(F1) do gráfico e distante das outras amostras e dos consumidores evidenciando ser a amostra menos aceita.

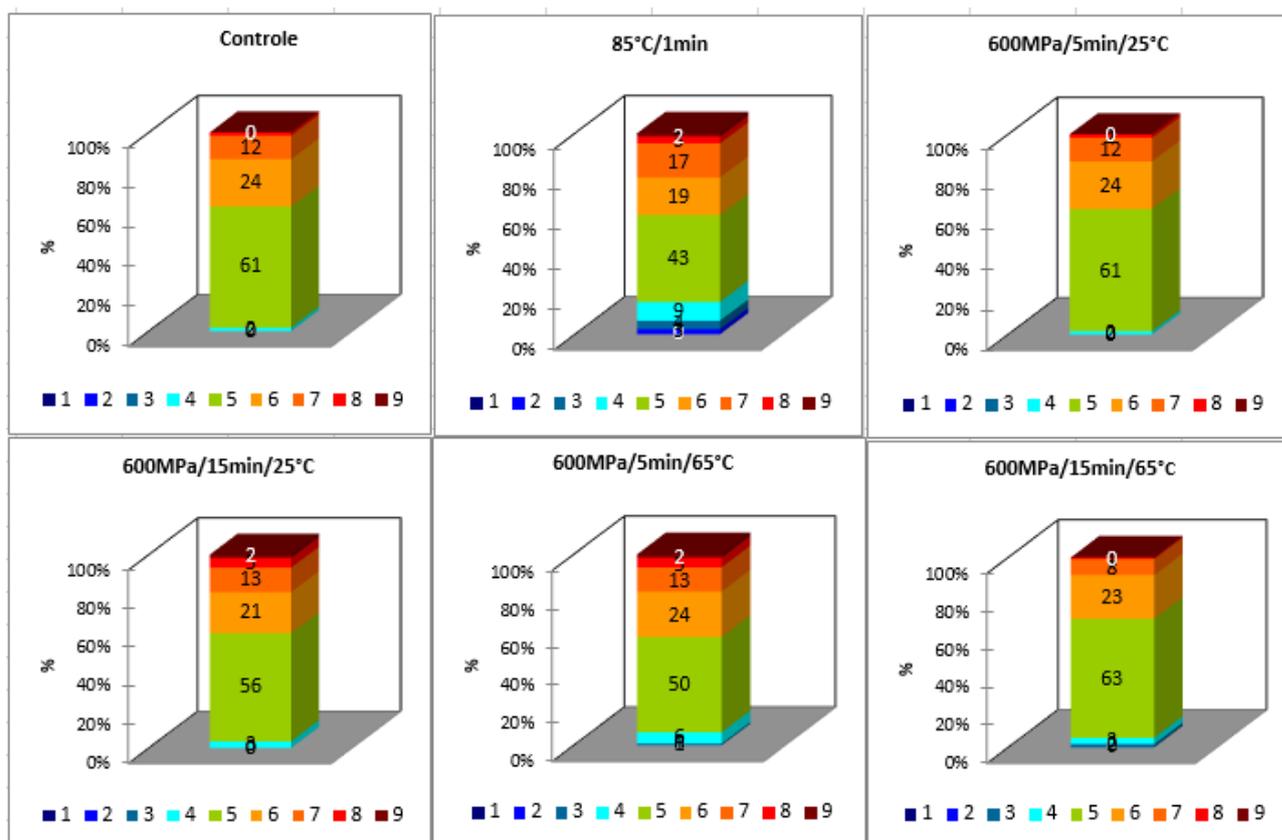


**Figura 12:** Mapa de preferência interno das amostras de polpa de açaí

Na mesma ficha do teste da aceitação, foi avaliado o ideal de cor das amostras de açaí, utilizando-se uma escala do ideal de nove pontos (DRAKE, 2007). A escala JAR (*Just About Right*) utilizada foi a seguinte: 1 (extremamente menos escuro que o ideal), 2 (muito menos escuro que o ideal), 3 (moderadamente menos escuro que o ideal), 4 (ligeiramente menos escuro que o ideal), 5 (ideal), 6 (ligeiramente mais escuro que o ideal), 7 (moderadamente mais escuro que o ideal), 8 (muito mais escuro que o ideal) e 9 (extremamente mais escuro que o ideal).

A **Figura 13** apresenta os dados de ideal de cor das amostras processadas. Como pode ser observado na mesma, em relação a cor, o controle foi avaliado como ideal para pelo menos 61% dos consumidores. Para a amostra pasteurizada (85 °C/1 min), 43% avaliaram como ideal, porém, 41% disseram que a cor dessa amostra estava entre “ligeiramente mais escura que o ideal” ou “extremamente mais escura que o ideal”. Para as amostras processadas por API a cor estava ideal para 61%, 56%, 50% e 63% para os processos a 600 MPa/5 min/25 °C, 600 MPa/15 min/25 °C, 600 MPa/5 min/65 °C e 600 MPa/15 min/65 °C, respectivamente. A partir dos resultados

podemos concluir que o processo de API não afetou negativamente a cor da polpa de açaí para mais da metade dos consumidores consultados, sendo esse um atributo extremamente relevante para aceitação desse produto. Até o momento não haviam sido registrados trabalhos com API em polpa de açaí avaliando sensorialmente a cor do produto final.



**Figura 13:** Ideal de cor das amostras de polpa de açaí.

\*Escala do ideal: 9 – extremamente mais escura que o ideal; 8 – muito mais escura que o ideal; 7 – moderadamente mais escura que o ideal; 6 – ligeiramente mais escura que o ideal; 5 – ideal; 4 – ligeiramente menos escura que o ideal; 3 – moderadamente menos escura que o ideal; 2 – muito menos escura que o ideal; 1 – extremamente menos escura que o ideal

### 5.6.2. Free listing

Segundo Rusell Bernard (2005), o *free listing* é uma metodologia qualitativa simples muito utilizada em antropologia e consiste em pedir para os participantes listarem tudo o que eles sabem sobre qualquer idéia, por exemplo, sobre frutas, marcas ou animais. A metodologia foi apresentada para o consumidor de alimentos por Hough; Ferraris (2008) para se obter uma visão da percepção do consumidor em relação às frutas. Atualmente, está sendo utilizada cada vez mais na ciência para

investigar a percepção dos consumidores em relação aos alimentos (ARES; GIMÉNEZ; GAMBARO, 2008; GUERRERO et al, 2010). Segundo vários autores, os itens com o maior número de menções e os primeiramente lembrados são os mais relevantes para os consumidores (ANTMANN et al, 2011).

O teste de *free listing* da polpa de açaí gerou uma lista com um comprimento médio de 18 itens, variando de 62 a 1 citação. A implementação do *free listing* permitiu obter um vocabulário representativo para os quatro atributos sensoriais: aparência, aroma, sabor e textura. Um total de 10 descritores foram desenvolvidos, 4 dos quais foram relacionados ao sabor do atributo (amargo, terra, adstringente, sem açúcar) seguido de textura (3 descritores – arenosa, fluida e consistente), aparência (2 descritores – separação de gordura e cor escura) e aroma (1 descritor, doce). Os resultados enfatizaram a importância do atributo sabor na percepção dos consumidores, evidenciando a necessidade de otimização desse atributo durante o desenvolvimento de produtos com polpa de açaí.

Durante a aplicação do *free listing*, a relevância de um termo é um domínio cognitivo definido por dois fatores: a frequência de menções e a ordem do descritor sensorial na lista fornecida pelos consumidores. Quando analisados simultaneamente, esses dados fornecem uma análise mais relevante sobre a importância de cada termo na opinião do consumidor. Sobre isso, os atributos mais importantes listados são aqueles citados por um número maior de consumidores que se classificam nas principais posições da lista (LIBERTINO et al., 2012). No entanto, o uso desses dois fatores por si só fornece informações diferentes (GINON et al., 2014; ARES et al., 2014). Portanto, é necessário um parâmetro quantitativo para expressar esses dois fatores. Assim, o uso de coeficientes de saliência como o Índice de Saliência Smith usado neste estudo se faz necessário (LIBERTINO et al., 2012).

A **Tabela 11** mostra os valores do Índice de Saliência de Smith (ISS) dos vários descritores sensoriais de cada amostra e a frequência de menções (NC) e a posição média (OM) desses atributos na *free listing*. Os valores de ISS apresentaram alta variação em relação a todos os descritores que caracterizam o conjunto de amostras. A amostra controle exibiu os valores mais elevados de SSI para sabor amargo (0,317) e textura fluida (0,323), enquanto que a amostra tratada termicamente (85 °C/1 min) apresentou os valores mais altos para sabor amargo (0,375) e para o descritor separação de gordura, embora não tenha um ISS elevado (0,089). Entre as amostras

processadas por API, 600 MPa/5 min/25 °C apresentou o ISS mais elevado para o termo descritor textura consistente (0,340) e foi citada por 49 consumidores.

Em relação ao número de citações e à posição média do descritor na lista, o descritor de sabor amargo geralmente apresentou valores elevados, independentemente da amostra, com valores de 62, 51, 50 e 1,64, 1,63 e 1,53, respectivamente. Nesse contexto, esse descritor pode ser mais relevante para essa categoria de produto, porque ele é mais frequentemente listado (HOUGH; FERRARIS, 2010) e, portanto, deve ser considerado no desenvolvimento de produtos com polpa de açaí.

Curiosamente, no teste de escala do ideal para cor, todas as amostras, exceto a pasteurizada, apresentaram esse atributo como ideal para mais de 50% dos consumidores. Já no *free listing* o descritor cor escura foi mencionado. Embora seja um atributo relevante no conjunto de amostras em estudo, ele apresentou valores de índice saliência intermédios, variando de 0,055 (600 MPa/15 min/65 °C) a 0,129 (85 °C/1 min), o que pode ser relacionado a uma percepção semelhante desse descritor em todas as amostras, embora a amostra pasteurizada e a 600 MPa/5 min/25 °C tenham 23 e 25 citações, respectivamente.

**Tabela 11:** Índices calculados para os 10 termos descritores e número total de entrevistados (n = 118).

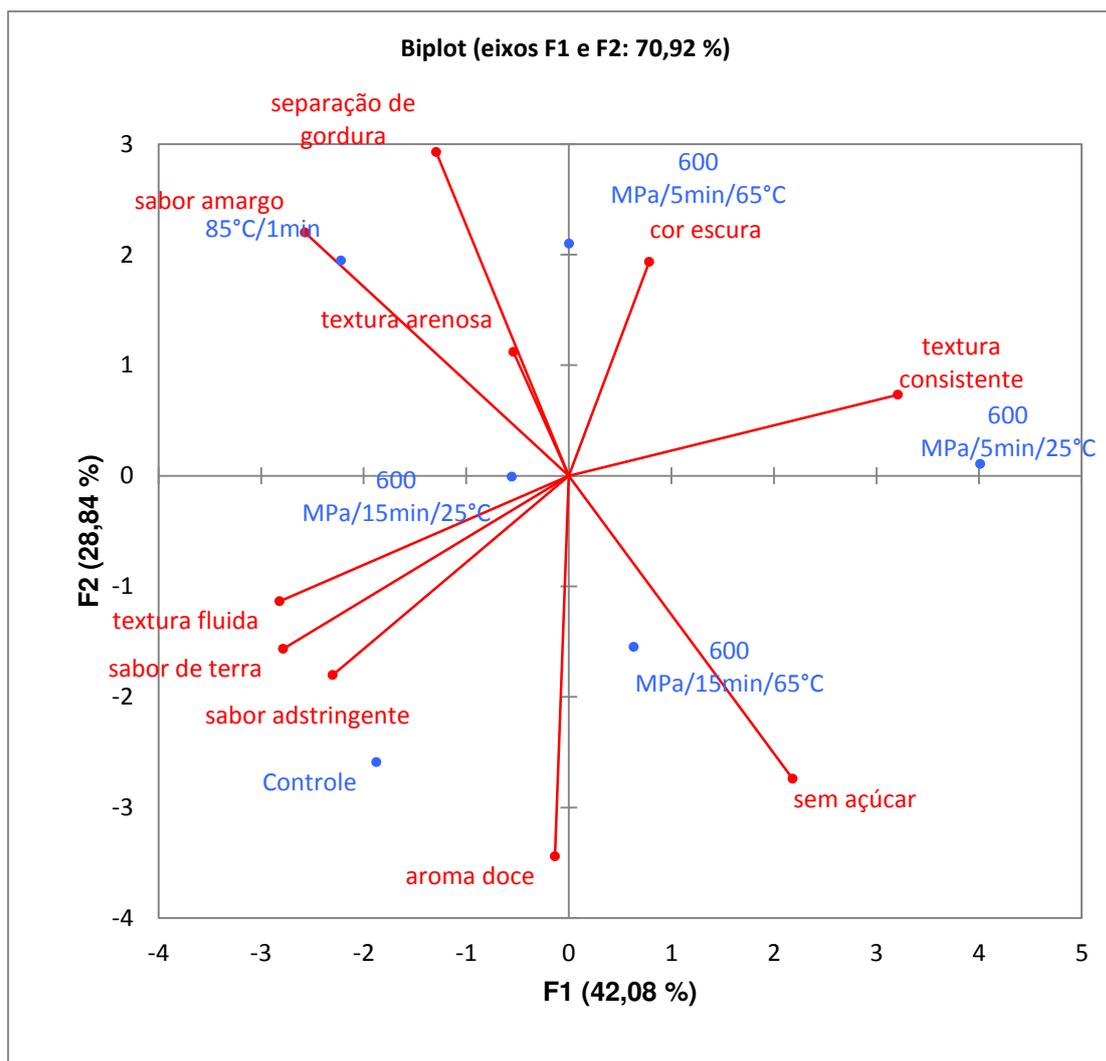
	Controle			85 °C/1 min			600 MPa/ 5 min/25 °C			600 MPa/ 15 min/25 °C			600 MPa/ 5 min/65 °C			600 MPa/ 15 min/65 °C		
	ISS	NC	OM	ISS	NC	OM	ISS	NC	OM	ISS	NC	OM	ISS	NC	OM	CS	NC	OM
<b>Aparência</b>																		
Separação de gordura	0,018	3	2,00	0,089	13	1,54	0,023	4	1,75	0,012	2	2,00	0,053	8	1,75	0,025	4	1,50
Cor escura	0,101	18	1,94	0,129	23	1,87	0,149	25	1,84	0,127	18	1,39	0,109	20	1,90	0,055	11	1,91
<b>Aroma</b>																		
Doce	0,052	8	1,38	0,021	4	2,25	0,035	8	2,13	0,044	7	1,71	0,026	4	1,75	0,036	5	1,60
<b>Sabor</b>																		
Amargo	0,317	50	1,64	0,375	62	1,40	0,263	43	1,63	0,343	51	1,53	0,339	49	1,51	0,268	42	1,50
Terra	0,040	5	1,20	0,035	5	1,40	0,008	1	1,00	0,021	3	1,33	0,018	3	1,67	0,030	4	1,25
Adstringente	0,102	13	1,15	0,088	13	1,54	0,030	5	1,80	0,044	9	1,67	0,021	3	1,33	0,058	9	1,33
Sem açúcar	0,083	13	1,62	0,049	9	1,89	0,105	16	1,69	0,061	12	1,92	0,047	9	2,0	0,095	13	1,38
<b>Textura</b>																		
Arenosa	0,105	18	1,78	0,106	18	1,78	0,094	13	1,77	0,167	25	1,76	0,169	27	1,67	0,136	23	1,70
Fluida	0,323	48	1,56	0,244	37	1,54	0,131	23	1,17	0,297	43	1,47	0,244	36	1,58	0,219	29	1,38
Consistente	0,056	9	1,67	0,084	13	1,69	0,340	49	1,45	0,116	19	1,74	0,177	23	1,22	0,162	27	1,70

ISS: índice de saliência de Smith's; NC: número de citações; OM: ordem média

A **Figura 14** mostra a Análise de Componentes Principais (ACP) dos dados de *free listing*, usando os valores do índice de saliência (ISS). Usando duas dimensões (F1 e F2) foi relatado 70,92% da variância dos dados experimentais, sendo 42,08% e 28,84% na primeira (F1) e segunda dimensão (F2), respectivamente. A amostra controle foi associada aos descritores sensoriais de sabor adstringente, sabor de terra, textura fluida e aroma doce. A amostra pasteurizada (85 °C/1 min) foi relacionada aos descritores sabor amargo, separação de gordura e textura arenosa. Para as amostras processadas por API a 600 MPa/5 min/25 °C e 600 MPa/5 min/65 °C foram associados aos descritores cor escura e textura consistente. O descritor sem açúcar foi associado a amostra processada a 600 MPa/15 min/65°C.

Correlacionado a análise do mapa bidimensional e o teste de aceitação, podemos observar que a baixa aceitação da amostra pasteurizada no atributo sabor (nota 2,48) sugere que o sabor amargo (dados de *free listing*) dessa amostra realmente foi o atributo que mais influenciou negativamente na aceitação. Para a amostra 600 MPa/5 min/25 °C que obteve maior nota em textura (5,23), podemos afirmar que a textura consistente (dados de *free listing*) foi o atributo que influenciou positivamente na aceitação. *Free listing* tem sido cada vez mais utilizada em vários estudos sobre ciência do consumidor, sendo relatado na literatura estudos para se verificar a relevância das características de pacote de sobremesas de leite (ARES; DELIZA, 2010), bem como para entender melhor os processos de tomada de decisão do consumidor ao comprar vinho (GINON; ARES; ISSANCHOU; LABOISSIÈRE; DELIZA, 2014). Em um estudo realizado por Santos et al. (2015), os autores também utilizaram a metodologia de *free listing* para descrever as características sensoriais de salsichas fermentadas com baixo teor de sódio.

Os resultados apresentados pelo teste *free listing* são consistentes sob os aspectos envolvidos na tecnologia de processamento de polpa de açaí por API e tratamento térmico, uma vez que refletem a percepção dos consumidores.



**Figura 14:** Representação das amostras e dos atributos na primeira e segunda dimensões da análise de componentes principais (ACP) realizada nos dados de *free listing*.

\*F1(dimensão 1) e F2 (dimensão 2).

## 5.7. Análise de compostos bioativos

Em relação a extração de compostos bioativos, os solventes orgânicos como o etanol, metanol, acetato de etila e as suas misturas com água têm sido amplamente utilizados, sendo que o etanol e a água são os solventes por excelência, muito devido à sua baixa toxicidade e elevados rendimentos (FRANCO et al., 2008). A principal desvantagem das extrações convencionais com solventes é o seu baixo rendimento em antioxidantes com baixa polaridade ou lipossolúveis (carotenóides) (FRANCO et al., 2008). A solubilidade dos polifenóis vai depender principalmente dos seus grupos hidroxila, do tamanho molecular e do comprimento do hidrocarboneto (FRANCO et al., 2008). Vários métodos de extração foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar

o rendimento de extração dos compostos com baixa polaridade e lipossolúveis, como as extrações assistidas por ultra-som, extrações com fluidos supercríticos, extração por micro-ondas, e também por alta pressão (POEJO, 2011).

No presente estudo, os extratos utilizados para quantificação de compostos funcionais foram elaborados utilizando água como solvente. Deste modo, os resultados aqui encontrados podem não apresentar altos teores de compostos como antocianinas e fenólicos totais como reportados na literatura, uma vez que o objetivo principal foi comparar os resultados entre a amostra controle (sem processamento), a pasteurizada termicamente e as processadas por API.

### 5.7.1. Antocianinas

Na **Figura 15** são apresentados os teores de antocianinas monoméricas. Na amostra controle foram encontrados  $25,74 \pm 0,78$  mg C3G/100 g de polpa. Esses dados estão de acordo com dados encontrados por Constant (2003), que analisou o teor total de antocianinas no fruto e na polpa de açaí e constatou valores de 127,86 mg/100 g de fruto e 27,0 mg/100 g de polpa com predomínio de cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo.

Rogez (2000) mostrou que os teores de antocianinas variaram de 34 a 702 mg por 100 g de açaí médio. Rufino et al. (2010) encontraram teor de antocianinas de 111,0 mg/100 g de peso fresco (expresso como cianidina 3-glicosídeo ou malvidina-3-glicosídeo), porém, os autores utilizaram metanol/água/acetona como solventes de extração. Segundo Constant (2003), na literatura científica, as quantidades de antocianinas em açaí são bastante divergentes, principalmente dada a terminologia empregada referenciando o açaí como o fruto propriamente dito, e não a bebida, e vice-versa. Além disso, a metodologia adotada para a extração e quantificação também contribui para essa diferença, e ainda a ampla variabilidade da matéria-prima, especialmente, quanto à sazonalidade e à região produtora.

Os dados apresentados na **Figura 15** demonstram que para antocianinas monoméricas, em comparação a amostra controle, ambos os processos a 600 MPa tanto a 25 °C como a 65 °C, aumentaram ( $p < 0,05$ ) em 37,6% e 36,5%, respectivamente, a quantidade extraída desse pigmento na polpa processada.

Embora o processamento da polpa de açaí por API não tenha inativado totalmente as enzimas oxidativas (PPO e POD) de compostos fenólicos, entre eles as antocianinas, pode-se observar que houve um aumento na capacidade de extração

das mesmas. Segundo Ferrari et al. (2010), as antocianinas de diferentes alimentos líquidos (sucos de frutas vermelhas) são estáveis ao tratamento com API a temperaturas moderadas.

Em relação ao resultado obtido a partir do tratamento térmico (85 °C/1 min), houve redução ( $p < 0,05$ ) do teor de antocianinas em 16,3%. Essa redução pode ser explicada pois a temperatura tem efeito deletério sobre as antocianinas quando submetidas ao calor, durante o processamento e/ou estocagem de alimentos. O impacto do processamento térmico em polpa de açaí foi determinado por alguns autores que realizaram processamento (90 °C/ 10 minutos ou 100 °C/ 5 minutos) com açaí pré-embalado em sacos (SOUSA et al., 2006) e com envase posterior ao processamento utilizando alta temperatura por curto *tempo* (HTST) (82,5 °C / 60 s) (ROGEZ, 2000). Nas diferentes condições avaliadas, o processamento térmico foi capaz de garantir adequada inativação microbiológica, entretanto, uma intensa redução na concentração de antocianinas e alteração sensorial, com separação de fase lipídica da polpa e mudança de cor, foi verificado no processo mais intenso (100 °C/5 minutos).

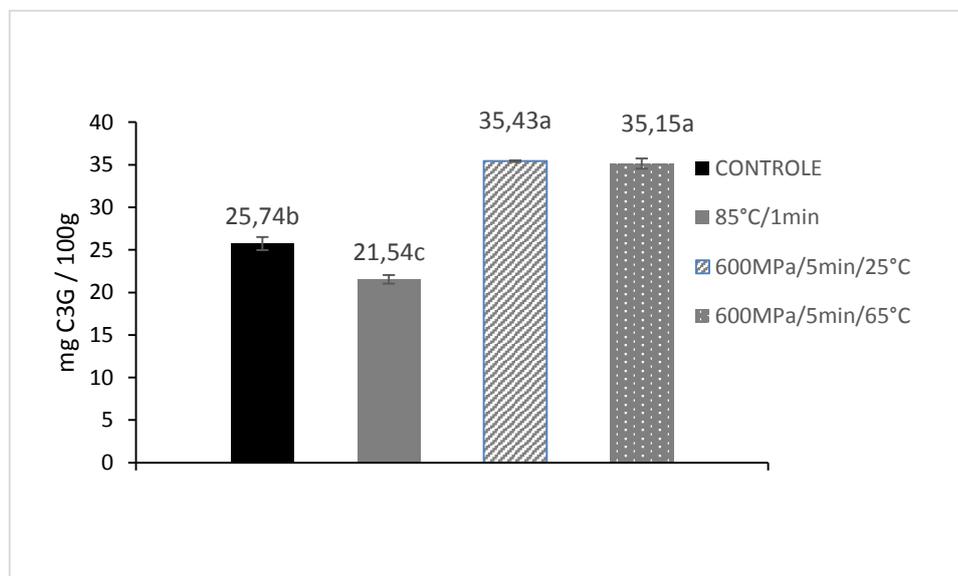
Para o teor de antocianinas após aplicação de API, os resultados encontrados neste estudo foram bem superiores aos encontrados por Barba; Esteve; Frígola (2012b) em suco de blueberry processado por API a 400 MPa/25 °C/15 min. Os autores conseguiram um aumento de apenas 16% na extração desses compostos.

Poucas são as pesquisas voltadas ao estudo do impacto da API nas propriedades funcionais dos alimentos. Em estudo realizado por Liu et al. (2016) em *Lonicera caerulea berry* (fruta nativa da Sibéria), o teor de antocianinas também aumentou 5,80 e 6,84% quando submetido a tratamento com API a 200 MPa durante 5 e 10 minutos, respectivamente. Assim, os autores justificaram que a API tornou as antocianinas mais acessíveis para extração.

Alguns estudos demonstraram que a extração de compostos bioativos por alta pressão pode proporcionar maiores rendimentos de processo, ao mesmo tempo em que são menores os efeitos na estrutura e atividade antioxidante dos mesmos. O uso de HIP aumenta as taxas de transferência de massa, aumenta a permeabilidade celular e aumenta a difusão de metabolitos secundários (DORNENBURG; KNORR, 1993; CHEFTEL, 1995; TOKUŞOĞLU; DOONA, 2011 a, b).

Em geral, o processamento por API não diminuiu os teores de antocianinas em fruta, porém, grande parte dos trabalhos relatam a elevação dos níveis de

antocianinas, atribuída a maior extração destas em alimentos processados pela referida tecnologia. A integridade da matriz, a intensidade e o tempo de pressurização e a temperatura são aspectos que devem ser observados nas pesquisas com alimentos ricos em antocianinas submetidos à API.



**Figura 15-** Efeito da API no teor de antocianinas monoméricas em polpa de açaí após 24 h do processamento a,b,c : Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

### 5.7.2. Compostos fenólicos totais.

Na **Figura 16** são apresentados os dados de compostos fenólicos totais. A quantidade de fenólicos totais encontrados na amostra controle (*in natura*) de polpa de açaí foi  $230,75 \pm 4,39$  mg GAE / 100g de polpa. Esses valores estão abaixo dos valores encontrados por Rufino et al (2010) (454,0 mg GAE / 100g), esses dados podem ser justificados pois os autores utilizaram como solvente de extração metanol/acetona/água, o que provavelmente aumentou o rendimento da extração. Conforme descrito em alguns trabalhos, diferentes extratos hidroalcoólicos, alcoólicos e orgânicos apresentam respostas diferentes em métodos distintos (GIADA, MANCINI FILHO, 2008; VIDAL et al., 2009)

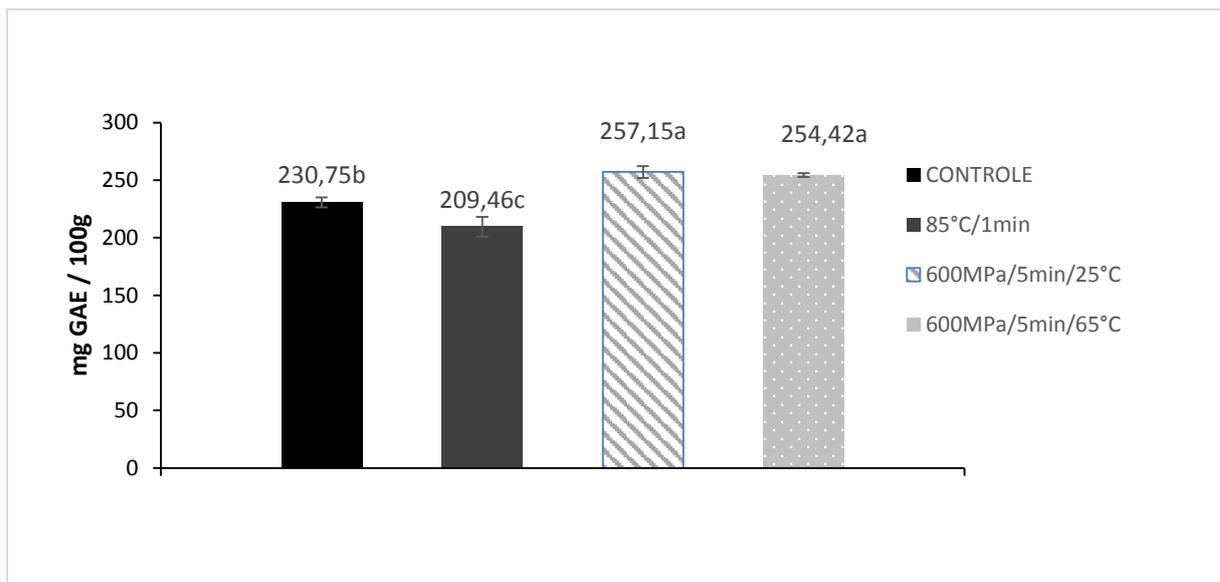
Os dados apresentados na **Figura 16** demonstram que para fenólicos totais, ambos os processos a 600 MPa tanto a 25 °C como a 65 °C, aumentaram em 11,44% e 10,25%, respectivamente, a extração de compostos fenólicos na polpa de açaí em relação a amostra controle. Fazendo uma relação com o teor de antocianinas, que são os compostos fenólicos majoritários em açaí, os resultados estão de acordo, ou

seja, para as amostras processados por API a extração de antocianinas aumentou assim como a de fenólicos totais. Para a amostra pasteurizada esses valores (antocianinas e fenólicos totais) foram menores nas duas análises.

Alguns trabalhos relataram que a API aumenta a taxa de dissolução dos compostos bioativos. Sob alta pressão, uma permeação rápida é observada devido à grande pressão diferencial entre o interior da célula e o exterior das membranas celulares (ZHANG et al., 2005). Esta situação aumenta a penetração do solvente através das membranas quebradas das células ou aumenta a taxa de transferência de massa devido ao aumento da permeabilidade (SHOUQIN et al., 2004). Isto significa que, quanto maior a pressão isostática, mais solvente pode entrar na célula. Mais compostos podem permear a membrana celular, o que poderia causar o maior rendimento de extração (SHOUQIN et al., 2004; ZHANG et al., 2005). Em outras palavras, a capacidade de extração de constituintes fenólicos pode aumentar por API e as amostras pressurizadas mantêm níveis mais elevados de compostos bioativos. Estudos sobre efeitos de preservação de alta pressão sobre compostos fenólicos totais, determinaram que esses compostos não foram afetados ou realmente aumentaram (maior extração) após o tratamento com alta pressão (ZHANG et al., 2005; CORRALES et al., 2008; PRASAD et al., 2009; TOKUŞOĞLU et al., 2010).

Diversos autores têm relatado maior concentração e estabilidade dos compostos bioativos quando as frutas são processadas por API. Barba et al. (2011), compararam os efeitos da API (100 a 400 MPa / 20 a 42 °C / 2 a 9 min) e os processos térmicos (90 °C durante 15 ou 21 s e 98 °C durante 15 ou 21s) em suco de laranja. Os autores constataram que os níveis de compostos fenólicos totais foram maiores nas amostras processadas por API, atingindo um aumento máximo de 22% (100 MPa / 7 min) e as amostras processadas termicamente aumentaram 8-17% em comparação com as amostras não processadas.

Em nosso estudo, o aumento no conteúdo de compostos fenólicos pode estar relacionado à maior extração de alguns dos componentes antioxidantes das células vegetais pelo processamento por alta pressão (CARBONELL-CAPELLA et al., 2013; BARBA et al., 2012), que promove uma descompartmentalização da matriz celular do vegetal, onde os compostos se encontram alojados (BUTZ; TAUCHER, 2002).



**Figura 16-** Efeito da API no teor de compostos fenólicos totais em polpa de açai após 24h do processamento.

a,b,c : Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $p>0,05$ ).

### 5.8. Atividade antioxidante

Numerosas são as metodologias para a determinação da capacidade antioxidante e elas podem estar sujeitas a interferências, por isso, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a capacidade antioxidante total de uma amostra (HUANG; PRIOR, 2005; PRIOR et al., 2005).

Baseado nas reações químicas envolvidas, a maior parte dos métodos usados para avaliar a capacidade antioxidante pode ser dividida em duas categorias: (1) baseados na reação de transferência de elétrons, representado pelo método FRAP, (2) baseado na reação de transferência de átomos de hidrogênio, representado pelo ORAC (Huang; Prior, 2005). Essas metodologias *in vitro* têm sido frequentemente usadas para estimar a atividade antioxidante em frutas. Como esses ensaios antioxidantes são baseados em diferentes mecanismos usando diferentes fontes radicais ou oxidantes (USDA, 2010), os resultados obtidos são expressos em diferentes unidades e, portanto, não podem ser comparados diretamente (USDA, 2010). O ORAC é um dos métodos mais comumente utilizados para medir a capacidade antioxidante de extratos alimentares, amostras biológicas e compostos puros (PRIOR et al., 2007; KANG et al., 2012, FRAGOSO et al., 2013,). É um teste

que tem como princípio a inibição da ação de agentes oxidantes como compostos do tipo azo (Dicloridrato de 2,2-azobis(2-metilpropionamidina) – AAPH) por agentes antioxidantes (DAVALOS; GOMEZ-CORDOVES; BARTOLOME, 2004).

O método do poder redutor do ferro (FRAP) é baseado na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) do extrato reduzirem em meio ácido (pH 3,6) o  $\text{Fe}^{3+}$  a formar o  $\text{Fe}^{2+}$ . O  $\text{Fe}^{2+}$  reage com o 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina TPTZ formando o complexo de intensidade azul, comparando com a força antioxidante em meio plasmático (BENZIE; STRAIN, 1996).

Como se pode observar na **Figura 17**, pelo método FRAP e ORAC, os valores de capacidade antioxidante encontrados para amostra controle foram de 31,46  $\mu\text{mol TE/g}$  e 46,71  $\mu\text{mol TE/g}$ , respectivamente. Analisando ambas as metodologias, pode-se observar que as amostras processadas por API não mostraram aumento da capacidade antioxidante nestes ensaios em relação à amostra controle.

No ensaio de ORAC, pode-se observar que a amostra processada por API a 600 MPa/5 min/65 °C apresentou um valor maior (49,72  $\mu\text{mol TE/g}$ ) que a amostra pasteurizada (43,45  $\mu\text{mol TE/g}$ ). De acordo com Ali et al. (2016) antocianinas são bons doadores de hidrogênio, sendo assim, o ensaio de ORAC é baseado em doação de átomos de hidrogênio para neutralizar espécies radicais, o que pode explicar a maior capacidade antioxidante encontrada nessa amostra. Diversos trabalhos utilizando ensaios de ORAC e FRAP relataram um aumento da capacidade antioxidante em comparação ao tratamento térmico em produtos derivados de frutas (APICHARTSRANGKON et al., 2012; TADAPANENI et al., 2012; CHEN et al., 2013; HERNÁNDEZ-CARRIÓN et al., 2014; CHEN et al., 2015).

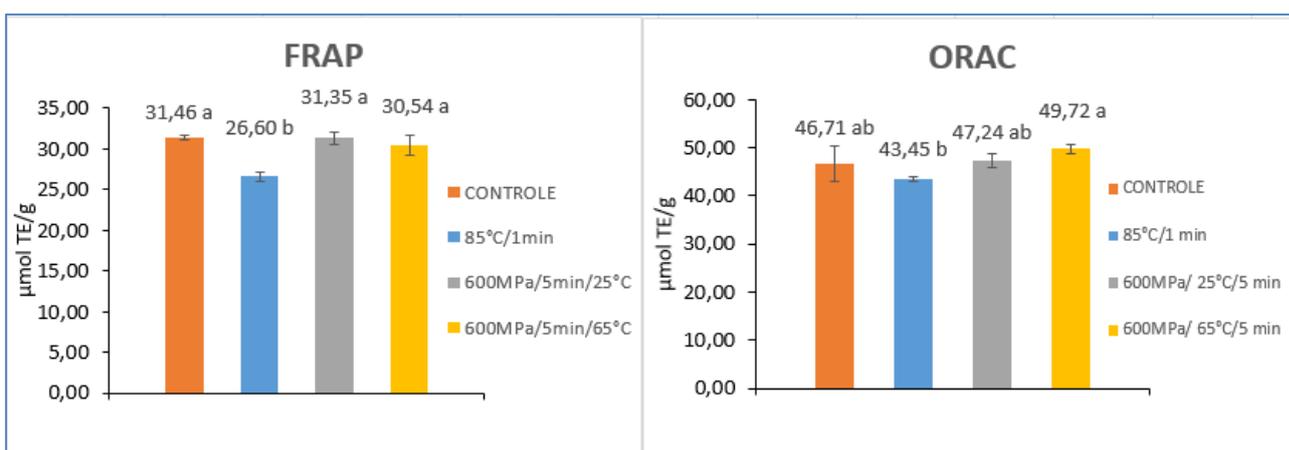
Somente pelo método FRAP a amostra termicamente pasteurizada (85°C/ 1 min) apresentou a menor capacidade antioxidante (26,60  $\mu\text{mol TE/g}$ ), quando comparada ao controle e as amostras pressurizadas, representando uma redução de 15,4%. Essa redução na capacidade antioxidante pode ser justificada pela redução no teor de antocianinas após o tratamento térmico, já que a temperatura tem efeito deletério sobre elas.

A atividade antioxidante de muitos frutos surge da ação sinérgica combinada de uma mistura de compostos, incluindo compostos fenólicos, carotenóides e vitamina C e E. No entanto, em frutas como o açaí, que contêm quantidades relativamente pequenas dessas vitaminas, ácidos fenólicos e flavonóis, as antocianinas são os principais responsáveis para a capacidade antioxidante da fruta (RUFINO et al., 2010).

O fato da capacidade antioxidante para amostras pressurizadas terem sido maiores somente quando avaliada pelo método FRAP pode ser justificado pelos diferentes princípios em que se baseiam os métodos utilizados. Há uma dificuldade de comparar estes métodos, devido à complexidade e princípios diferentes de reações (PAZ et al., 2015). Alguns métodos antioxidantes produzem resultados diferentes ou mesmo contraditórios, tornando-se algumas vezes impossível qualquer comparação entre eles (ALONSO et al., 2002). Essas diferenças podem estar relacionadas também à presença de outros compostos redutores, como açúcares e tocoferóis, que são conhecidos por interferir nos testes de capacidade antioxidante (REZAIRE et al., 2014).

Pode-se observar no presente estudo, que existe uma correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e antocianinas com a capacidade antioxidante. As amostras pressurizadas mantiveram a capacidade antioxidante (em relação ao controle) e apresentaram uma quantidade maior desses compostos bioativos em relação à polpa processada termicamente.

Os resultados do presente trabalho sugerem que a API pode ser considerada um método de conservação alternativo para polpa de açaí, pois em comparação ao tratamento térmico ela é capaz de inativar micro-organismos mas também preserva a capacidade antioxidante da polpa.



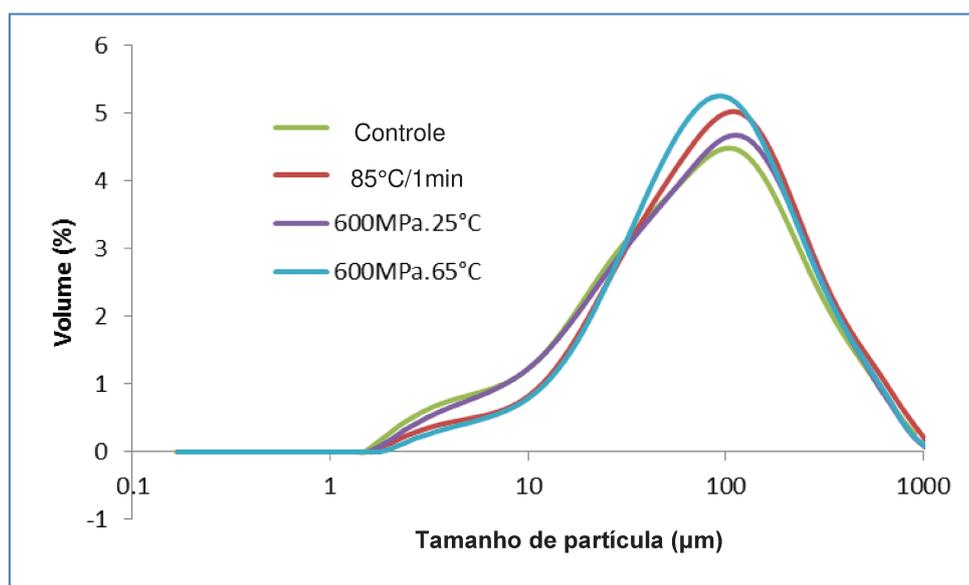
**Figura 17:** Capacidade antioxidante das amostras de polpa de açaí pelo método FRAP e ORAC.

a,b,c : Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ( $p > 0,05$ )

### 5.9. Análise de distribuição de tamanho de partículas (DTP)

A viscosidade aparente de polpas de frutas é influenciada por inúmeros fatores como a quantidade de sólidos solúveis e insolúveis, distribuição de tamanho de partículas, formato das partículas e variáveis de processo. Uma concentração muito

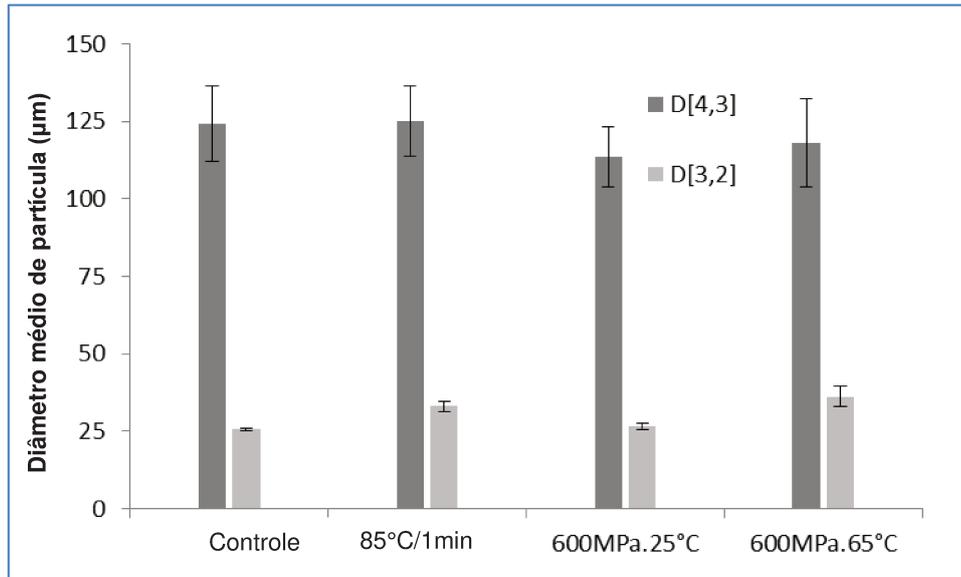
baixa da fase dispersa, faz com que a fase contínua determine o caráter do fluido, resultando em um comportamento Newtoniano. Por outro lado, sólidos em grandes quantidades podem provocar um grande aumento na viscosidade de suspensões (FERGUSON; KEMBLOWSKI, 1991). A distribuição de tamanho de partículas de todas as amostras foi apresentada na **Figura 18**. Pode-se notar que o perfil da distribuição quase não teve alterações em nenhum dos processos e a maioria das partículas apresentou cerca de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Embora a amostra processada a 600 MPa/5 min/65 °C tenha apresentado um volume (%) ligeiramente maior de partículas com um tamanho de cerca de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetros e um volume ligeiramente menor de partículas com menos de 10  $\mu\text{m}$ , todas as outras apresentaram quase o mesmo perfil.



**Figura 18:** Distribuição de tamanho de partícula (DTP) e os diâmetros médio de partículas (D [4,3] e D [3,2]) de polpa de açaí.

Tanto o diâmetro médio das partículas D [4,3] (**Equação 6**) quanto o D [3,2] (**Equação 7**) são apresentados na **Figura 19**. O D [4,3] e D [3,2] não apresentaram diferença estatística entre todas as amostras, embora D [4,3] tenha sido cinco vezes maior do que o D [3,2]. Isso indica que as partículas da polpa de açaí não são próximas de uma forma de esfera, o que geraria valores semelhantes entre D [4,3] e D [3,2].

Embora alguns estudos evidenciem que a API pode influenciar no tamanho médio das partículas de polpa de frutas, o resultado de nosso estudo mostrou que nem o processo de API e nem o processo térmico têm efeito elegível na distribuição de tamanho de partícula em polpa do açaí.

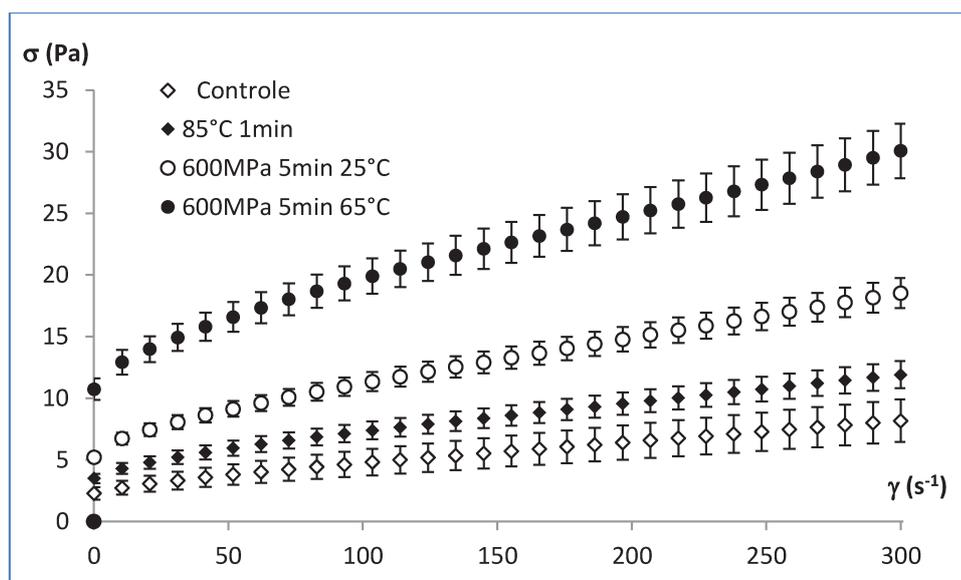


**Figura 19:** Diâmetro médio das partículas (D [4,3] e D [3,2]) de polpa açaí .(Barras verticais são desvio padrão).

## 5.10. Comportamento reológico

### 5.10.1. Comportamento ao fluxo de polpa de açaí

A **Figura 20** mostra o comportamento ao fluxo da polpa de açaí a 25 ° C, processada em diferentes condições. A polpa mostrou comportamento pseudoplástico com tensão residual e foi bem descrita pelo modelo Hershel-Buckley (**Equação 9**).



**Figura 20:** Comportamento ao fluxo de polpa açaí processada por API e processo térmico. (Os pontos são os valores médios de pelo menos 3 repetições e barras verticais são desvio padrão).

A **Tabela 12** compara os valores obtidos para a amostra controle neste trabalho com os relatados anteriormente na literatura usando outros produtos de frutas / vegetais.

**Tabela 12:** Parâmetros de comportamento ao fluxo de polpa de açaí e outros produtos vegetais a uma temperatura similar.

Produto	T (°C)	$\sigma_0$ (Pa)	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n (-)	Referência
Polpa de Açaí (Controle)	25	2,37	0,059	0,80	Presente trabalho
Polpa de Açaí	25	4,35	0,17	0,78	Tonon et al. (2009)
Polpa de Jabuticaba	25	1,55	0,48	0,6	Sato; Cunha (2009)
Purê de Framboesa	25	28,72	0,19	0,88	Medina-Meza et al. (2016)
Purê de Blueberry	25	43,27	0,98	0,31	
Polpa de Blackberry	20	0,29	1,12	0,44	Haminiuk et al. (2006a)
Polpa de Butiá	20	32,54	0,15	0,86	Haminiuk et al (2006b)
Suco de Tomate	25	5,38	0,92	0,44	Augusto et al. (2011a)
Suco de Pêssego (10% fibra)	20	3,26	13,1	0,46	Augusto et al. (2012c)
Suco de laranja concentrado	25	-	6,10	0,59	Leite et al. (2014)
Suco de caju	25	1,336	0,42	0,46	Leite et al. (2015)

O processo de API, afetou o comportamento ao fluxo da polpa do açaí, especialmente quando o processamento foi a 65 °C, como mostrado na **Figura 20**, aumentando a consistência da polpa. Embora apenas o processo térmico não mostrou quase nenhum efeito sobre a polpa, pode-se observar que a amostra não processada (controle) mostrou menor consistência independente da taxa de cisalhamento. O aumento da consistência pode melhorar nos aspectos sensoriais, uma vez que é desejável uma elevada consistência para este produto.

A **Tabela 13** mostra o efeito da API e do processamento térmico nos parâmetros do modelo Hershel-Bulckley para açaí a 25 °C. A alta pressão aumentou o índice de consistência (k), a tensão residual ( $\sigma_0$ ), enquanto o índice de comportamento ao fluxo (n) mostrou o comportamento oposto. O processo de API a 65 °C mostrou um aumento ainda maior do que a 25 °C. Apenas o processamento térmico mostrou quase nenhum impacto nesses parâmetros (sem diferença estatística).

As polpas de frutas são sistemas complexos que possuem muitos componentes, alguns deles são solúveis em água, que é o principal componente, também há algum conteúdo insolúvel disperso pela água. Essas duas fases têm um

impacto na consistência e em outras propriedades reológicas do produto como um todo. Geralmente, a fase solúvel não desvia-se de um comportamento newtoniano, no entanto, o conteúdo insolúvel que desvia-se desse comportamento devido à interação com a fase solúvel e a interação partícula-partícula (AUGUSTO; IBARZ; CRISTIANINI, 2012a, b).

É possível que as alterações na distribuição de tamanho de partícula demonstrem algum efeito na consistência do produto, no entanto, como mostrado na **Figura 18** e **Figura 19**, a DTP não mudou de forma notável. No entanto, todos os parâmetros de Hershel-Bulckley analisados mudaram após ambos os processos de API (**Tabela 13**), o que pode ser atribuído a uma maior mudança nas interações partículas-partículas.

**Tabela 13:** Parâmetros de comportamento ao fluxo da polpa açaí processada por API e processo térmico

Amostras	Temp.(°C)	$\sigma_0$ (Pa)	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n (-)
Controle	25	2,37 ± 0,467 <sup>a</sup>	0,059 ± 0,0210 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,025 <sup>a</sup>
85°C /1 min	25	3,19 ± 0,498 <sup>b</sup>	0,101 ± 0,0327 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,025 <sup>b</sup>
600 MPa/5 min/25 °C	25	4,65 ± 0,976 <sup>c</sup>	0,154 ± 0,0420 <sup>c</sup>	0,74 ± 0,009 <sup>b</sup>
600 MPa/5 min/65 °C	25	8,80 ± 2,522 <sup>d</sup>	0,266 ± 0,0830 <sup>d</sup>	0,70 ± 0,011 <sup>c</sup>

Valores expresso como média ± desvio padrão. As mesmas letras na mesma coluna não apresentam diferença estatística.

A polpa de açaí apresentou tensão residual ( $\sigma_0$ ), isso já mostra que as interações partículas-partículas são relevantes, criando uma rede que afeta o fluxo do fluido. Apenas o processo térmico apresentou um aumento em torno de 35% do seu valor original. As amostras processadas por API apresentaram uma tensão de cisalhamento ainda maior, a amostra processada a 25 °C quase dobrou o valor e a amostra processada a 65°C apresentou o valor quase quatro vezes maior, sendo claro um efeito sinérgico entre temperatura e pressão.

O índice de consistência (k) mostrou tendência semelhante. O processo térmico aumentou seu valor cerca de 70%. A API a 25 °C apresentou um valor 2,5 vezes maior, e mais uma vez a amostra processada por API a 65 °C mostrou o maior aumento (mais de 4 vezes). O efeito sinérgico foi observado entre temperatura e pressão novamente. Este parâmetro (k) representa a resistência ao escoamento ou

ao arrasto da partículas na fase solúvel, assim o aumento das interações entre partículas e entre partículas e fase solúvel, como acima mencionado, pode também ser a causa dessa mudança.

Finalmente, o índice de comportamento ( $n$ ) mostrou a tendência oposta, sendo a amostra controle o valor mais alto. As amostras processadas por processo térmico e API a 25 °C apresentam valores próximos entre si e perto de 92% da amostra controle. A amostra processada pela API a 65 °C mostrou uma redução de 87% em relação ao controle. O índice de comportamento ( $n$ ) está relacionado ao alinhamento das partículas ao fluxo, o aumento na rede pode alterar a mobilidade, aumentando a resistência das partículas ao alinhamento do fluxo acima mencionado.

O efeito da API em reologia foi claro, no entanto, seus mecanismos não foram inteiramente elucidados. O processo de API não alterou o diâmetro médio das partículas, e seu perfil na curva DTP também não mudou de forma notável. O processo térmico também não alterou a DTP. No entanto, em ambos os casos, os parâmetros reológicos mudaram, especialmente quando se aplicaram pressão e temperatura.

O aumento na tensão residual indica que a rede já existente se torna mais intensa, devido a API ou ao processo térmico (mesmo com um efeito menor no processo térmico), mais uma vez, um efeito sinérgico com pressão e temperatura é notável. A aplicação de calor pode alterar alguns componentes, promover algum nível de gelatinização da pectina ou desnaturação de vários componentes, levando a um aumento na interação com água e / ou outros componentes, aumentando assim a força da rede, esse efeito é menor durante o processo térmico. O processo térmico pode solubilizar algum conteúdo adicional de fração de pectina solúvel em água, levando a um fluido de maior consistência (CONTRERAS et al., 2007).

O aumento da consistência dos produtos de frutas devido a API não é um fenômeno frequentemente relatado na literatura. Kreebers et al. (2003) apresentaram um aumento na viscosidade do purê de tomate a medida que aumentou a pressão da pasteurização não-térmica. Andreou et al. (2016), verificaram que um suco de tomate processado por pressão necessitou de menos evaporação de água para obter um produto concentrado de tomate a 5000cP de viscosidade, o que significa que o suco de tomate processado por API pré-concentrado apresentou maior consistência em comparação com o suco de tomate não processado. Estes poucos trabalhos apresentam alguns resultados que podem ser relacionados em algum nível para aumentar a consistência devido a API, no entanto, nenhum deles possui os mesmos

métodos de caracterização de reologia, como o usado neste trabalho, sendo difícil compará-los, porém, uma tendência é verificada. Chakraborty et al. (2016), realizaram uma avaliação em estado estacionário em purê de abacaxi, descobrindo que o processamento por alta pressão também aumenta o produto.

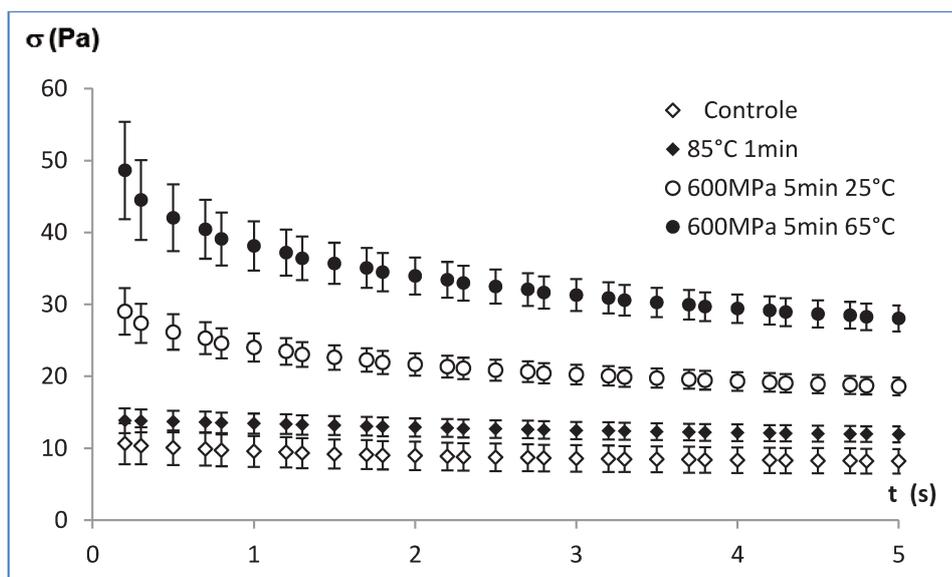
A API poderia promover a extração de alguns componentes da matriz do produto (KREEBERS et al., 2003), aumentando assim o número de componentes no produto que podem alterar a carga do meio e, conseqüentemente, a interação das partículas. Vários trabalhos mostram que a API também pode promover algum nível de gelatinização de amidos (BLASZACK et al. 2005; VALLONS; ARENDT, 2009; AHMED et al. 2014; LEITE et al., 2017). Algum nível de geleificação de um componente como pectina também poderia ser alcançada, considerando os níveis de energia da alta pressão especialmente a 65 °C. Kreebers et al. (2003) também teorizaram que uma coagulação proteína-pectina dependente da pressão poderia contribuir para o fenômeno, um mecanismo semelhante foi indicado por Porretta et al. (1995).

O possível aumento na interação pode promover algum nível de aglomeração de partículas que afetam a reologia, no entanto, durante a diluição na medição de DTP (algumas gotículas em várias centenas de mililitros de água em agitação constante), essa aglomeração é perdida e nenhuma alteração elegível no tamanho de partícula é verificada.

O aumento da consistência pode influenciar a percepção do consumidor e possivelmente aumentar a aceitação do produto.

### **5.10.2. Propriedades dependentes do tempo**

O efeito dos processos sobre a tixotropia da polpa de açaí foi avaliado e apresentado na **Figura 21**. O modelo Figoni-Shoemaker descreveu bem o produto e seus parâmetros são mostrados na **Tabela 14**.



**Figura 21:** Tixotropia de polpa de açaí processada por API e processo térmico (os pontos são os valores médios de pelo menos 3 repetições e barras verticais são desvio padrão).

**Tabela 14:** Parâmetros do modelo Figoni-Shoemaker em polpa processada por API e processo térmico.

Amostras	Temp. (°C)	$\sigma_i$ (Pa)	$\sigma_e$ (Pa)	$k_{FS}$ (s <sup>-1</sup> )
Controle	25	10,82 ± 2,867 <sup>a</sup>	8,06 ± 1,801 <sup>a</sup>	0,553 ± 0,1281 <sup>a</sup>
85°C/ 1 min	25	12,12 ± 2,368 <sup>a</sup>	9,28 ± 1,784 <sup>a</sup>	0,496 ± 0,1189 <sup>a</sup>
600 MPa/5 min/ 25°C	25	22,85 ± 7,593 <sup>b</sup>	15,09 ± 3,748 <sup>b</sup>	0,477 ± 0,1807 <sup>a</sup>
600 MPa/5 min/ 65°C	25	38,84 ± 12,023 <sup>c</sup>	23,02 ± 5,544 <sup>c</sup>	0,513 ± 0,1047 <sup>a</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. As mesmas letras na mesma coluna não apresentam diferença estatística.

O comportamento tixotrópico é uma mudança dependente do tempo em suas características de fluxo causadas por cisalhamento, neste caso, uma redução na resistência ao fluxo, que significa uma destruição da estrutura ao longo do tempo, pode ser reversível, parcialmente reversível ou irreversível. (RAMOS; IBARZ, 1998; CEPEDA; VILLARAN; IBARZ, 1999). Os resultados da tixotropia apresentam a mesma tendência observada nos resultados do comportamento ao fluxo. A amostra processada termicamente (85°/1 min) apresentou valores de tensão de cisalhamento ligeiramente maior do que a amostra controle, e as processadas por API apresentaram valores mais altos, especialmente a 65°C, embora não tenha mostrado diferença estatística. A amostra que apresentou maior tixotropia (API a 65 °C) mostrou uma tensão inicial em 38,84 Pa e a tensão de equilíbrio de 23,02 Pa. Realçar a relevância

para o estudo tixotrópico é extremamente importante para melhorar a compreensão das mudanças que ocorrem no produto durante o processo.

A alteração na consistência / viscosidade devido a API não foi frequentemente relatada / estudada por outros autores, o que é especialmente verdadeiro para as propriedades de dependência do tempo. Não há nenhuma comparação que possa ser comparada com outros estudos, porém, algumas características do fluido podem ser obtidas pelos parâmetros do modelo.

Ambas, tensão inicial ( $\sigma_i$ ) e de equilíbrio ( $\sigma_e$ ), aumentaram com o processamento, bem como sua diferença ( $\sigma_i - \sigma_e$ ). Uma vez que a análise de DTP não apresentou nenhum efeito importante no tamanho da partícula, os resultados podem ser explicados pela mudança nas interações que está de acordo com o aumento da tensão residual como foi reportado anteriormente. No entanto, nenhuma tendência foi observada na constante de redução de tensão ( $k_{FS}$ ), o que significa que o processo mudou as forças elegíveis que criam a rede sem alterar algumas das forças fracas que contribuem para a estrutura inicial ou "em repouso". Na literatura  $k_{FS}$  geralmente muda quando a concentração ou a taxa de cisalhamento também são alteradas (LOZANO; IBARZ, 1994; RAMOS; IBARZ, 1998). Os resultados da tixotropia podem ser usados para futuros estudos e design de processos / produtos.

## 6. Conclusões Gerais

O processamento de polpa de açaí por API desempenhou efeitos diferentes sobre a atividade das enzimas POD e PPO. A POD não teve sua atividade reduzida em nenhum dos tratamentos adotados. A PPO teve sua atividade aumentada quando as polpas foram submetidas a 600 MPa/5 min/ 25 °C, mas de forma geral, processos a 65 °C juntamente com a alta pressão (600 MPa), reduziram sua atividade e mantiveram a cor do produto a níveis não detectáveis ao olho humano.

Os processos de API (690 MPa) aliados à alta temperatura (80 °C) apresentaram bons resultados para inativação da PPO (49,4% de inativação), porém, não foram tão vantajosos em relação a mudança de cor da polpa que apresentou uma coloração mais escura logo após processamento.

Quanto à caracterização microbiológica, a amostra *in natura* foi considerada imprópria para consumo a partir da segunda semana de estocagem a 5°C, ultrapassando os limites de fungos filamentosos e leveduras. Por outro lado, os dois processos (600 MPa/5 min/25°C e 600 MPa/5 min/65°C) aplicados nesse estudo

reduziram todas as populações de fungos filamentosos e leveduras, bem como micro-organismos do grupo coliforme. Também reduziu em até 2 ciclos log de bactérias aeróbias mesófilas, quando a polpa foi processada a 600 MPa/5 min/25 °C, e até 4 ciclos log de bactérias psicotróficas, quando processada a 600 MPa/5 min/65 °C.

Todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* sp em 25 g do produto.

Apesar da polpa de açaí utilizada nesse estudo apresentar uma contagem inicial elevada de bactérias lácticas, a API se mostrou efetiva na inativação de *L. fructivorans* com reduções de até 4,8 ciclos log para a condição de 600 MPa/5 min/25 °C.

Para *E. coli*, a aplicação de API na menor condição de processo (400 MPa/5 min/25°C) se mostrou eficaz na inativação do micro-organismo. Entretanto, o mesmo foi inativado (> 6,1) em todas as condições avaliadas nesse estudo.

O processamento à alta pressão associado a temperatura mediana (600 MPa/5 min/65 °C) foi capaz de reduzir 2,72 ciclos log de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, sendo o modelo de Weibull o modelo matemático capaz de descrever o perfil de inativação dos esporos desse micro-organismo após aplicação de API.

Os dados apresentados neste estudo podem trazer uma contribuição para a indústria de polpas/sucos de frutas comercializados e que utilizam polpa de açaí como matéria prima, uma vez que existe a tendência para o desenvolvimento de bebidas que misturam frutas e vegetais e o conhecimento da prevalência desses micro-organismos nessas matrizes pode ser considerado o primeiro passo para se desenvolver métodos para garantir a estabilidade microbiana durante a vida útil.

Pesquisas adicionais são necessárias para estudar o comportamento (crescimento, sobrevivência ou inativação) desses micro-organismos em polpa de açaí e esta informação será útil para melhorar o estado microbiológico dos produtos garantindo assim produtos estáveis durante a vida de prateleira.

Em polpas de açaí pressurizadas, a extração de antocianinas aumentou em média 37% para ambos os processos de API a 600 MPa/5 min a 25°C e 65°C. Em oposição, o tratamento térmico reduziu o teor desse pigmento em 16,3% em comparação com a amostra *in natura*, evidenciando que a aplicação de API em polpa de açaí pode ser um processo promissor para aumentar a capacidade de extração desse composto bioativo. Da mesma forma, para fenólicos totais, ambos os processos

a 600 MPa tanto a 25 °C como a 65 °C, aumentaram a extração em 11,44% e 10,25%, respectivamente.

A API foi capaz de manter a atividade antioxidante para as polpas processadas, existindo assim uma correlação positiva entre o teor de compostos fenólicos totais e antocianinas com a capacidade antioxidante. Entretanto, apenas pela metodologia de FRAP foi possível observar uma diferença entre as amostras pressurizadas e a pasteurizada, possivelmente devido aos diferentes princípios em que se baseiam os métodos utilizados. Os resultados sugerem que a API pode ser considerada um método de conservação alternativo para a preservação da polpa de açaí preservando assim os compostos bioativos avaliados.

A pasteurização térmica tradicional durante o processamento de frutas e vegetais tipicamente induz uma perda pronunciada de compostos fenólicos. Em contrapartida, a alta pressão isostática se mostrou benéfica para a retenção de fenólicos e antocianinas mantendo a capacidade antioxidante das polpas processadas, além de manter de forma mais eficaz o sabor e a cor originais nos processos avaliados. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar se o processamento por API e armazenamento refrigerado (5 °C) subsequente mantêm os níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante na polpa de açaí de forma mais eficaz em comparação ao tratamento térmico.

Os resultados do teste de aceitação sensorial demonstraram que a amostra processada por API, sem uso de temperatura elevada e no menor tempo de processo (600 MPa/5 min/25 °C), apresentou uma boa aceitação (5,03) pelos consumidores, não diferindo estatisticamente da amostra *in natura*, sendo o atributo de “textura consistente” o mais relevante para os consumidores. Já a amostra com menor aceitação foi a amostra que sofreu tratamento térmico (85°C/ 1 min). Os consumidores atribuíram para a referida amostra algumas características como: sabor amargo, sabor de terra, sabor adstringente, separação de gordura, o que foi evidenciado pela aplicação da metodologia sensorial de *free listing*, gerando assim 10 termos descritores para amostras de polpa de açaí.

Os resultados de análise de tamanho de partícula mostraram que os processos de API e térmico não têm efeito elegível na distribuição de tamanho de partícula em polpa do açaí. Porém, as análises reológicas mostraram que a API afetou o comportamento ao fluxo da polpa de açaí, especialmente quando os processos foram realizados a 65 °C, aumentando a consistência da polpa, apresentando

comportamento pseudoplástico com tensão residual de cisalhamento, o que foi bem descrito pelo modelo Hershel-Buckley.

O aumento da consistência pode influenciar a percepção do consumidor e possivelmente aumentar a aceitação do produto. Neste estudo esse aumento de consistência na polpa de açaí processada por API foi observado pelo consumidor durante análise sensorial e evidenciado na aparência visual das amostras.

Diante dos resultados, conclui-se que o processamento API a 600 MPa/5 min/65 °C pode ser uma alternativa para tratamentos térmicos de pasteurização, gerando um produto seguro, com parte de suas enzimas inativadas, com a preservação de suas características funcionais, em termos de antocianinas e compostos fenólicos totais e sensoriais para cor (após processamento) e aceitação. Entretanto, o uso da tecnologia de API para polpa de açaí deve ser acompanhado por uma barreira secundária a fim de evitar degradação do produto pela ação da POD e PPO durante a estocagem refrigerada.

### **Sugestões de Trabalhos Futuros**

Com os resultados obtidos na realização deste trabalho, assim como o conhecimento adquirido durante seu desenvolvimento, foram sugeridos os seguintes trabalhos a serem desenvolvidos:

- A realização de ensaios cinéticos para explicar a sequência de modificações que levam ao aumento e/ou redução da concentração de compostos fenólicos e antocianinas. Ensaios durante a estocagem para se verificar a estabilidade desses compostos durante o armazenamento refrigerado.
- Como o açaí é uma fruta rica em lipídeos, sugere-se a investigação do perfil de ácidos graxos também após processamento por API.
- Durante a análise sensorial de *free listing* um termo descritor apontado pelos consumidores foi o aroma doce. Como as amostras não foram adicionadas de sacarose seria interessante uma análise do perfil de compostos voláteis para se verificar qual composto poderia ser responsável por essa resposta sensorial.
- Sugere-se também análises complementares de antocianinas por cromatografia (HPLC) para que se possa verificar o perfil das antocianinas após tratamento por API, assim como estudos *in vivo* sobre os efeitos da API na biodisponibilidade dos compostos bioativos.

- Ensaios de validação do modelo preditivo de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

## Referências Bibliográficas

ALI, H.M.; ALMAGRIBI, W.; AL-RASHIDI, M. N. Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structure–activity relationship and synthesis. **Food Chemistry**, v. 194, p.1275–1282, 2016.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. Changes in colour during high pressure processing of fruits and vegetables. **Stewart Postharvest Review**, v.5 (9), p. 1–8, 2006.

AHMED, J.; SINGH, A.; RAMASWAMY, H.S.; PRAMOD K. PANDEY; P.K.; RAGHAVAN, G.S.V. Effect of high-pressure on calorimetric, rheological and dielectric properties of selected starch dispersions. **Carbohydrate Polymers**, v.103, p. 12– 21, 2014.

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R.L.; HUBINGER, M.D. **Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos**. Campinas-SP. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 24 (1);p.114-11, 2004.

ALONSO, A.M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLE N, D.A.; BARROSO,C.G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method as its correlation with phenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,v. 50, p. 3112-3115, 2002.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. Basic anthocyanin chemistry and dietary sources. In T. C. Wallace, M. M. Giusti (Eds.), **Anthocyanins in health and disease**. Boca Raton, FL: CRC Press, p.13–89, 2014.

ANDREOU, V.; DIMOPOULOS, G.; KATSAROS, G.; TAOUKIS, P. Comparison of the application of high pressure and pulsed electric fields technologies on the selective inactivation of endogenous enzymes in tomato products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.38, p. 349–355, 2016.

ANESE, M.; NICOLI, M. C.; DALLAGLIO, G.; LERICI, C. R. Effect of high-pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities. **Journal of Food Biochemistry**, v.18, p.285-293, 1995.

ANTMANN, G.; ARES, G.; VARELA, P.; SALVADOR, A.; COSTE, B.; FISZMAN, S.M. Consumers' texture vocabulary: Results from a free listing study in three Spanish-speaking countries. **Food Quality and Preference**, v.22, p.165-172, 2011.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official Methods of Analysis**, 17th ed, Washington, D. C., 2000.

AOAC. HORWITZ, W. (Ed.) **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18 th Ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010 Gaithersburg, Maryland, AOAC, 2010. Chapter 41 **Met. 996.06**, p. 20, 2010a.

AOAC. **Official Method 2004.03** (*Salmonella* VIDAS *Salmonella* (SLM) Assay Kit). In: HORWITZ, W. (ed). **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18 th ed., revision 3. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, 2010b

AOAC, LATIMER Jr., G. W. (Ed.) **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.19th Ed. 2012. Gaithersburg, Maryland, AOAC, 2012.

AOCS, FIRESTONE, D. (Ed.) **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 6th ed., 3rd printing, Urbana, AOCS, 2014.

APHA, American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed.; Washington, 676p. 2001.

APICHARTSRANGKOON, A.; CHATTONG, U.; CHUNTHANOM, P. Comparison of bioactive components in fresh, pressurized, pasteurized and sterilized pennywort (*Centella asiatica* L.) juices. **High Pressure Research**, v.2, p. 1–7, 2012.

ARES, G.; GIMÉNEZ, A.; GÁMBARO, A. Understanding consumers' perception of conventional and functional yogurts using word association and hard laddering. **Food Quality and Preference**, v.19, p. 636–643, 2008.

ARES, G.; DELIZA, R. Identifying important package features of milk desserts using free listing and word association. **Food Quality and Preference**, v. 21, p.621-628, 2010.

ARES, G.; SALDAMANDO, L.; GIMÉNEZ, A.; DELIZA, R. Food and wellbeing. Towards a consumer-based approach. **Appetite**, v.74, 61-69, 2014.

ARIEDFJOHAN, M.W.; NELSON, P.E.; SINGH, R.K.; BHUNI, A.K.;BALASUBRAMANIAM, V.M.; SINGH, N. The use of high hydrostatic pressure treatment in eliminating *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in alfalfa seeds. **Journal of Food Science**, v.69, p.117-120, 2004.

ASAKA, M.; AOYAMA, Y.; RITSUKO, N.; HAYASHI, R. Purification of a latent form of polyphenoloxidase from la France pear fruit and its pressure activation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, p.1486-1489, 1994.

AUGUSTO, P. E. D.; FALGUERA, V.; CRISTIANINI, M.; IBARZ, A. Influence of fibre addition on the rheological proprieties of peach juice. **International Journal of food Science and Technology**, v.46, 1086-1092, 2011a.

AUGUSTO, P. E. D; IBARZ, A, CRISTIANINI, M. Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of a fruit juice serum model. **Journal of Food Engineering**, v.111, p. 474-477, 2012a.

AUGUSTO, P. E. D.; IBARZ, A.; CRISTIANINI, M. Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of tomato juice: Time-dependent and steady-state shear. **Journal of Food Engineering**, v.111, p 570–579, 2012b.

AUGUSTO, P. E. D.; FALGUERA, V.; CRISTIANINI, M.; IBARZ, A. Rheological behavior of tomato juice: steady-state shear and time-dependent modeling. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, p. 1715-1723, 2012c.

BARBA, F. J.; CORTÉS, C.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Study of Antioxidant Capacity and Quality Parameters in An Orange Juice-Milk Beverage After High-Pressure Processing Treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v.5(6), p 2222–2232, 2012a.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. High Pressure Treatment Effect on Physicochemical and Nutritional Properties of Fluid Foods During Storage: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, p. 307-322, 2012b.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. **Food Research International**, v. 50, p. 545–549, 2013.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; RODRÍGUEZ, J. J.. Update on nonthermal food processing technologies, irradiation and ultrasound. **Food Australia**, v.54, n.11, 2002.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H. S. Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p 601-607, 1996.

BATISTA, A. G., FERRARI, A. S., DA CUNHA, D. C., DA SILVA, J. K., et al. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. **Food Chemistry**, v.197(Part B), p 1153-1159, 2016.

BATISTA, Â. G., DA SILVA, J. K., BETIM CAZARIN, C. B.; BIASOTO, A. C. T.; SAWAYA, A. C. H. F.; PRADO, M. A.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in fruits and leaves. **LWT - Food Science and Technology**, v.76, Part B, 284-291., 2017.

BAYINDIRLI, A.; ALPAS, H.; BOZOG˘LU, F.; HIZAL, M. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. **Food Control**, v. 17, p. 52–58, 2006.

BENGTSSON, H., TORNBERG, E. Physicochemical characterization of fruit and vegetable fiber suspensions. I: Effect of homogenization. *Journal of Texture Studies*, v. 42, 4, p. 268–280, 2011.

BENZI E, I.F.F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p.70 –76, 1996.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; An Update on High Hydrostatic Pressure, from the Laboratory to Industrial Applications. **Food Engineering Reviews**, v.3, p. 44-61, 2011.

BI, X.; ZHANG, J.; CHEN, C.; ZHANG, D.; LI, P.; M, F. Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. **Food Chemistry**, v.152, p. 205–209, 2014.

BLACK, E. P.; SETLOW, P.; HOCKING, A. D.; STEWART, C. M.; KELLY, A. L., HOOVER, D. G. Response of spores to high-pressure processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.6(4), p.103-119, 2007.

BLACKBURN, W.C. Modeling shelf-life. In: Kilcast, D.; subramaniam, P. **The stability and shelf-life of Food**, CRC Press LLC, Cambridge, Englando, 2000.

BŁASZCZAK,W.; FORMAL. J.; VALVERDE, S.; GARRIDO, L. Pressure-induced changes in the structure of corn starches with different amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v.61, p.132–140, 2005.

BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.

Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. **Food Research International**, v. 44 ,p. 708– 715, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001: regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos**. Disponível em: <[http://anvisa.gov.br/legis/reso12\\_01rda.htm](http://anvisa.gov.br/legis/reso12_01rda.htm)> Acesso em: 01/02/2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. **Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 janeiro de 2000.

BROWN, M. J.; FERRUZZI, M. G.; NGUYEN, M. L.; COOPER, D. A.; ELDRIDGE, A. L.; SCHWARTZ, S. J., et al. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p. 396–403, 2004.

BUCKOW, R.; WEISS, U.; KNORR, D. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10 (4), p.441-448, 2009.

BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Emerging technologies: chemical aspects. **Food Research International**, v.35, 279–284, 2002.

BUZRUL, S.; ALPAS, H. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. **FEMS Microbiology Letter**, v.238, p.29-36, 2004.

BUZRUL S, ALPAS H, BOZOGLU F. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure and different temperature. **Food Research International**, v.38, p.151–7, 2005.

CADENA, R. S; BOLINI, H. M. A. Time–Intensity Analysis And Acceptance Test For Traditional And Light Vanilla Ice Cream. **Food Research International**, v. 44, p. 677–683, 2011.

CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L; CRISTIANINI, M. The use of High Pressure Technology in Food Processing - **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6(2), p. 351- 357, 2003.

CANO, M. P.; DE ANCOS, B.; SANCHEZ-MORENO, C. **Altas presiones. Nueva alternativa para la mejora de la calidad y seguridad. en vegetales frescos cortados. In: Simposium Nuevas Tecnologías de Conservación y Envasado de Frutas y Hortalizas.Vegetales Frescos Cortados**, La Habana, Cuba. Anais. La Habana, Cuba: mar.,p. 9, 2005.

CANO, M. P.; HERNÁNDEZ, A.; DE ANCOS, B. High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products. **Journal of Food Science**, v. 62, p.85- 88, 1997.

CARBONELL-CAPELLA, J.M.; BARBA, F.J.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with Stevia rebaudiana Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.18, p. 48–56, 2013.

CARNEIRO, F.R.B.D. **Uso da tecnologia de barreiras na obtenção da polpa de açaí e sua caracterização reológica**. Campinas: UNICAMP, 2000. 135p. Tese Doutorado

CASTENMILLER, J. J.; WEST,C.E.; LINSSSEN, J. P.; VAN HETHOF,K.H.;VORAGEN, A.G. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of beta-carotene and to a lesser extent of lutein in humans. **Journal of Nutrition**, v.129, p. 349–355, 1999.

CASTRO MP, ROJAS AM, CAMPOS CA AND GERSCHENSON LN. Effect of preservatives, tween 20, oil content and emulsion structure on the survival of

Lactobacillus fructivorans in model salad dressings. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, p. 1428–1434, 2009.

CECCHI, H. M. Método de análise. In: **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Editora da UNICAMP, p. 15-19, 2003.

CEPEDA, E.; VILLARAN, M. C.; IBARZ, A. Rheological properties of cloudy and clarified juice of *Malus flurzbunda* as a function of concentration and temperature. **Journal of Texture Studies**, v.30, 481–491, 1999.

CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S.; MISHRA, H. N. Changes in Quality Attributes During Storage of High-Pressure and Thermally Processed Pineapple Puree. **Food and Bioprocess Technology**, v.9, p. 768–791, 2016.

CHAKRABORTY, S.; KAUSHIK, N.; RAO, P. S.; MISHRA, H. N. High-pressure inactivation of enzymes: A review on its recent applications on fruit purees and juices. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13(4), p. 578–596, 2014.

CHAKRABORTY, S.; RAO, P.S.; MISHRA, H.N. Effect of combined high pressure temperature treatments on color and nutritional quality attributes of pineapple (*Ananas comosus* L.) puree. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 28, p. 10–21, 2015.

CHEAH, P. B.; LEDWARD, D. A. High-pressure effects on lipid oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.72 (9),p. 1059–1063, 1995.

CHEAH, P. B.; LEDWARD, D. A. Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. **Journal of Food Science**, v.62, p.1135–1138, 1997.

CHEFTEL, J. C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v.1, p.75-90, 1995.

CHEN, D.; XI, H.; GUO, X. et al. Comparative study of quality of cloudy pomegranate juice treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.19, p.85–94, 2013.

CHEN, D.; PANG, X.; ZHAO, J. et al. Comparing the effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on papaya beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 16–28, 2015.

CHEN, M.; ZENG, G.; XU, P.; LAI, C.; TANG, L. How Do Enzymes “Meet” Nanoparticles and Nanomaterials? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 11, p. 914–930, 2017.

CHINESE NUTRITION SOCIETY. **Chinese DRIs handbook**. Beijing (China): Standards Press of China; 2013.

CHOI, M. H.; KIM, G. H.; LEE, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. **Food Research International**, v.35(8), p.753–759, 2002.

CHUTINTRASRI, B.; NOOMHORM, A. Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. **LWT - Food Science and Technology**, v.39(5), p. 492–495, 2006.

CLINTON, S. K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Nutrition Reviews**, v.56, p. 35-51, 1998.

CONSTANT, P. B. L. **Extração, Caracterização e Aplicação de antocianinas de açai (*Euterpe oleracea* M.)**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 183 p., 2003.

CONTRERAS, C.; MARTÍN-ESPARZA, M. E.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; CHIRALT, A. Influence of osmotic pre-treatment and microwave application on properties of air dried strawberry related to structural changes. **European Food Research Technology**, v. 224, p.499–504, 2007.

CORRALES, M.; TOEPFL, S.; BUTZ, P.; KNORR, D.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonic, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p. 85–91, 2008.

DALMADI, I.; RAPEANU, G.; LOEY, A. VAN; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. Characterization and Inactivation By Thermal and Pressure Processing of Strawberry (*Fragaria Ananassa*) Polyphenol Oxidase: a Kinetic Study. **Journal of Food Biochemistry**, v.30(1), p. 56-76, 2006.

DANTIGNY, P., PANAGOU, E. **Predictive Mycology**. Nova Publishers, New York, 2013.

DARYAEI, H.; BALASUBRAMANIAM, V.M. Kinetics of *Bacillus coagulans* spore inactivation in tomato juice by combined pressure-heat treatment. **Food Control**, v. 30, p. 168-175, 2013.

DAVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52(1), p. 48–54, 2004.

DE ANCOS, B.; SGROPPO, S.; PLAZA, L.; CANO, M. P. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p.790-796, 2002.

DEGL'INNOCENTI, E.; GUIDI, L.; PARDOSSI, A.; TOGNONI, F. Biochemical Study of Leaf Browning in Minimally Processed Leaves of Lettuce (*Lactuca sativa* L. Var. Acephala). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53(26), 2005.

DEINHARD, G., BLANZ, P., PORALLA, K., ALTAN, E. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v.10, 47- 53, 1987.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Natural colorants for food and nutraceutical uses**. CRC Press, New York, USA, p. 327, 2003.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Cellular permeabilization of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. **Food Biotechnology**, v. 7, p. 35–48, 1993.

DRAKE, M. A. Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, v.90,p. 4925–4937, 2007.

DUMOULIN, M. Evolution des produits hautes pressions au Japon. **Industries Alimentaires et Agricoles**, p.3–8, 1998.

EMKEY, R.D.; EMKEY, G.R. Calcium metabolism and correcting calcium deficiencies. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 41(3):p. 527-56, 2013.

EIROA, M. N. U.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SCHIMDT, F. L. *Alicyclobacillus* in orange juice: Occurrence and heat resistance of spores. **Journal of Food Protection**, v.62(8), p. 883 - 886, 1999.

EISELE, T.A; SEMON, M.J. Best estimated aroma and taste detection threshold for guaiacol in water and apple juice. **Journal of Food Science**, v.70, 267-269, 2005.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45(5), p. 331–347, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema de produção do açaí**,2005.Disponível em:  
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai/arvore/CONT000gbfbxyh102wx5ok07shnq9fmqapzn.html>. Acesso em 01.05.17.

ERDMAN, J.W., JR. Variable bioavailability of carotenoids from vegetables. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.179–180, 1999.

EVELYN; SILVA, F. V. M. Inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores in strawberry puree by high pressure, power ultrasound and thermal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p.129–136, 2015.

EVELYN; KIM, H. J.; SILVA, F. V. M. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. **Food Control**, v.59, p. 530 - 537, 2016.

EVELYN; SILVA, F. V. M. High pressure processing pretreatment enhanced the thermosonication inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in orange juice. **Food Control**, v. 62, p.365–372, 2016.

FARKAS, D. F.; HOOVER, D. G. High Pressure Processing. **Journal of Food Science**, v.65, n.4, 47-64, 2000.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; BUTZ, P.; BOGNÀR, A.; TAUSCHER, B. Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange–lemon–carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. **European Food Research Technology**, v. 213, p. 290–296, 2001.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Does the antioxidant potential of high pressure treated apple juice change during storage. **High Pressure Research**, v. 19, p. 543–550, 2000.

FERRARI, G.; MARESCA, P.; CICCARONE, R. The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. **Journal of Food Engineering**, v.100, p. 245–253, 2010.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal/SP, v. 32, n. 3, p. 664-674, set. 2010.

FERGUSON, J.; KEMBLOWSKI, Z. **Applied fluid rheology**. New York: Elsevier Applied Science, 323p., 1991.

FIGONI, P. I.; SHOEMAKER, C. F. Cararacterization of the time dependent flow properties of mayonnaise under steady shear. **Journal of Texture Studies**, v.14, 431-442, 1983.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies -high pressure processing**. 2010. Disponível em:<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/uc m101456.htm>. Acesso em Maio de 2017.

FORTEA, M. I.; LÓPEZ-MIRANDA, S.; SERRANO-MARTÍNEZ, A.; CARREÑO, J.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). **Food Chemistry**,v.113, p. 1008-1014, 2009.

FRAGOSO, M.F.; ROMUALDO, G.R.; RIBEIRO, D.A.; BARBISAN, L.F. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v.58:p. 68–76, 2013.

FRANCIS, F. J.; CLYDESDALE, F. M. **Food Colorimetry: Theory and Applications**. Westport, CT: AVI Publ. Co, 477 pp., 1975.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, SP: Ed. Atheneu, p.182, 1996.

FRANCO, D.; SINEIRO, J.; RUBILAR, M.; SANCHÉS, M.; JEREZ, M.; PINELO, M.; et al. Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidante power. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v.7, p. 3210-3216, 2008.

GALAZKA, V. B.; SMITH, D.; LEDWARD, D. A.; DICKINSON, E. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 303–310, 1999.

GARCÍA-PARRA, J.; GONZÁLEZ-CEBRINO, F.; DELGADO, J.; LOZANO, M.; HERNÁNDEZ, T.; RAMÍREZ, R. Effect of thermal and high-pressure processing on the nutritional value and quality attributes of a nectarine puree with industrial origin during the refrigerated storage. **Journal of Food Science**, v. 76, p.618–625, 2011.

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

GARCÍA-PARRA, J.; GONZÁLEZ-CEBRINO, F.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. Effect of a different high pressure thermal processing compared to a traditional thermal treatment on a red flesh and peel plum purée. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.26, p. 26–33, 2014.

GARCÍA-PARRA, J.; GONZÁLEZ-CEBRINO, F.; DELGADO, J.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. High pressure assisted thermal processing of pumpkin purée: Effect on microbial counts, color, bioactive compounds and polyphenoloxidase enzyme. **Food and Bioproducts Processing**, v.98, p.124–132, 2016.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 95–105, 2005.

GIADA, M. R. L.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus*, L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. **International Journal Food Science and Nutrition**, v.1, p. 1-7, 2008.

GINON, E.; ARES, G.; ISSANCHOU, S.; LABOISSIÈRE, L.H.E.S.; DELIZA, R. Identifying motives underlying wine purchase decisions: Results from an exploratory

free listing task with Burgundy wine consumers. **Food Research International**, v.62, p. 860-867, 2014.

GOCMEN, D.; Elston, A.; Williams, T.; Parish, M.; Rouseff, R.L. "Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS." **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.127–177, 2005.

GONZÁLEZ-CEBRINO, F.; GARCÍA-PARRA, J.; CONTADOR, R.; RAMÍREZ, R. Effect of High-Pressure Processing and Thermal Treatment on Quality Attributes and Nutritional Compounds of " Songold " Plum Purée. **Journal of Food Science**, v.77(8), p. 866–873, 2012.

GOODNER, J.K.; BRADDOCK, R.J.; PARISH, M.E. Cloud Stabilization of Orange Juice by High Pressure Processing. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, n.5, p.1997-2000, 1998.

GRIGORAS, C.G.; DESTANDAU, E.; ZUBRZYCKI, S.; CLAIRE, E. Sweet cherries anthocyanins: An environmental friendly extraction and purification method. **Separation and Purification Technology**, v.100, p. 51–58, 2012.

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products. **Food Reviews International**, v.10, 37–41, 2005.

GUERRERO, L.; CLARET, A.; VERBEKE, W.; ENDERLI, G.; ZAKOWSKA-BIEMANS, S.; VANHONACKER, F., et al. Perception of traditional food products in six European regions using free word association. **Food Quality and Preference**, v.21, p.225–233, 2010.

HAMINIUK, C. W. I.; SIERAKOWSKI, M.R.; IZIDORO, D. R.; MASSON, M. L. Rheological Characterization of Blackberry Pulp. **Brazilian Journal Food Technology**, v.9 (4), p.291-296, 2006a.

HAMINIUK, C. W. I.; SIERAKOWSKI, M. R.; MACIEL, G. M.; VIDAL, R. M. B.;BRANCO, I. G., MASSON, M. L. Rheological properties of butia pulp. **International Journal of Food Engineering**,v. 2 (1), article 4, 2006b.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. **Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids**. Lab. Pract., v. 22 (8),494-495, 1973.

HAYAKAWA, I.; LINKO, Y.-Y.; LINKO, P. Mechanism of High Pressure Denaturation of Proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, n. 8, p. 756–762, 1996.

HAYASHI, R. **Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology**. Elsevier Science B. V., 2002, p. 511-516, 2002.

HAYASHI, R. **Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development, Engineering and Food**. (W. E. L. Spiess and H. Schubert, eds.). London: Elsevier Applied Science, v. 2, p. 815, 1989.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN,I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) - A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p.10–21, 2011.

HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; BROECK, I. VAN DEN; WEEMAES, C. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v,9(5), p.197–203, 1998.

HERNÁNDEZ-CARRIÓN, M.; VÉLAZQUEZ-GUTIÉRREZ, J.L.; HERNANDO, I.; QUILES, A. Impact of high hydrostatic pressure and pasteurization on the structure and the extractability of bioactive compounds of persimmon “Rojo Brillante”. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.1, 32–38, 2014.

HITE, B.H.; GIDDINGS, N.J.; WEAKLY, C.E. The effects of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. **West Virginia University Agricultural Experiment Station**, v.146, p.1–67, 1914.

HOUGH, G.; FERRARIS, D. **Free listing: A method to gain initial insight of a food category.** In The 9th Sensometrics Meeting. Sensometrics 2008. St. Catherine: Sensometrics Society, 2008.

HONGKANG, Z.; MITTAL, G. S. Effects of high-pressure processing (HPP) on bacterial spores: An overview. **Food Reviews International**, v.24(3), p.330-351, 2008.

HORI, K.; MATANABE, Y.; KANEKO, M., SEKIMOTO, T., SUGIMOTO, Y., YAMANE, T. The development of high pressure processor for food industries. In: **High Pressure and Biotechnology**, edited by Claude, B., Rikimaru, H., Karel, H., and Patrick, M. Colloque INSERM, Paris: John Libbey Euro text Ltd., p. 499–507, 1992.

HSU, K.C. Evaluation of processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.450, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005

HUANG, W.; BI, X.; ZHANG, X.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J. Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.18, 74–82, 2013.

HUANG, L. IPMP 2013 - A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.171,p. 100–107, 2014.

INDRAWATI, O.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Pressure and temperature stability of water-soluble antioxidants in orange and carrot juice: a kinetic study. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 161–166, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 4a ed. Brasília: Ministério da Saúde/ANVISA São Paulo. ZENEON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco (Coord.), 2005.

IOM – Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. **National Academy Press**, Washington, p. 394-419, 2001.

ITC (International Trade Centre). **Fruit juices: market news service (MNS) 2011**. Disponível

em:<[http://www.intracen.org/uploadedFiles/intracenorg/Content/Exporters/MNS/Fruit\\_Juice\\_sample.pdf](http://www.intracen.org/uploadedFiles/intracenorg/Content/Exporters/MNS/Fruit_Juice_sample.pdf)>. Acesso em: 8 de dez. 2014.

JENSEN, N. *Alicyclobacillus*. A new challenge for the food industry. **Food Australia**, v.51(1 e 2), p.33-36, 1999.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; et al. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v.133, 671–677, 2012.

KANNENBERG, E.; BLUME, A.; PORALLA, K. Properties of u-cyclohexane fatty acids in membranes. **FEBS Letters**, v.172(2), p.331-334, 1984.

KALIL, A.C. **Manual Básico de Nutrição**. São Paulo: Instituto de Saúde, 1975

KEENAN, D.F.; RÖBLE, C.; GORMLEY, R.; BUTLER, F.; BRUNTON, N.P. Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. **Food Science and Technology**, v.45, p. 50-57, 2012.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; MELLO, J.C.P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p. 502–506, 2012.

KNORR, D. Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. **Food Technology**, v.47, n.6, p.156-161, 1993.

KREBBERS, B.; MATSER, A. M.; HOOGERWERF, S. W.; MOEZELAAR, R.; TOMASSEN, M. M. M.; VAN DEN BERG, R. W. Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.4, 377–385, 2003

LAVINAS, F. C.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice, **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 273-277, 2008.

LEITE, T. S.; AUGUSTO, P. E. D.; CRISTIANINI, M. The Use of High Pressure Homogenization (HPH) to Reduce Consistency of Concentrated Orange Juice (COJ). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.26, p.124-133, 2014.

LEITE, T. S.; DE JESUS, A. L. T.; SCHMIELE, M.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. High pressure processing (HPP) of pea starch: Effect on the gelatinization properties. **LWT - Food Science and Technology**, v.76, p.361-369, 2017.

LEITE, T.S.; AUGUSTO, P.E.D.; CRISTIANINI, M. Using High Pressure Homogenization (HPH) to Change the Physical Properties of Cashew Apple Juice. **Food Biophysics**, v.10, p.169–180, 2015.

LIBERTINO, L.; FERRARIS, D.; LÓPEZ OSORNIO, M.M.; HOUGH, G. Analysis of data from a free-listing study of menus by different income-level populations. **Food Quality and Preference**, v. 24, p. 269-275, 2012.

LIU, F.; WANG, Y.; LI, R.; BI, X.; LIAO, X. Effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on antioxidant activity, antioxidant compounds and color of mango nectars. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.21, 35–43, 2014.

LIU, S.; XU, Q.; LI, X.; WANG, Y.; ZHU, J.; NING, C.; MENG, X. Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical properties, enzymes activity, and antioxidant

capacities of anthocyanins extracts of wild *Lonicera caerulea* berry. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p.48–58, 2016.

LIU, F.; ZHANG, X.; ZHAO, L.; WANG, Y.; LIAO, X. Potential of high-pressure processing and high-temperature / short-time thermal processing on microbial, physicochemical and sensory assurance of clear cucumber juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.34, p. 51–58, 2016.

LOPEZ-SANCHEZ, P.; NIJSSE, J.; BLONK, H. C. G.; BIALEK, L.; SCHUMM, S.; LANGTON, M. Effect of mechanical and thermal treatments on the microstructure and rheological properties of carrot, broccoli and tomato dispersions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p. 207-217, 2011a.

LOZANO, J. E.; IBARZ, A. Thixotropic Behaviour of concentrated fruit pulps. **LWT - Food Science and Technology**. v.27(1), p.16-18, 1994.

LUDIKHUYZE, L.; VAN LOEY, A.; DENYS, I.S.; HENDRICKX, M. E. Effects of high-pressure on enzymes related to food quality. In: **Ultra high pressure treatments of foods**. New York: Springer. p.115–66, 2001.

LUDIKHUYZE, L.; VAN LOEY, A.; OEY, I.; HENDRICKX, M. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. In: Hendrickx MEG, Knorr D (eds) **Ultra high pressure treatments of foods**. Kluwer Academic, New York., 2002.

MAC FADDEN, J. **A produção de açaí a partir do processamento dos frutos do palmito (*Euterpe edulis Martius*) na Mata Atlântica**. 2005. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MAFART P, COUVERT O, GAILLARD S, LEGUERINEL I. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.107–13, 2002.

MARKAKIS, P. Stability of Anthocyanins in foods. In: **Anthocyanins in color foods**.

New York: Academic Press, 1982. 263 p.

MARKETS and MARKETS. HPP (High Pressure Processing) **Market by Equipment Type (Orientation, Vessel Size), Application (Meat, Seafood, Beverage, Fruit & Vegetable), Product Type (Meat & Poultry, Seafood, Juice, Ready Meal, Fruit & Vegetable) & Geography** - Forecast to 2018. 2013. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/hpp-market-1274.html>>. Acesso em: 11 de mai. 2017.

MARTÍN, M. F.S.; CÁNOVAS, G. V. B.; SWANSON, B. G. **Food Processing by High Hydrostatic**, 2002.

MARSZAŁEK, K.; MITEK, M.; SKĄPSKA, S. The effect of thermal pasteurization and high pressure processing at cold and mild temperatures on the chemical composition, microbial and enzyme activity in strawberry purée. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.27, p.48–56, 2015.

MATSER, A.M.; KNOTT, E.R.; TEUNISSEN, P.G.M.; BARTELS, P.V. Effects of high isostatic pressure on mushrooms. **Journal of Food Engineering**, v.45, p.11-16, 2000.

MATSER, A.M.; KREBBERS, B.; BERG, R.W.V.D; BARTELS, P.V. Advantages of High Pressure Sterilization on Quality of Food Products - **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p. 79-85, 2004.

MCINERNEY J. K.; SECCAFIEN C. A.; STEWART C. M.; BIRD A. R.. Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. **Innovative Food Science and Emerging Technologie**,. v. 8, p. 543 – 548, 2007.

MCMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N.; ROSS, T.; RATKIWSKY, D.A. **Predictive Microbiology: theory and application**. Taunton. Research Studies, p 1-86, 1993.

MCMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal Food Microbiology*, v. 78, p.133–153, 2002.

MEDINA-MEZA, I. G.; BOIOLI, P.; BARBOSA-CÁNOVAS G. V. Assessment of the effects of ultrasonics and pulsed electric fields on nutritional and rheological properties of raspberry and blueberry purees. *Food and Bioprocess Technology*, v.9 (3), p.520– 531, 2016.

MEDINA-MEZA, I. G.; BARNABA, C.; VILLANI, F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Effects of thermal and high pressure treatments in color and chemical attributes of an oil-based spinach sauce. *LWT - Food Science and Technology*, v.60(1), p.86–94, 2015.

MEEK, M.E. et al. Risk assessment practice for essential metals. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Washington, v. 73, n. 2, p. 253-260, 2010.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. Boca Raton: CRC Press. 218 p, 2004.

MENEZES, E. M. S.; ROSENTHAL, A.; SABAA-SRUR, A.; CAMARGO, L.; CALADO, V.; SANTOS, A. Efeito da alta pressão hidrostática na atividade de enzimas da polpa de açaí. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, p.14–19, 2008.

MENEZES, E.M.S. **Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. 2005. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

MERTENS-TALCOTT, S. U. RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; PACHECO-PALENCIA, L. A.; MEIBOHM, B.; TALCOTT, S. T.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açaí Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p.7796–7802, 2008.

MONTENEGRO, G.; PEREIRA, K. S.; MELO, L. The Brazilian Way to Consume acai: Do guarana Extract and Sugar Concentrations Influence on Acceptance? **Journal of Food Research**, v. 3, n. 1, p. 39–45, 2013.

MOR-MUR, M.; YUSTE, J. Microbiological Aspects of High pressure Processing. In: SUN, D. **Emerging Technologies for Food Processing**. 1. ed. United Kingdom: Elsevier, p.792, 2005.

MOHAMMAD, HD. Effectiveness of ultrasound on the destruction of *Escherichia coli*. **American Journal of Environmental Sciences**, (1), p.187–189, 2005.

MÙJICA-PAZ, H.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; TONELLO, C.; WELTI-CHANES, J.; TORRES, J.A. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. p.969-985, 2011.

MÜTFÜGIL, N. The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.36(9), p.877–880, 1985.

NASCIMENTO, R. J. S. DO; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30(2), p.498–502, 2008.

OEY, I. Effect of novel food processing on fruit and vegetable enzymes. In: 'Enzymes in fruit and vegetable processing: **Chemistry and Engineering Applications**', Ed.A. Bayindirli., CRC Press, Taylor & Francis Group, Florida, United States, p. 245-312, 2010.

OEY, I.; LILLE, M.; VAN LOEY. A.; HENDRICKX, M. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavor of fruit based food products: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p.320, 2008.

OGAWA, H. et al. Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in Satsuma mandarin juice: Effects of juice concentration, pH, and organic acids, and

comparison with heat sanitation. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1219–1225, 1990.

PALACIO, D. N. M. **Concentração de suco clarificado de açaí por osmose inversa**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 86p, 2008.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T. Chemical stability of açaí fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. **Food Chemistry**, v.118(1), p.17–25, 2010.

PALOU, E.; HERNÁNDEZ-SALGADO C.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G.; WELTI-CHANES, J. High pressure-processed guacamole. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, p. 69-75, 2000.

PASSMORE, R; NICOL, B.M.; RAO, M.N. **Manual sobre Necesidade Nutricionales del Hombre**. Genebre: O.M.S.; 1975 (série de monografias, 61). Disponível em <http://apps.who.int/iris/handle/10665/41420>. Acesso em: 11 de maio. 2017, 1975.

PATTERSON, M.F. A REVIEW: Microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p.1400–1409, 2005

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of termal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v 21, p. 3-11, 2010.

PATRAS, A., BRUNTON, N. P., GORMELY, T. R.; BUTLER, F. Impact of high pressure processing on antioxidant activity, ascorbic acid, anthocyanins and instrumental colour of blackberry and strawberry puree. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** , v. 10, n. 3, p. 308 - 313, 2009.

PAVAN, M. A. **Effects of freeze drying, refractance window drying and hot-air drying on the quality parameters of açaí**. Thesis submitted in partial fulfillment of

the requirements for the degree of Master of Science in Food Science and Human Nutrition in the Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Champaign, p.88, 2010.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M.F.; CARVALHO, A.P.; DOMINGUES, V.F.; GOMES, A.M., et al., Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v.172, p.462–468, 2015

PELEG, M., COLE, M.B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, p.353–380, 1998.

PEREZ-CACHO, P.R., MAHATTANATAWEE, K., SMOOT, J.M. AND ROUSEFF, R. Identification of sulfur volatiles in canned orange juices lacking orange flavor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.5761-5767, 2007.

PETTIPHER, G.L.; OSMUNDSON, M.E.; MURPHY, J.M. “Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks.” **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.185–189, 1997.

PLAZA, L.; MUÑOZ, M.; DE ANCOS, B.; CANO, M. P. Effect of combined treatments of high-pressure, citric acid and sodium chloride on quality parameters of tomato puree. **European Food Research and Technology**, v.216(6), p. 514–519, 2003.

PLAZA, L.; SANCHEZ-MORENO, C.; DE ANCOS, B.; CANO, M.P. Carotenoid content and antioxidant capacity of Mediterranean vegetable soup (gazpacho) treated by high-pressure/temperature during refrigerated storage. **Europe Food Research Technology**, v. 223, p. 210–215, 2006.

PLAZA, L.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE ANCOS, B.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O.; CANO, M. P. Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. **Food Science and Technology**, v.44, p.834-839, 2011.

POEJO, J. **Evaluation of Opuntia spp. Bioactive products as promising natural chemotherapeutical agents- an in vitro approach.** Dissertation presented at Faculdade de Ciência e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa to obtain master degree in Biotecnologia, supervisor by Doutora Ana Teresa Serra, Lisbon, 2011.

POF. **Pesquisa de Orçamentos Familiares – Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil 2008-2009**, IBGE, 2011.

POIANA, M. A.; MOIGRADEAN, D.; RABA, D.; ALDA, L. M.; POPA, M. The effect of long-term frozen storage on the nutraceutical compounds, antioxidant properties and color indices of different kinds of berries. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 8, n. 1, p. 54–58, 2010.

POJER, E.; MATTIVI, F.; JOHNSON, D.; STOCKLEY, C. S. The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12(5), p.483–508, 2013.

POLYDERA, A.C.; STOFOROS, N.G.; TAOUKIS, P.S. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstituted orange juice. **Journal of Food Engineering**, n.60, p.21-29, 2003.

POLYDERA, A. C.; STOFOROS, N. G.; TAOUKIS, P. S. Quality kinetics of pasteurized and high pressure processed fresh Navel orange juice: nutritional parameters and shelf life. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6, p.1-9, 2005.

PORRETTA, S.; BIRZI, A.; GHIZZONI, C.; VICIN, E. Effects of ultra-high hydrostatic pressure treatments on the quality of tomato juice. **Food Chemistry**, v.52, p. 35-41, 1995.

PRASAD, K.N.; YANG, B.; RUENROENGLIN, N.; JIANG, Y. Application of ultrasonication or high-pressure extraction of flavonoids from litchi fruit pericarp. **Journal of Food Process Engineering**, v.32, p. 828–843, 2009.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53: p. 4290-4302, 2005.

PRIOR, R.L.; GU, L.; WU, X.; JACOB, R.A.; SOTOUDEH, G.; KADER, A. A.; COOK, R. A. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. **Journal of the American College of Nutrition**, v.26:p,170–181, 2007.

PUPPO, C.; CHAPLEAU, N.; SPERONI, F.; LAMBALLERIEANTON, M. de; MICHEL, F.; AÑÓN, C.; ANTON, M. Physicochemical modifications of high pressure- treated soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1564-1571, 2004.

RAMASWAMY, H. S.; RIAHI, E.; IDZIAK, E. High-pressure destruction kinetics of *E. coli* (29055) in apple juice. **Journal of Food Science**,v. 68(5), p.1750–1756, 2003.

RAMOS, A. M.; IBARZ, A. Thixotropy of orange concentrate and quince puree. **Journal of Texture Studies**, v.29, p.313-324, 1998.

RAO, L.; GUO, X.; PANG, X.; TAN, X.; LIAO, X.; WU, J. Enzyme activity and nutritional quality of peach (*Prunus persica*) juice: effect of high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Properties**, v.17(6), p.1406–1417, 2014.

RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47(1), p. 69– 112, 2007.

RENDUELES, E.; OMER, M. K.; ALVSEIKE, O.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R.; PRIETO, M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v.44(5), p.1251-1260, 2011.

REZAIRE, A.; ROBINSON, J.C.; BEREAU, D.; VERBAERE A, SOMMERER, N.; KHAN, M.K.; et al., Amazonian palm *Oenocarpus bataua* ('patawa'): chemical and biological antioxidant activity – phytochemical composition. **Food Chemistry**, v.149:p. 62–70, 2014.

ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A.M. Polyphenol oxidase. **Oxidative enzymes in foods**. New York, p.217-273, 1991.

RICHARD-FORGET, F. C.; GAUILLARD, F. A. Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins , and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv . Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase : A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.8561(97), p.2472–2476, 1997.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2000.

ROGEZ, H.; AKWIE, S. N. L. T.; MOURA, F. G.; LARONDELLE, Y. Kinetic Modeling of Anthocyanin Degradation and Microorganism Growth during Postharvest Storage of Açaí Fruits (*Euterpe oleracea*). **Journal of Food Science**, v. 77(12), p.1299–1305, 2012.

ROSENTHAL, A.; MAC KEY, B.; BIRD, A. Effect of ultra-high pressure on fruit juices contaminant yeasts. **Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology**, (8), p.511–516, 2002.

ROSSO, V. V. DE; HILLEBRAND, S.; CUEVAS MONTILLA, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21(4), 291–299, 2008.

RUFINO, M. D. M.; ALVES, R. E., DE BRITO, E. S.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121(4), 996–1002, 2010.

RUFINO, M. S.M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; OLIVEIRA, M. S. P.; et al. Açaí (*Euterpe oleraceae*) “BRS Pará”: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, p. 2100–2106, 2011.

RUSELL BERNARD, H. Free listing. In H. Rusell Bernard (Ed.), **Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches** (4th ed., pp. 301–311). Lanham, MD: AltaMira Press, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; DE ANCOS B.; CANO, M. P. Impact of high-pressure and traditional thermal processing of tomato puree on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity. **Journal Science Food Agriculture**, v. 86, p. 171–179, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; DE ANCOS, B.; MARTÍN-BELLOSO, O.; CANO, M. P. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4403- 4409, 2005.

SAN MARTÍN, M.F.; BARBOSA-CÀNOVAS, G. V.; SWANSON, B.G. Food processing by high hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, n.6, p.627- 645, 2002.

SANT'ANNA, V., DAROIT, D. J. e BRANDELLI. Kinetic Stability Modelling of Keratinolytic Protease P45: Influence of Temperature and Metal Ions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3147-3152, 2010.

SANTOS, V. S. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como importante fonte de alguns elementos químicos essenciais potencialmente biodisponíveis e efeito neuroprotetor de seu extrato frente à neurotoxicidade do Manganês em astrócitos**. 2014, 114 p. Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2014.

SANTOS, B. A. DOS; CAMPAGNOL, P. C. B.; CRUZ, A. G.; GALVÃO, M. T. E. L., MONTEIRO, R. A.; WAGNER, R.; POLLONIO, M. A. R. Check all that apply and free listing to describe the sensory characteristics of low sodium dry fermented sausages: Comparison with trained panel. **Food Research International**, v.76, p.725–73, 2015.

SATO A. C. K.; CUNHA, R. L. Effect of particle size on rheological properties of jaboticaba pulp. **Journal of Food Engineering**, v.91, p.566–570, 2009.

SCHIEBER, A.; CARLE, R. Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: technological, analytical, and nutritional implications. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.416-422, 2005.

SCHULTZ, J. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açais de *Euterpe edulis* Martius e *Euterpe oleracea* Martius submetidos a tratamentos para sua conservação**. 2008. 50 p. Monografia (Trabalho de conclusão de curso – Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SENTANDREU, E; GURREA, M. C; BETORET, N; NAVARRO, J. L. Changes in orange juice characteristics due to homogenization and centrifugation. **Journal of Food Engineering**. v.105, p.241–245, 2011.

SERMENT-MORENO, V.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; TORRES, J.A.; WELTI-CHANGES, J. High- pressure processing: kinetic models for microbial and enzyme inactivation. **Food Engineering Reviews**, v.6, p.56–88, 2014.

SHALINI, G. R.; SHIVHARE, U. S.; e BASU, S. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. **Journal of Food Engineering**, v.85, p.147–153, 2008.

SHAO-QIAN, C.; LIANG, L.; SI-YI, P. Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual color of blood orange juice. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, p. 1992-1997, 2011.

SHOUQIN Z.; JUNJIE Z.; CHANGZHEN W. Novel high pressure extraction technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, p.471–474, 2004.

SILVA, F. V.M.; TAN, E.K.; FARID, M. Bacterial spore inactivation at 45 e 65 °C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. **Food Microbiology**, v. 32, p. 206-211, 2012.

SILVA, N., et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, J. L.; WEBER, G. Pressure Stability of Proteins. **Annual Review of Physical Chemistry**, v.44(1), p. 89–113, 1993.

SILVA, F. V. M.; GIBBS, P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. **Trends in Food Science & Technology**, v.12(2), p. 68-74, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144–153, 1965.

SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E.; LEA, P.; ENERSEN, G. Color stability of strawberry and black currant syrups. **Journal of Food Science**, v.57(1), p.172–177, 1992.

SMELT, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p.152–158, 1998.

SMELT, J. P.; HELLEMONS, J. C.; PATTERSON, M. Effects of high pressure on vegetative microorganisms. In: HENDRICKX, M. and KNORR, D. (Eds). **Ultra high pressure treatments of foods**. New York, United States: Kluwer Academic/plenum Publishers, p. 55-76, 2002.

SOUSA, M.A.C.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; PANTOJA, L. Suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): avaliação microbiológica, tratamento térmico e vida de prateleira. **Acta Amazônica**, v. 36, p. 483-496, 2006.

SOUTO, R. N. M. **Uso da radiação  $\gamma$ , combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. 2001. 95 p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

SOUZA, M. O.; SILVA, L. S.; MAGALHÃES, A, C. L. B.; FIGUEIREDO, B. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. The hypocholesterolemic activity of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition Research**, v. 32, p.976–984, 2012.

SULAIMAN, A.; SILVA, F.V.M. High pressure processing, thermal processing and freezing of ‘Camarosa’ strawberry for the inactivation of polyphenoloxidase and control of browning. **Food Control**, v. 33, p. 424-428, 2013

SULAIMAN, A.; SOO, M. J.; FARID, M.; SILVA, F. V. M. Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. **Journal of Food Engineering**, v.165, p.133–140, 2015.

SUTHANTHANGJAI, W.; KAJDA, P.; ZABETAKIS, I. The effect of high hydrostatic pressure on the anthocyanins of raspberry (*Rubus idaeus*). *Food Chemistry*, v. 90, p.193–197, 2005.

TADAPANENI, R.K., BANASZEWSKI, K., PATAZCA, E. et al. Effect of high-pressure processing and milk on the anthocyanin composition and antioxidant capacity of strawberry-based beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, p. 5795–5802, 2012.

TARANTOLA, A. **Inverse Problem Theory and Methods for Model Parameter Estimation**. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA, 2005.

TAUSCHER, B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, Heidelberg, v. 200, n. 1, p. 3-13, 1995.

TEDFORD, L. A.; SMITH, D.; SCHASCHKE, C. J. High pressure processing effects on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and  $\beta$ -lactoglobulin. **Food Research International**, v. 32, n. 2, p. 101–106, 1999.

TENENHAUS-AZIZA, F.; ELLOUZE, M. Software for predictive microbiology and risk assessment: a description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. **Food Microbiology**, v. 45, p. 290–299, 2015.

TEREFE, N.S.; MATTHIES, K.; SIMONS, L.; VERSTEEG, C. Combined high pressure- mild temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of strawberries (*Fragaria×ananassa*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 297–307, 2009.

TOKUŞOĞLU, Ö.; ALPAS, H.; BOZOĞLU, F.T. High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, 2, p. 250–258, 2010.

TOKUŞOĞLU, Ö.; DOONA, C. J. High Pressure Processing Technology on Bioactives in Fruits & Cereals. in: *Fruit and Cereal Bioactives: Sources, Chemistry & Applications* (eds. Ö. Tokuşoğlu, C. Hall). Chapter 21 – Part IV. **Functionality, Processing, Characterization and Applications of Fruit & Cereal Bioactives**, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, ISBN: 9781439806654; ISBN-10:1439806659, p. 459, 2011a.

TOKUŞOĞLU, Ö.; DOONA, C. J. **High Pressure Processing [HHP] Strategies on Food Functionality, Quality and Bioactives: Biochemical and Microbiological**

**Aspects.** Nonthermal Processing Division Workshop 2011, October 12–14, Osnabrück, Germany, 2011b.

TONELLO, C. Case Studies on High-Pressure Processing of Foods. **Nonthermal Processing Technologies for Food**, p. 36–50, 2011.

TONON, R. V.; ALEXANDRE, D.; HUBINGER, M. D.; CUNHA, R. L. (2009). Steady and dynamic shear rheological properties of açai pulp (*Euterpe oleraceae* Mart.). **Journal of Food Engineering**, v. 92(4), p.425-431, 2009.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43(3), p. 907–914, 2010.

TORRES, B.; TIWARI, B. K.; PATRAS, A.; CULLEN, P. J.; BRUNTON, N.; O'DONNELL, C. P. Stability of anthocyanins and ascorbic acid of high-pressure-processed blood orange juice during storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.12, p. 93–97, 2011.

TORREZAN, R. Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de micro-organismos em produtos cárneos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21 , n. 2, p. 249-266, 2003.

TRIBST, A.A.L.; SANT'ANA, A.S.; MASSAGUER, P.R. Review: microbiological quality and safety of fruit juices: past, present and future perspectives microbiology of fruit juices. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p.310–339, 2009.

TRIBST, A. A. L.; LEITE JÚNIOR, B. R. D. C.; DE OLIVEIRA, M. M.; CRISTIANINI, M. High pressure processing of cocoyam, Peruvian carrot and sweet potato: Effect on oxidative enzymes and impact in the tuber color. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 302-309, 2016.

UNDERHILL, S.; CRITCHLEY, C. Cellular Localisation of Polyphenol Oxidase and Peroxidase Activity in Litchi chinensis Sonn. Pericarp. **Functional Plant Biology**, v.22, p. 627–632, 1995.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Composition of Foods Washington, 1963.

USDA. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. **Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods**, Release 2. Beltsville, MD, USA: Nutrient Data Laboratory, 2010.

VALERO, E.; VARON, R.; GARCIA-CARMONA, F. Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes. **Journal of Food Science**, v. 53(5), p.1482–1485, 1988.

VALLONS, K.J.R.; ARENDT, E.K. Effects of high pressure and temperature on the structural and rheological properties of sorghum starch. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.449–456, 2009.

VÁMOS-VIGYAZO, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.15, p.49-127, 1981.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Kinetic Modeling of Reactions in Foods**. CRC Press, Boca Raton, FL, 2009.

VAN HET HOF, K. H.; BROUWER, I. A.; WEST, C. E.; HADDEMAN, E.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; VAN DUSSELDORP, M., et al. Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of beta-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p. 261–268, 1999.

VAN HET HOF, K. H.; WEST, C. E.; WESTSTRATE, J. A.; HAUTVAST, J.G. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **Journal of Nutrition**, v.130, p.503–506, 2000.

VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, F. M.; SPAANSEN, C. H.; PILNIK, W. Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 4, p. 969– 972, 1980.

VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40(6–8), p.501–507, 2002.

VIDAL, A.; ANDRADE WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; PAVAN, R.; LIMA,A.; FALLARERO, A.; BATISTA, A. E.; MANCINI-FILHO,J. Actividad antioxidante y polifenoles de lãs algas marinas Halimeda opuntia y Halimeda monile. **Ars;Pharmaceutical.**, v. 50, n.1, p. 24-31, 2009.

WADA, Y.; MIZOGUCHI, H. New insertion sequence in *Lactobacillus fructivorans* strains isolated from spoiled sake. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.103, p.399–405, 2007.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins. **Advances in Nutrition**, v. 6(5):p. 620–622. 2015.

WALKER, J.R. Enzymatic browning in fruits: its biochemistry and control. In C.Y. Lee, & J.R. Whitaker (Eds.), **Enzymatic browning and its preservation**. Washington, DC: American Chemical Society. p. 8-22, 1995.

WANG, L.; LIM, E.-J.; TOBOREK, M.; HENNIG, B. The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell activation. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 57(10), p.1328–39, 2008.

WANG, B.S.; LI, B.S.; ZENG, Q.X.; HUANG, J.; RUAN, Z.; ZHU, Z.W.; LI, L.I.N. Inactivation kinetics and reduction of *Bacillus coagulans* spore by the combination of high pressure and moderate heat. **Journal of Food Process Engineering**. v.32, p.692– 708, 2009.

WEBER, F.; LARSEN, L. R. Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. **Food Research International**, v. 100, n. 3, p. 354–365, 2017.

WEEMAES, C. A.; LUDI KHUYZE, L. R.; BROECK, I. VAN DEN; HENDRICKX, M.E. Kinetics of Combined Pressure-Temperature Inactivation of Avocado Polyphenoloxidase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.60 (3), p. 292–330, 1998a.

WEEMAES, C.; LUDI KHUYZE, L.; BROECK, I. VAN DEN; HENDRICKX, M. High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases. **Journal of Food Science**, v. 63(5), p. 1–5, 1998b.

WEEMAES, C. A.; LUDI KHUYZE, L. R.; BROECK, I. VAN DEN; HENDRICKX, M.E. Influence of pH, benzoic acid, glutathione, EDTA, 4-hexylresorcinol, and sodium chloride on the pressure inactivation kinetics of mushroom polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3526–3530, 1999.

WEIBULL, W. A statistical distribution function of wide applicability. **Journal of Applied Mechanics**, v. 18, p.293–297, 1951.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. A classification of models in predictive microbiology- a reply to K.R. Davey. **Food Microbiology**, v.10, p.175-177, 1993.

WHITAKER, J. R. Enzymes: Monitors of food stability and quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p.94–97, 1991.

WISOTZKEY, J.D., JURTSUK, P., FOX, G.E., DEINHARD, G., PORALLA, K. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 263 - 269, 1992.

WOLBANG, C. M.; FITOS, J. L.; TREEBY, M. T. The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 196–200, 2008.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 423-428, 2005.

WU, X. et al. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). **Food Chemistry**, v. 129, p.443– 453, 2011.

WUYTACK, E. Y.; BOVEN, S.; MICHIELS, C. W. Comparative study of pressure induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64(9), p.3220-3224, 1998.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIEL, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.205-212, 2002.

YAMAGUCHI, K. K. D. L.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. 2015). Amazon açai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v.179, p.137–151, 2015.

YEUM, K. J.; RUSSELL, R. M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p. 483–504, 2002.

YUYAMA, L. K. O., AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. F.; YUYAMA, K.; JESUS VAREJÃO, M. DE, FÁVARO, D. I. T.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v.41(4), p.545–552, 2011.

ZABETAKIS, I.; LECLERC, D.; KAJDA, P. The effects of high hydrostatic pressure on the strawberry anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2749–2754, 2000

ZHANG S., XI J., WANG C., High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.80, p.50–54, 2005.

## Anexos

### Anexo 1: Ficha de avaliação sensorial

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Amostra: \_\_\_\_\_

1) Por favor, avalie a Cor da amostra codificada de polpa de açaí (apenas olhando) e marque na escala abaixo a sua opinião:

- Extremamente mais escuro do que o ideal
- Muito mais escuro do que o ideal
- Moderadamente mais escuro do que o ideal
- Ligeiramente mais escuro do que o ideal
- Ideal
- Ligeiramente menos escuro do que o ideal
- Moderadamente menos escuro do que o ideal
- Muito menos escuro do que o ideal
- Extremamente menos escuro do que o ideal

2) Por favor, avalie a amostra codificada de polpa de açaí e marque nas escalas abaixo o quanto você gostou da amostra em relação à impressão global, aparência, aroma, sabor e textura.

Impressão Global	Aparência	Aroma	Sabor	Textura
<input type="checkbox"/> Gostei extremamente				
<input type="checkbox"/> Gostei muito				
<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente				
<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente				
<input type="checkbox"/> Indiferente				
<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente				
<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente				
<input type="checkbox"/> Desgostei muito				
<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente				

3) Indique com um X a sua opinião quanto à intenção de compra:

- CERTAMENTE COMPRARIA   
  PROVAVELMENTE EU COMPRARIA   
  TENHO DÚVIDAS SE COMPRARIA   
  PROVAVELMENTE NÃO COMPRARIA  
 CERTAMENTE NÃO COMPRARIA

**Anexo 2:** Questionário

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

Idade: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ (ex: região em que nasceu)

Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

**Escolaridade:**

( ) Ensino Fundamental

( ) Ensino Médio

( ) Ensino Superior

( ) Ensino Superior Incompleto

( ) Pós-graduação

**Costuma consumir polpa de açaí?**

( ) Sim ( ) Não

**Caso afirmativo, qual a frequência?**

( ) Diariamente ( ) Semanalmente ( ) Mensalmente ( ) Anualmente

**Como prefere consumir polpa de açaí? (Pode marcar mais de uma opção):**

( ) Pura ( ) Com adicionais (ex.: xarope de guaraná, cereais, frutas)

( ) Congelada ( ) Refrigerada

Outra: \_\_\_\_\_

**Características que observa no momento da compra de polpa de açaí?**

( ) Marca ( ) Preço ( ) Data de validade ( ) Informação nutricional

Outros: \_\_\_\_\_

**Você acha importante para sua saúde consumir polpa de açaí pasteurizada?**

( ) Sim ( ) Não

OBS: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Anexo 3: Free listing**

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

**FREE LISTING – POLPA DE AÇAÍ**

Você está recebendo 6 amostras de **polpa de açaí**. Para cada amostra, individualmente, observe a **aparência**, o **aroma**, o **sabor**, a **cor** e experimente as amostras na ordem em que elas estão sendo fornecidas. Em seguida, escreva todos os atributos sensoriais que melhor descrevem as amostras em sua opinião. **Evite termos afetivos, ou seja, tente ser o mais específico possível na sua resposta.**

**Anexo 4:**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**TÍTULO DO PROJETO**

Processamento de Polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) por Tecnologia de Alta Pressão Isostática

**RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA E PELA APRESENTAÇÃO DO TCLE**

Ana Laura Tibério de Jesus e Marcelo Cristianini.

Número do CAAE: 58564116.3.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:**

Os consumidores têm buscado cada vez mais alimentos que contribuam para sua saúde, o que, aliado à grande oferta de produtos no mercado, leva ao aumento no consumo de frutas *in natura*, sucos e derivados. Estes produtos aliados à prática de exercícios físicos podem conferir benefícios à saúde. Da mesma forma, o consumo de alimentos que apresentem compostos bioativos, com potencial antioxidante e compostos fenólicos contribuiria para a redução do risco de uma série de doenças, reforçando o conceito de alimentos com apelo saudável, buscado pelo consumidor. Na literatura são escassos os estudos sobre análise sensorial em polpa de açaí processada por alta pressão isostática (API). Neste projeto será avaliada a aceitação sensorial de polpa de açaí processada por API.

**PROCEDIMENTOS:**

Para participar do teste você deve ser consumidor de açaí. Primeiramente será entregue um questionário para avaliar a frequência de consumo de açaí. Em seguida, será avaliada a aceitação de amostras de polpa de açaí utilizando uma escala de 9 pontos (variando de 1 = desgostei extremamente, a 9 = gostei extremamente). Serão atribuídas notas para aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. Na mesma ficha de avaliação será perguntada a intenção de compra do produto (escala de 1 a 5). O tempo estimado para realização do teste é de aproximadamente 10 minutos.

**DESCONFORTOS E RISCOS PREVISÍVEIS:**

Você **não** deve participar deste estudo se possuir algum tipo de restrição ou alergia a açaí. Não há riscos previsíveis para quem for participar da pesquisa. Os voluntários terão garantia de sigilo durante toda a pesquisa e poderão deixar de participar dos testes sensoriais a qualquer momento, não havendo ônus ao voluntário.

**BENEFÍCIOS:**

Os benefícios principais seriam decorrentes dos nutrientes presentes na polpa de açaí como vitaminas, minerais e compostos bioativos.

**ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:**

Em caso de necessidade, os pesquisadores se comprometem a providenciar intervenção médica ou nutricional por eventuais problemas que venham a apresentar resultante da ingestão das amostras da pesquisa.

**SIGILO E PRIVACIDADE:**

Você terá a garantia de que a sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

**RESSARCIMENTO:**

Não haverá ressarcimento ou remuneração financeira pela participação na pesquisa, uma vez que o estudo será conduzido durante a rotina de trabalho/estudo do participante. Você terá a garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

**CONTATO:**

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Ana Laura Tiberio de Jesus, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Rua Monteiro Lobato, 80 – Campinas – SP – CEP: 13083-862, Tel: (19)3521-0226, e-mail: [analauratj@hotmail.com](mailto:analauratj@hotmail.com).

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br).

**O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).**

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:**

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: \_\_\_\_\_

Contato telefônico: \_\_\_\_\_

e-mail (opcional): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

**RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

(Assinatura do pesquisador)

**Anexo 5**

5835913418887473

**AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO PARA FINS DE PEQUISAS CIENTÍFICA nº 010618/2015-5**

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

**Instituição:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

**CNPJ:** 460.684.250/0001-33

**Representante Legal:** GLAUCIA MARIA PASTORE

**Cargo/Função:** Pró-Reitora de Pesquisa

**CPF:** 602.929.038-04 **RG:** 54628908

**Projeto:** Processamento de Polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* Martius) por Tecnologia de Alta Pressão Isostática

**Coordenador do Projeto:** Marcelo Cristianini

**CPF:** 068.753.098-90 **RG:** 104644916 - SSP / SP

**Finalidade do projeto:** O açaí (*Euterpe oleracea* Martius) é um fruto que apresenta importante contribuição econômica ao Brasil, principalmente para as regiões norte e nordeste. O consumo da polpa de açaí é crescente, tanto nas regiões Sul e Sudeste, como no mercado internacional, devido ao seu importante valor nutricional e a grande quantidade de compostos bioativos, dentre eles as antocianinas. Por ser uma fruta altamente perecível, o açaí necessita de tratamentos que prolonguem sua vida de prateleira, inativando as enzimas naturalmente presentes e micro-organismos deteriorantes e patogênicos. O tratamento térmico não é uma boa alternativa para o processamento deste fruto, uma vez que promove intensa modificação sensorial em compostos de cor e aroma e leva à perda de compostos bioativos. Neste contexto, este projeto propõe avaliar o efeito da tecnologia de alta pressão isostática (API) na inativação das principais enzimas presentes na polpa do açaí (polifenoloxidase, peroxidase), bem como em um micro-organismo patogênico (*Escherichia coli*) e um deteriorador termorresistente (*Alycyclobacillus acidoterrestris*), permitindo estabelecer parâmetros de processos adequados para que seja possível garantir a segurança microbiológica do produto e preservar as propriedades funcionais e sensoriais do fruto.

**Amostras a serem acessadas:**

Grupos Taxonômicos: *Euterpe oleracea* Martius

Tipo de material/quantidade de amostras: amostra comercial de polpa de açaí congelada: 40 kg

**Local de depósito de subamostra:** Banco Ativo de Germoplasma de Açaizeiro (*Euterpe* spp) - BAG-Açaí da Embrapa Amazônia Oriental/EMBRAPA

**Equipe do projeto:** MARCELO CRISTIANINI / CPF

068.753.098-90 ANA LAURA TIBERIO DE JESUS /

CPF 642.074.713-91

**Validade da Autorização:** 01/11/2015 a 01/11/2018

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico, para o endereço [apg@cnpq.br](mailto:apg@cnpq.br), em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010618/2015-5. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço [apg@cnpq.br](mailto:apg@cnpq.br), em formato .pdf.

Esta autorização não dispensa nem substitui quaisquer outras autorizações ou licenças por ventura exigíveis pela legislação vigente, seja federal, estadual ou municipal.

Brasília, 26 de agosto de 2015

Marcelo Marcos Morales

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

*Para visualizar a versão digital da Autorização, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 5835913418887473 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.*

### Anexo 6: Lista das publicações

Artigo 1: JESUS, A.L.T.; TRIBST, A.A.L.; CRISTIANINI, M. Alta Pressão Isostática: efeitos sobre enzimas, compostos bioativos e micro-organismos em frutas e vegetais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos** (Submetido).

Artigo 2: High isostatic pressure (HIP) in açai (*Euterpe oleracea* Martius): effect on the color and enzymatic inactivation of peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO). (Publicado: revista ***Food Research International***)

Artigo 3: Effects of high-pressure processing on the microbial inactivation and extraction of bioactive compounds from açai (*Euterpe oleracea* Martius) pulp (Será submetido: revista ***Innovative Food Science & Emerging Technologies***).

Artigo 4: Comparative effect of thermal and high pressure processing on rheological characteristics and sensory acceptance of açai pulp. (Será submetido: revista ***LWT - Food Science and Technology***)