

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM POLPA**  
**DE AÇAÍ PRÉ-CONGELADA (*Euterpe oleracea*, Mart.)**

**Ellen Mayra da Silva Menezes**

**2005**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM POLPA DE  
AÇAÍ PRÉ-CONGELADA (*Euterpe oleracea*, Mart.)**

**ELLEN MAYRA DA SILVA MENEZES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Amauri Rosenthal**

*e Co-orientação do Professor*

**Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Magister  
Scientiae** em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.

Seropédica, RJ  
Junho de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**ELLEN MAYRA DA SILVA MENEZES**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae**, em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ----/----/----

---

Amauri Rosenthal.  
Diretor (Ph.D.) Embrapa - Agroindústria de Alimentos  
(Orientador)

---

Armando U. O. Sabaa Srur.  
Professor Titular (Dr.) UFRRJ  
(Co-orientador)

---

Antônio Tavares da Silva.  
Professor Adjunto (Ph.D.) UFRRJ  
(Membro Suplente)

---

Maria Beatriz de Abreu Glória.  
Professor Adjunto (Ph.D.) UFMG  
(Membro Externo)

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico essa conquista aos meus queridos pais, Washington e Olga, que sempre me mostraram o imenso plano que é a vida, e que apesar das dificuldades, também me fizeram ver que não é impossível atingir nossos objetivos. Com enorme afeto, ofereceram-me, educação, caráter e amor. São os verdadeiros responsáveis por minhas realizações e pelo meu sucesso.*

*Ofereço essa ardorosa vitória, com todo o carinho, ao meu Lindo, Maurinho, pelo enorme incentivo e apoio ao longo dessa longa trajetória. Compartilho com você minha alegria.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me fez um pouco como é: criador. Obrigada por ter-me dado força suficiente para conter e agir. Obrigada Senhor, pela sabedoria, pela modéstia para aprender e por me fazer reconhecer meu poder, meus erros e meus deveres.

À minha família querida, meu pai, minha mãe e meu irmão, por todo o estímulo, apoio, confiança e dedicação para que eu continuasse caminhando e me guiasse pelo caminho mais sensato para a conclusão desta nova conquista em minha vida.

Ao Meu Lindo, por todo o amor, companheirismo e compreensão dedicados, diante de minha constante aflição e ansiedade, ao avanço deste glorioso obstáculo.

À minhas queridas tias, Tânia e Eliane, que me ajudaram muito, incentivando-me para que eu realizasse este sonho.

Ao meu querido Prof., Dr. Armando Sabaa Srur, por ter sido mais que um co-orientador, um amigo, por sua dedicação, apoio, incentivo, orientação e ensinamento, somando para que eu crescesse humana e profissionalmente.

Ao meu orientador, Dr. Amauri Rosenthal, pelo apoio, orientação e confiante credibilidade para a realização deste árduo trabalho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ e ao Instituto de Tecnologia/IT, pelas condições cedidas para a realização deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos – CTAA (EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos), pela gratificante oportunidade para o desenvolvimento de minha pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Capes, pela concessão da bolsa de estudos e credibilidade para a contribuição científica do país.

Aos colegas do Curso de Mestrado, pelos momentos de estudo, compartilhados em aula e em trabalhos. Em especial à amiga Cláudia, pela amizade e companheirismo nos momentos extremos de felicidade e do mais angustiante desespero, e a Jeane por ter me dado muito apoio ao longo desses anos.

À Zizi, Dr<sup>a</sup>. Lourdes Maria Camargo, pela amizade e atenção dedicadas, que muito iluminaram meu caminho com palavras de incentivo moral e ético para a realização deste sonho.

À Dr<sup>a</sup>. Verônica Calado, do Departamento de Engenharia Química da Escola de Química/UFRJ e ao Dr. Sérgio Saraiva, pesquisador da EMBRAPA, pelo extraordinário apoio no planejamento do experimento e ajuda na interpretação de meus resultados.

À estagiária Ana Cristina pelo ouvido amigo, sensibilidade, dedicação e grande apoio empenhado no desenrolar do meu trabalho, sem o qual seria inviável a realização deste.

À Rosires e Turma da Sensorial do CTAA, principalmente Lúcia e Aline, por terem me ajudado nas horas de desânimo, consolando-me e compartilhando experiências e dificuldades para continuar caminhando. Também ao Zé Carlos e à estagiária Priscila, pela enorme ajuda na realização das análises de cor.

Aos colegas da Planta II do CTAA, William e Filé, que sempre se puseram à disposição para me ajudar.

Aos colegas da Planta V, Dr<sup>a</sup>. Neide Botrel, Henriqueta, Mário e Marco que se mostraram sempre pacientes, tornando possível a realização das análises de antocianinas.

Aos colegas da ASA II, do laboratório de Microbiologia, Dr<sup>a</sup>. Regina Siqueira, Ivan, Rogério e Sr. Luís, pela concessão do apoio e do local para que fosse possível a realização das análises microbiológicas.

Aos colegas da ASA I, do laboratório de Físico-química, Dr<sup>a</sup>. Sidnéia de Freitas e sua equipe de trabalho pela possibilidade de ter realizado as análises de composição centesimal.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

## BIOGRAFIA

ELLEN MAYRA DA SILVA MENEZES, filha de Washington Jatobá de Matos Menezes e Olga Elí da Silva Menezes, nasceu na cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte, em 30 de novembro de 1979.

Em 1998, ingressou no curso de Nutrição, na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Durante o curso de graduação foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq e realizou pesquisas sobre vegetais minimamente processados, sob orientação do Prof. Armando Sabaa Srur, cujos resultados serviram de base para a apresentação de trabalhos em eventos científicos e a publicação de um artigo na *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Graduiu-se em dezembro de 2002 pela Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

Em fevereiro de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, onde sob orientação dos Doutores Amauri Rosenthal e Armando Sabaa Srur desenvolveu esse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1. Açaí .....	3
2.1.1. <i>Colheita e Pós-Colheita do Fruto Açaí</i> .....	6
2.1.2. <i>Processamento do Fruto</i> .....	7
2.1.3. <i>Degradação do Fruto e da Polpa</i> .....	8
2.1.3.1. <u>Microbiologia</u> .....	8
2.1.3.2. <u>Peroxidase e polifenoloxidase</u> .....	9
2.1.3.3. <u>Antocianinas</u> .....	13
2.2. Alta Pressão Hidrostática (APH) .....	16
2.2.1. <i>Alta Pressão Hidrostática (APH) e Microorganismos</i> .....	20
2.2.2. <i>Alta Pressão Hidrostática (APH) e Enzimas</i> .....	24
2.2.2.1. <u>Peroxidase</u> .....	26
2.2.2.2. <u>Polifenoloxidase</u> .....	26
2.2.3. <i>Alta Pressão Hidrostática (APH) e Nutrientes</i> .....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
3.1. Material .....	31
3.1.1. <i>Matéria-Prima</i> .....	31
3.1.2. <i>Aparelho de Alta Pressão Hidrostática</i> .....	31
3.2. Métodos .....	32
3.2.1. <i>Manuseio e Caracterização da Polpa de Açaí</i> .....	32
3.2.2. <i>Análises Microbiológicas</i> .....	33
3.2.2.1. <u>Contagem total padrão em placa</u> .....	33
3.2.2.2. <u>Contagem de fungos filamentosos e leveduras</u> .....	33
3.2.2.3. <u>Enumeração de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C</u> .....	33
3.2.2.4. <u>Detecção de Salmonella spp.</u> .....	34
3.2.3. <i>Composição Centesimal</i> .....	35
3.2.3.1. <u>Umidade</u> .....	35
3.2.3.2. <u>Sólidos totais</u> .....	35
3.2.3.3. <u>Cinzas (resíduo mineral fixo)</u> .....	35
3.2.3.4. <u>Lipídeos totais</u> .....	35
3.2.3.5. <u>Nitrogênio total e proteína bruta</u> .....	35
3.2.3.6. <u>Carboidratos e fibras</u> .....	35
3.2.4. <i>Análises Físico-Químicas</i> .....	36
3.2.4.1. <u>Acidez titulável</u> .....	36
3.2.4.2. <u>pH</u> .....	36

3.2.4.3. <u>Sólidos solúveis</u> .....	36
3.2.4.4. <u>Relação brix/acidez</u> .....	36
3.2.5. <u>Processamento de Alta Pressão Hidrostática (APH)</u> .....	36
3.2.5.1. <u>Delineamento experimental</u> .....	36
3.2.5.2. <u>Análises microbiológicas</u> .....	37
3.2.5.3. <u>Análises enzimáticas</u> .....	38
3.2.5.4. <u>Análises quantitativas de antocianinas</u> .....	39
3.2.5.5. <u>Análises de cor instrumental</u> .....	39
3.2.5.6. <u>Análises estatísticas</u> .....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Caracterização da Polpa de Açaí.....	41
4.1.1. <u>Análises Microbiológicas</u> .....	41
4.1.1.1. <u>Contagem total padrão em placa</u> .....	41
4.1.1.2. <u>Contagem de fungos filamentosos e leveduras</u> .....	41
4.1.1.3. <u>Enumeração de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C</u> .....	41
4.1.1.4. <u>Deteção de Salmonella spp.</u> .....	42
4.1.2. <u>Composição Centesimal</u> .....	43
4.1.3. <u>Análises Físico-Químicas</u> .....	44
4.2. <u>Processamento de Alta Pressão Hidrostática (APH)</u> .....	45
4.2.1. <u>Análises Microbiológicas</u> .....	45
4.2.1.1. <u>Redução microbiana de bactérias mesófilas</u> .....	45
4.2.1.2. <u>Redução microbiana de fungos filamentosos e leveduras</u> .....	48
4.2.1.3. <u>Número Mais Provável de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C</u> .....	49
4.2.1.4. <u>Deteção de Salmonella spp.</u> .....	50
4.2.2. <u>Análises Enzimáticas</u> .....	50
4.2.2.1. <u>Percentual de atividade da peroxidase</u> .....	50
4.2.2.2. <u>Percentual de atividade da polifenoloxidase</u> .....	53
4.2.3. <u>Análises Quantitativas de Antocianinas</u> .....	56
4.2.3.1. <u>Percentual de retenção de antocianinas</u> .....	56
4.2.4. <u>Análises de Cor Instrumental</u> .....	59
4.2.4.1. <u>Valor de diferença de cor (DE)</u> .....	59
5. CONCLUSÕES.....	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8. APÊNDICE.....	79
ANEXO I: Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para redução de bactérias aeróbias mesófilas.....	79
ANEXO II: Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para redução de fungos filamentos e leveduras.....	80
ANEXO III: Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para percentual de atividade da POD.....	80

<b>ANEXO IV:</b> Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para percentual de atividade da PFO.....	81
<b>ANEXO V:</b> Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para percentual de retenção de antocianinas.....	82
<b>ANEXO VI:</b> Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para valor de DE.....	83

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição da polpa de açaí segundo diferentes autores .....	4
<b>Tabela 2:</b> Perfil de ácidos graxos da polpa de açaí segundo diferentes autores .....	5
<b>Tabela 3:</b> Contaminação microbiana de polpas de açaí estudadas por diversos autores....	11
<b>Tabela 4:</b> Estrutura das antocianidinas encontradas em tecidos de plantas.....	15
<b>Tabela 5:</b> Produtos pressurizados comercializados no mundo .....	18
<b>Tabela 6:</b> Tempos de inativação por pressão de células vegetativas de alguns patógenos em diferentes substratos .....	21
<b>Tabela 7:</b> Variáveis de processo .....	36
<b>Tabela 8:</b> Delineamento experimental de 11 ensaios .....	37
<b>Tabela 9:</b> Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C/g de polpa de açaí grossa .....	42
<b>Tabela 10:</b> Composição centesimal da polpa de açaí .....	43
<b>Tabela 11:</b> Aspectos físico-químicos da polpa de açaí.....	45
<b>Tabela 12:</b> Análise de variância do modelo quadrático, para redução de bactérias mesófilas (Rm) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos. ....	46
<b>Tabela 13:</b> Efeito da alta pressão hidrostática sobre bactérias aeróbias mesófilas observado por diferentes autores .....	48
<b>Tabela 14:</b> Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C em polpas de açaí controles. ....	49
<b>Tabela 15:</b> Análise de variância do modelo quadrático para percentual de atividade da POD (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos .....	50
<b>Tabela 16:</b> Análise de variância do modelo quadrático para percentual de atividade da PFO (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos .....	53
<b>Tabela 17:</b> Análise de variância do modelo quadrático para percentual de retenção de antocianinas (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos .....	56
<b>Tabela 18:</b> Análise de variância do modelo quadrático para o valor de DE em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fluxograma da produção da polpa de açaí .....	7
<b>Figura 2:</b> Reação geral da enzima peroxidase .....	12
<b>Figura 3:</b> Formação de compostos intermediários durante a reação da peroxidase .....	12
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de ação da polifenoloxidase .....	13
<b>Figura 5:</b> Estrutura do cátion <i>Flavilium</i> .....	14
<b>Figura 6:</b> Equipamento de alta pressão hidrostática .....	32

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Valores previstos (linha) versus valores observados (pontos), com base no modelo quadrático, para redução de bactérias mesófilas ( $R_m$ ) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos .....	47
<b>Gráfico 2:</b> Médias das reduções de bactérias mesófilas ( $R_{m\text{média}}$ ) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos .....	47
<b>Gráfico 3:</b> Valores previstos (linha) versus observados (pontos), com base no modelo quadrático, para percentuais de atividade da POD (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.....	52
<b>Gráfico 4:</b> Médias dos percentuais de atividade da POD (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos. ....	52
<b>Gráfico 5:</b> Valores previstos (linha) versus valores observados (pontos), com base no modelo quadrático, para percentuais de atividade da PFO (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos. ....	55
<b>Gráfico 6:</b> Médias dos percentuais de atividade da PFO (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos. ....	55
<b>Gráfico 7:</b> Valores previstos (linha) versus valores observados (pontos), com base no modelo quadrático, para percentuais de retenção de antocianinas (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos .....	57
<b>Gráfico 8:</b> Médias dos percentuais de retenção de antocianinas (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos .....	57
<b>Gráfico 9:</b> Valores previstos (linha) versus observados (pontos), com base no modelo quadrático, para valores de DE em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.....	61
<b>Gráfico 10:</b> Médias dos valores de DE em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos .....	61

## LISTA DE SÍMBOLOS

AACC	American Association of Cereal Chemistry
ANOVA	Analysis Of Variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry
Ap	Apigenidina
AP	Alta Pressão
APH	Alta Pressão Hidrostática
Au	Aurantidinidina
Aw	Atividade de água
bar	Múltiplo da bária (10 <sup>6</sup> bárias)
BDA	Ágar Batata Dextrose
BG	Ágar verde brilhante
Cp	Capesinidina
CTAA	Centro Tecnológico de Agroindústria de Alimentos
Cy	Cianidina
DE	Diferença de cor
DOPA	3,4 – dihidroxi - fenilalanina
Dp	Delfinidina
DRI	Dietary Reference Intake
E. C.	Enzymology Classification
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Eu	Europinidina
F	Teste de Fischer
Hs	Hirsutinidina
IA	Ingestão Adequada
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IFT	Institute of Food Technology
K	Kelvin
LDL	Low Density Lipoprotein
Log	Logarítmico
LST	Lauril Sulfato Triptose
Lt	Luteonidina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPa	Megapascal
MS	Ministério da Saúde
Mv	Malvidina
NMP	Número Mais Provável
p	Valor de p
PCA	Ágar padrão para contagem
PFO	Polifenoloxidase
Pg	Pelargoidina
Pl	Pulchelidina
PME	Pectinametilesterase
Pn	Peonidina
POD	Peroxidase

Pt	Petunidina
PVPP	Polivinilpirrolidona
R <sup>2</sup>	Coefficiente de regressão
RDA	Recommended Dietary Allowance
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rm	Redução microbiana
SC	Caldo selenito-cistina
SS	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i>
t	Tempo
T °C	Temperatura
TT	Caldo tetracionato verde brilhante
UAP	Ultra Alta Pressão
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UHT	Ultra High Temperature
XLD	Ágar xilose lisina-desoxicolato
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
o	orto
$\rho$	para

## RESUMO

MENEZES, Ellen Mayra da Silva. **Efeito do processamento de Alta Pressão Hidrostática (APH) em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 83p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

O Brasil é considerado líder em produção e exportação de sucos de frutas. Esse setor está crescendo e conquistando novos mercados, atraídos principalmente pelos sucos e polpas de frutos tropicais e amazônicos, dentre eles o açaí. A bebida ou polpa de açaí é altamente energética, rica em lipídeos, fibras, vitaminas, minerais e contém significativa concentração de antocianinas. Porém, apresenta importante capacidade degradativa devido à normalmente elevada carga microbiana e às ações de suas enzimas. A exigência do consumidor na obtenção de produtos seguros microbiologicamente, com características próximas das originais e com longa vida de prateleira fez com que alavancassem novas tecnologias alternativas de conservação que mantivessem esse nível de qualidade, destacando-se a Alta Pressão Hidrostática (APH). O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da APH em polpa de açaí congelada, sobre parâmetros microbiológicos, enzimáticos, nutricional e sensorial, adotando delineamento experimental composto por combinações de três níveis de pressão (300, 400 e 500 MPa), temperatura (25, 30 e 35 °C) e tempo (5, 10 e 15 minutos). Inicialmente, polpas de açaí foram caracterizadas quanto à carga microbiológica, à composição centesimal e aos aspectos físico-químicos. Logo após a pressurização, foram realizadas análises microbiológicas de bactérias mesófilas aeróbias, fungos filamentosos e leveduras, e de coliformes a 45 °C. Análises enzimáticas de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO) foram feitas espectrofotometricamente e os resultados expressos em percentuais da atividade original. As análises quantitativas de antocianinas foram determinadas em espectrofotômetro e expressas em percentuais de retenção, e as análises de cor instrumental, em valores de diferença de cor (DE). A matéria-prima se apresentou dentro dos padrões de identidade e qualidade, embora estivesse acima dos limites microbiológicos exigidos pela legislação brasileira. A APH exerceu excelente efeito sobre fungos filamentosos, leveduras e bactérias da família *Enterobacteriaceae*, entretanto foi capaz de reduzir, no máximo, 4 ciclos log UFC de bactérias mesófilas aeróbias/g de polpa de açaí pressurizada. Em enzimas, tratamentos a 500 MPa, 25 °C por 5 e 15 minutos ativaram a PFO e todos os demais processos reduziram seu percentual de atividade. A POD apresentou maior estabilidade não sendo, qualquer processo, capaz de reduzir sua atividade. Efeitos de APH sobre antocianinas foram em geral minimamente negativos, com pequenas reduções dos percentuais de retenção decorrentes dos processamentos, exceto aquele a 300 MPa, 35 °C por 15 minutos, que as preservou como no produto original. Valores de DE não foram alterados após o processo, com exceção das polpas tratadas a 500 MPa, 25 °C, com valores de DE 32,53 e 13,22. Os resultados mostraram que essa tecnologia não convencional é capaz de produzir um produto seguro quanto à carga microbiológica, com parte de suas enzimas inativadas e com concentrações de pigmentos mantidas, sem alterar a cor do mesmo; porém, maiores investigações são sugeridas para otimizar a melhor condição de trabalho visando a atingir a polpa de açaí de melhor qualidade em todos os aspectos.

**Palavras chave:** Açaí, microbiologia, peroxidase, polifenoloxidase, antocianina.

## ABSTRACT

MENEZES, Ellen Mayra da Silva. **Effect of High Hydrostatic Pressure Processing (HHPP) in frozen assai pulp (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 83p. (Dissertation, Master Science in Food Science and Technology).

Brazil is considered the leader in producing and exporting fruit juices. This industry is increasing and conquering new markets, attracted specially, by tropical and Amazonian fruit juices and pulps, among them, the exotic assai. Such drink is greatly energetic, rich in lipids, fibers, vitamins, and minerals, and has significant anthocyanins concentration. However, it shows important degrading capacity due to its usual high microbiological load and enzyme activities. Consumer's demand to obtain microbiologically secure products, with characteristics close to original ones and with expanded shelf-life, has induced new preservation technologies that could maintain this quality, such as the High Hydrostatic Pressure (HHP). The aim of this study was to evaluate the HHP effect in assai frozen pulps, over microbiological, enzymatic, nutritional and sensorial parameters, using three level combinations of pressure (300, 400 and 500 MPa), temperature (25, 30 and 35 °C) and time (5, 10 and 15 minutes). Initially, assai pulps were characterized for its microbiology load, composition and physical-chemical aspects. Right after pressurization, microbiology analyses were done, including aerobics mesophils bacteria, molds and yeasts, and 45 °C coliforms. Enzymatic analysis of peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) were done in spectrophotometer, and the results expressed in activity percentage. Anthocyanins quantity analysis were determined in spectrophotometer and expressed in retention percentage, and instrumental color measurements in difference color value. Samples were within the identity and quality standardization, although its microbiology limits were over the Brazilian laws demand. HHP developed excellent effect on molds, yeasts and *Enterobacteriaceae* bacteria, thus it was able to reduce a maximum of 4 log aerobic mesophilic bacteria UFC/g pressured assai pulp. In enzymes, 500 MPa treatments, at 25 °C during 5 and 15 minutes activated PPO and all other processes reduced its activity percentage. POD has shown great stability where none of the processes were able to reduce its activity. HPP effects over anthocyanins were rather negative with retention percentage reductions after all treatments, except for 300 MPa at 35 °C during 15 minutes that has remained as the original product. DE values were not changed with the process, except for treated pulps at 500 MPa, 25 °C, with DE values 32,53 and 13,22. Results have shown that this non-conventional technology can be able to produce secure product regarding microbiology load, with part of its enzymes inhibited and with pigments concentration preserved, without altering the product color. However, further investigations are suggested to optimize the best working condition aiming to achieve an assai pulp of greater quality in all aspects.

**Key words:** Assai, microbiology, peroxidase, polyphenoloxidase, anthocyanin.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e na exportação de vários produtos agropecuários. É o terceiro pólo mundial de fruticultura, com uma produção anual de cerca de 38 milhões de toneladas. Em 2003, a produção de frutas promoveu um superávit de US\$ 267 milhões. Hoje, o mercado interno absorve 21 milhões de toneladas/ano e o excedente exportável é de cerca de 17 milhões de toneladas. Com uma fruticultura diversificada, o Brasil é considerado líder em produção e exportação de sucos de frutas. No ano passado, as exportações do setor alcançaram US\$ 1,25 bilhão, US\$ 1,2 bilhão em 2003 e 14,6% a menos em 2002, mostrando crescente a valorização desse importante agronegócio na esfera internacional.

A indústria de sucos no Brasil está crescendo gradativamente, passando de 120,185 milhões de litros vendidos em 2001, para 164,949 milhões em 2002, e 172,331 milhões de litros em 2003. Permanece conquistando novos mercados, principalmente, o externo, atraídos, em especial, pelos sucos e polpas de frutos tropicais e seus produtos derivados. Essa expansão tem proporcionado à agroindústria de frutas uma busca incessante para a obtenção de produtos com melhor qualidade nutricional e sensorial e com características mais próximas às dos *in natura*, e que ainda possuam vida útil longa.

Apesar do extrativismo, a Amazônia destaca-se por ser importante fornecedora de sucos e polpas. Sua fruticultura abrange grande número de espécies exóticas, largamente consumidas por habitantes da região e que já atingem outros estados e países, merecendo destaque o fruto do açaizeiro.

O açaizeiro (*Euterpe oleracea*, Mart.) é a palmeira mais produtiva do Estuário Amazônico. Seus frutos são amplamente comercializados para a produção de suco denominado “polpa de açaí”, ou simplesmente, “açaí”, alimento de rico valor energético e nutricional, por possuir significativo teor lipídico, antociânico e de fibras, além de outros importantes nutrientes.

Nas regiões produtoras, o açaí é comercializado normalmente à temperatura ambiente quando é imediatamente consumido, ou após certo período de refrigeração. Quando se destina a comércios distantes, a polpa é congelada, porém esse método de conservação promove ao alimento danos irreversíveis, como perdas vitamínicas, alterações reológicas e de cor, que modificam as propriedades originais. Modificar o processo de beneficiamento, adotando novas tecnologias que minimizem perdas nutricionais e sensoriais, é importante e necessário, como por exemplo, o uso de Alta Pressão Hidrostática, para assegurar maior estabilidade da polpa de açaí.

A Alta Pressão Hidrostática é uma tecnologia não convencional, que vem sendo pesquisada, principalmente no processamento de polpas de frutas, sucos e néctares. Nesse processo, o alimento é submetido a pressões isostáticas que variam de 100 a 900 MPa, com combinação ou não de elevação de temperatura. A Alta Pressão Hidrostática aplicada ao produto visa a inativar algumas enzimas e a destruir microorganismos prolongando a vida de prateleira do produto, embora modificações na textura sejam evidenciadas.

O objetivo do presente trabalho foi, inicialmente, caracterizar a polpa de açaí, quanto a sua carga microbiana, sua composição centesimal e suas características físico-químicas, e em seguida, avaliar o efeito do processamento de Alta Pressão Hidrostática

em polpas de açaí pré-congeladas e a ação simultânea das variáveis de processo, pressão, temperatura e tempo sobre parâmetros microbiológicos, enzimáticos, nutricionais e sensoriais, de maneira a promover uma melhor estabilidade geral do produto, mantendo suas características originais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Açaí

Dentre a rica flora da Amazônia, o açaizeiro destaca-se por ser a palmeira mais produtora desse Estuário. É uma árvore de porte médio, encontrada em solos de várzea, igapó e terra firme, sendo muito utilizada na produção de adubo orgânico, como vermífugo, na elaboração de artesanatos, e em especial, na alimentação humana. O palmito e os frutos, matéria-prima para a obtenção do açaí, bebida símbolo do estado do Pará, são os principais produtos, o Brasil se posiciona como o maior produtor, consumidor e exportador.

Entre os estados produtores, Pará, Maranhão, Amapá, Acre e Rondônia são os mais importantes, sendo que o Pará, sozinho, responde por 95% da produção de açaí, calculada em 100 mil toneladas por ano, e por 90% da produção nacional de palmito de açaizeiro, com a estimativa de 20 mil toneladas produzidas anualmente somente na cidade de Belém, segundo a Secretaria de Estado de Agricultura do Pará. No Rio de Janeiro, o mercado de açaí atinge 500 toneladas/mês, principalmente no verão; enquanto que em São Paulo os números são mais moderados (cerca de 150 toneladas/mês). No entanto, a tendência ainda é de crescimento, tanto no território nacional quanto no exterior, onde o açaí já é comercializado, especialmente Áustria, Alemanha, Estados Unidos e Japão (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MENDES, 2003).

O açaí é uma bebida de grande destaque na região norte do país, apresentando valor nutritivo significativo (Tabela 1). A bebida é classificada em três tipos diferentes de polpa, segundo os padrões de identidade e qualidade fixados na Instrução Normativa nº 01 de 07/01/2000: açaí grosso ou especial (tipo A), quando se tem mais que 14% de sólidos totais; açaí médio ou regular (tipo B), o mais consumido entre eles, com mais de 11% de sólidos totais, porém menos que 14%; e açaí fino ou popular (tipo C), possuindo entre 8 e 11% de sólidos totais (BRASIL, 2000). Essa classificação é bastante importante, pois esclarece a qual matéria-prima se refere os estudos reportados na literatura. Entretanto, nem todos os autores a mencionam, dificultando assim a comparação de muitos dados já pesquisados. Também são geradas dúvidas quando se menciona “açaí”, pois não se sabe ao certo se se faz referência ao fruto ou à bebida (polpa). Na verdade, essa bebida não é uma polpa, apesar de ser classificada como tal, mas sim um suco, pois o produto é obtido por esmagamento das partes comestíveis do fruto açaí, acrescido de água potável (BRASIL, 2003).

O açaí é um alimento altamente calórico devido ao alto percentual em matéria graxa, seu principal nutriente. A tabela 2 apresenta o perfil completo em ácidos graxos, esteróis, tocoferóis e tocotrienóis de suco e de polpa do açaí. Segundo ROGEZ (2000), o ácido oléico é o mais abundante (54,9%), seguido dos ácidos palmítico (25,9%) e linoléico, porém apresentando reduzido teor em ácido linolênico, que é indispensável (YUYAMA *et al.*, 2004). A polpa de açaí liofilizada possui uma fração

**Tabela 1:** Composição da polpa de açaí segundo diferentes autores.

Composição	TAVARES & COSTA (1936)	CHAVES & PECHNICK (1948)	INCAP (1961)	ALMEIDA & VALSECHI (1966)	ENDEF (1977)	ROGEZ (2000)	CARNEIRO* (2000)	SOUTO* (2001)	ALEXANDRE* (2002)
pH	-	-	-	5,9	-	-	5,1	-	5,2
Energia (Kcal/100g)	111,7	80	265	-	247	-	-	-	-
Matéria seca (%)	61,4	59,00	59,0	49,1	54,1	-	14,97	18,76	13,99
Proteínas (1)	5,70	5,73	5,76	9,6	7,02	10,05	1,4	1,75	1,5
Lipídios totais (1)	17,92	22,71	20,68	24,8	22,55	52,64	7,19	7,64	6,75
Açúcares totais (1)	0,65	20,37	20,68	24,5	36,41	2,96	3,58	2,37	0,5
Açúcares redutores (1)	-	-	-	19,4	-	-	-	-	-
Frutose (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose (1)	-	-	-	4,8	-	-	-	-	-
Fibras brutas (1)	74,59*	30,51	30,51	32,4	31,24	25,22	2,38	6,71	4,37
Cinzas (1)	1,14	2,12	2,03	3,6	2,77	-	0,42	0,29	0,43
Sódio (2)	-	-	-	69	-	76	-	-	-
Potássio (2)	-	-	-	1185	-	990	-	-	-
Cálcio (2)	-	-	-	241	2,18	309	-	-	-
Magnésio (2)	-	-	-	140	-	178	-	-	-
Ferro (2)	-	-	-	24	21,8	0,26	-	-	-
Cobre (2)	-	-	-	-	-	1,38	-	-	-
Zinco (2)	-	-	-	-	-	1,73	-	-	-
Enxofre (2)	-	-	-	112	-	-	-	-	-
Fósforo (2)	-	-	-	119	107	147	-	-	-
Vitamina C (2)	-	-	-	-	17	-	-	-	-
Vitamina B <sub>1</sub> (2)	-	-	-	-	0,67	0,25	-	-	-
Vitamina B <sub>2</sub> (2)	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-
Vitamina B <sub>3</sub> (2)	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-
α -tocoferol (2)	-	-	-	-	-	45	-	-	-

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

**Tabela 2:** Perfil de ácidos graxos da polpa de açaí segundo diferentes autores.

Origem	Belém suco(1)	Belém polpa(2)	Benjamin Constant polpa(3)	Parintins polpa(3)	Tabatinga polpa(3)	Ilha da Onças polpa(3)	Barcelos polpa (3)	Manaquiri polpa(3)
Ácidos graxos (% totais)								
C <sub>16:0</sub> (palmitico)	25,9	22	16,5	17,1	15,1	23	17,5	18,2
C <sub>18:0</sub> (esteárico)	1,6	2	3,1	1,3	6,3	1,3	3,7	2,5
C <sub>20:0</sub> (araquídico)	-	2,5						
C <sub>16:1</sub> (palmitolé.)	4,9	2	0,4	3,1	0,2	4,3	0,1	0,2
C <sub>18:1</sub> (oléico)	54,9	60	71,6	65,1	74,6	58,7	71,6	67,8
C <sub>18:2</sub> (linoléico)	11,5	12	6,3	11,6	2,0	11,0	5,4	8,5
C <sub>18:3</sub> (linolênico)	1,1	traços	0,8	1,3	1,0	0,7	0,7	1,7
Esteróis (% totais)								
Colesterol		2,0						
Campesterol		6,0						
Stigmasterol		6,5						
β Sitosterol		78,0						
δ5 Avenasterol		6,5						
Outros		1,0						
Tocoferóis (T) e Tocotrienóis (T3) (% totais)								
α T 100%*	45	67						
α T3 20%*		-						
β T 30%*		15						
γ T 15%*		1,3						
β T3 5%*		17						
γ T3 0%*		-						
δ T 0%*		-						

Legenda: \*= poder antioxidante; o símbolo - foi utilizado quando os componentes não puderam ser detectados; um espaço branco consta quando eles não foram determinados.

Fontes: (1) ROGEZ *et al.* (1996b) *apud* ROGEZ, (2000). (2) LUBRANO *et al.* (1994) *apud* ROGEZ (2000). (3) YUYAMA *et al.*, (2004)..

desses ácidos graxos bastante próxima do próprio fruto, no qual o C<sub>18:1</sub>, ácido graxo de valor essencial apresenta concentrações consideravelmente altas (52,70g/100g de açaí liofilizado), comparado ao insaturado linoléico, também de caráter essencial a alimentação humana, com apenas 0,95% (SABAA-SRUR *et al.*, 2004). O alto teor de ácidos graxos mono e poliinsaturados implica, certamente, na sua fácil oxidação, o que contribui sem dúvida para a rancificação rápida da bebida.

Essa bebida contém teores de proteínas e glicídeos assimiláveis (glicose, frutose e sacarose) relativamente baixos, 1,26 g/100 ml e 0,37 g/100 ml de açaí médio, respectivamente, devendo ser ressaltado que esses teores são insuficientes para suprir as necessidades dos consumidores. Porém, embora a concentração de açúcares redutores seja reduzida, as quantidades presentes são suficientes para promover a reação de *Maillard* com componentes nitrogenados da polpa, resultando na formação de polímeros marrons, as melanoidinas, quando submetidas a métodos de conservação que envolvem calor (BOBBIO & BOBBIO, 2001).

Em segundo lugar, na composição do açaí, após os lipídeos, estão as fibras alimentares, particularmente as insolúveis, que correspondem a 25,22% da matéria seca

em média, na qual encontram-se 3,15 g de fibras totais/100 ml de açaí médio (ROGEZ, 2000). A ingestão diária por indivíduo saudável, segundo a Ingestão Adequada (IA) da DRI (2002), é de 38 g/dia para homens e 21 - 25 g/dia para mulheres, sendo portanto 82,9% e 150 - 126% da recomendação, respectivamente, atingidos com 1 litro da bebida (YUYAMA *et al.*, 2004).

O açaí é considerado uma excelente fonte de vitamina E (tocoferóis), um importante antioxidante natural, que protege os lipídeos e inibe a formação de radicais livres. A quantidade total de  $\alpha$ -tocoferol presente no açaí é, aproximadamente, 45 mg/100 g de matéria seca (ROGEZ, 2000), ao passo que a recomendação diária de vitamina E é de 15 mg para o adulto (RDA, 2000).

Quanto aos minerais, o potássio e o cálcio são os mais abundantes no açaí, contendo cerca de 1185 mg de potássio e 241 mg de cálcio/100 g de matéria seca da polpa segundo ALMEIDA & VALSECHI (1966) *apud* ROGEZ (2000), e 932 mg de potássio e 286 mg de cálcio por 100 g de matéria seca da bebida açaí segundo ROGEZ *et al.* (1996) *apud* ROGEZ (2000). Diferentemente do que coloca a crença popular, o açaí não pode ser considerado como uma boa fonte de ferro, pois além desse mineral se encontrar na forma férrica (ou não-heme) contido somente em vegetais, esta é de menor biodisponibilidade no organismo (ANDERSON *et al.*, 1998), e apresenta valores médios de 2,6 mg de ferro/100 g de matéria seca (ROGEZ, 2000; YUYAMA *et al.*, 2002; YUYAMA *et al.*, 2004), estando muito aquém do recomendado por dia pela RDA (2001): equivalente a 18 mg para mulheres com idades entre 19 e 50 anos, fora de gravidez e 8 mg para homens na mesma faixa etária.

A cor intensa do açaí se deve, em grande parte, à presença de pigmentos naturais, denominados antocianinas (BOBBIO *et al.*, 2000; CONSTANT, 2003), pertencentes ao grupo dos flavonóides, que são potentes antioxidantes frequentes na dieta humana e, comprovadamente, capazes de melhorar a coordenação motora, a memória e a visão (JACKMAN & SMITH, 1996).

### **2.1.1. Colheita e Pós-Colheita do Fruto Açaí**

A frutificação do açaizeiro se dá a partir do terceiro ano, podendo ocorrer durante o ano inteiro (CALZAVARA, 1987). Existem dois períodos de produção: safra de inverno (correspondendo à estação das chuvas), que se estende de janeiro a junho, e safra de verão ou alta estação (estação mais seca), quando a produção é duas a três vezes maior que no inverno, além de apresentar frutos mais numerosos por cacho e nível de maturidade mais homogêneo (ROGEZ, 2000).

O processamento da polpa de açaí é apresentado na figura 1. A seguir são descritas as principais etapas do processo de produção da polpa de açaí.

A colheita, normalmente, é feita pela manhã, quando o caboclo, com auxílio de peçonhas, escala a palmeira e corta os cachos que são levados ao solo com cordas. Quando é possível, o coletor passa de uma palmeira para a outra sem voltar ao solo, já que o açazal é um aglomerado de centenas de açaizeiros.

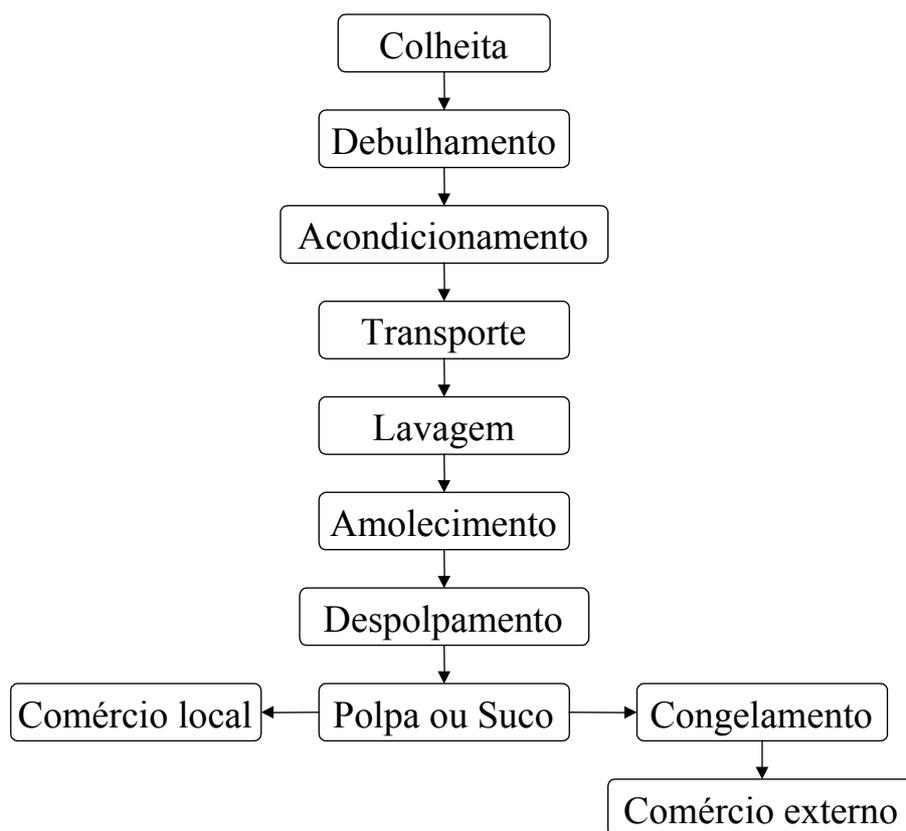
Após a colheita, os frutos são removidos manualmente das ráquias, sendo esta chamada a etapa de debulhamento. São acondicionados em paneiros confeccionados com fibras vegetais para serem transportados por via fluvial até seus locais de comercialização (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

### 2.1.2. Processamento do Fruto

Nos frutos do açazeiro, matéria-prima para polpa ou suco, representa apenas 5 a 15% do volume do fruto, havendo variação quanto ao cultivar e ao grau de maturação (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Segundo AGUIAR *et al.* (1980), a parte comestível do açai corresponde a aproximadamente, 6,7% do total do fruto.

O processo de fabricação da polpa se inicia com a colheita dos frutos maduros. Em seguida, são lavados em água clorada e depois imersos em água morna em temperatura que pode oscilar entre 25 e 60 °C, para promover o amolecimento da polpa e facilitar a sua remoção. O tempo de maceração dos frutos nessa água morna pode variar entre 10 e 60 minutos, em alguns casos chegando a até 12 horas, conforme o grau de maturação dos frutos, a variedade e a procedência.

O despulpamento, nas regiões mais carentes, normalmente é manual e realizado por mulheres chamadas de açazeiras. Os frutos são atritados em peneiras construídas com fibras vegetais, e com auxílio de água, o suco do açai é recolhido em bacias. O processo mais moderno, empregado nos centros mais desenvolvidos, utiliza máquinas ou despulpadeiras verticais, com formato cilíndrico, que possuem uma peneira no fundo e uma hélice acionada eletricamente, promovendo a remoção da polpa. A polpa e o suco



**Figura 1:** Fluxograma da produção da polpa de açai.

obtidos são, geralmente, acondicionados em sacos de polietileno que, depois de fechados são imediatamente comercializados e/ou submetidos ao congelamento para a venda.

### ***2.1.3. Degradação do Fruto e da Polpa***

Vários fatores pós-colheita influenciam diretamente a qualidade do fruto do açaizeiro. Desde a colheita, o fruto sofre danos físicos e é exposto a condições desfavoráveis à manutenção de suas características originais, o que o torna um produto altamente perecível e de fácil deterioração, podendo até atingir um tempo máximo de conservação, mesmo sob refrigeração, de 12 horas (SOUTO, 2001; ALEXANDRE *et al.*, 2004). Ao longo dessa cadeia, existem indicadores que refletem a qualidade do produto devido à ação de fatores ambientais, como as altas temperaturas e a baixa ou alta umidade relativa do ar, além de outros como a exposição ao oxigênio, a lesão dos frutos, a manipulação anti-higiênica, a má qualidade da água, etc. (KADER & BARRET, 1996).

Os fatores responsáveis por essas modificações são de natureza microbiana, enzimática e química, ocasionando reações de oxidação, redução dos teores de antocianinas e descoloração da polpa, alterando as características originais desse produto com conseqüente desvalorização sensorial.

#### **2.1.3.1. Microbiologia**

As condições microbiológicas dos produtos revelam a sanidade da matéria-prima ou o grau de contaminação da mesma (FRANCO & LANDGRAF, 1999). Um dos fatores responsáveis pela alta perecibilidade do açaí é a elevada carga microbiana (ALEXANDRE *et al.*, 2004), que se dá pela contaminação, ainda na colheita, através do solo, dos insetos, do vento, por danos nas cascas dos frutos, e através do manuseio do fruto durante a produção da polpa, por intermédio de utensílios, máquinas, água, manipulador, embalagens e transporte (BRACKET, 1997). Diante disso, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de melhorar a qualidade da polpa desse fruto.

A grande maioria das pesquisas aponta a polpa de açaí como sendo um produto de procedência comprometedor, uma vez que apresenta resultados microbiológicos além dos limites máximos de higiene fixados pela legislação brasileira. A Instrução Normativa nº 01 de 07 de janeiro de 2000, do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (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 de polpa *in natura*, seja congelada ou não, e o limite de  $2,0 \times 10^3$  UFC/g para polpa conservada quimicamente e/ou que sofreu tratamento térmico. Inclui também esse regulamento, o valor máximo de 1 NMP/g de polpa de coliforme fecal (a 45 °C) e ausência de salmonela em 25 g de polpa. A ANVISA, em 02 de janeiro de 2001, colocou em vigor a RDC nº 12 (BRASIL, 2001), que regulamenta padrões microbiológicos em alimentos, e, em especial para sucos e polpas, fixa o limite máximo de  $10^2$  NMP de coliformes fecais por g de polpa e ausência de salmonela em 25 g de produto.

Além das exigências legais, para melhor caracterização da carga microbiana de polpa de açaí, também devem ser realizadas determinações de bactérias mesófilas pois são comumente empregadas para indicar a qualidade sanitária de alimentos. Apesar da

legislação atual não utilizar esse procedimento para condenar um produto de frutas, um número elevado dessas bactérias indica que o alimento é insalubre, e mais, dentre esses organismos existem alguns que são patógenos. A deterioração de alimentos pode ser ocasionada pela presença de microorganismos, que podem alterar as características nativas refletindo no valor nutritivo e sensorial do produto. Para que essas alterações sejam detectáveis na maioria dos alimentos, são necessários números superiores a  $10^6$  UFC/g do alimento. Porém, ainda há aqueles em que são necessárias contagens maiores, da ordem de  $10^7$  ou  $10^8$  UFC/g (FRANCO & LANDGRAF, 1999).

Em alimentos ácidos e de baixa atividade de água, como em frutas frescas e vegetais, o crescimento de fungos e leveduras é mais evidente que o de bactérias, podendo ser os responsáveis pela deterioração dos mesmos (BRACKETT, 1997). São responsáveis também pela deterioração de sucos de frutas, quando armazenados em condições inadequadas, principalmente abaixo de 15 °C. A presença de fungos e leveduras pode se tornar um perigo à saúde pública, uma vez que muitos bolores são produtores de micotoxinas em alimentos, embora a deterioração por leveduras não seja prejudicial à saúde (FRANCO & LANDGRAF, 1999).

O grupo de coliformes a 35 °C é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que são encontradas em fezes e em outros ambientes como vegetais e solo, mas isso não indica necessariamente a contaminação fecal recente ou a ocorrência de enteropatógenos. Já pesquisas de coliformes a 45 °C nos alimentos, fornecem, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (FRANCO & LANDGRAF, 1999), por isso tanto a Instrução Normativa (MAPA), quanto a RDC (ANVISA) exigem limites de coliformes a 45 °C.

A tabela 3 apresenta a carga microbiana de polpas de açaí estudadas por diferentes autores, e observa-se que a maioria dos trabalhos identificou polpas impróprias para o consumo de acordo com os limites exigidos pela legislação brasileira vigente.

Em face da alta carga de bolores e leveduras em polpas de açaí, estudos foram conduzidos por ROGEZ *et al.* (1997) a fim de identificar os principais gêneros presentes e avaliar a diversidade dessa contaminação, já que esses bolores são produtores potenciais de micotoxinas. Mais de 20 gêneros de bolores filamentosos foram identificados, principalmente deuteromicetos, como os hiphomicetos e os coelomicetos. Entre os hiphomicetos, merecem destaque os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Sporothrix*, *Trichoderma*, *Trichosporiella*, *Trichosporon*; e, dentre os coelomicetos, os *Phoma*, *Phomopsis* e *Coniella*.

A carga microbiológica de polpas de açaí é bastante variável; suas alterações dependem do tipo de polpa (fina, média ou grossa), da região produtora (Pará, Amapá, Rondônia, etc.), da safra do ano (de inverno ou de verão), da indústria que despolda os frutos, entre outros aspectos. Na verdade, todas as etapas da sua produção podem ser consideradas pontos críticos de contaminação, sejam físicos ou microbiológicos.

### **2.1.3.2. Peroxidase e polifenoloxidase**

Além das alterações devidas à ação de microorganismos, a polpa de açaí também é modificada em função das enzimas presentes. Entre essas enzimas, as peroxidases (POD) e as polifenoloxidasas (PFO), presentes na maioria dos frutos e legumes, são importantes no processamento de produtos vegetais, já que participam de reações oxidativas, diretamente relacionadas com mudanças nas características sensoriais, tais

como *off-flavors*, alterações de cor e qualidade nutricional (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; CLEMENTE & PASTORE, 1998).

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) pertencem ao grupo das oxidoredutases amplamente distribuídas no reino vegetal, também encontradas nos tecidos animais e em microorganismos. Existem três grupos de peroxidases, dos quais dois contêm ferro como grupo prostético, que são as ferriprotoporfirinas e verdoperoxidases presentes em frutas e legumes; e o terceiro, das flavoproteínas, contendo o dinucleotídeo flavinadenina, apenas encontradas em animais e microrganismos (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Em frutos climatéricos, as concentrações de POD aumentam com o processo de maturação. Já nos não climatéricos, ocorre o contrário, há uma diminuição das mesmas (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

A POD decompõe-se em peróxidos de hidrogênio na presença de doador de hidrogênio. A reação geral de POD pode ser visualizada na figura 2. No decorrer dessa reação, compostos intermediários são formados (Figura 3).

As peroxidases possuem pouca especificidade para o doador de hidrogênio, no qual vários substratos podem servir de redutores, como os fenóis, as aminas aromáticas, as hidroquinonas e as aminas-hidroquinóides, especialmente os derivados benzidinas, com destaque de substratos cromógenos como o guaiacol (PÜTTER, 1974; MORALES-BLANCAS *et al.*, 2002), o-dianisidina (LOURENÇO & NEVES, 1997; HERNÁNDEZ *et al.*, 1997; CLEMENTE, 2002), o-fenilenediamina (PÜTTER, 1974), *p*-fenilenediamina (LÜCK (1965) *apud* ROGEZ, 2000; CANO *et al.*, 1997; HERNÁNDEZ & CANO, 1998; ROSENTHAL *et al.*, 2002a; DOMINGUES, 2003) e benzidina (SCHORMÜLLER, 1967 *apud* ROGEZ, 2000).

As PODs exercem importante papel fisiológico na natureza e no processamento de alimentos. Essas enzimas têm função na biossíntese de etileno, no balanço hormonal, na degradação de clorofila ou auxinas, na oxidação de fenóis, incluindo a biossíntese de lignina, na integridade da membrana e no controle da respiração, no amadurecimento e na senescência de vegetais (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; CLEMENTE & PASTORE, 1998). Também estão envolvidas na descoloração catalítica de antocianinas (KHAN & ROBINSON, 1993).

No processamento de alimentos, a POD está intimamente relacionada à formação de *off-flavors* em vegetais estocados e é largamente utilizada como índice de adequação de tratamentos térmicos, tais como o branqueamento e a pasteurização face à sua termorresistência. Podem também agir em temperaturas abaixo de zero e em condições de umidade muito baixas, como nos vegetais congelados (RICHARDSON & HYSLOP, 1985).

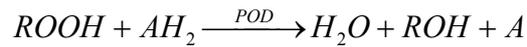
A polifenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) é outra enzima que está largamente distribuída no reino vegetal e animal, e em algumas bactérias e fungos (MAYER & HAREL, 1979; ZAWISTOWSKI *et al.*, 1991). Diferentes nomes têm sido associados incluindo tirosinase, creolase, catecolase, difenolase e fenolase. A Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica a enquadrou em duas categorias chaves, E.C. 1.14.18.1. – monofenol monoxigenase, também conhecida como tirosinase e E.C. 1.10.3.2. o-difenol:O<sub>2</sub> oxidoredutase (ZAWISTOWSKI *et al.*, 1991).

**Tabela 3:** Contaminação microbiana de polpas de açaí estudadas por diversos autores.

Autores	Bactérias mesófilas (UFC/g ou ml)	Fungos filamentosos e leveduras (UFC/g ou ml)	Coliformes a 35 °C (NMP/g ou ml)	Coliformes a 45 °C (NMP/g ou ml)	<i>E. coli</i> (NMP/g ou ml)	<i>Salmonella</i> (em 25 g ou ml)	<i>S. aureus</i> (UFC/g ou ml)
OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1988 (15 amostras de polpa)	10 <sup>6</sup> a 10 <sup>8</sup>	<b>5,0 x 10<sup>5</sup> a 6,0 x 10<sup>9</sup></b>	>2400	-	>1 (4)	<b>presença (2)*</b>	>100 (5)
VELOSO & SANTOS, 1994 (matéria seca)	10 <sup>7</sup> a 10 <sup>9</sup>		>1100	-	presença	<b>presença*</b>	presença
ROGEZ, 2000 (26 amostras de polpa)	1,1 x 10 <sup>5</sup> a 1,5 x 10 <sup>9</sup>	<b>2,3 x 10<sup>4</sup> a 8,3 x 10<sup>6</sup></b>	-	<b>&gt;1100*</b>	-	<b>presença (4)*</b>	-
CARNEIRO, 2000 (polpa média)	-	<b>1,1 x 10<sup>5</sup> fungos 3,8 x 10<sup>8</sup> leveduras</b>	0,04	ausência	-	ausência	-
SOUTO, 2001 (polpa grossa)	5,5 x 10 <sup>5</sup>	<b>8,13 x 10<sup>3</sup></b>	>140	<b>100*</b>	-	ausência	-
ALEXANDRE, 2002 (polpa média)	4,1 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>3</sup>	21	ausência	-	ausência	-

Resultados em **negrito** indicam amostras impróprias para o consumo segundo a Instrução Normativa n° 01, de 07/01/2000 do MAPA (BRASIL, 2000).

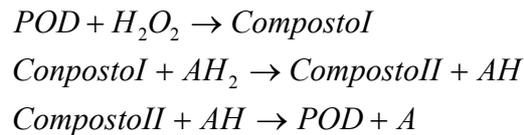
\* Resultados indicam amostras impróprias para o consumo segundo RDC n° 12, de 02/01/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001).



Onde

ROOH = acceptor de hidrogênio; R = H<sup>+</sup>, CH<sub>3</sub> ou C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; AH<sub>2</sub> = doador de hidrogênio na forma reduzida e; A = doador na forma oxidada.

**Figura 2:** Reação geral da enzima peroxidase (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).



**Figura 3:** Formação de compostos intermediários durante a reação da peroxidase (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

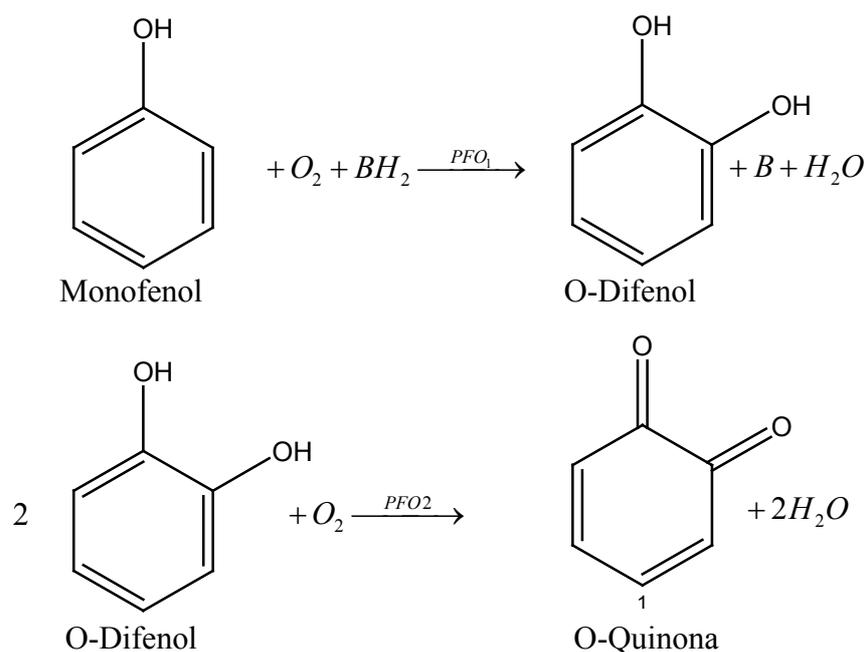
Em plantas, as PFOs estão localizadas nas células, variando conforme a espécie, o cultivar e a maturidade, dentro de cloroplastos, mitocôndrias, microsomas, peroxissomos e plasma celular. São conhecidas tanto a PFO solúvel, associada aos cloroplastos, quanto a PFO ionicamente ligada à membrana através de ligações peptídicas de aminoácidos não aromáticos (MAYER, 1996 *apud* ZAWISTOWSKI *et al.*, 1991; MARTINEZ & WHITAKER, 1995). A enzima contém entre um e quatro íons de cobre, de acordo com as espécies. Catalisa duas reações bem distintas em cadeia: (a) a hidroxilação dos monofenóis em o-difenóis e (b) a oxidação de o-difenóis em o-quinonas. As duas reações ocorrem na presença de oxigênio (Figura 4) (SANTOS, 2001).

Frutas e legumes possuem uma variedade de compostos fenólicos, parte serve como substrato para a PFO, dos quais os mais importantes são as catequinas, ésteres de ácido cinâmico, 3,4-dihidroxi fenilalanina (DOPA) e tirosina. Em tecidos vivos, o substrato fenólico e as enzimas estão separados dentro das células. Com a extração, ou outro tratamento que danifique a célula, a enzima e o substrato entram em contato, permitindo que reações ocorram rapidamente.

As o-quinonas, formadas durante a oxidação, são altamente reativas e reagem com outras quinonas, aminoácidos, peptídeos e proteínas, causando mudanças estruturais, sensoriais e funcionais (ESCIBANO *et al.*, 1997), como alterações de cor, para colorações marrons (SIDDIQ *et al.*, 1994); e de sabor, evidenciando adstringência, e diminuição do valor nutritivo dos produtos, como a oxidação da vitamina C, por apresentar potencial de oxirredução inferior e degradação de antocianinas (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). As antocianinas sozinhas não são substratos para essa enzima, mas podem ser oxidadas na presença de fenóis ou ácido clorogênico (SIDDIQ *et al.*, 1994). Reações não-enzimáticas também podem levar à descoloração de polifenóis, como, por exemplo, reações entre compostos nitrogenados e carboidratos (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; ESCIBANO *et al.*, 1997).

A PFO exerce importante papel na resistência de plantas contra infecções microbianas e virais, o que se explica pela formação de quinonas a partir da ação dessa enzima. As quinonas são submetidas a reações de polimerização secundárias, tornando polímeros escuros e insolúveis. Os tecidos impregnados com esses polímeros agem

como barreiras, não permitindo que a infecção se alastre pela planta (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).



$PFO_1$  – monofenol monooxigenase, tirosinase ou creolase.

$PFO_2$  – difenol oxidase, catecol oxidase ou catecolase.

**Figura 4:** Mecanismo de ação da polifenoloxidase (SANTOS, 2001).

As atividades enzimáticas da POD e PFO são extremamente variáveis quanto às condições de exposição em que as reações são submetidas durante a análise, sendo alteradas de acordo com o pH, temperatura, solução tampão, tipo e concentração de substratos ótimos para cada fonte específica (HOOVER, 1997).

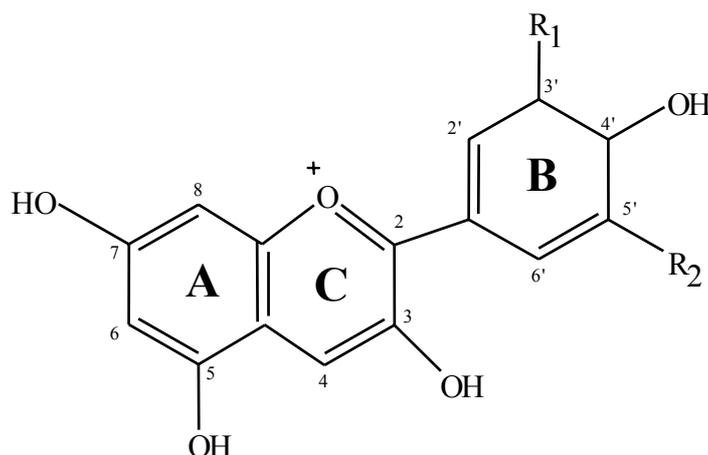
### 2.1.3.3. Antocianinas

As antocianinas são pigmentos solúveis em água, intensamente coloridos e amplamente distribuídos na natureza, que representam, juntamente com os carotenóides, a maior classe de substâncias coloridas do reino vegetal. São responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e as tonalidades da cor vermelha que aparecem em muitas flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. O termo antocianina é derivado das palavras gregas: *anthos*, flor e *kianos*, azul, as quais foram unidas por Marquart em 1835 para designar os pigmentos azuis das flores (MARKAKIS, 1982; JACKMAN & SMITH, 1996; EINBOND *et al.*, 2004).

As antocianinas fazem parte de um grande grupo de compostos orgânicos denominados flavonóides e apresentam a estrutura química básica  $-C_6-C_3-C_6-$ . Diferentemente dos outros flavonóides, as antocianinas são capazes de absorver luz fortemente na região do visível, conferindo uma infinidade de cores entre laranja, vermelho, púrpura e azul, dependendo do meio em que se encontrem (BROUILLARD, 1982).

Quimicamente pode-se definir antocianinas como glicosídeos de antocianidinas. São polidroxí e/ou polimetoxi derivados do 2-fenilbenzopirílium ou, cátion *flavilium* (Figura 5) (KONG *et al.*, 2003; HASSIMOTO *et al.*, 2004).

As diversas formas antociânicas encontradas diferem entre si pelo número de grupos hidroxilas e metoxilas presentes na aglicona, pela natureza, número e sítio de ligação de açúcares e pelo número e natureza de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados à molécula de açúcar (HUTCHINGS, 1994). Os açúcares mais comumente encontrados ligados a antocianidina são monossacarídeos como glicose, arabinose, galactose e rarnose (COULTATE, 1984). Di e trissacarídeos também podem ocorrer (KONG *et al.*, 2003), como a rutinose (L-rarnosil  $\alpha$ 1-6 D-glicose) e a sulforose (D-glicosil  $\beta$ 1-2 glicose) (COULTATE, 1984). Em muitos casos, os resíduos de açúcar são



**Figura 5:** Estrutura do cátion *Flavilium* (KONG *et al.*, 2003).

acilados por ácido *p*-cumárico, caféico, ferrúlico, malônico, *p*-hidroxibenzóico, oxálico, málico, succínico e acético (GROSS, 1987; MAZZA & MINIATI, 1993).

Existem 17 antocianidinas que ocorrem como agliconas nas antocianinas naturais, mostradas na tabela 4. Dentre as antocianidinas encontradas na natureza, apenas seis estão presentes nos alimentos: pelargonidina (Pg), cianidina (Cy), delfinidina (Dp), peonidina (Pn), malvidina (Mv) e petunidina (Pt), que variam entre si quanto ao número de hidroxilas e grau de metilação presentes no anel B (Figura 5) (GOIFFON *et al.*, 1999; LIMA & GUERRA, 2003; KONG *et al.*, 2003).

É bem conhecido que a cor das soluções de antocianinas depende de uma série de fatores como concentração, tipo de solvente, temperatura, pH, estrutura do pigmento, presença de substâncias capazes de reagir reversível ou irreversivelmente com a antocianina, etc. (CONSTANT, 2003).

O pH é certamente o fator mais importante no que diz a respeito à coloração das antocianinas. As antocianinas são estáveis e se encontram na forma colorida como o cátion *flavilium* apenas em soluções muito ácidas (GONNET, 1998; CABRITA *et al.*, 2000). A cor das antocianinas também é influenciada pelo tipo de estrutura química da molécula (MAZZA & MINIATI, 1993). A temperatura faz com que as antocianinas sejam destruídas, quando submetidas ao calor, durante o processamento e/ou estocagem de alimentos. A luz exerce efeito duplo sob os pigmentos, favorecendo a biossíntese, mas aumentando a velocidade de sua degradação. O oxigênio também apresenta efeito deletério sobre as antocianinas, acelerando sua degradação (MARKAKIS, 1982). As antocianinas também são facilmente descoloridas por reações enzimáticas, sendo

hidrolisadas ou oxidadas por antocianases ou catecolases com formação de produtos sem cor (GROSS, 1987; CEMEROGLU *et al.*, 1994; JACKMAN & SMITH, 1996; BOBBIO & BOBBIO, 2003).

**Tabela 4:** Estrutura das antocianidinas encontradas em tecidos de plantas.

Antocianidinas	Grupos de substituição							cor
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigenidina (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Aurantidinina (Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Laranja
Capesinidina (Cp)	H	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Violeta
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Vermelho alaranjado
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Violeta
Europinidina (Eu)	OH	OMe	H	OH	Ome	OH	OH	Violeta
Hirsutinidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Violeta
6-Hidroxicianidina (6OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	H	-	Vermelho
Luteonidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Laranja
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Violeta
5-Metilcianidina (5-MCy)	OH	OMe	H	OH	OH	H	-	Vermelho alaranjado
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Peonidina (Pn)	OH	OH	HH	OH	OMe	OH	H	Vermelho alaranjado
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Violeta
Pulchelinidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Violeta
Rosi	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Vermelho
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Vermelho

Fonte: FRANCIS, 1982; KONG *et al.*, 2003.

Algumas frutas como uva, framboesa, amora, ameixa, cereja e maçã têm sido estudadas extensivamente, e muitos dados já são disponíveis no que diz a respeito à composição da fração antociânica destes vegetais (CONSTANT, 2003). Recentemente, o açaí foi descoberto como importante fonte deste pigmento; desde então, passou a ser bastante estudado.

Quando o teor antociânico de açaí é mencionado na literatura, os dados divergem bastante entre si, 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 dos pigmentos também contribui para tamanha diferença, e ainda a ampla variabilidade da matéria-prima, especialmente, quanto à sazonalidade e à região produtora (CONSTANT, 2003).

CONSTANT (2003), analisando o teor total de antocianinas no fruto e na polpa, 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. Segundo OZELA (1997), o teor de antocianinas na polpa varia sensivelmente entre os frutos de safra e os frutos de entressafra, apresentando 926,1 e 356,7 mg/100 g de polpa, respectivamente. BOBBIO *et al.* (2000) obtiveram  $50 \pm 5$  mg de antocianina por 100 g de fruto, o que seria equivalente a 263 mg por 100 g de polpa, e as identificou como cianidina-3-arabinosídeo e cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo. Já IADEROZA *et al.* (1992) encontraram 336 mg de antocianina por 100 g de frutos e os mesmos tipos qualitativos que CONSTANT (2003).

Estudo de ROGEZ (2000) mostrou que as concentrações de antocianinas encontradas variaram de 71 e 1022 mg de antocianinas por 100 g de frutas. Estas variações, muito importantes entre amostras, chamaram atenção do autor. Com efeito, segundo essas variações registradas, os teores em pigmentos variaram de 34 a 702 mg por 100 g de açaí médio. Isso pode ser creditado à perecibilidade das antocianinas dessa polpa, muito susceptível à degradação, atentando para questões como tempo de colheita e do intervalo até o início da extração, que são de grande importância. Desta forma, poderão ocorrer variações significativas conforme o procedimento adotado, ou seja, se a determinação foi efetuada imediatamente após a colheita ou em algumas horas depois, se o fruto foi conservado sob refrigeração ou não, a forma como foi transportado e manuseado, etc. (CONSTANT, 2003).

Recentemente, diversos grupos de pesquisa sugerem a importância de frutas e legumes como uma dieta rica em antioxidantes. Estudos realizados com compostos fenólicos, em especial flavonóides, incluindo as antocianinas, demonstraram sua capacidade antioxidante e sua significativa contribuição na dieta. As antocianinas tornaram-se conhecidas por suas diversas propriedades farmacológicas e propriedades medicinais, incluindo anticarcinogênica, antiinflamatória e antimicrobiana, prevenindo a oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL), enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas (KUSKOSKI, 2002; ALASALVAR *et al.*, 2005).

A abundante disponibilidade de dados da literatura permite afirmar que, especialmente, a cianidina-3-glicosídeo, tem atividade antioxidante *in vitro*, geralmente superior a outros antioxidantes naturais (GALVANO *et al.*, 2004).

## 2.2. Alta Pressão Hidrostática (APH)

A indústria de alimentos em todo o mundo tem buscado mudanças visando ao aumento de produtividade e à melhoria de qualidade de produtos, de forma a fazer frente a mercados cada vez mais competitivos e a conquistar nichos mais específicos. Neste sentido, a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias alternativas de conservação, que propiciem a obtenção de produtos com melhores qualidades quando comparados aos processos envolvendo tratamentos térmicos, vêm sendo realizados em diversos países (ROSENTHAL & SILVA, 1997). Apesar da grande eficiência nas tecnologias tradicionais de conservação, o uso de altas temperaturas é comumente conhecido por causar mudanças nos produtos processados. Essas alterações indesejáveis afetam atributos nutricionais e sensoriais. Dessa forma, muitas vitaminas são degradadas, bem como pigmentos e substâncias aromáticas. A textura também pode ser afetada negativamente, em geral, tecidos vegetais amolecem e certos compostos químicos muitas vezes precisam ser adicionados para a manutenção da firmeza (CHEFTEL, 1995; PRÉSTAMO & ARROYO, 1998; SAN MARTÍN *et al.*, 2002).

A crescente demanda dos consumidores por alimentos mais naturais ou frescos fez com que novas formas de preservação fossem estudadas (BARBOSA-CÁNOVAS & RODRÍGUEZ, 2002) visando a minimizar perdas qualitativas de produtos, mantendo-os mais próximos do *in natura* e com uma vida-de-prateleira mais estável (MEYER *et al.*, 2000). Dentre essas tecnologias, destacam-se o tratamento ôhmico, o processamento por campos eletromagnéticos, a tecnologia de ultra-som, a irradiação ionizante, a esterilização por membranas e, em especial, a tecnologia de alta pressão (ROSENTHAL & SILVA, 1997; SANGRONIS *et al.*, 1997; BUTZ & TAUSCHER, 2002).

O processamento de Alta Pressão (AP), também referido como Ultra Alta Pressão (UAP) ou Alta Pressão Hidrostática (APH), tem sido aplicado há anos nas

indústrias que processam cerâmica, diamante, carbono-grafite, metal e plásticos. Entretanto, Hite (1899), há mais de um século, foi pioneiro ao estudar o efeito dessa tecnologia sobre microrganismos, submetendo o leite a pressões de 650 MPa e obtendo uma redução do número viável de organismos (WILLIAMS, 1994).

Nos últimos anos, o uso da APH na indústria de alimentos tem aumentado bastante, suprimindo as exigências dos consumidores, principalmente no Japão, que conta com uma grande variedade de produtos pressurizados no mercado (Tabela 5) (TEWARI *et al.*, 1999). As geléias pressurizadas apareceram no mercado japonês desde 1990, seguidas de gelatinas de frutas e molhos. Ainda no Japão, uma linha de produção foi desenvolvida para produtos à base de arroz. Após certo tempo, geléias e sucos também eram comercializados na Europa. Outros novos produtos estão, ainda em pequena escala, na França, Espanha e Estados Unidos (KNORR, 1999; BUTZ & TAUSCHER, 2002): purê de abacate temperado (*guacamole*), presunto (HEIJ *et al.*, 2003), iogurte, peixes e ostras (SIZER *et al.*, 2002). Nesse sentido, o processamento de APH vem sendo utilizado com o objetivo de promover a pasteurização de produtos, porém ainda não foi atingida a esterilização (MEYER *et al.*, 2000).

A tecnologia de Alta Pressão consiste em submeter alimentos líquidos ou sólidos, embalados ou não, a pressões da ordem de 100 a 900 MPa (10000 a 90000 bar) e em escala comercial, a sistemas entre 400 e 700 MPa, combinando ou não alterações de temperatura (SAN MARTÍN *et al.*, 2002). A temperatura, durante o processo, pode ser especificada menor que 0 °C, para minimizar qualquer efeito de calor adiabático, e acima de 100 °C para melhores efeitos de letalidade microbiana (FARKAS & HOOVER, 2000). O tempo de exposição pode variar desde alguns segundos até mais de 20 minutos (BUTZ & TAUSCHER, 2002). A combinação de pressão e temperatura é proposta com o intuito de aumentar a taxa de inativação de microrganismos durante o tratamento. Temperaturas na margem de 45 a 50 °C aumentam a taxa de inativação de patógenos e microorganismos deteriorantes. Já a 90 - 110 °C, com pressões a 500 - 700 MPa, bactérias formadoras de esporos, como *Clostridium botulinum*, podem ser inativadas. A maioria dos alimentos tratados por Alta Pressão hoje necessita de refrigeração após o tratamento (ANSTINE, 2003), de forma a aumentar a vida útil, o que se exemplifica pelos sucos de frutas, cujas vidas de prateleira alcançam 30 dias ou mais, a 4 °C (PELLETIER, 2001).

Seguindo as idéias de Hite (1899), Bridgman (1914) observou também o aumento de vida-de-prateleira dos produtos pressurizados, bem como mudança da estrutura terciária de proteínas e polissacarídeos. Além da destruição de microrganismos (SMELT, 1998), outros efeitos da pressão nos alimentos são esperados, como citado por Bridgman (1914), a desnaturação ou modificação protéica, ativação ou inativação enzimática, mudanças nas interações substrato-enzima e alterações nas propriedades de polímeros, carboidratos e gorduras (HEREMANS, 1995 *apud* BUTZ & TAUSCHER, 2002).

Dois princípios formam a base do efeito da AP: o princípio de *Le Chatelier* e o princípio da pressão isostática. O primeiro é aquele no qual 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, a pressão alterará o equilíbrio na direção do sistema de menor volume (CHEFTEL, 1995). O segundo indica que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea, através de uma amostra biológica. O processo de pressurização é, portanto, independente do volume e da forma da amostra, ao contrário do processo térmico; não sendo também tempo/massa dependente (BARBOSA-CÁNOVAS & RODRÍGUEZ, 2002).

**Tabela 5:** Produtos pressurizados comercializados no mundo.

Produto	Condições de processo	Mercado
Produto à base de frutas (pH < 4,5). Geléia de maçã, kiwi, morango e framboesa	400 MPa, 20 °C 30 min	Japão
Suco de pomelo	200 MPa 5 °C 10 - 15 min	Japão
Suco de mandarina	300 - 400 MPa 20 °C 2 - 3 min	Japão
Frutas tropicais saturadas com açúcar (mantidos a -18°C). Pedacos de abacaxi, mamão e mangas imersas no xarope de frutose	50 - 200 MPa	Japão
Presunto de porco cru (1/4 de NaCl)	250 MPa 20 °C 3 horas	Japão
Saquê cru	400 MPa	Japão
“Mochi” (bolinho de arroz) com 40% de água	400 MPa, 45 ou 70 °C, 10 min (dependendo do material cru)	Japão
Ervas aromáticas frescas	400 Mpa, 20 °C, 10 min	Japão
Arroz hipoalergênico pré-cozido Arroz marrom semi-pronto Arroz pré-cozido	400 MPa	Japão
Produtos de salmão	400 MPa 15 - 25 °C 10 min	Japão
Molho de abacate ( <i>guacamole</i> )	580 - 600 MPa 25 °C 5 - 10 min	EUA México
Presunto fatiado	400 MPa 17 °C 20 min	Espanha
Ostras	400 MPa 7 °C 10 min	EUA

Fonte: SUZUKI, 2002.

Então, tamanho, formato e composição de embalagem não são fatores na determinação do processo. No processo à AP, um líquido de baixa compressibilidade, como água, é utilizado (CHEFTEL, 1995; CAMPOS, 2003), embora também possam ser adotadas soluções hidroalcoólicas, óleo de linhaça (THAKUR & NELSON, 1998), óleo de silicone, benzoato de sódio e glicol. Na verdade, o que se sugere é um meio semelhante ao comportamento da amostra com relação à pressão e ao calor, como melhor exemplo, água ao se pressurizar sucos, pois nesse caso além da vantagem de ser mais seguro, é mais econômico (TING *et al.*, 2002).

Existem três tipos de processos básicos de tratamento com AP empregados nas várias indústrias (RAMOS *et al.*, 2003):

**pressão isostática a frio** – é essencialmente uma técnica usada na indústria de metal, cerâmica carbono-grafite e plásticos, sendo atualmente o processo de maior aplicação na indústria de alimentos. As pressões utilizadas industrialmente são da ordem de 50 a 600 MPa, dependendo do tipo de material, aplicadas à temperatura ambiente;

**pressão isostática a média temperatura** – é também uma técnica de moldagem na qual a pressão isostática é aplicada em combinação com temperaturas que variam entre 25 e 200 °C. Este tipo de método é utilizado para produtos onde ocorrem reações químicas durante a fase de compressão;

**pressão isostática a alta temperatura** – é um processo aplicado nas indústrias de metais e cerâmicas, onde o material é uniformemente aquecido e pressurizado. A temperatura utilizada chega a 2200 °C e a pressão varia de 100 a 400 MPa. O meio de compressão utilizado é um gás, como argônio, nitrogênio, hélio ou o ar.

No processamento isostático, o produto é embalado em garrafa ou bolsa plástica e colocado no interior do vaso de pressão (ou recipiente) para ser processado. Esse vaso contém um meio que transfere a pressão ao produto (PELLETIER, 2001). Experimentos demonstraram que qualquer embalagem com flexibilidade suficiente para compensar a compressão do ar dentro dela e a redução do volume do alimento (aproximadamente 12% a 400 MPa, ou até 15%) (FARKAS & HOOVER, 2000) pode ser adotada sem sofrer danos (FOOD MANUFACTURE, 1992). A energia mecânica da pressurização dentro do recipiente resulta em uma geração de calor moderada e temporária, chamada calor adiabático, onde a cada 100 MPa de pressão, a temperatura dentro do recipiente é aumentada de 3 a 9 °C, dependendo do sistema, que pode variar conforme a natureza do produto, a temperatura do processo e a pressão aplicada (FARKAS & HOOVER, 2000; ROVERE, 1995; BUTZ & TAUSCHER, 2002; ANSTINE, 2003; HEIJ *et al.*, 2003).

Durante o processamento, é necessário um tempo inicial para atingir a pressão de trabalho programada. Logo após o tempo de pressurização no nível desejado, o vaso de pressão é descomprimado (BARBOSA-CÁNOVAS & RODRÍGUEZ, 2002). A pressão cai bruscamente e o calor adiabático se dissipa. O alimento pressurizado é removido ou submetido a um novo tratamento em série. Processos em sistemas contínuos são mais indicados para fluidos que possam ser bombeados, como sucos e polpas de frutas.

O tratamento de AP ainda é de alto custo devido, principalmente, aos investimentos iniciais com aquisição de equipamentos, o que limita ainda a sua maior aplicação. Entretanto pode-se esperar que estes custos venham a se tornar mais acessíveis, como uma consequência do desenvolvimento tecnológico. Com isto, mais produtos submetidos a esse tipo de tratamento poderão chegar ao mercado, como é o caso do leite pasteurizado por AP, que já disponível no mercado inglês (SMELT, 1998), outros produtos existentes no Japão, França, Espanha e Estados Unidos citados anteriormente (BUTZ & TAUSCHER, 2002).

O custo por volume processado varia com o tamanho do sistema de APH. Vasos de pressão maiores oferecem melhor eficiência. Estima-se que o custo por quilo de produto processado é 35% menor em um vaso de pressão de 400 litros do que com um vaso de 150 litros (GRANT *et al.*, 2000 *apud* RAMOS *et al.*, 2003). Mas ainda assim, autores relatam alto custo ao produto processado, como THAKUR & NELSON (1998), em torno de 10 a 50 centavos de dólar por litro e PELLETIER (2001) 0,056 Euro por litro. Para se obter um processamento comercialmente viável, soluções técnicas são sugeridas como: a aplicação de APH a um nível superior a 5 MPa/segundo; a aquisição de um recipiente constituído de material com propriedades de transferência de calor baixas (menor que 1 W/m/K) e/ou com aumento da temperatura adiabática igual ou maior que no seu aumento no produto (4 a 8 K/100 MPa); e evitar a perda de calor do produto para o fluido de pressurização mais frio que entra no recipiente durante o tratamento, seja pelo isolamento do produto através de um outro container ou pela escolha de um fluido de pressurização que possua temperatura adiabática igual ou superior a do produto (HEIJ *et al.*, 2002).

### **2.2.1. Alta Pressão Hidrostática (APH) e Microorganismos**

A aplicação da APH como um método para inativação microbiana tem despertado considerável interesse na indústria de alimentos (TEWARI *et al.*, 1999), principalmente ao ser aplicada na conservação de alimentos ácidos (pH < 4,6), os quais possuem a germinação de esporos bacterianos inibida (WEEMAES *et al.*, 1998b). A APH é considerada um método confiável e promissor para destruir microorganismos patogênicos, incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Vibrio vulnificus*. Além desses, é capaz de matar grande proporção (> 90%) daqueles causadores de deterioração em alimentos, sem alterar as qualidades de aceitação do produto (KALCHAYANAND *et al.*, 1998). A capacidade do processo de AP de destruir e/ou inativar microorganismos varia de acordo com o tipo de microorganismo e sua fase de crescimento, a composição do meio, o nível de pressão, o tempo de exposição e a temperatura durante o tratamento (Tabela 6) (HOOVER *et al.* 1989; RONSENTHAL & SILVA, 1997; ARROYO *et al.*, 1997; PALOU *et al.*, 1999 *apud* BARBOSA-CÁNOVAS & RODRÍGUEZ, 2002).

A ação da pressão sobre organismos eucarióticos é mais efetiva que sobre os procarióticos (HOOVER *et al.*, 1989). LUDWIG & LCHRECK (1996) *apud* SAN MARTÍN (2002) e WUYTACK (2002) identificaram que a inativação também depende do formato da bactéria, sendo os bastonetes mais sensíveis que os cocos. Na maioria dos casos, o efeito do processamento sobre bactérias Gram positivo é menos evidente que sobre bactérias Gram negativo (FONBERG-BROCZEK *et al.* (1995) *apud* ARROYO *et al.* 1997; CHEFTEL, 1995; SMELT, 1998) devido à espessura da camada de peptídeoglicano naquelas serem mais espessas (ARROYO & PRESTAMO, 1996; ARROYO *et al.*, 1997; WUYTACK *et al.*, 2002). Bactérias em fase estacionária de crescimento ou em fase letal são mais resistentes que aquelas em fase logarítmica (CHEFTEL, 1995; ZOBEL (1970) *apud* ARROYO *et al.*, 1997; SMELT, 1998; BARBOSA-CÁNOVAS & RODRÍGUEZ, 2002).

O ambiente físico e químico também pode mudar a resistência de espécies bacterianas com relação à pressão (KNORR, 1995). Inúmeras pesquisas têm sido feitas visando a avaliar o efeito da AP em microorganismos. Dentre elas, muitas não adotam produtos como meio inoculação, e sim soluções tampões ou meios de culturas para demonstrar a redução microbiana, que muitas vezes resultam em respostas diferentes

daquelas obtidas com alimentos (Tabela 6). Dessa forma, ROSENTHAL *et al.* (2002b), ao estudarem a inativação de *Zygosaccharomyces bailii*, observaram que um tratamento a 300 MPa, por um reduzido período de tempo, foi suficiente para reduzir de 4 a 5 ciclos log em sucos de abacaxi, laranja, maçã e tomate. Ao mesmo tempo em que outros autores promoveram uma inativação de 7 ciclos log de *Zygosaccharomyces bailii* em tampão citrato submetido a 300 MPa, por 10 minutos (PANDYA *et al.*, 1995).

**Tabela 6:** Tempos de inativação por pressão de células vegetativas de alguns patógenos em diferentes substratos.

Microorganismo	Substrato	Tratamento	Redução da população microbiana
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Tampão fosfato (pH 7,0) + NaCl 3%	170 MPa, 30 min, 23 °C	10 <sup>6</sup>
	Alimentos marinhos	170 MPa, 10 min, 23 °C	<10 <sup>5</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Tampão fosfato (pH 7,0)	325 MPa, 10 min, 20 °C	10 <sup>6</sup>
	Carne suína	300 MPa, 10 min, 25 °C	10 <sup>6</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	Tampão fosfato (pH 7,0) + NaCl 0,85%	340 MPa, 10min, 23 °C	<10 <sup>2</sup>
	Alimentos infantis	340 MPa, 10 min, 23 °C	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella senftenberg</i>	Tampão fosfato (pH 7,0) + NaCl 0,85%	340 MPa, 10 min, 23 °C	10 <sup>4</sup>
	Alimentos infantis	340 MPa, 10 min, 23 °C	<10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella enteritidis</i>	Tampão fosfato (pH 7,0)	500 MPa, 1 min, 20 °C	10 <sup>6</sup>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Tampão fosfato (pH 7,0)	70 MPa, 13 min, 20 °C	10 <sup>6</sup>
	Leite UHT	800 MPa, 10 min, 20 °C	10 <sup>6</sup>
	Carne de ave	700 MPa, 30 min, 20 °C	10 <sup>5</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tampão fosfato (pH 7,0)	340 MPa, 20 min, 23 °C	<10 <sup>6</sup>
	Leite UHT	340 MPa, 80 min, 23 °C	10 <sup>6</sup>
	Leite cru	340 MPa, 60 min, 23 °C	10 <sup>6</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tampão fosfato (pH 7,0)	400 MPa, 20 min, 20 °C	10 <sup>8</sup>
	Leite UHT	600 MPa, 30 min, 20 °C	10 <sup>2</sup>

Fonte: PATTERSON *et al.*, 1995.

Importantes fatores devem ser considerados durante o tratamento, entre eles, a mudança no volume da água e o aumento no volume de proteínas (KNORR, 1995). A redução no volume de água é próxima de 4%, a 100 MPa e chega até aproximadamente 15%, a 600 MPa. Alimentos que possuem bastante água e pouco gás têm a compressibilidade semelhante à da água (CHEFTEL, 1995). Alterações na fase de transição de água, redução do pH e aumento da temperatura devido ao calor adiabático também devem ser observados (KNORR, 1995).

ROSENTHAL *et al.* (2002b), comparando a inativação de leveduras em diferentes sucos de frutas, notaram que esta pode ser influenciada pela composição do produto pressurizado e pelas condições de processamento, como a redução de atividade de água que exerce um efeito protetor, enquanto suaves aumentos de temperatura em até 40 °C aumentam essa inativação. A atividade de água ( $A_w$ ) das células também afeta a resistência dos microorganismos à pressão. Tem-se observado que quanto menor a  $A_w$ , maior é a resistência das células (TEWARI *et al.*, 1999). Segundo SMELT (1998), quando as  $A_w$ s são baixas, geralmente as células são protegidas da pressão, mas microorganismos em condições subletais devido à AP geralmente são mais sensíveis às baixas  $A_w$ s.

O pH dos alimentos representa outro importante fator na determinação do efeito da AP sobre microorganismos (TEWARI *et al.*, 1999). A dissociação iônica da água (e de vários ácidos fracos) é aumentada quando sob pressão, ocasionando uma diminuição do pH. Essa redução pode promover desnaturação protéica e inativação de microorganismos (CHEFTEL, 1995). Os efeitos do pH na inativação de fungos e leveduras em suco de mandarina pressurizado foram avaliados por OGAWA *et al.* (1990), onde os autores não notaram qualquer diferença na inativação desses microorganismos. Entretanto, segundo ARROYO *et al.* (1997), Hite (1914) afirmava que o efeito da AP em vegetais, em meios ácidos é mais destrutivo que em meios neutros.

A presença de macronutrientes como açúcares, proteínas ou gorduras, também influencia a condição de processo a que o alimento deve ser submetido para eliminar microorganismos patogênicos (SANGRONIS *et al.*, 1997; SAN MARTÍN *et al.*, 2002). Estudos em suco de mandarina mostram que o conteúdo de açúcar, expresso em graus Brix, exerce um efeito baroprotetor considerável (OGAWA *et al.*, 1990). Sacarose a concentrações acima de 55% protege contra a destruição de fungos e leveduras (LECHOWICH, 1993). Geléias cruas à base de frutas vendidas no mercado japonês, possuem 40% de açúcar. Este componente junto à pressurização, à estocagem a frio e ao pH ácido, contribuem para a estabilidade microbiológica dos produtos. Com relação à gordura, alguns trabalhos relatam que altos conteúdos de gordura não previnem a inativação microbiana através da Alta Pressão, como cremes lácteos com 35% de gordura e patês de fígado de ganso (*froie gras*) (CHEFTEL, 1995).

Microorganismos são inativados quando são expostos a fatores que substancialmente alteram sua estrutura celular ou funções fisiológicas (LADO & YOUSEF, 2002). A APH pode induzir várias mudanças na morfologia, reações bioquímicas, mecanismos genéticos, membranas e paredes celulares de microorganismos (HOOVER, 1989; KNORR, 1995). Dentre as modificações morfológicas, relacionam-se: o alongamento celular, a perda de motilidade de determinadas células/organismos, a separação e/ou a contração da parede celular, com formação de poros, modificações do citoesqueleto, do núcleo e organelas intracelulares, com redução ou colapso dos vacúolos; coagulação das proteínas citoplasmáticas e liberação de constituintes intracelulares, especialmente os de origem nuclear, para fora da célula (CHEFTEL, 1995; TEWARI *et al.*, 1999; BARBOSA-CÁNOVAS & RODRÍGUEZ, 2002; RAMOS *et al.*, 2003).

Quando células são submetidas à AP, ocorrem mudanças na organização molecular do complexo lipídeo-peptídeo e rompe-se a estrutura da membrana de dupla camada de ácidos fosfatídicos. Na reorganização da membrana, ocorrem alterações na função de proteínas que controla a permeabilidade de íons (WILLIAMS, 1994; ARROYO *et al.*, 1997; PRÉSTAMO & ARROYO, 1998; RUSSEL, 2002; RAMOS *et al.*, 2003). Sabe-se que a membrana celular apresenta um papel muito importante no

transporte celular e nas funções de respiração, portanto, uma grande alteração na sua permeabilidade pode causar a morte da célula (LECHOWICH, 1993).

Em geral, as formas bacterianas vegetativas são inativadas à temperatura ambiente, quando pressões da ordem de 400 a 600 MPa, ou até menores, são aplicadas. Quando pressões bem baixas são aplicadas, entre 20 e 40 MPa, a velocidade de crescimento bacteriano é reduzida, porém entre 200 e 400 MPa, esporos bacterianos podem ser germinados, e somente após outro tratamento consecutivo, inativados pela própria pressão (HENDRICKX *et al.*, 1998; RAMOS *et al.*, 2003; HEIJ *et al.*, 2003).

Do mesmo modo que as células vegetativas bacterianas, fungos e leveduras também são sensíveis à aplicação de AP (RUSSUEL, 2002; RAMOS *et al.*, 2003), sendo inativados por pressões entre 200 e 300 MPa (SMELT, 1998). Em geral, todas as formas vegetativas de fungos são inativadas em poucos minutos pela exposição a 300 MPa, em temperatura de 25 °C. A maioria dos esporos de fungos e leveduras é facilmente inativada a aproximadamente 400 MPa (SMELT, 1998), entretanto, os ascósporos necessitam de tratamento a pressões maiores (RAMOS *et al.*, 2003), por se apresentarem bastante resistentes, não só ao calor, mas também à pressão: por exemplo, o tratamento dos esporos de *Byssoschlamys*, a 700 MPa, a 70 °C por 15 minutos, não é suficiente para reduzir essa população a 3 ciclos log (SMELT, 1998). Inativação de fungos e leveduras tem sido relatada em sucos cítricos submetidos a tratamentos de pressão a 350 MPa por 30 minutos ou 400 MPa por 5 minutos: a contagem de leveduras altamente resistentes à pressão foram reduzidas a  $1/10^5$  (OGAWA *et al.*, 1990).

Enquanto fungos, leveduras e células vegetativas são, em geral, sensíveis ao tratamento de AP acima de 100 MPa, certos esporos bacterianos que apresentam além da alta resistência ao calor, à radiação e à homogeneização, também apresentam resistência à AP (KNORR, 1995; RONSENTHAL & SILVA, 1997). O efeito da pressão em esporos bacterianos ainda é motivo de especulação. Os esporos podem ser destruídos por pressões acima de 1000 MPa (SMELT, 1998), mas, em alguns casos, podem também sobreviver a pressões acima de 1200 MPa (LECHOWICH, 1993). A contagem de esporos pode ser reduzida pela exposição à pressão, mas a aplicação somente de AP pode não ser suficiente para inativá-los (SANGRONIS *et al.*, 1997), sugerindo-se tratamento de AP combinado ao térmico com temperaturas moderadas (ao redor de 60 °C) (RONSENTHAL & SILVA, 1997; SAN MARTÍN *et al.*, 2002).

Na verdade, tem-se demonstrado que a germinação de esporos induzida pela pressão é dependente da temperatura. Por exemplo, o processo de pressurização de esporos a baixas temperaturas (abaixo de 0 °C), mesmo a pressões tão altas como 1000 MPa, não foi capaz de induzir a germinação de esporos e também não apresentou capacidade letal, ao passo que, à medida que a temperatura era aumentada, a germinação tornava-se evidente, mesmo a pressões abaixo de 100 MPa (GOULD & SALE, 1970). HOOVER *et al.* (1989) também encontraram dados em que esporos de *Clostridium perfringens* somente podem ser inativados por pressões muito altas e temperaturas da ordem de 100 °C.

Algumas vezes, o efeito sinérgico sobre os microorganismos pela combinação de AP e altas temperaturas não ocorre. IWAHASHI *et al.* (1991) *apud* SANGRONIS *et al.* (1997) observaram que um choque térmico de 51 °C por 10 minutos, antes da pressurização a 150 MPa, protegeu a população de *Saccharomyces cerevisiae*. Quando se aplicaram, primeiro, 150 MPa por 60 minutos, para posterior ação do calor, essa proteção foi diminuída. Essa alta resistência dos esporos à pressão é creditada à estrutura e espessura da capa protetora, uma vez que suas proteínas estão protegidas por ácido dipicolínico, que impede sua solvatação, excessiva ionização e conseqüente precipitação (KNORR, 1995).

Dependendo do microorganismo, do meio de crescimento e da temperatura, a pressão induz a germinação de esporos, porém tratamentos de pressão subseqüentes sobre esses esporos germinados mostram a eficiência desse processo na redução substancial da contagem de esporos (KNORR, 1995). Diante disso, ALEMAN *et al.* (1996) e HAYAKAWA *et al.* (1992) *apud* THAKUR & NELSON (1998) sugeriram, a adoção de pulsos repetidos de pressão como método mais efetivo de inativação de esporos, no qual inicialmente, a pressão iria induzir a germinação de esporos, ou uma injúria subletal ocorreria nos organismos, e, logo em seguida, em uma segunda pressurização, a pressão e a temperatura atuariam sobre os esporos germinados, reduzindo assim a contagem da população (MEYER *et al.*, 2000; SAN MARTÍN *et al.*, 2002). Uma inativação de 4 a 6 ciclos log foi obtida quando esporos de *Bacillus stearothermophilus* foram submetidos a 4 ou 6 tratamentos de pressão a 600 MPa, a 70 °C, com duração de 5 minutos cada (HAYAKAWA *et al.*, 1994). A aplicação de pressões oscilatórias entre 60 e 500 MPa, com tempos de exposição de 1 minuto, pode reduzir o número de esporos de *Bacillus subtilis* a um fator superior a  $10^8$  (SOJKA & LUDWIG, 1997). Ressalta-se que a aplicação de ciclos de pressão pode tornar o processo mais dispendioso e prejudicial à conservação do equipamento de pressão.

Os vírus são muitos barorresistentes (RUSSUEL, 2002; RAMOS *et al.*, 2003) face à diversidade estrutural e isso se reflete na ampla margem de resistência à pressão (SMELT, 1998). Resultados têm sugerido que a maioria dos vírus patogênicos é eliminada por tratamentos de pressão, porém essa área ainda necessita de maiores investigações (FARKAS & HOOVER, 2000).

### **2.2.2. Alta Pressão Hidrostática (APH) e Enzimas**

Além da destruição de microorganismos, existem certas influências da pressão em alimentos, como a desnaturação ou modificação protéica, ativação ou inativação enzimática e mudanças nas interações substrato-enzima (BUTZ & TAUSCHER, 2002).

Proteínas são estruturas delicadas, mantidas por interações entre a cadeia protéica (seqüência de aminoácidos) e o solvente ao redor. Mudanças nos fatores externos, como pressão e temperatura, podem perturbar o complexo balanço das interações intramoleculares e, entre solvente-proteína, e podem conseqüentemente, levar ao desdobraimento e/ou à desnaturação da cadeia de peptídeos (HENDRICKX *et al.*, 1998).

Enzimas são classes especiais de proteínas, nas quais a atividade biológica surge a partir de um sítio ativo, mantido pela conformação tri-dimensional da molécula. Pequenas mudanças no sítio ativo podem levar à perda da atividade da enzima. Como a desnaturação protéica é associada a mudanças conformacionais, estas podem mudar a funcionalidade bioquímica da enzima, como, por exemplo, através do aumento ou perda da atividade biológica, e através das mudanças na especificidade do substrato (HENDRICKX *et al.*, 1998).

As estruturas secundárias, terciárias e quaternárias podem ser afetadas significativamente pela AP, seja de forma reversível ou não. Quando isso ocorre no processamento, pode resultar em novas propriedades funcionais, pois a estrutura terciária é normalmente determinante da funcionalidade da proteína. A quantidade de pressão necessária para que ocorram mudanças favoráveis à conservação do produto pressurizado, depende do tipo e concentração de proteína (CHEFTEL, 1995), pH e a carga iônica das soluções tratadas (THAKUR & NELSON, 1998; TEWARI, 1999). O processamento de APH afeta enzimas de várias maneiras, dependendo dos parâmetros

de processo, como temperatura e tempo de exposição, e do meio de imersão, seja em tampão ou no próprio produto (SEYDERHELM *et al.*, 1996). Muitos estudos adotam o extrato enzimático como sendo o meio pressurizado, ao contrário de se utilizar o próprio produto, que, quando tratado, pode apresentar resultados de atividades enzimáticas bastante diferentes (GOMES & LEDWARD, 1996).

Segundo ANESE *et al.* (1995), a inativação de enzimas ocorre somente quando altas pressões são aplicadas. Ao contrário, em níveis moderados de pressão, os efeitos sobre a ativação enzimática podem estar atribuídos a configurações reversíveis e/ou a mudanças conformacionais das enzimas e/ou das moléculas de substrato. O pH é um fator do qual as enzimas dependem para apresentar um bom desempenho do tratamento de pressão, seja ele combinado à temperatura ou não.

Para várias enzimas, tem sido relatado que a inativação induzida pela pressão age rápido em pH mais baixos (WEEMAES *et al.*, 1997; JOLIBERT *et al.* (1994) *apud* HENDRICKX *et al.*, 1998). Segue-se o efeito da ativação, observado, em alguns casos, como consequência da combinação de tratamentos com pressão, temperatura e pH.

LÓPEZ-MALO *et al.* (1998) determinaram os efeitos da AP e pH inicial na atividade da PFO de purê de abacate, e observaram que em tratamentos com pH 4,1 e a 689 MPa, a PFO do purê foi reduzida em 24,7; 21,8 e 15,6%, quando expostos a 10, 20 e 30 minutos, respectivamente. O tratamento de pressão e o pH inicial mostraram-se significativos estatisticamente ao alterar a atividade enzimática, embora o tempo não tivesse se mostrado significativo nos tratamentos a 345 ou 517 MPa. Em tratamentos a 517 e 689 MPa, o efeito significativo do pH inicial na atividade enzimática da PFO também foi observado. A 345 MPa, a atividade residual da PFO mais baixa foi de 62%, quando o pH do purê de abacate foi reduzido a 3,9, e o tempo de tratamento foi 20 minutos. Em purês com pH 4,1 e 4,3, a atividade enzimática residual foi superior a 75% até mesmo no processo com 30 minutos de exposição. ESHTIAGHI & KNORR (1993) relataram que a redução do pH do meio de imersão pela adição de ácidos, durante os tratamentos de AP pode levar ao aumento da inativação da enzima PFO.

WEEMAES *et al.* (1998a) objetivaram quantificar a estabilidade da PFO de diferentes frutos, combinando pressão e temperatura, em extratos enzimáticos com diferentes pH. A estabilidade mais baixa de PFOs, quando submetidas à AP, foi a de maçãs e de uvas a pH 6,0, comparada à estabilidade de PFOs de abacate, pêra e ameixa a pH 7,0, provavelmente devida ao baixo pH, uma vez que uma redução na estabilidade da pressão com o aumento do pH já fora relatada para a PFO (WEEMAES *et al.*, 1998b). Entretanto, tendo por base a comparação entre os sistemas enzimáticos inativados a pH 6,0 e 7,0, concluiu-se que a resistência da PFO à pressão é dependente da fonte da enzima. Como exemplificação, foi observado em maçãs da variedade *Grammy Smith* uma diminuição rápida da atividade da PFO a pressões maiores que 136 MPa, enquanto em maçãs *Golden Delicious* a atividade aumentou sob pressões menores que 136 MPa, mas depois diminuiu (IBARZ *et al.* (1996) *apud* SANGRONIS *et al.*, 1997).

As PFO e POD estão presentes na maioria dos vegetais, são as principais responsáveis por alterações indesejáveis e degradação de características originais de produtos. Essas enzimas catalisam a oxidação de substâncias polifenólicas naturalmente presentes em vegetais crus, originando produtos responsáveis pela mudança na cor, características sensoriais e nutricionais (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981). A AP pode ser aplicada visando à inativação dessas enzimas, para que o escurecimento enzimático e mudanças na aparência e nas propriedades sensoriais não ocorram (HENDRICKX *et al.*, 1998).

### **2.2.2.1. Peroxidase**

CANO *et al.* (1997) estudaram o efeito de inativação enzimática da POD além da PFO e pectinametilesterase (PME) em morangos e produtos de laranja, variando pressão e temperatura. A atividade de POD foi reduzida em apenas 25% sob 230 MPa, quando tratando morangos a 43 °C, por 15 minutos. Em suco de laranja, a atividade de POD foi reduzida em 50% sob 250 MPa, a 32 °C. Diferentemente, OGAWA *et al.* (1990), em sucos de mandarina, mostraram uma notável redução dessa enzima sob pressões maiores, de 300 a 400 MPa, por 10 minutos, a 23 °C. Um tratamento a 900 MPa, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, foi necessário para causar uma redução de 88% da atividade enzimática da POD em feijão verde. Os tratamentos combinados à temperatura aumentaram o efeito dessa inativação a 600 MPa, mas nenhuma diferença significativa foi detectada a 700 MPa (HENDRICKX *et al.*, 1998). ROSENTHAL *et al.* (2002a), ao estudarem a POD, também observaram interação entre pressão e temperatura, pois obtiveram atividades quase constantes com o aumento da pressão a temperatura ambiente; porém, com o incremento da temperatura, a atividade reduziu bruscamente, atingindo 60,08% de inativação, quando extratos enzimáticos de abacaxi foram tratados sob 600 MPa, a 60 °C, por 45 minutos.

Em purê de morango, a POD foi inativada de forma crescente até 300 MPa, em tratamentos a 20 °C, por 15 minutos. Acima de 300 MPa nas mesmas condições de temperatura e tempo, a atividade da POD de purê de morango foi suavemente aumentada. Em temperaturas superiores a 45 °C, uma redução foi encontrada em todas as pressões (50 - 400 MPa). Nos sucos de laranja, à temperatura ambiente, a atividade da POD diminuiu continuamente até 400 MPa, em tratamentos com 15 minutos de duração. A maior taxa de inativação encontrada foi de 50% quando a temperatura de exposição foi a 32 °C. Tratamentos de AP, a 33 - 60 °C, aumentaram a atividade de POD em suco de laranja (SEYDERHELM *et al.*, 1996).

A atividade da POD no purê de tomate mostrou uma ativação quando tratamentos combinados à temperatura foram desenvolvidos, a pressões abaixo de 350 MPa, à temperatura ambiente (20 °C). Entretanto, uma significativa inativação dessa enzima pode ser obtida adotando-se tratamentos com pressões acima de 350 MPa. Todavia, combinações de pressões (400 - 500 MPa) e temperaturas amenas (30 - 60 °C) levaram ao aumento da atividade da POD (HERNÁNDEZ & CANO, 1998).

O efeito da pressão a 400 MPa sobre a atividade da POD em morangos levou a ativação de 13 e 1%, quando tratados por 5 e 10 minutos, respectivamente. Porém, quando tratado por 15 minutos, foi atingida uma inativação de 5%. Pressões de 600 e 800 MPa foram mais eficazes na inativação da POD, enquanto, no geral, inativações de 11 - 35% foram observadas, sendo a condição mais eficaz para inativação 600 MPa por 15 minutos (GARCIA-PALAZON *et al.*, 2004).

Nas condições experimentais trabalhadas por ANESE *et al.* (1995), a POD foi um pouco resistente a níveis de pressão abaixo de 900 MPa, com 1 minuto de tratamento. Uma perda total da sua atividade somente foi atingida a 900 MPa, ao mesmo tempo em que a ativação foi observada entre 300 e 500 MPa.

### **2.2.2.2. Polifenoloxidase**

Pesquisadores trataram a PFO a níveis suficientes para também ocorrer inativação microbiana. Nesses níveis, a PFO não foi inativada (TEWARI *et al.*, 1999).

GOMES & LEDWARD (1996) também estudaram o efeito da pressão na atividade da PFO, e notaram a inativação incompleta da mesma. Por outro lado, ASAKA & HAYASHI (1991) encontraram aumento na atividade enzimática da PFO em peras, quando tratadas a 400 MPa, 25 °C, por 10 minutos. Esses autores, no mesmo estudo de AP, porém usando extrato dessas peras, adotando variáveis de 100 a 600 MPa e 25 °C, por 10 minutos, observaram que a atividade enzimática da PFO aumentou quando pressões de 200 MPa ou mais foram utilizadas, apresentando maiores percentuais a 400 e 500 MPa.

GOMES & LEDWARD (1996) investigaram a atividade de PFO em cogumelos, batatas e maçãs, sob tratamentos de 100 a 800 MPa por um tempo de 1 a 20 minutos. Nos tubérculos, a atividade de PFO foi perdida com o aumento da pressão, mas após 10 minutos a 800 MPa, 40% da atividade ainda foi mantida. Para cogumelos, essa atividade aumentou depois de tratamento a 400 MPa por 10 minutos e, mesmo a 800 MPa por 10 minutos, 60% da PFO se manteve em atividade.

JOLIBERT *et al.* (1995, *apud* TEWARI, 1999), estudaram os efeitos da AP em ameixas, damascos, morangos e maçãs. A AP aumentou o escurecimento de maçãs, mas reduziu a atividade da PFO de ameixas. Sugeriram que a inativação completa da PFO dessas frutas pudesse ser atingida a 600 MPa. Relataram que ocorreu inativação enzimática irreversível, dependente do substrato, da fruta e do pH, pois a inativação máxima ocorreu sob baixos valores de pH.

CANO *et al.* (1997) estudaram o efeito da inativação de POD, PFO e pectinametilsterase em morangos e produtos derivados de laranja, usando pressão e temperatura. As amostras foram submetidas a pressões de 50 a 400 MPa, combinadas a tratamentos térmicos de 20 a 60 °C. Concluíram que significativa inativação de atividade de PFO (60%) ocorreu, sob 285 MPa, a 20 °C.

Ao comparar tratamentos de AP a 600 MPa, 20 minutos, a 5, 20 e 50 °C, com branqueamento a 100 °C por 2 minutos, sobre as atividades enzimáticas da lipoxidase e da POD do brócolis, a AP demonstrou um efeito menos efetivo para a POD e mais, para a lipoxidase (KNORR, 2000). PALOU *et al.* (1999) também adotaram o branqueamento em purê de banana, mas, previamente à pressão, observaram que a atividade residual da PFO ao processamento de 517 MPa e 689 MPa, por 10 minutos, foi reduzida.

WEEMAES *et al.* (1998a) demonstraram que pressões de 800 MPa foram necessárias para inativar a PFO de cogumelos. Outros frutos como maçãs, uvas, abacates e pêras começaram a mostrar redução da atividade enzimática em 600, 700, 800 e 900 MPa, a 25 °C, respectivamente, enquanto a redução, nas ameixas, somente foi conseguida a 900 MPa, a 50 °C.

ROSENTHAL *et al.* (2002a), estudando variáveis de pressão em cinco níveis (0, 100, 300, 500 e 600 MPa), três de temperatura (20, 40 e 60 °C) e três de tempo (15, 30 e 45 minutos) em extratos enzimáticos de abacaxi, notaram que a temperatura tem efeito bem maior em PFO que a pressão, ao passo que o tempo teve apenas um efeito linear negativo. A redução máxima atingida foi de 33,17%.

PFO de batatas e, de cogumelos mostraram-se bastante estáveis, uma vez que foram necessários tratamentos com aproximadamente, 800 e 900 MPa para a redução da atividade (HENDRICKX *et al.*, 1998). Por outro lado, PFO de pêssegos, de morangos e de maçãs mostram-se mais sensíveis, sendo inativadas por pressão excedendo 100, 400 e 600 MPa, respectivamente (JOLIBERT *et al.*, 1994 *apud* HENDRICKX *et al.*, 1998; AMATI *et al.*, 1996 *apud* HENDRICKX *et al.*, 1998).

No estudo do efeito combinado de pressão (0,1 MPa a 900 MPa) e temperatura (25 a 77,5 °C) sobre a PFO de abacate, a inativação ocorreu a aproximadamente a 800 -

900 MPa, à temperatura ambiente, e o efeito antagônico foi verificado sob pressões abaixo de 250 MPa e temperaturas excedentes a 62,5 °C (HENDRICKX *et al.*, 1998).

O efeito de diferentes tratamentos de compressão e decompressão em PFO mostrou que em purês de tomate, a enzima sofreu aumento na atividade, quando pressões abaixo de 200 MPa foram aplicadas, enquanto uma perda de atividade significativa foi observada usando pressões de 200 a 500 MPa, à temperatura ambiente (20 °C). O melhor resultado de inativação de PFO foi obtido usando a combinação de 200 MPa, 20 °C, por 15 minutos. Contudo, uma combinação de tratamentos a 500 MPa, sob diferentes temperaturas, pode realmente causar a desnaturação dessa enzima (HERNÁNDEZ & CANO, 1998).

A atividade residual da PFO de mostos de uvas brancas foi estudada por CASTELLARI *et al.* (1997), os quais observaram que, após tratamentos de 600 MPa e 900 MPa, por 10 minutos, com a temperatura da câmara a 15 °C, a atividade residual da enzima foi de 61,6% e 15,9%, respectivamente. A 900 MPa, baixos níveis de atividade residuais foram encontrados. Os autores sugeriram que para atingir a inativação completa, ao invés de usar pressões superiores a 600 MPa, seriam necessários tratamentos de AP associados à temperatura (40 a 50 °C).

SUN *et al.* (2002), ao estudarem o tratamento de pressão sobre cogumelos, observaram a redução da atividade enzimática da PFO de 7%, quando submetida a 600 MPa por 10 minutos, e, quando uma extensão do tempo foi feita (20 minutos), a atividade não foi alterada. Entretanto, 10 e 20 minutos de exposição a 800 MPa fizeram diminuir a atividade a 28 e 43%, respectivamente.

Em framboesas, a PFO foi ativada em 15 e 8%, quando as frutas foram submetidas a tratamentos de 400 MPa e 800 MPa por 5 minutos, respectivamente. Quando tratada por 10 e 15 minutos, foi inativada na margem de 3 - 29%. Por sua vez, o tratamento a 600 MPa resultou em ativação importante de 54 e 41% da enzima, quando aplicada por 5 ou 10 minutos, respectivamente, enquanto que experimentos de 15 minutos demonstraram uma inativação de 1%. Em morangos, o tratamento de AP reduziu a atividade da PFO desde 69% à completa inativação da mesma. A condição mais efetiva para a inativação de PFO em morangos foi de 600 MPa por 15 minutos ou 800 MPa por 10 minutos (GARCIA-PALAZON *et al.*, 2002).

Tratamentos de pressão aplicados a 689 MPa de maneira contínua e oscilatória reduziram a PFO em *guacamoles*. Tanto o tempo de exposição, quanto o número de ciclos afetaram significativamente a atividade residual da PFO. Após um tratamento contínuo de 20 minutos de exposição a 689 MPa, a atividade residual da PFO atingiu 22% (PALOU *et al.*, 2000), demonstrando a sua baixa barorresistência, conforme já relatada por outros autores (GOMES & LEDWARD, 1996; HENDRICKX *et al.*, 1998; WEEMAES *et al.*, 1998a).

### **2.2.3. Alta Pressão Hidrostática (APH) e Nutrientes**

O processamento de APH em vegetais oferece certas mudanças em suas características, após tratamento, obtendo-se produtos de alta qualidade, com maior segurança e vida-de-prateleira prolongada (BUTZ & TAUSCHER, 2002; GOULD, 1996; HAYASHI, 1992 *apud* BUTZ *et al.*, 2003). Espera-se que o processo venha a ser menos danoso que os térmicos, sobre compostos alimentares como componentes responsáveis pelo *flavor*, pigmentos, vitaminas etc., pelo fato de ligações covalentes não serem afetadas pela pressão (PRÉSTAMO & ARROYO, 1998; TAUSCHER, 1995 *apud* BUTZ *et al.*, 2003). Efeitos como os causados pelas reações de *Maillard* e

produção de sabor cozido não são esperados (THAKUR & NELSON, 1998). Pressões de aproximadamente 600 MPa, quando aplicadas para pasteurização, podem fazer com que reações químicas sejam aceleradas ou inibidas, de acordo com o princípio de *Le Chatellier*, alterando ou não determinadas propriedades funcionais (BUTZ *et al.*, 2003).

YEN & LIN (1996) relataram que o *flavor* de suco de goiaba mudou bastante após o tratamento térmico a 95 °C por 5 minutos, sendo a maioria dos compostos voláteis perdida. Enquanto isso, em amostras pressurizadas a 600 MPa por 15 minutos, o conteúdo destas se manteve semelhante ao original, conservando sua estabilidade por até 30 dias, a 4 °C.

POLYDERA *et al.* (2003), ao compararem a perda de vitamina C em sucos de laranja pasteurizados (80 °C por 30 segundos) e pressurizados (500 MPa por 5 minutos, a 35 °C), observaram que o suco pressurizado teve uma vida-de-prateleira maior que o pasteurizado, e, ainda, uma menor perda da vitamina C foi detectada. A pressão, isoladamente, não foi capaz de mudar a concentração de vitamina C somente quando se tratava de temperaturas maiores que 60 °C, durante o processamento (TAOUKIS *et al.* (1998) *apud* POLYDERA *et al.* (2003); VAN DEN BROECK *et al.*, 1998).

Em produtos como o morango c.v. *coulis*, que possuem um alto teor de vitamina C, o tratamento de AP não apresentou efeito significativo na retenção deste composto. Em tratamentos de pressão a 400 MPa por 30 minutos, a 20 °C, e de pasteurização a 72 °C por 20 segundos, obtiveram-se 88,86% e 91,52% de retenção de vitamina C, respectivamente, partindo de 100% de retenção para amostras não tratadas, sendo a perda considerada não significativa. Todavia, em amostras desse mesmo fruto esterilizadas (0,1 MPa por 20 minutos a 120 °C) apenas 67,1% da vitamina C inicial foi conservada após o tratamento (SANCHO *et al.*, 1999).

OGAWA *et al.* (1992 *apud* SANCHO *et al.*, 1999), em pesquisa com sucos de frutas cítricas, avaliaram o conteúdo de vitamina C nos sucos, antes (27,2 mg/100 g) e após o tratamento de AP com 500 MPa por 10 minutos, a 20 °C, e notaram uma concentração pós-processo de 27,2 mg/100 g, ou seja, inalterada. Segundo BUTZ *et al.* (2002b), o mesmo foi observado nos conteúdos de ácido L-ascórbico e do ácido dehidroascórbico de sucos de laranja processados a 500 MPa e 800 MPa, onde não foi observada redução significativa, confirmando os resultados de outros estudos sobre a estabilidade do ácido ascórbico e do dehidroascórbico no suco de laranja pressurizado.

Os carotenóides podem ser decompostos por oxidação devido ao seu grande número de ligações duplas. Tratamentos térmicos podem também decompor  $\beta$ -caroteno em isômeros *cis* ou em produtos de fragmentação. Porém, ao avaliar o impacto da AP sobre a vitamina C e carotenóides em produtos de frutas e vegetais, como os derivados de laranja, sucos de laranja, de limão, de cenoura e de tomate, BUTZ *et al.* (2003) concluíram que em todos os casos, não houve diferença significativa entre amostras pressurizadas (600 MPa a 25 e 44 °C, e 800 MPa a 44 °C por 6 minutos) e controles (sem tratamentos), mostrando que os tratamentos não levaram à perda desses parâmetros. Assim como em um outro estudo, BUTZ & TAUSCHER (2002), notaram que os carotenóides em purê de cenoura foram protegidos diante da ação da pressão/temperatura: mesmo após 40 minutos, a 600 MPa, a 75 °C, a redução de  $\beta$ -caroteno inicial não foi significativa.

BUTZ *et al.* (2003), ao estudarem a concentração de carotenóides e licopeno em tomates pressurizados, observaram que, mesmo após 60 minutos de tratamento de altas pressões nenhuma alteração foi detectada na concentração total de  $\beta$ -caroteno e licopeno. Temperaturas de processo extremas (95 °C por 60 minutos) não levaram à qualquer perda destas substâncias analisadas comparadas às controles, a 25 °C.

KREBBERS *et al.* (2003) compararam o processamento de purê de tomate combinando a Alta Pressão às altas temperaturas com tratamentos convencionais como esterilização e pasteurização. Avaliaram os parâmetros de qualidade, e o teor de licopeno, maior responsável pela coloração vermelha em tomates (> 90% de conteúdo de carotenóides). Adotaram pressões de 300, 500 e 700 MPa, a 20 °C, por 2 minutos, e os resultados revelaram que somente amostras esterilizadas apresentaram diferenças sensoriais e de cor, com uma perda significativa (40%) do conteúdo total de licopeno. TAKEOKA *et al.* (2001) detectaram perdas de licopeno de até 30% após processamento convencional.

Tratamentos térmicos geralmente resultam em perda de clorofila, o pigmento verde de plantas. A conversão de verde brilhante em marrom oliva de feofitinas, metabólitos de clorofila sem o átomo central de magnésio, é adotada como índice de que o tratamento térmico promove danos. O efeito de AP sobre clorofilas em soluções aquosas e alcoólicas foi relatado por TAUSCHER (1998) *apud* FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.* (2001), nenhum efeito foi encontrado em modelos alcoólicos, entretanto, naqueles aquosos, houve uma dramática perda, chegando à quase descoloração. Em comparando o processamento de AP a 600 MPa, por 20 minutos e temperaturas de 5, 20 e 50 °C, com o branqueamento de brócolis a 100 °C por 2 minutos, KNORR (2000) notou que a degradação da clorofila logo após os tratamentos foi menos evidente para amostras pressurizadas comparada àquelas que sofreram branqueamento. BUTZ *et al.* (2003) mostraram que dificilmente há algum efeito da pressão, mesmo após tratamentos bem longos a 600 MPa e 75 °C.

SUTHANTHANGJAI *et al.* (2005) pesquisaram a degradação de antocianinas de framboesas após serem pressurizadas a 200, 400, 600 e 800 MPa por 15 minutos, entre 18 e 22 °C, e estocadas a 4, 20 e 30 °C. O estudo mostrou que na estocagem dos frutos a 4 °C, o percentual de perda foi dos menores, e os maiores foram observados quando armazenados a 30 °C, principalmente dos frutos que receberam tratamentos a 400 e 600 MPa, devido às incompletas inativações enzimáticas.

Ainda são escassos os estudos que investigam a estabilidade de certos pigmentos, como, por exemplo, as antocianinas, em produtos tratados por APH.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. *Matéria-Prima*

A polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.), tipo média, foi adquirida em estabelecimento comercial localizado em Belém – Pará, que realiza legalmente o processamento de frutos de açaí e está devidamente registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A matéria-prima foi referente ao período de safra de verão (agosto a dezembro) de 2004. No processamento, os frutos foram lavados com água clorada, imersos em água morna e com o auxílio de máquinas apropriadas denominadas despoldadeiras de açaí, a polpa foi obtida com o acréscimo de água que classifica o açaí como médio, e os caroços, descartados. A polpa obtida foi embalada em sacos plásticos de 1 Kg e acondicionada em caixas de isopor contendo pedaços de gelo. No mesmo dia, foi transportada, por via aérea, para o Rio de Janeiro.

##### 3.1.2. *Aparelho de Alta Pressão Hidrostática*

Os tratamentos de Alta Pressão Hidrostática foram realizados em um equipamento Stansted Fluid Power Ltd., Stansted, UK, delineado para utilização em ambiente laboratorial, em processamento de alimentos ou pesquisa biológica. O aparelho de AP está localizado em local bem ventilado protegido de temperaturas extremas e de umidade, no Centro de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CTAA).

O esqueleto do equipamento é um módulo de pistão de aço inoxidável, combinado a um intensificador de pressão e à câmara de trabalho, em um módulo singular. A câmara de trabalho é pré-carregada por aproximadamente 3 minutos, através de uma bomba pneumática de pressão dirigida do tipo Stansted, com fluido compatível a produtos alimentícios, próprios para operar com pressões até 900 MPa. Os fluidos indicados para esse equipamento são o etanol ou óleo de linhaça. Neste caso, solução de álcool etílico a 70% foi utilizada. O intensificador de AP, incorporado ao módulo, é direcionado hidraulicamente por uma bomba Stansted eletro-hidráulica, possuindo mecanicamente uma proteção, interna ao sistema, contra a pressurização excessiva.

O equipamento opera com níveis de pressão (até 900 MPa) e tempos (até 30 minutos) programados pelo operador. Além disso, o sistema pode ser ajustado com controle de temperatura para a câmara, a qual opera com um meio trocador de calor (ou frio), oriundo de um reservatório com temperatura controlada (banho-maria), para um revestimento de transferência de calor ajustado à câmara de pressão. A temperatura de trabalho do equipamento se limita a uma faixa de 20 a 90 °C.

O recipiente de pressão, que acomoda o alimento a ser processado, possui uma dimensão de 37 mm de diâmetro e 246 mm de largura, comportando no máximo 250 g

de polpa. É um cilindro vazado com orifícios esféricos por onde circula o fluido pressurizante.



**Figura 6:** Equipamento de Alta Pressão Hidrostática.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. *Manuseio e Caracterização da Polpa de Açaí*

A polpa chegou ao laboratório da EMBRAPA – Agroindústria de Alimentos, CTAA em perfeitas condições, cerca de 12 horas depois de ser produzida. Foi reembalada em sacos de polietileno de cinco camadas, estéreis e com alta barreira, contendo 10, 15 e 20 g de polpa e fechados em seladora a quente, evitando-se a presença bolhas de ar. Posteriormente, os sacos de polpa foram armazenados a  $-10^{\circ}\text{C}$  e destinados à determinação da carga microbiológica, análises químicas, físicas, físico-químicas.

A polpa foi descongelada sob refrigeração. A carga microbiológica foi verificada e foram realizadas análises para determinação da composição centesimal e dos aspectos físico-químicos.

### **3.2.2. Análises Microbiológicas**

#### **3.2.2.1. Contagem total padrão em placa**

A análise de bactérias mesófilas aeróbias foi feita baseada no método descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (MORTON, 2001). Retirados assepticamente, 10 g de polpa foram homogeneizados com 90 ml de água peptonada (peptona de carne bacteriológica, VETEC, Brasil), para o preparo de diluições até  $10^{-6}$ . Alíquotas de 1 ml de cada diluição foram pipetadas em placas de petri estéreis, em duplicata. Adotou-se a técnica de plaqueamento em profundidade. O meio de cultura PCA (ágar padrão para contagem, MERCK, Alemanha), pH 7,0, foi vertido sobre a amostra já pipetada e homogeneizada em movimentos suaves, em forma de oito. Após a solidificação do ágar à temperatura ambiente, as placas foram incubadas em posição invertida a 35 - 37 °C por 48 horas.

Transcorrido o tempo de incubação, foram consideradas para a contagem, somente placas de mesma diluição que apresentassem entre 25 - 250 colônias. Os resultados foram expressos em UFC/g de polpa. As análises foram feitas em duplicata.

#### **3.2.2.2. Contagem de fungos filamentosos e leveduras**

A análise de fungos filamentosos e leveduras foi feita com base no método descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (BEUCHAT & COUSIN, 2001). Foram retirados assepticamente 10 g de polpa de açaí que, junto a 90 ml de água peptonada (peptona de carne bacteriológica, VETEC, Brasil) foram utilizadas para preparações de diluições até  $10^{-6}$ . Alíquotas de 1 ml de cada diluição foram pipetadas em placas de petri estéreis, em duplicata. Adotou-se a técnica de plaqueamento em profundidade. O meio de cultura usado foi o ágar batata dextrose (BDA, MERCK, Alemanha), acidificado com solução esterilizada de ácido tartárico a 10% para ajuste de pH, a  $3,5 \pm 0,1$ . Este foi vertido em placas de petri estéreis e homogeneizado em movimentos suaves, em forma de oito. Após a solidificação do ágar à temperatura ambiente, as placas foram incubadas em posição invertida, a 20 - 25 °C por 3 a 5 dias.

Transcorrido o tempo de incubação, foram consideradas para a contagem, somente placas de mesma diluição que apresentassem entre 25 - 250 colônias. Os resultados foram expressos em UFC/g de polpa. A contagem não foi expressa separadamente para fungos filamentosos e leveduras. As análises foram feitas em duplicata.

#### **3.2.2.3. Enumeração de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C**

A análise de coliformes a 35 °C e a 45 °C foi efetuada em meios de cultura líquidos, por colorimetria, através da técnica do número mais provável (NMP) em duplicata, método descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (KORNACKI & JOHNSON, 2001). Seguiram-se as três etapas de procedimento: teste presuntivo, que detecta a presença de microorganismos do grupo

coliforme; teste confirmativo, que inibe o crescimento de bactérias acompanhantes, permitindo apenas aquelas do grupo coliforme; e teste de coliformes a 45 °C, que usa meio seletivo para a determinação de coliformes fecais. Retirados assepticamente os 10 g de polpa de açaí, prepararam-se diluições até 10<sup>-3</sup>, com 90 ml de água peptonada (peptona de carne bacteriológica, VETEC, Brasil). Aliquotas de 1 ml de cada diluição foram pipetadas para uma série de três tubos de caldo lauril sulfato triptose (LST, MERCK, Alemanha), pH 6,8. Após a homogeneização dos tubos, foram incubados a 35 °C por 48 horas. Transcorrido o tempo de incubação, foram observados tubos com produção de gás, sendo os mesmos considerados positivos. Através desses registros, foram reportados à tabela do NMP para 3 diluições com 3 tubos em cada diluição (SWANSON *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em NMP de coliformes/10 g de polpa.

Nos testes confirmativos, cada tubo de caldo LST positivo foi transferido, através de uma alçada, ao tubo de caldo verde brilhante lactose bile a 2% (Caldo Brila, MERCK, Alemanha), pH 7,1 e incubado a 35 °C ± 0,2, por 48 horas. Passado o tempo de incubação, os tubos que tiveram produção de gás, foram considerados positivos, servindo para calcular o NMP (SWANSON *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em NMP de coliformes a 35 °C/g de polpa.

Na identificação de coliformes a 45 °C, uma alíquota de cada tubo de LST positivo foi transferida, assepticamente, com auxílio de alça de platina, ao tubo de caldo EC (MERCK, Alemanha), pH 6,9 e este incubado em banho maria a 44,5 °C ± 0,1, por 24 horas. Foram considerados positivos aqueles que tiveram produção de gás. Esses dados serviram para calcular o NMP (SWANSON *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em NMP de coliformes a 45 °C/g de polpa. Não foi feito teste confirmativo de *E. coli*.

#### **3.2.2.4. Detecção de *Salmonella*.spp**

A detecção de salmonela foi feita, em duplicata, baseada na metodologia descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (WALLACE *et al.*, 2001). Foram transferidos, assepticamente, 25 g de polpa homogeneizada para 225 ml de caldo lactosado (MERCK, Alemanha), que foi incubado a 35 - 37 °C, por 24 horas. Após o período de pré-enriquecimento, 10 ml desse meio foram transferidos, assepticamente, para 90 ml de caldo selenito-cistina (Caldo SC, MERCK, Alemanha), pH 7,0 e para 90 ml de caldo tetrationato verde brilhante (Caldo TT, MERCK, Alemanha). Após completa homogeneização, foram incubados a 42,5 °C por 24 h em banho maria. Na terceira etapa de análise, partindo do enriquecimento seletivo com auxílio de alça de platina, foram feitas estrias nos meios: ágar verde brilhante (Ágar BG, MERCK, Alemanha); ágar xilose lisina-desoxicolato (Ágar XLD, MERCK, Alemanha); ágar para enterobactérias seg. Hektoen (MERCK, Alemanha), pH 7,5 ± 0,1; ágar *Salmonella-Shigella* (Ágar SS, MERCK, Alemanha), pH 7,0 ± 0,1 e ágar Rambach (MERCK, Alemanha), pH 7,3 ± 0,2 a 25 °C. Todas as placas foram incubadas a 35 - 37 °C por 24 h. Transcorrido o período de incubação do plaqueamento seletivo, caso houvesse crescimento de colônias suspeitas de *Salmonella*, dar-se-ia a continuação do procedimento à triagem das colônias e às provas bioquímicas para confirmação da presença de salmonela.

### **3.2.3. Composição Centesimal**

#### **3.2.3.1. Umidade**

O teor de umidade (g de água/100 g de polpa) foi analisado em estufa à vácuo a 70 °C com auxílio de areia, segundo AOAC (2000), método 934.01 item 41.03.

#### **3.2.3.2. Sólidos totais**

O teor de sólidos totais (g de sólidos totais/100 g de polpa ou %) foi determinado segundo AOAC (2000), método 920.151 item 37.1.12.

#### **3.2.3.3. Cinzas (resíduo mineral fixo)**

A determinação de cinzas (g de cinzas/100 g de polpa) foi realizada segundo AOAC (2000), método 923.03 item 32.1.05.

#### **3.2.3.4. Lipídeos totais**

Os teores de lipídeos totais (g de lipídeos totais/100 g de polpa) foram mensurados por hidrólise ácida em extrator de *Monjonier* destilados com éter de petróleo e éter etílico, segundo AOAC (2000), método n° 922.06 item 32.1.114F.

#### **3.2.3.5. Nitrogênio total e proteína bruta**

A determinação de nitrogênio total (g de nitrogênio/100 g de polpa) foi baseada no método de Kjeldahl tradicional, segundo AACC (1995), método 46-13 modificado. O teor protéico bruto da polpa foi calculado pelo produto da quantidade de nitrogênio total (g) pelo fator de conversão 6,25 (IAL, 1985).

#### **3.2.3.6. Carboidratos e fibras**

A quantificação de carboidratos e fibras foi calculada por diferença entre 100 e o somatório das concentrações encontradas nos itens 3.2.3.1., 3.2.3.3., 3.2.3.4. e 3.2.3.5..

### 3.2.4. *Análises Físico-Químicas*

#### 3.2.4.1. Acidez titulável

A acidez média foi determinada pela titulação de alíquotas de polpa com NaOH 0,1 N até o pH 8,1 (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1995), sendo o resultado expresso em g de ácido cítrico anidro por 100 g de polpa, conforme AOAC (2000), método 942.15 item 37.1.37.

#### 3.2.4.2. pH

O pH médio foi verificado segundo AOAC (1997), método 981.12 n° 42.1.04, empregando-se um eletrodo de um potenciômetro com ajuste automático de temperatura, devidamente aferido com soluções tampões pH 4,0 e pH 7,0.

#### 3.2.4.3. Sólidos solúveis

A concentração de sólidos solúveis (graus Brix) foi realizada com apoio de um refratômetro de bancada, a 20 °C, segundo AOAC (2000), método 932.12 item 37.1.15.

#### 3.2.4.4. Relação brix/acidez

A razão entre os graus Brix e a acidez (g ácido cítrico/100 g de polpa) denominada Ratio foi calculada a partir das determinações de acidez e sólidos solúveis.

### 3.2.5. *Processamento de Alta Pressão Hidrostática (APH)*

#### 3.2.5.1. Delineamento experimental

Adotou-se no estudo um planejamento fatorial com 2 níveis e com pontos centrais para o delineamento e tratamento de dados. Pressão (MPa), temperatura (T °C) e tempo (t) foram consideradas as variáveis de processo (Tabela 7), enquanto que as variáveis de resposta foram: redução microbiana de bactérias mesófilas aeróbias, redução microbiana de fungos filamentosos e leveduras, enumeração de coliformes a 35 °C e a 45 °C, percentual de atividade da peroxidase e polifenoloxidase, percentual de retenção de antocianinas e valor de diferença de cor.

**Tabela 7:** Variáveis de processo.

Variáveis de processo	Níveis			
	variáveis	-1	0	+1
Pressão (MPa)	P	300	400	500
Temperatura (T °C)	T	25	30	35
Tempo (t)	t	5	10	15

A matriz do planejamento fatorial com pontos centrais é apresentada na tabela 8.

Amostras de polpa de açaí eram descongeladas sob refrigeração e mantidas em geladeira até o instante do processamento. Amostras controles (sem tratamento) eram descongeladas nas mesmas condições e analisadas juntamente com as pressurizadas. Logo após o tratamento de alta pressão, as variáveis de resposta foram avaliadas, não ultrapassando 120 minutos de espera.

**Tabela 8:** Delineamento experimental de 11 ensaios.

Processamento	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
8	300	35	5
4	500	25	15
5*	400	30	10
9	300	35	15
2	300	25	15
10	500	35	5
6*	400	30	10
7*	400	30	10
1	300	25	5
11	500	35	15
3	500	25	5

\*processamentos referentes aos pontos centrais. Experimento com repetições.

### 3.2.5.2. Análises microbiológicas

#### ➤ *Redução microbiana de bactérias mesófilas*

As análises de contagem padrão em placa das amostras pressurizadas foram feitas conforme descrito no item 3.2.2.1. Os resultados foram expressos em redução microbiana, calculado através da equação (01) (SMELT, 1998; ROSENTHAL *et al.*, 2002; LADO & YOUSEF, 2002).

$$Rm = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (01)$$

Onde: Rm = Redução microbiana; N = n° final de microorganismos e N<sub>0</sub> = n° inicial de microorganismos.

#### ➤ *Redução microbiana de fungos filamentosos e leveduras*

As análises para contagem de fungos filamentosos e leveduras na amostras pressurizadas foram feitas conforme descrito no item 3.2.2.2. Os resultados foram expressos em redução microbiana, calculado através da equação (01) (SMELT, 1998; ROSENTHAL *et al.*, 2002; LADO & YOUSEF, 2002).

➤ ***Número Mais Provável de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C***

As análises de coliformes a 35 °C e a 45 °C nas amostras pressurizadas foram feitas conforme descrito no item 3.2.2.3. Os resultados foram expressos em NMP de coliformes a 35 °C/g de polpa e em NMP de coliformes a 45 °C/g de polpa.

➤ ***Detecção de *Salmonella* spp.***

A detecção de *Salmonella* spp. não foi realizada nas amostras controle, nem nas pressurizadas, já que não foi detectada esta espécie de microorganismo por ocasião da caracterização dessa matéria-prima.

**3.2.5.3. Análises enzimáticas**

A determinação de atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase foi realizada de acordo com o método de CANO *et al.* (1997), modificado por DOMINGUES (2003).

O extrato enzimático para a determinação da atividade enzimática foi obtido através da homogeneização de aproximadamente 15 g de polpa de açaí com 30 - 35 ml de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, contendo polivinilpirrolidona 1% (PVPP) e completando o volume com água destilada até 50 ml. Após homogeneização por 3 minutos com intervalos de 30 segundos, o material foi filtrado em papel qualitativo de filtração média, obtendo-se o extrato enzimático.

➤ ***Percentual de atividade da peroxidase***

Para a atividade de peroxidase, foram utilizados 0,025 ml do extrato enzimático e uma mistura reacional composta de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,5, com 0,2 ml de  $\rho$ -fenilenodiamina 1% (p/v) como doador de hidrogênio, e 0,1 ml de peróxido de hidrogênio 1,5% (p/v) como oxidante.

➤ ***Percentual de atividade da polifenoloxidase***

Para a atividade da polifenoloxidase, utilizaram-se 0,2 ml do extrato enzimático e uma mistura reacional composta de 3,0 ml de catecol 0,07 M em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5.

As análises das enzimas peroxidase e polifenoloxidase foram determinadas em espectrofotômetro SPECORD 205 com leituras a 485 nm e 420 nm, a 25 °C, durante 5 minutos, respectivamente. As atividades enzimáticas foram realizadas em triplicatas e calculadas através da variação da absorbância versus tempo. A avaliação do efeito do processamento sobre atividades das enzimas foi expressa em percentual (%) de atividade, calculado pela equação (02):

$$\% \text{ de atividade enzimática} = \frac{\text{atividade enzimática final}}{\text{atividade enzimática inicial}} \times 100 \quad (02)$$

#### 3.2.5.4. Análises quantitativas de antocianinas

A determinação quantitativa do teor antociânico da polpa de açaí foi realizada por espectrofotometria a 535 nm, conforme descrito por FULEKI & FRANCIS (1968).

Para a extração dos pigmentos, aproximadamente 10 g de polpa foram misturados a 10 ml da solução extratora (etanol 95% e ácido clorídrico 1,5 M (85:15)). A mistura foi armazenada em geladeira e mantida em repouso no escuro por 2 horas, depois foi filtrada em funil de Büchner com papel qualitativo de filtração média. O resíduo foi lavado com a mesma solução extratora e o filtrado avolumado até 50 ml. A partir desta, uma nova diluição foi feita com 2 ml do filtrado diluído até atingir 100 ml com a solução extratora, para a leitura da densidade ótica em triplicata. As análises de antocianinas foram determinadas em espectrofotômetro SPECORD 205, Alemanha, com leituras a 535 nm, a 25 °C. O coeficiente de distinção molar (E) adotado foi o encontrado por FULEKI e FRANCIS (1968) para o extrato de *cranberry* igual a 98,2.

#### ➤ *Percentual de retenção de antocianinas*

A avaliação do efeito do processamento sobre os pigmentos foi expressa em percentual (%) de retenção calculado conforme a equação (03), correspondendo à quantidade de antocianinas que ficou retida na polpa de açaí.

$$\% \text{ de retenção de antocianinas} = \left[ \frac{100 - (\text{antocianina inicial} - \text{antocianina final})}{\text{antocianina inicial}} \right] \times 100 \quad (03)$$

#### 3.2.5.5. Análises de cor instrumental

A análise instrumental de cor foi realizada por reflectância no S & M Colour Computer modelo SM - 4 - CH da Suga, no sistema Hunter com abertura de 30 mm de diâmetro. Os parâmetros de cor medidos, em quadriplicata, em relação à placa branca (L = 90,20; a = -2,34 e b = 1,38) foram: luminosidade (L), a e b.

A luminosidade é o parâmetro responsável pelo grau de claridade da luz, variando de 0 (preto) a 100 (branco puro), caracterizando as cores como claras e escuras. Os parâmetros a\* e b\* são responsáveis pela tonalidade, sendo que o primeiro define o componente vermelho-verde (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho) e o segundo define o componente amarelo-azul (-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo) (HUTCHINGS, 1994).

➤ **Valor de diferença de cor (DE)**

Os resultados do efeito do processamento de APH na cor da polpa de açaí foram expressos pelo valor de diferença de cor (DE), calculado a partir da seguinte equação (04) (NIENABER & SHELLHAMMER, 2001; CAMPOS, 2004):

$$DE = \sqrt{(a_{\text{processado}} - a_{\text{não-processado}})^2 + (b_{\text{processado}} - b_{\text{não-processado}})^2 + (L_{\text{processado}} - L_{\text{não-processado}})^2}$$

**3.2.5.6. Análises estatísticas**

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA versão 7.0 para Teste de Fischer, em nível de 5% de probabilidade, com procedimentos de ANOVA.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização da Polpa de Açaí

#### 4.1.1. Análises Microbiológicas

##### 4.1.1.1. Contagem total padrão em placa

A polpa de açaí apresentou contagem média de bactérias aeróbias mesófilas equivalente a  $3,57 \times 10^5$  UFC/g de polpa. Os resultados podem indicar uma matéria-prima contaminada, que foi sujeita a técnicas de higienização insatisfatórias, ou a possibilidade de certo abuso em relação ao binômio tempo/temperatura adequado durante o armazenamento, favorecendo a multiplicação desses patógenos (THATCHER & CLARK, 1978). Certos autores encontraram valores ainda superiores, com contagens da ordem de  $10^7$  a  $10^9$  UFC de bactérias mesófilas/g de matéria seca de açaí (VELOSO & SANTOS, 1994). Mas, muitos outros obtiveram contagens semelhantes às apresentadas (BUXANT *et al.*, 1997; ROGEZ, 2000; SOUTO, 2001; ALEXANDRE, 2002), comprovando a má qualidade, em geral, de polpas de açaí quanto à presença de bactérias aeróbias mesófilas.

##### 4.1.1.2. Contagem de fungos filamentosos e leveduras

A contagem média de fungos filamentosos e de leveduras na polpa de açaí tipo grossa foi de  $5,14 \times 10^4$  UFC/g de polpa. A Instrução Normativa n° 01, de 07/01/2000, do MAPA (BRASIL, 2000) estipula o limite máximo para esses microorganismos de  $5,0 \times 10^3$ /g de polpa *in natura*, o que classificaria a matéria-prima como imprópria para o consumo, quanto ao padrão de higiene. Já o Ministério da Saúde (MS), em portaria, RDC n° 12 de 02/01/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001), não determina limites máximos para fungos filamentosos e leveduras em polpas e sucos de frutas.

ALEXANDRE (2002) obteve contagens inferiores, com  $1,5 \times 10^3$  UFC de fungos filamentosos e leveduras/g de polpa de açaí média, valores considerados adequados para o consumo pela legislação do MAPA (BRASIL, 2000). Entretanto, a maioria dos trabalhos mostrou polpas impróprias do ponto de vista higiênico quando considerada a norma do MAPA (BRASIL, 2000), como, por exemplo, os trabalhos de BUXANT *et al.* (1997); ROGEZ (2000); CARNEIRO (2000) e SOUTO (2001).

##### 4.1.1.3. Enumeração de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C

Os resultados de coliformes, tanto a 35 °C quanto a 45 °C (Tabela 9), apresentaram grande variação entre as amostras e entre as duplicatas, o que é justificado

pela dispersão bacteriana nessas amostras, em função de cargas microbianas diversificadas em uma mesma amostra. Também a possibilidade de erro técnico de homogeneização da amostra, ou mesmo contaminação desta durante o procedimento das análises, pode ter ocorrido. Apesar dessa variabilidade nos resultados, todas amostras, ao serem comparadas à Instrução Normativa nº 01, de 07/01/2000 (BRASIL, 2000) a legislação do MAPA, estariam impróprias para o consumo, acima do limite máximo de 1 NMP de coliformes a 45 °C/g de polpa de açaí. Nesse elenco, 3 das 4 amostras apresentaram valores de coliformes a 45 °C superiores ao limite máximo estabelecido na RDC nº 12, de 02/01/2001, ANVISA (BRASIL, 2001), 100 NMP de coliformes a 45 °C/g de polpa de açaí.

**Tabela 9:** Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C/g de polpa de açaí grossa.

Amostras	Coliformes a 35°C (NMP/g de polpa de açaí grossa)	Coliformes a 45°C (NMP/g de polpa de açaí grossa)
1	9	<b>9</b>
	150	<b>7</b>
2	93	<b>93</b>
	460	<b>150*</b>
3	240	<b>240*</b>
	> 2400	<b>120*</b>
4	240	<b>240*</b>
	240	<b>240*</b>

Resultados de coliformes a 45 °C em **negrito** indicam amostras impróprias para o consumo, segundo a Instrução Normativa nº 01, de 07/01/2000 do MAPA (BRASIL, 2000).

\* Resultados de coliformes a 45 °C que indicam amostras impróprias para o consumo, segundo a RDC nº 12, de 02/01/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001).

Os trabalhos de CARNEIRO (2000) e de ALEXANDRE (2002) mostraram que em polpa de açaí média, valores encontrados de coliformes a 35 °C foram de 0,04 e 21 NMP/g de polpa, respectivamente, e ausência de coliformes a 45 °C. Entretanto, VELOSO & SANTOS (1994), pesquisando coliformes a 35 °C/g de açaí, detectaram cargas superiores a 2400 NMP/g de suco. ROGEZ (2000), analisando 26 amostras de açaí, encontrou população elevada, maior que 1100 NMP de coliformes a 45 °C/g de açaí, valores acima dos limites estabelecidos em legislação brasileira (BRASIL, 2000; BRASIL, 2001).

#### **4.1.1.4. Detecção de *Salmonella* spp.**

Para a caracterização microbiológica, foram realizadas as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e plaqueamento em meios seletivos para detecção da *Salmonella*, porém não foram feitas a triagem das colônias, nem as provas bioquímicas complementares ou sorológicas, pois não houve crescimento de colônias características de *Salmonella*. Nesse caso, a polpa de açaí grossa analisada apresentou ausência de salmonela em 25 g de amostra, estando de acordo com os padrões de qualidade fixados na Instrução Normativa nº 01, de 07/01/2000, do MAPA (BRASIL, 2000) e também com a RDC nº 12, de 02/01/2001, da ANVISA (BRASIL, 2001), sobre padrões microbiológicos de sucos e polpas.

Embora a *Salmonella* geralmente cresça e se desenvolva em produtos de origem animal, foram encontradas *Salmonella* entre 10 e 20% das amostras analisadas de açaí (VELOSO & SANTOS, 1994). Entre as 26 amostras de açaí analisadas por ROGEZ (2000), em 4 foram detectadas *Salmonella*.

A carga microbiana elevada no fruto açaí pode ser explicada pela conjunção dos seguintes fatores: é um excelente meio para o crescimento de contaminantes; a superfície da fruta é considerável em comparação à sua espessura; a palmeira açaí cresce em meios tropicais úmidos, propícios ao crescimento de microorganismos e de insetos; a falta de cuidado durante a colheita e o transporte da fruta (BUXANT *et al.*, 1997).

#### 4.1.2. Composição Centesimal

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, mediante a Instrução Normativa nº 01, de 07/01/2000 (BRASIL, 2000), estabelece os padrões de identidade e as características mínimas e gerais de qualidade sob as quais deverá o produto polpa de açaí ser observado. Sabe-se que essa polpa corresponde à parte comestível do fruto do açazeiro produzido através de processos tecnológicos. Durante o despulpamento, “açazeiras” ou as próprias indústrias adicionam água potável, e dependendo do volume, a polpa obtida é classificada em função do percentual de sólidos totais quanto ao tipo: fino, médio ou grosso. As análises da polpa de açaí revelaram percentual de sólidos totais de 15,48 (Tabela 10), mostrando que o percentual está superior ao limite máximo (14%) de polpa média, enquadrando-o portanto, como açaí tipo A ou grosso, muito embora, o fabricante o tenha classificado como sendo tipo B ou médio como constava no rótulo.

**Tabela 10:** Composição centesimal da polpa de açaí.

Análises	Resultados
Umidade (%)	84,52 ± 0,87 <sup>1</sup>
Cinzas (%)	0,61 ± 0,02 <sup>1</sup> / 3,92 ± 0,31 <sup>2</sup>
Sólidos Totais (%)	15,48 ± 0,87 <sup>1</sup>
Lipídeos (%)	6,71 ± 0,11 <sup>1</sup> / 42,73 ± 2,06 <sup>2</sup>
Proteínas (%)	1,78 ± 0,42 <sup>1</sup> / 11,45 ± 2,15 <sup>2</sup>
Carboidratos (%)	6,38 ± 0,64 <sup>1</sup> / 41,16 ± 2,05 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>em g/100 g de polpa

<sup>2</sup>em g/100 g de matéria seca

A polpa de açaí grossa apresentou elevado teor de lipídeos, 6,71% ± 0,11 em base úmida ou 42,73% ± 2,06 em termos de matéria seca, estando de acordo com as normas regulamentares, que determinam que ela deve ter, no mínimo, 20 g de lipídeos totais/100 g de matéria seca (BRASIL, 2000). Outros autores encontraram para essa fração, valores em base úmida de 6,0 a 7,7% (PONTES *et al.*, 1998; SIQUEIRA *et al.*, 1998; FRANCO, 1999; CARNEIRO, 2000; SOUTO, 2001; ALEXANDRE, 2002; BEZERRA, 2002). O extrato etéreo, é normalmente citado na literatura especificamente como lipídeos, por ser constituído de óleos e gorduras e outros nutrientes lipossolúveis como pró-vitaminas, vitaminas e pigmentos (FENNEMA, 2000). Universalmente, os valores de lipídeos, quando multiplicados por 9, fornecem parte do valor calórico total do produto. Portanto, isso só deve ser considerado quando a maior fração dos lipídeos

for de óleos e gorduras. Assim, esses valores contribuem para o alto valor energético da polpa (OLIVEIRA *et al.*, 2002; YUYAMA *et al.*, 2002; YUYAMA *et al.*, 2004).

A quantidade de carboidratos,  $6,38\% \pm 0,64$  g em matéria úmida e  $41,16\% \pm 2,05$  g em base seca, contida na polpa de açaí grossa, pode ter sido mascarada pelo teor de fibras, que não fora analisado na composição centesimal e foi incluído no cálculo de açúcares totais. No açaí grosso, o teor de glicídeos é relativamente baixo, correspondendo, em média, a  $2,96\%$  em matéria seca. O açaí não é considerado uma boa fonte de hidratos de carbono, isso conforme relatado por ROGEZ (2000), que encontrou 0,37 g de açúcares/100 g de polpa de açaí médio. Apesar de não ser pesquisada a fração de fibras alimentares, a polpa de açaí contém quantidade de fibras bastante expressiva, como mostraram estudos de MOTTA (1946) e CHAVES & PECHNIK (1945) *apud* ROGEZ (1996) (Tabela 1), que relataram percentuais entre 30 - 32 (base seca) e de YUYAMA *et al.* (2004), que encontraram 7,7, 5,3 e 7,2% (base úmida) em polpas de três diferentes localidades do Ecossistema Amazônico. Esses valores chamaram a atenção de outros, principalmente, por atingirem percentuais próximos ao da concentração de lipídeos, o mais importante componente desse produto.

Os resultados das análises de proteínas na polpa foram, em média, de 1,78 g de proteína/100 g de polpa de açaí grosso, valores bem próximos de CARNEIRO (2000), SOUTO (2001) e ALEXANDRE (2002), com 1,4 g, 1,75 g e 1,5 g de proteína/100 g de polpa de açaí, respectivamente. O teor protéico encontrado em bebidas de açaí varia de 1,5% a 13% (BEZERRA *et al.*, 2002). Comparado aos padrões de identidade exigidos pela Instrução Normativa do MAPA (BRASIL, 2000), os 11,45 g de proteínas/100 g de matéria seca encontrados estão além do limite mínimo de 5 g de proteínas/100 g de matéria seca, portanto, enquadrando-se dentro dos padrões vigentes. Esses valores se aproximam dos percentuais de 13 a 18 de proteínas relatados por ROGEZ *et al.* (1996). Embora a fração protéica dessa polpa seja baixa (OLIVEIRA *et al.*, 2002), esse macronutriente não deve ser desprezado, pois existe ainda carência de informações a respeito do perfil de aminoácidos que constituem essa fração.

#### **4.1.3. Análises Físico-Químicas**

Na polpa de açaí grossa, contendo 15,48% de sólidos totais, foi detectada acidez de 0,3609 g de ácido cítrico/100 g de matéria úmida (Tabela 11), dentro do limite máximo de 0,45 g de ácido cítrico/100 g de matéria úmida, específico para açaí grosso, fixado pela Instrução Normativa nº 01 de 07/01/2000, do MAPA (BRASIL, 2000). CARNEIRO (2000) e ALEXANDRE (2004) obtiveram valores de acidez semelhantes embora tratando-se de polpa média, com  $0,332 \pm 0,001$  e  $0,310 \pm 0,000$  g de ácido cítrico/100 g de polpa, respectivamente.

A polpa de açaí apresentou pH igual a  $4,75 \pm 0,05$  (Tabela 11), valores dentro dos padrões estabelecidos pelo MAPA, que dispõe uma margem de pH de 4,00 a 6,2 (BRASIL, 2000). Isso demonstra as boas condições físico-químicas da matéria-prima utilizada nesse trabalho. Porém, nesse caso, por ser considerada um alimento de baixa acidez (pH > 4,6), segundo FRANCO & LANDGRAF (1996), coloca-se entre os mais sujeitos à contaminação microbiana, tanto de espécies patogênicas quanto de deteriorantes.

A concentração de sólidos solúveis expressa em graus Brix, referente à polpa utilizada nesse estudo, apresentou  $4,25 \pm 0,29$  °Brix, indicando que há, em média, 4,25 g de sólidos solúveis/100 g de polpa grossa. Valores diferentes foram observados

por CARNEIRO (2000) e ALEXANDRE (2004) para polpa média,  $3,1 \pm 0,20$  e  $3,2 \pm 0,10$ , respectivamente. O valor obtido foi superior em função de ser polpa grossa, menos diluída, assim, com mais sólidos solúveis em 100 g de extrato úmido.

**Tabela 11:** Aspectos físico-químicos da polpa de açaí.

Análises	Valores médios
Acidez titulável (g ácido cítrico/100 g de polpa)	$0,3609 \pm 0,18$
pH	$4,75 \pm 0,05$
Sólidos solúveis (°Brix)	$4,25 \pm 0,29$
Relação brix/acidez (ratio)	$11,77 \pm 0,80$

A relação brix/acidez é adotada por muitos produtores para determinar o ponto ótimo de maturação de frutos, no momento da colheita (CHEFTEL, 1989). A razão entre os sólidos solúveis e a acidez do produto é importante para indicar o grau de doçura que apresenta a polpa, sendo também bastante utilizada na indústria de sucos para a obtenção de uma melhor qualidade dos mesmos (CHEFTEL, 1989). Nesse caso, a relação brix/acidez de  $11,77 \pm 0,80$  é diferente da encontrada em outras polpas, principalmente daquelas com maiores teores de açúcares e de ácidos.

## 4.2. Processamento de Alta Pressão Hidrostática (APH)

O equipamento foi programado para a pressão, temperatura e tempo correspondentes ao processamento desejado. Após o descongelamento das polpas, sob refrigeração, e separadas as amostras controles, outras foram colocadas no recipiente de pressão, e submetidas ao processamento.

No início do processo, existe um “tempo de subida”, que corresponde ao tempo necessário para que se atinja a pressão de trabalho na câmara. Esse tempo não excedeu 5 minutos; a velocidade de injeção de pressão foi de, aproximadamente, 20 MPa por segundo. Durante o tratamento, a temperatura e a pressão oscilaram ligeiramente, em especial a primeira, por conta do calor adiabático gerado, mas, ainda assim, apresentaram temperatura e pressão por minuto bastante próximo das variáveis ajustadas.

Ao término do tempo, contabilizado a partir do instante em que a pressão de trabalho foi atingida, o sistema foi despressurizado e as amostras foram retiradas do recipiente e mantidas sob refrigeração por um período máximo de 2 horas até as determinações.

### 4.2.1. Análises Microbiológicas

#### 4.2.1.1. Redução microbiana de bactérias mesófilas

Amostras controles, analisadas antes da pressurização, apresentaram contagem média de  $1,68 \times 10^6$  UFC/g de polpa de açaí grossa.

A tabela 12 apresenta a análise de variância do modelo para a redução microbiana de bactérias mesófilas, após os 11 ensaios de pressurização de polpas de

açai. Com base nos resultados, apenas a temperatura possui importância sobre a morte microbiana dessas bactérias ( $p < 0,05$ ). A curvatura, não foi significativa, sugerindo um modelo linear e não quadrático, como estabelecido na análise dos dados.

**Tabela 12:** Análise de variância do modelo quadrático, para redução de bactérias mesófilas (Rm) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.

Fator	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	p
Curvatura	0,06	1	0,06	0,5361	0,4771
MPa (1)	0,12	1	0,12	1,0341	0,3278
T °C (2)	2,90	1	2,90	24,4801	<b>0,0003</b>
t (3)	0,04	1	0,04	0,3351	0,5725
Interação (1) e (2)	0,20	1	0,20	1,6766	0,2180
Interação (1) e (3)	0,01	1	0,01	0,0966	0,7569
Interação (2) e (3)	0,37	1	0,37	3,0820	0,1027
Interação (1), (2) e (3)	0,25	1	0,25	1,0875	0,1722
Erro	1,53	13	0,12		
Soma quadrática total	5,49	21			

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ ).

$R^2 = 0,71941$ .

$R^2_{\text{ajustado}} = 0,54674$ .

O gráfico 1 ilustra os valores observados de redução microbiana de bactérias aeróbias mesófilas e os valores previstos pelo modelo quadrático adotado. Observou-se que a maioria dos pontos encontra-se próximo dos valores previstos, embora ainda se notasse que outros se colocaram bastante distantes, o que talvez tenha sido indicado pelo valor do  $R^2$  (Tabela 12).

Tratamentos a 300 MPa, a 25 °C, com tempos de exposição de 5 e 15 minutos, foram capazes de reduzir a população de bactérias mesófilas em menos de 3 ciclos log UFC/g de polpa de açaí, apresentando  $R_m < - 3,00$  (Gráfico 2). A contagem de bactérias mesófilas nessas polpas pressurizadas não diferiu significativamente entre si (Anexo I). As reduções microbianas dessas polpas foram superiores às encontradas por diversos outros autores observados na tabela abaixo (Tabela 13).

Quando polpas de açaí foram tratadas a 300 MPa, a 25 °C, por 5 ou 15 minutos, a redução microbiana foi entre 2 e 3 ciclos log UFC de bactérias mesófilas/g de polpa de açaí. Porém, quando essa polpa foi pressurizada nas mesmas condições de pressão, a 35 °C, durante 5 ou 15 minutos, a redução na população foi superior, entre 3 e 4 ciclos log UFC/g de polpa, mostrando, nesse caso, a importância da temperatura na destruição desses microorganismos (Tabela 12 e Gráfico 2). Em tratamentos a 500 MPa por 5 minutos, tanto a 25 °C, quanto a 35 °C, também apresentaram  $R_m$  entre 3 e 4, mas naqueles com 15 minutos de exposição, o aumento da temperatura outra vez evidenciou significância, reduzindo mais que 4 ciclos log UFC de bactérias mesófilas/g de polpa. Esses valores são superiores aos encontrados por PORRETA *et al.* (1995), em sucos de tomate tratados a 500, 700 e 900 MPa, durante 3, 6 e 9 minutos, com pH 4,0; 4,5 e 5,0, pois obtiveram reduções de 2 ciclos log UFC de bactérias mesófilas/ml de suco, quando pressurizados a 500 MPa por 3 minutos, independentemente do pH.



**Tabela 13:** Efeito da alta pressão hidrostática sobre bactérias aeróbias mesófilas observado por diferentes autores.

Autor	Fonte	Tratamento de APH	Redução microbiana (ciclo log UFC/g)
ALEMAN <i>et al.</i> (1996)	fatias de abacaxis	340 MPa/4 °C/5 min.	2
ARROYO e PRÉSTAMO (1997)	alfaces em pedaços	350 MPa/20 °C/10 min.	1
ARROYO e PRÉSTAMO (1997)	tomates em pedaços	300 MPa/10 °C/20 min.	1
BOYNTON <i>et al.</i> (2002)	pedaços de manga Tommy Atkins	300 MPa/5 a 45 °C/1 min.	1
BOYNTON <i>et al.</i> (2002)	pedaços de manga Keitt	600 MPa/5 a 45 °C/1 min.	2
KREBBERS <i>et al.</i> (2003)	purê de tomate	300 MPa/ 20 °C/ 2 min. 500 MPa/20 °C/2 min.	0,5 0,7

#### **4.2.1.2. Redução microbiana de fungos filamentosos e leveduras**

As contagens de fungos filamentosos e leveduras foram realizadas simultaneamente nas amostras controles e nas amostras tratadas por APH. A média de contagem desses microorganismos nas amostras controles foi de  $1,08 \times 10^5$  UFC/g, superior às encontradas por ocasião da caracterização da matéria-prima ( $5,14 \times 10^4$  UFC/g), no início do experimento. Considerando a Instrução Normativa n° 01, de 07/01/2000, do MAPA (BRASIL, 2000), que formaliza o limite máximo desses microorganismos em polpa *in natura* que é  $5,0 \times 10^3$ /g, a polpa de açaí que foi usada nessa pesquisa seria classificada como imprópria para o consumo quanto ao padrão de higiene.

Todas as amostras pressurizadas reduziram ao máximo as contagens de fungos e leveduras, exatamente conforme relatou SMELT (1998), que pressões entre 200 – 300 MPa seriam suficientes para inativar este tipo de microorganismo. Após tratamentos de pressão, as contagens reduziram até 5 ciclos log UFC/g de polpa de açaí em todos os níveis de pressão, temperatura e tempo. Tratamentos mais brandos como 300 MPa, a 25 °C, por 5 minutos, foram tão eficazes quanto aqueles máximos, como 500 MPa, a 35 °C, por 15 minutos. OSUMI *et al.* (1992) *apud* ARROYO & PRÉSTAMO (1996) investigaram a ultraestrutura e citoesqueleto de células de leveduras usando microscópio eletrônico: observaram que acima de 200 MPa a parede celular foi danificada e a estrutura subcelular alterada, principalmente o núcleo e mitocôndrias. O mesmo efeito pode ter ocorrido na população de microorganismos dessa espécie em polpas de açaí pressurizadas em diferentes níveis de pressão, temperatura e tempo.

PORRETA *et al.* (1995) pressurizando suco de tomate a 500 MPa por 3 minutos e a 900 MPa por 9 minutos, independentemente dos níveis de pH que foram adotados como variáveis do processo, conseguiram reduções de 4 e 3 ciclos log UFC de fungos e leveduras/ml de suco, respectivamente, reduções inferiores às observadas em polpas de açaí. Essa resposta do efeito de altas pressões sobre populações de fungos e leveduras também foi observada por ARROYO & PRÉSTAMO (1996) em alface e tomate em pedaços tratados a 350 MPa, 20 °C, por 10 minutos ou sob 300 MPa, 10 °C, por 20 minutos, onde as reduções encontradas se limitaram a apenas 1 ciclo log UFC de fungos filamentosos e leveduras/g de produto.

#### 4.2.1.3. Número Mais Provável de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C

Polpas de açaí sem tratamento foram analisadas antes de cada processamento de APH. Nessas polpas foram detectadas leituras de coliformes, a 35 °C, equivalentes a mais de 2400 NMP/g de polpa, valores superiores aos apresentados por ocasião da caracterização da matéria-prima (Tabela 14 e Tabela 9). Os valores encontrados para coliformes a 45 °C foram variados, semelhantes aos resultados revelados na caracterização dessa matéria-prima (Tabela 9), todos acima dos limites preconizados pela Instrução Normativa nº 01 de 07/01/2000, MAPA (BRASIL, 2000) e mais da metade dela imprópria para o consumo, de acordo com a RDC nº 12 de 02/01/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001).

**Tabela 14:** Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C em polpas de açaí controles.

Amostras	Coliformes a 35 °C (NMP/g de polpa de açaí)	Coliformes a 45 °C (NMP/g de polpa de açaí)
1	>2400	<b>&gt;2400*</b>
	>2400	<b>&gt;2400*</b>
2	>2400	<b>43</b>
	>2400	<b>43</b>
3	>2400	<b>&gt;2400*</b>
	>2400	<b>&gt;2400*</b>
4	>2400	<b>460*</b>
	>2400	<b>1100*</b>
5	>2400	<b>43</b>
	>2400	<b>15</b>
6	>2400	<b>93</b>
	>2400	<b>93</b>
7	>2400	<b>1100*</b>
	>2400	<b>460*</b>

Resultados de coliformes a 45 °C em **negrito** indicam amostras impróprias para o consumo, segundo a Instrução Normativa nº 01, de 07/01/2000 do MAPA (BRASIL, 2000).

\* Resultados de coliformes a 45 °C que indicam amostras impróprias para o consumo, segundo a RDC nº 12, de 02/01/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001).

As amostras pressurizadas apresentaram resultados surpreendentes diante dos diferentes níveis de pressão (300, 400 e 500 MPa), temperatura (25, 30 e 35 °C) e tempo (5, 10 e 15 minutos) adotados nos ensaios, observando-se a total letalidade de coliformes a 35 °C (< 3 NMP/g de polpa de açaí) e, conseqüentemente, de coliformes a 45 °C (< 3 NMP/g de polpa de açaí), mostrando o efeito benéfico desse processo na

destruição dessa flora microbiana contida na polpa de açaí e, também, na preservação deste produto, contribuindo para aumentar a sua durabilidade quando armazenado sob refrigeração.

#### 4.2.1.4. Detecção de *Samonella spp.*

As polpas de açaí pressurizadas não foram analisadas quanto à detecção de *Salmonella spp.*, partindo do princípio que havia ausência destes microorganismos em 25 g de amostra, avaliadas na caracterização da matéria-prima no início do estudo.

#### 4.2.2. *Análises Enzimáticas*

##### 4.2.2.1. Percentual de atividade da peroxidase

A tabela 15 mostra os resultados da análise de variância do modelo quadrático.

**Tabela 15:** Análise de variância do modelo quadrático para percentual de atividade da POD (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.

Fator	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	p
Curvatura	295,99	1	295,99	5,9076	<b>0,0229</b>
MPa (1)	119,178	1	119,178	2,3786	0,1361
T °C (2)	170,42	1	170,42	3,4014	0,0775
t (3)	2034,60	1	2043,60	40,7877	<b>0,0000</b>
Interação (1) e (2)	492,95	1	492,95	9,8386	<b>0,0045</b>
Interação (1) e (3)	159,31	1	159,31	3,1797	0,0872
Interação (2) e (3)	760,37	1	760,37	15,1761	<b>0,0007</b>
Interação (1), (2) e (3)	52,39	1	52,39	1,0456	0,3167
Erro	1202,48	24	50,10		
Soma quadrática total	5296,69	32			

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ )

$$R^2 = 0,77298$$

$$R^2_{\text{ajustado}} = 0,6973$$

A curvatura foi um fator importante, mostrando-se significativa ( $p < 0,05$ ) e indicando que o modelo quadrático foi apto ao expressar o comportamento da POD submetida às variáveis de trabalho mencionadas. Apesar da importância há a necessidade de obter-se um planejamento mais abrangente, com mais experimentos, para identificar o verdadeiro fator determinante da curvatura. Além da curvatura, dentre os três fatores (pressão, temperatura e tempo), somente o tempo, isoladamente, apresentou significância ( $p < 0,05$ ) (Tabela 15), diferente do trabalho de HENDRICKX *et al.* (1998), em que não havia efeito significativo no aumento do tempo sobre a atividade enzimática da POD em feijões verdes. Na polpa de açaí, as interações entre os fatores pressão e temperatura, e temperatura e tempo foram significativas, mostrando, nesse caso, que a temperatura só foi importante quando interagindo com outra variável de processo (Tabela 15). O mesmo foi observado por HENDRICKX *et al.* (1998),

quando a inativação enzimática da POD em feijões verdes aumentou, com a combinação de pressão e temperatura, em especial sob 600 MPa.

Percentuais de atividade da POD observados foram comparados aos resultados previstos pelo modelo e demonstrados no gráfico 3, onde se nota uma satisfatória qualidade do modelo quadrático adotado para a análise dos dados, também representada pelo coeficiente de regressão ( $R^2 = 0,77$ ).

No gráfico 4 mostra que polpas de açaí submetidas a processamentos, com 15 minutos de exposição, apresentaram independentemente do nível de pressão e temperatura, um percentual de POD médio inferior às processadas a 5 minutos, mostrando a importância do tempo de trabalho sobre a enzima (Tabela 15). Também demonstraram menores percentuais de atividade da POD médios que as amostras controles, com exceção do tratamento 300 MPa, 35 °C, 15 minutos, onde foi obtido 102,78% de atividade da POD (Gráfico 4). A sobreposição das retas no gráfico indica a relevância da interação entre as variáveis pressão e temperatura (Gráfico 4).

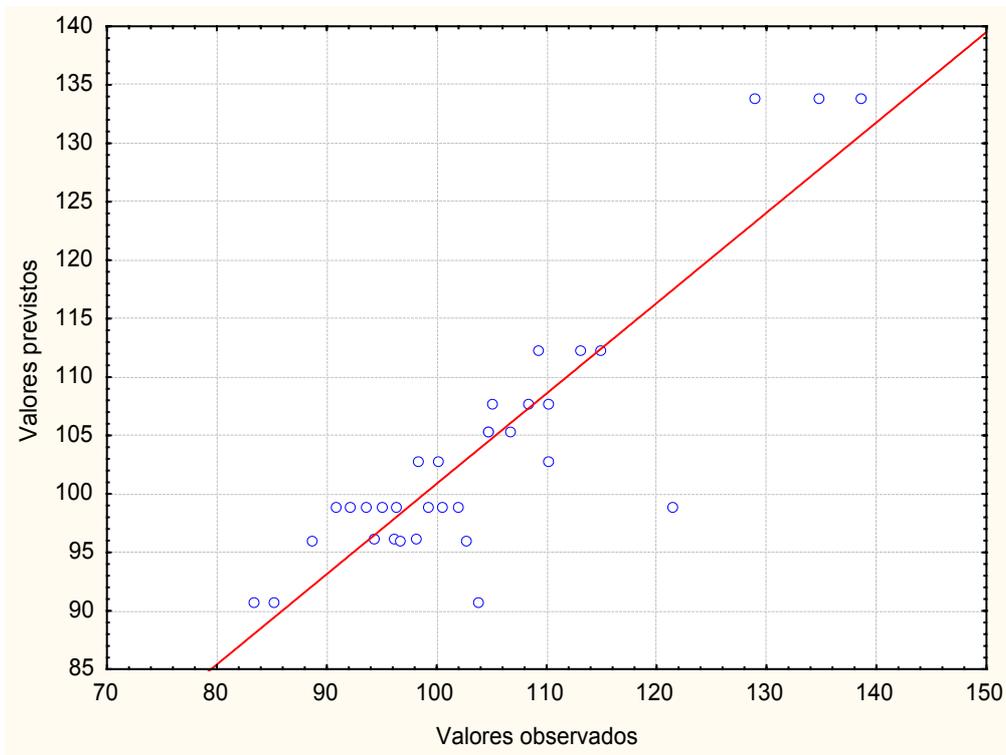
Quando a amostra foi submetida a 300 MPa, foram observados comportamentos opostos na atividade enzimática da POD, em função da temperatura e do tempo (Gráfico 4). Na polpa tratada por 5 minutos, houve ligeira redução do percentual de atividade com o aumento da temperatura para 35 °C, entretanto, as diferenças não foram consideradas estatisticamente significativas (Gráfico 4 e Anexo III) e, o contrário ocorreu quando as amostras foram tratadas por 15 minutos, pois o aumento da temperatura para 35 °C resultou em ativação da POD (Gráfico 4).

HERNÁNDEZ & CANO (1998) estudaram o efeito do processamento de alta pressão sobre a POD de purês de tomate. Observaram que pressões inferiores a 350 MPa, 20 °C, por 15 minutos, aumentavam a atividade da POD do purê, como pressões a 300 MPa, a 25 °C, por 5 minutos também aumentaram as atividades de POD em polpas de açaí (Gráfico 4). Em purês de tomate submetidos a tratamentos com pressões maiores que 350 MPa, a 20 °C, por 15 minutos, a inativação da POD mostrava-se significativa, diferentemente do ocorrido em polpas de açaí pressurizadas sob 500 MPa, a 25 e a 35 °C, por 15 minutos, em que se registraram percentuais de atividade da POD de apenas 96,15% e 95,97%, estatisticamente iguais a 100% de atividade (amostras controles) (Gráfico 4).

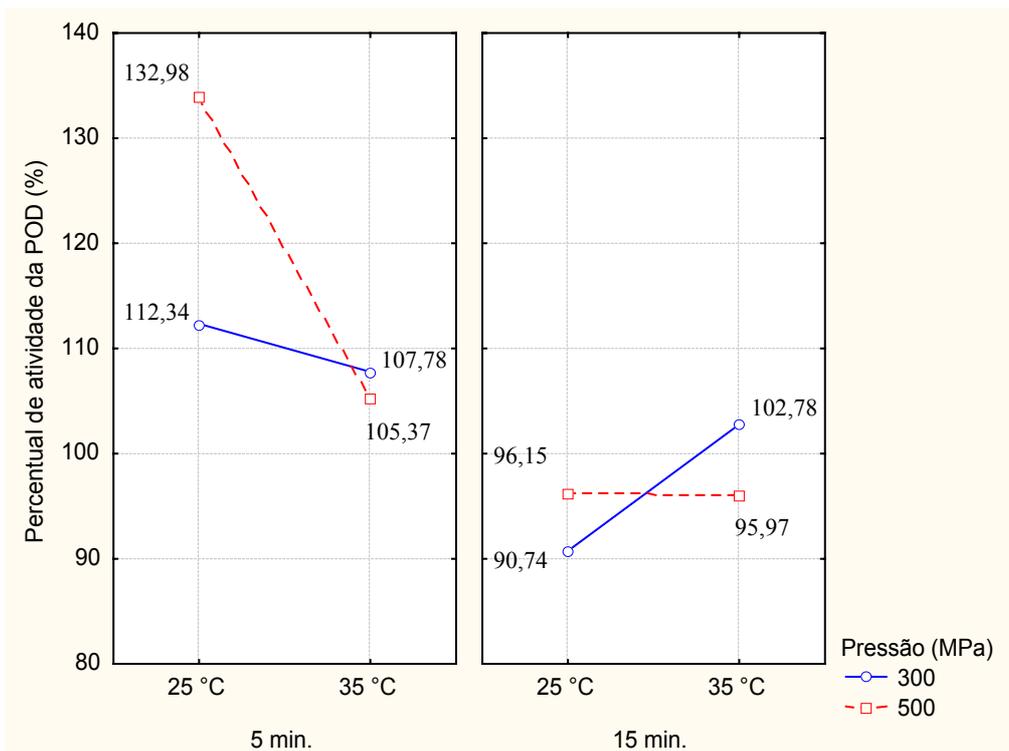
Tratamentos de pressão a 400 MPa, a 30 °C por 10 minutos em polpas de açaí revelaram percentual de atividade da POD igual à 106,53% e GARCIA-PALAZON *et al.* (2004), ao processarem morangos a 400 MPa, a 18 - 22 °C por 15 minutos, observaram atividade residual da POD diferente das encontradas em polpas de açaí, notando que 5% da atividade da POD era inativada. Estes dados são divergentes daqueles encontrados por CANO *et al.* (1997), que obtiveram a melhor inativação da POD, quando restaram apenas 50% da atividade residual dessa enzima, em suco de laranja tratado a 400 MPa, a 32 °C, por 15 minutos de processo, condições parecidas com as adotadas neste estudo e por GARCIA-PALAZON *et al.* (2004), pois segundo CANO *et al.* (1997), a inativação depende principalmente da característica do produto, mas também, do tipo da enzima e da condição de processo.

Quando HERNÁNDEZ & CANO (1998) adotaram tratamentos a 400 - 500 MPa e temperaturas entre 30 e 60 °C, houve um aumento da atividade da POD de purês de tomate, mas esse comportamento em polpas de açaí foi observado somente quando as amostras foram tratadas por processos com 5 minutos de exposição, principalmente a 500 MPa, a 25 °C, tendo ocorrido uma ativação da POD de 32,98%, considerando-se que polpas controles, correspondem a 100% (Gráfico 4). Tomando por base, os resultados obtidos, pode-se comparar os tratamentos com pressão, e observa-se que nem

**Gráfico 3:** Valores previstos (linha) versus observados (pontos), com base no modelo quadrático, para percentuais de atividade da POD (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.



**Gráfico 4:** Médias dos percentuais de atividade da POD (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.



todos os ensaios diferiram estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) (Anexo III). Curiosamente, os resultados demonstraram que segundo ANOVA a POD de açaí apresenta o mesmo percentual de atividade médio após tratamento a 300 MPa e 500 MPa, a 25 °C, por 15 minutos (90,74% e 96,15%), e este último estatisticamente igual ao 500 MPa, a 35 °C por 15 minutos com 95,97% de atividade da POD. Nos tratamentos a 35 °C, por 5 minutos, as observações foram iguais a 300 MPa ou a 500 MPa (107,78% e 105,37%). Percentuais de atividade da POD de polpas de açaí pressurizadas a 300 MPa, 35 °C (107,78% e 102,78%) e a 400 MPa, 30 °C por 10 minutos (106,53%) (Anexo III) também revelaram semelhanças. Esses fatos comprovaram que a pressão, isoladamente, não teve importância significativa à resposta do percentual de atividade da POD (Tabela 15).

#### 4.2.2.2. Percentual de atividade da polifenoloxidase

A tabela 16 demonstra a análise de variância do modelo quadrático para o efeito da APH sobre a PFO de polpas de açaí. A curvatura mostrou importância significativa ( $p < 0,05$ ), indicando que o modelo foi próprio à análise dos processamentos sobre o percentual de atividade da PFO. A pressão e a temperatura, isoladamente, também foram fatores significativos em nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), bem como a interação entre eles (Tabela 16). O coeficiente de regressão ( $R^2 = 0,88$ ), próximo de 1,0, aponta para uma boa qualidade dos resultados de percentual de atividade da PFO de polpas de açaí (Tabela 16).

**Tabela 16:** Análise de variância do modelo quadrático para percentual de atividade da PFO (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.

Fator	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	p
Curvatura	3656,76	1	3656,76	12,0418	<b>0,0020</b>
MPa (1)	12928,04	1	12928,04	42,57232	<b>0,0000</b>
T °C (2)	20731,70	1	20731,70	68,2699	<b>0,0000</b>
t (3)	330,06	1	30,06	1,0869	0,3075
Interação (1) e (2)	14366,10	1	14366,10	47,3079	<b>0,0000</b>
Interação (1) e (3)	935,37	1	935,37	3,0802	0,0920
Interação (2) e (3)	877,02	1	877,02	2,8881	0,1022
Interação (1), (2) e (3)	542,37	1	542,37	1,7861	0,1939
Erro puro	7288,14	24	303,67		
Soma quadrática total	61655,57	32			

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ ).

$$R^2 = 0,88179$$

$$R^2_{\text{ajustado}} = 0,84239$$

O modelo quadrático, empregado para a análise dos resultados de percentual de atividade da PFO em polpas de açaí pressurizadas, mostrou-se satisfatório, pois os valores experimentais observados distam pouco daqueles previstos pelo próprio modelo (Gráfico 5).

Processamentos hidrostáticos sobre polpas de açaí grossas, a 300 MPa, apresentaram percentual de atividade da PFO médio menores do que aqueles tratados a

500 MPa, exceto quando a 500 MPa, a 35 °C, por 15 minutos de exposição, registrando-se, em média, 70,25% de atividade da PFO inferior ao 300 MPa, a 35 °C, por 15 minutos (75,74%) (Gráfico 6). Tratamentos sob 300 MPa, tanto a 25 °C, quanto a 35 °C, inativaram a PFO, reduzindo seus percentuais de atividade a 65,79% e a 53,25%, quando o tempo de processo foi de 5 minutos (Gráfico 6). A polpa de açaí pressurizada a 300 MPa, a 25 °C, por 5 minutos atingiu percentual de atividade de PFO médio (65,79%) bem próximo aos 61,6% encontrados por CASTELLARI *et al.* (1997), em mostos de uvas brancas submetidos a 600 MPa, a 15 °C, por 10 minutos. YEN & LIN (1998) também verificaram que ainda existiam 63% de atividade de PFO em purê de goiaba submetido a 600 MPa, a 25 °C, por 5 minutos. Quando a polpa de açaí foi tratada por 15 minutos, sob 300 MPa, a 25 °C a média da atividade da PFO foi 83% (Gráfico 6). Semelhante resultado (86%) foi encontrado por YEN & LIN (1998), ao submeterem purês de goiaba a 400 MPa, a 25 °C, por 15 minutos. No entanto, ASAKA & HAYASHI (1991), ao tratarem peras fatiadas nas mesmas condições dos purês de goiaba, obtiveram aumento da atividade enzimática. Isso prova que os comportamentos de polifenoloxidasas são diversificados, dependendo da origem e de diferentes condições de processos (WEEMEAS, 1998a).

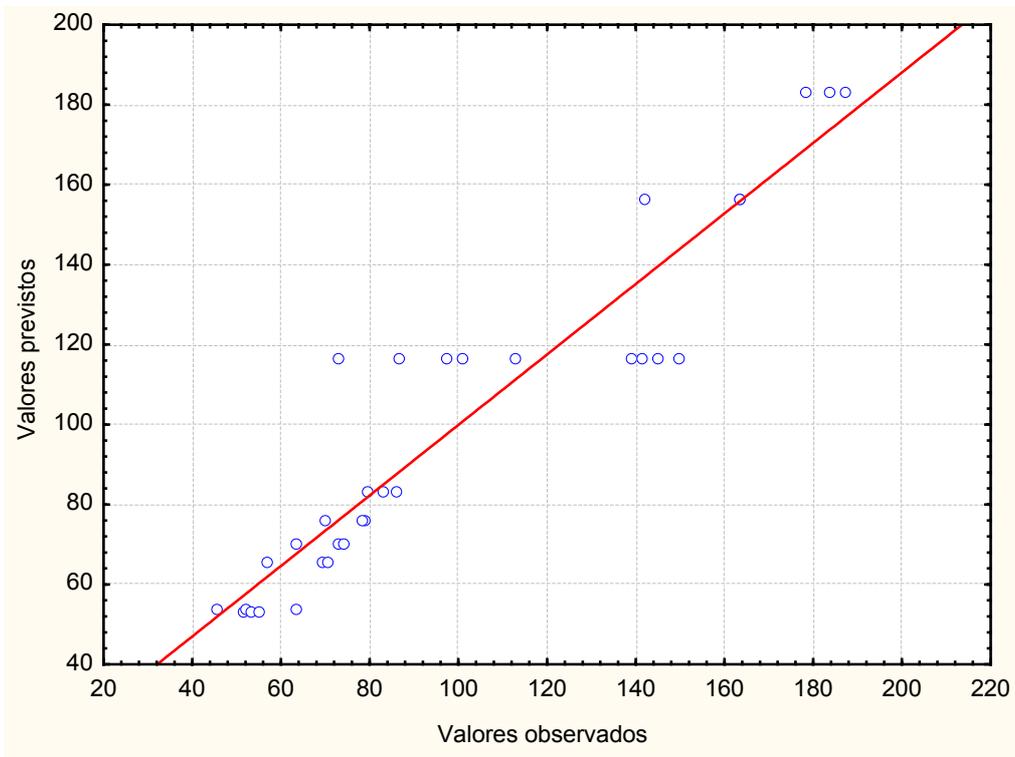
Observações interessantes foram feitas, quando se compararam processamentos com variações de pressão, temperatura e tempo. Polpas tratadas a 300 MPa e 500 MPa a 35 °C, por 5 minutos (53,25% e 53,72%), resultaram em percentuais de atividade da PFO de polpas de açaí, estatisticamente, iguais ( $P < 0,05$ ) (Anexo IV). As polpas de açaí também obtiveram os mesmos percentuais de atividade da PFO, quando tratadas às mesmas condições, por 15 minutos de exposição (75,74% e 70,25%) (Anexo IV).

As enzimas POD e PFO desempenharam diferentes reações diante das condições a que foram expostas ao se submeterem polpas de açaí aos 11 ensaios com pressão, diferindo quanto à importância dos fatores nos processos, quanto às condições ótimas de inativação entre níveis de pressão, temperatura e tempo, e até mesmo quanto à adequabilidade do modelo aplicado para a análise dos resultados.

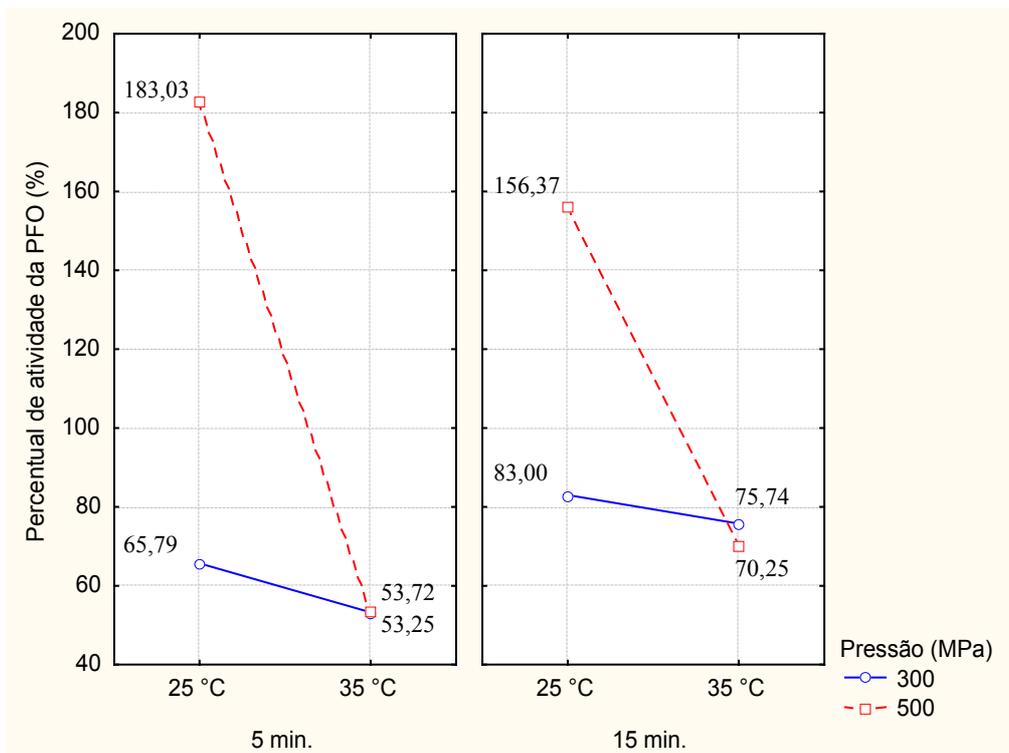
A atividade da POD em polpas de açaí pressurizadas se apresentou bastante estável, sofrendo inativação máxima de apenas 9,26% (300 MPa, a 25 °C, por 15 minutos) e atingindo percentuais bem próximos das atividades de POD em polpas não tratadas (amostras controles com 100% de atividade), exceto no tratamento a 500 MPa, a 25 °C, por 5 minutos, que registrou a maior ativação (32,98%). Esse fenômeno também aconteceu na PFO, onde, neste mesmo processamento, a atividade da PFO aumentou 83,03%. Aquela estabilidade da POD pode, talvez, ser explicada devido ao efeito diferenciado da APH sobre isoperoxidases, da mesma forma que o calor exerce, pois sabe-se que, em extratos vegetais, a atividade da POD tem sido estudada mostrando propriedades térmicas diferentes (SANTOS, 2001; DOMINGUES, 2003; CLEMENTE, 2002). Diversamente da POD, a PFO conseguiu ser bastante inativada dentre os vários processos.

O máximo de informações é necessário para avaliar a relação entre a baroestabilidade de enzimas e o universo de fatores que contribuem ou protegem o efeito do processamento de APH sobre a POD e a PFO de vegetais (SEYDERHELM *et al.*, 1996). A inativação enzimática pela AP depende das características do meio, como já relatado por diversos autores (OGAWA *et al.*, 1990; ROVERE, 1995; CASTELLARI *et al.*, 1997), bem como da temperatura e do tempo dos tratamentos (SEYDERHELM *et al.*, 1996).

**Gráfico 5:** Valores previstos (linha) versus valores observados (pontos), com base no modelo quadrático, para percentuais de atividade da PFO (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.



**Gráfico 6:** Médias dos percentuais de atividade da PFO (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.



### 4.2.3. Análises de Quantitativas de Antocianinas

#### 4.2.3.1. Percentual de retenção de antocianinas

Amostras controles de polpa de açaí grossa apresentaram, em média, 78,77 mg de antocianinas por 100 g de polpa. Esse resultado se mostrou superior ao encontrado por CONSTANT (2003), entretanto inferior aos observados por OZELA (1999) e BOBBIO *et al.* (2000).

Ao analisar o modelo quadrático para o percentual de retenção de antocianinas, quando as amostras foram tratadas por APH, todos os fatores adotados tiveram importância significativa ( $p < 0,05$ ), exceto a interação entre temperatura e tempo (Tabela 17). O coeficiente de regressão ( $R^2 = 0,97$ ), bem como o  $R^2$  ajustado (0,95), mostraram a qualidade dos dados obtidos (Tabela 17).

**Tabela 17:** Análise de variância do modelo quadrático para percentual de retenção de antocianinas (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.

Fator	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	p
Curvatura	455,27	1	455,27	137,0377	<b>0,0000</b>
MPa (1)	83,72	1	83,72	25,1997	<b>0,0002</b>
T °C (2)	194,73	1	194,73	58,6147	<b>0,0000</b>
t (3)	32,48	1	32,48	9,7768	<b>0,0080</b>
Interação (1) e (2)	262,28	1	262,28	78,9458	<b>0,0000</b>
Interação (1) e (3)	313,05	1	313,05	94,2278	<b>0,0000</b>
Interação (2) e (3)	6,00	1	6,00	1,8066	0,2019
Interação (1), (2) e (3)	53,27	1	53,27	16,0356	<b>0,0015</b>
Erro	3,32	13	3,32		
Soma quadrática total	1443,99	21			

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ ).

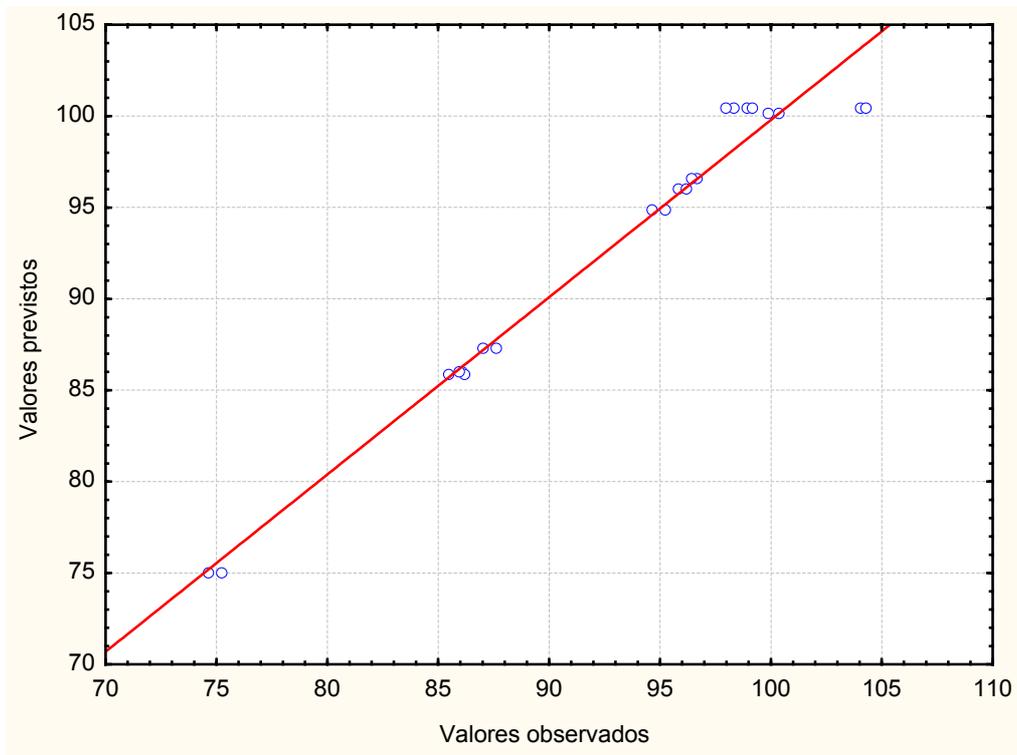
$$R^2 = 0,97009$$

$$R^2_{\text{ajustado}} = 0,95168$$

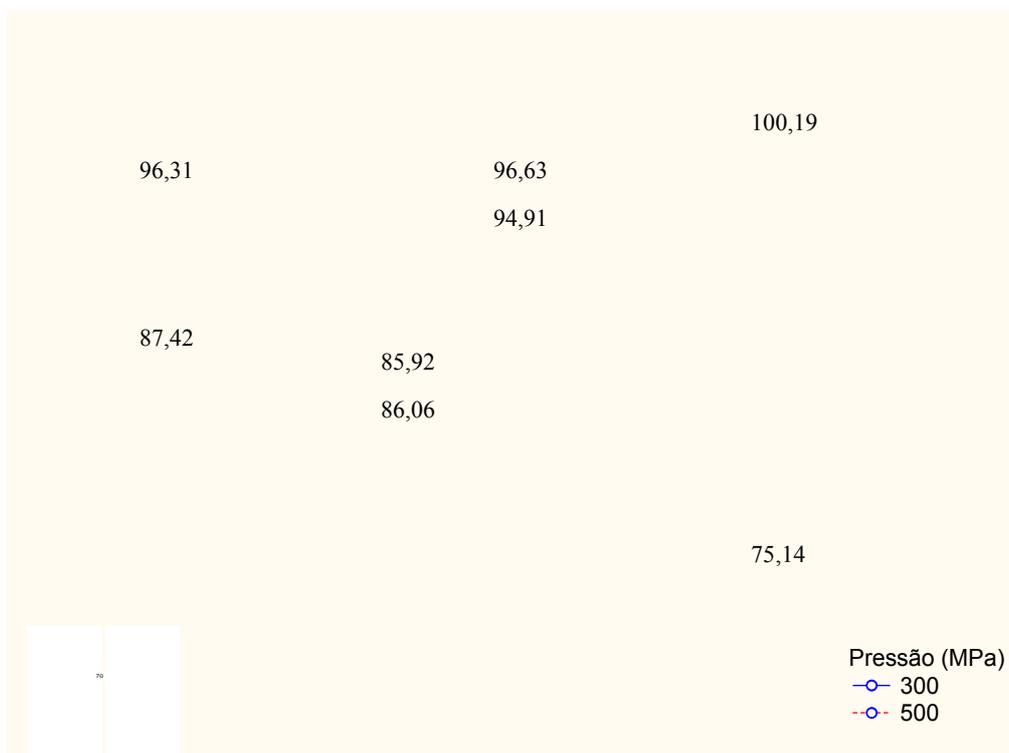
Os resultados observados nos 11 ensaios se aproximaram bastante dos valores previstos pelo modelo empírico adotado, mostrando outra vez que o modelo quadrático foi próprio para a análise de dados (Gráfico 7).

O gráfico das médias dos percentuais de retenção de antocianinas, encontradas através das análises quantitativas desse pigmento logo após os ensaios, demonstrou que processamentos sob 500 MPa, a 25 °C, apresentaram médias semelhantes de quando expostas a 5 e a 15 minutos: 96,31% e 94,91%, respectivamente (Gráfico 8), embora esses percentuais sejam significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) (Anexo V). O mesmo não ocorreu quando a temperatura foi aumentada para 35 °C, nesse mesmo nível de pressão, pois o tratamento por 15 minutos apresentou 75,14% de retenção de antocianinas, mostrando que nesse caso houve uma perda superior ao tratamento por 5 minutos, com aproximadamente 14% de perda (Gráfico 8). ROGEZ (2000) ao estudar a conservação das antocianinas em polpas de açaí acidificadas com ácido cítrico, pH 3,75, empregou tratamentos de pasteurização a 82,5 °C por 1 minuto, e obteve perdas de

**Gráfico 7:** Valores previstos (linha) versus valores observados (pontos), com base no modelo quadrático, para percentuais de retenção de antocianinas (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.



**Gráfico 8:** Médias dos percentuais de retenção de antocianinas (%) em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.



até 15%, pois a adição daquele ácido contribuiu para estabilizar as antocianinas. Tanto que, quando foi empregado o processo sem a adição do ácido, perdas foram superiores a 15%, como já era de se esperar, pois sabe-se que durante tratamentos térmicos, os pigmentos naturais, particularmente as antocianinas, são rapidamente destruídas (ROGEZ, 2000). SOUTO (2001) também observou importante perda de antocianinas (46,34%) após a irradiação de polpas de açaí a 2,5 KGy. Nos experimentos adotando 300 MPa, durante 5 minutos de exposição, a polpa apresentou menor percentual de retenção de antocianinas que as tratadas a 15 minutos, evidenciando-se diferentes estabilidades das antocianinas em função do tempo (Gráfico 8). Esse acúmulo de antocianinas nos tratamentos a 15 minutos pode ter sido influenciado por fatores ambientais como a luz, os nutrientes da polpa e danos mecânicos decorrente do próprio processo, sendo a luz o mais importante destes (HENDRY & HOUGHTON, 1996), por aumentar as atividades enzimáticas implicadas na via de biossíntese das antocianinas (MARKAKIS, 1982). Curiosamente, aquela polpa onde se empregaram 300 MPa, a 25 °C por 15 minutos (96,63%), 500 MPa, a 25 °C por 5 (96,31%) e 15 minutos (94,91%) apresentaram percentuais de retenção similares segundo ANOVA (Anexo V) e não representaram perda importante do pigmento. SANCHO *et al.* (1999) observou, em morangos *coulis*, 88,68% de retenção da vitamina C após processos a 400 MPa, a 20 °C por 30 minutos, semelhante aos percentuais de retenção de antocianinas em polpas de açaí pressurizadas a 300 MPa, a 35 °C, por 5 minutos (86,06%), e a 500 MPa, a 35 °C, por 5 minutos (85,92%) que demonstraram percentuais estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 8 e Anexo V). Nesta mesma temperatura, em processos sob 300 MPa, com 15 minutos de exposição, os percentuais de retenção observados foram os maiores, em média 100,19% de retenção, o que manteve a concentração de antocianinas comparada à polpa controle (100%) (Gráfico 8).

Nesse estudo, o processamento de APH em polpa de açaí demonstrou vantagem como o IFT (2000) já havia apontado, pelo fato de ser menos danoso a esse importante componente (antocianinas) que outros processamentos, como a pasteurização e a irradiação  $\gamma$  (ROGEZ, 2000; SOUTO, 2001). Devido à escassez de informações na literatura, que tratem de efeitos da APH sobre antocianinas, fez-se necessário comparar os resultados obtidos em polpas de açaí, com outros produtos que, da mesma forma, possuem importantes pigmentos em sua composição, como licopeno e carotenóides que também são substâncias de baixo peso molecular e com grande potencial antioxidante (FENNEMA, 2000; FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2001). KREBBERS *et al.* (2003) notaram que o teor de licopeno de purês de tomate pressurizados a 300 MPa, a 20 °C, por 2 minutos foi igual ao de amostras não pressurizadas, comportamento semelhante ao observado em polpas de açaí tratadas por APH sob 300 MPa, a 35 °C, por 15 minutos (100, 19% de retenção de antocininas). FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.* (2001) também comprovaram que não houve perdas de licopeno e de  $\beta$  caroteno, comparadas às amostras controles, mesmo quando purês de tomate foram pressurizados a 600 MPa, a 20 e a 25 °C, por 60 minutos, um tratamento comercialmente inviável.

O efeito da APH na retenção das antocianinas das polpas de açaí, quando os resultados foram analisados por ANOVA, mostraram curiosas características, pois tratamentos a 300 MPa, por 5 minutos, seja a 25 °C (87,42%) ou a 35 °C (86,06%), mostraram percentuais de retenção de antocianinas iguais estatisticamente ( $p > 0,05$ ) (Anexo V). Processamentos a 25 °C, por 15 minutos, tratados sob 300 e 500 MPa, não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) (96,63% e 94,91%, respectivamente), assim como tratamentos a 35 °C, por 5 minutos, sob 300 MPa (86,06%) e 500 MPa (85,92%) (Anexo V).

Sabe-se que a POD é capaz de oxidar compostos fenólicos, antocianinas, antocianidinas e flavonóides (KADER *et al.*, 2002) e a PFO, além de seu papel na oxidação de substâncias fenólicas, também catalisa a degradação de antocianinas, descolorindo-as (SIDDIQ *et al.*, 1994). Em função disso, compararam-se resultados de POD e PFO aos percentuais de retenção de antocianinas de polpas de açaí pressurizadas, para verificar se os valores estavam atrelados um ao outro, como SUTHANTHANGJAI *et al.*, (2005) observaram que mudanças na atividade enzimática, influenciaram a estabilidade de antocianinas de framboesas após processamento de AP. Em polpas de açaí, entretanto, os comportamentos das atividades enzimáticas não mostraram influência nos percentuais de retenção de antocianinas encontrados, (o que se pode explicar pelo fato de as análises não terem sido feitas a partir da mesma embalagem e/ou do mesmo ensaio), exceto quando foi detectada atividade de PFO média de 75,74% e a mesma concentração de antocianinas que amostras controles sob 300 MPa, a 35 °C, por 15 minutos (100,19%), mostrando que, possivelmente, por ter-se obtido 24,27% de inativação da PFO, as antocianinas podem ter sido mais conservadas.

Em alguns processamentos de AP em polpas de açaí, após a análise quantitativa de antocianinas, foram observados menores percentuais de retenção do pigmento indicando a perda do mesmo, em ordem crescente, sob 300 MPa, a 25 °C, por 5 minutos (87,42%); sob 300 MPa, a 35 °C, por 5 minutos (86,06%); sob 500 MPa, a 35 °C, por 5 minutos (85,92%) e, principalmente, sob 500 MPa, a 35 °C, por 15 minutos (75,14%). Paralelamente, esses mesmos tratamentos foram capazes de inativar, apenas parcialmente, a PFO da polpa de açaí, levando a crer que os percentuais de retenção de antocianinas encontrados foram em consequência da ação da PFO ainda presente no produto. GARCIA-PALAZON *et al.* (2004), ao estudarem a estabilidade de antocianinas em framboesas vermelhas, também associaram este fato à atividade da PFO de framboesas terem sido mantidas, mesmo após tratamentos de APH.

Considerando os percentuais de retenção de antocianinas inferiores à 100% (percentual das amostras controles) em polpas de açaí, sugere-se, ainda, a justificativa dessas perdas do pigmento pela manutenção ou ativação das POD, pois sabe-se que esta enzima pode catalisar a oxidação de um grande número de compostos com anéis aromáticos (BURNETTE, 1977), estando envolvida na descoloração catalítica de antocianinas (KHAN & ROBINSON, 1993).

#### **4.2.4. Análises de Cor Instrumental**

##### **4.2.4.1. Valor de diferença de cor (DE)**

As polpas controles e pressurizadas de polpa de açaí foram analisadas quanto à luminosidade e os parâmetros a e b, a partir dos quais serviram de base para a obtenção do valor de diferença de cor (DE).

Polpas de açaí pressurizadas foram avaliadas quanto aos valores de DE e seus resultados foram analisados na tabela 18. A análise de variância do modelo quadrático representou a importância significativa ( $p < 0,05$ ) de todos os fatores (pressão, temperatura e tempo) e a interação entre eles (Tabela 18 e Anexo VI). A curvatura também se mostrou importante significativamente ( $p < 0,05$ ), indicando que o modelo quadrático foi ideal para a apuração dos resultados, assim como o coeficiente de regressão também provou a qualidade das observações representadas por um  $R^2 = 0,97$  e  $R^2_{ajustado} = 0,96$ , bem próximos de 1,0 (Tabela 18).

**Tabela 18:** Análise de variância do modelo quadrático para o valor de DE em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	50,36	1	50,36	15,8588	<b>0,0003</b>
MPa (1)	1135,95	1	1135,95	357,7595	<b>0,0000</b>
T °C (2)	710,45	1	710,45	223,7512	<b>0,0000</b>
t (3)	258,94	1	258,94	81,5514	<b>0,0000</b>
Interação (1) e (2)	840,76	1	840,76	264,7905	<b>0,0000</b>
Interação (1) e (3)	325,80	1	325,80	102,6094	<b>0,0000</b>
Interação (2) e (3)	115,76	1	115,76	36,4567	<b>0,0000</b>
Interação (1), (2) e (3)	94,32	1	94,32	29,7046	<b>0,0000</b>
Erro puro	111,13	35	3,18		
Soma Quadrática total	3643,46	43			

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ ).

$$R^2 = 0,9695$$

$$R^2_{\text{ajustado}} = 0,96253$$

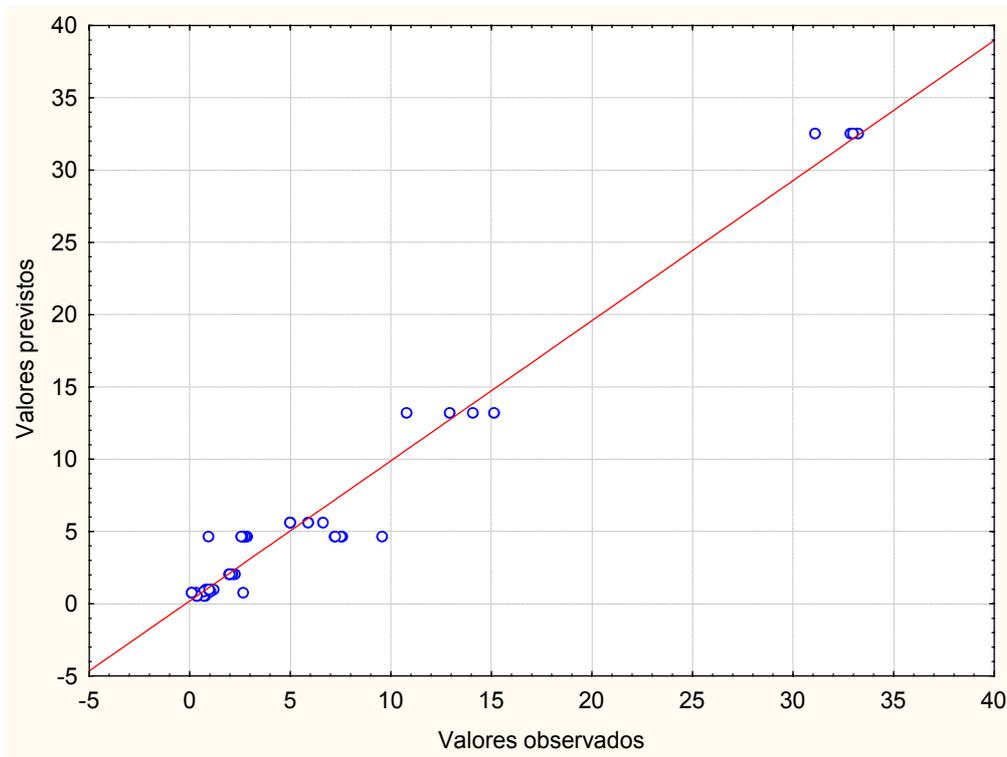
Valores observados nos experimentos são apresentados no gráfico 9, onde também se observam os valores previstos pelo modelo quadrático adotado. A representação indica que os valores observados não se distanciam muito dos valores previstos, demonstrando a boa qualidade do modelo aplicado (Gráfico 9).

No gráfico das médias, tratamentos a 300 MPa não apresentaram diferenças significativas, independentemente das temperaturas e tempos adotados, com valores de DE médios entre 0,55 e 2,07 (Gráfico 10). Valores médios de DE dos processamentos sob 300 MPa, a 35 °C, por 15 minutos (2,07) e sob 500 MPa, a 35 °C, por 15 minutos (0,79) não diferem entre si ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 10 e Anexo VI). Esses baixos valores de DE implicam em diferenças de cor quase nulas, mostrando, portanto, que essas polpas de açaí se assemelham às amostras controles. Geralmente a AP resulta em uma boa retenção de cor, diferentemente do que ocorre em tratamentos convencionais de conservação (MATSER *et al.*, 2004), tanto que PALOU *et al.* (2000) observaram que a cor de *guacamoles*, logo após tratamentos de 689 MPa, a 21 °C, por 5, 10, 15 ou 20 minutos, não foi diferente da cor de amostras controles. LÓPEZ-MALO *et al.* (1999), PALOU *et al.* (1999) e BOYTON *et al.* (2002) também observaram em tratamentos variados, a preservação da coloração em amostras de purês de abacate, purês de bananas e pedaços de mangas pressurizados, respectivamente. Nas polpas de açaí, tratamentos a 500 MPa, entretanto, apresentaram valores médios de DE superiores, principalmente aqueles a 25 °C (Gráfico 10), e, em especial, aquele resultante da polpa pressurizada sob 500 MPa, a 25 °C, por 5 minutos, com valor de DE 32,53, mostrando a expressiva diferença de cor da polpa de açaí pressurizada, como também observaram BOYTON *et al.*, (2002), em pedaços de carambolas pressurizadas a 600 MPa, por 2 minutos.

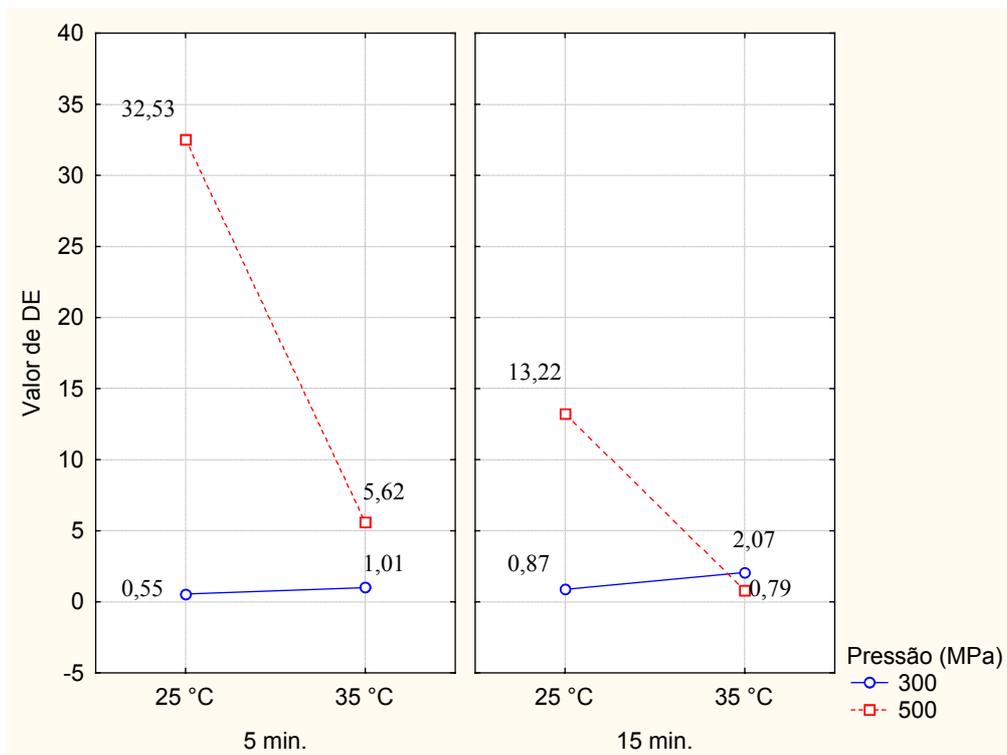
De uma maneira geral, a diferença de cor foi importante apenas em tratamentos a 500 MPa, a 25 °C. Todos os outros tratamentos, apesar dos valores médios de DE apresentarem variação de 0,55 a 5,62, não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) (Anexo VI).

Os valores de DE foram comparados aos percentuais de retenção de antocianinas de polpas de açaí pressurizadas, visto a forte relação entre esses parâmetros quanto à

**Gráfico 9:** Valores previstos (linha) versus observados (pontos), com base no modelo quadrático, para valores de DE em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.



**Gráfico 10:** Médias dos valores de DE em polpas de açaí pressurizadas a 300, 400 e 500 MPa, a 25, 30 e 35 °C, de 5 a 15 minutos.



qualidade do produto citada na literatura, e diante dos resultados encontrados no estudo, não foi possível observar correlação nítida entre eles, pois tratamentos sob 500 MPa, a 25 °C, por 5 e 15 minutos, apresentaram DE importante: 32,53 e 13,22, respectivamente, mas esses processamentos não representaram perda importante de antocianinas, mas ao contrário, registraram satisfatórios percentuais de retenção equivalentes a 96,31 e 94,91. Entretanto, ao comparar os resultados obtidos de percentuais de atividades das enzimas, em especial, a polifenoloxidase, sugeriram intensa relação com os valores de DE, os quais apresentaram-se altos quando as polpas foram pressurizadas a 500 MPa, a 25 °C tanto a 5 quanto a 15 minutos, e nestes mesmos tratamentos, os percentuais de atividade da PFO aumentaram (183,03% e 156,37%, respectivamente). Todos os outros tratamentos mostraram coloração de polpas de açaí iguais às amostras controles, pois estes mesmos tratamentos foram capazes de inativar parcialmente a PFO.

## 5 CONCLUSÕES

- A polpa de açaí foi classificada como grossa (ou Tipo A), contendo 15,48% de sólidos totais. Apresentou rico teor de lipídeos (6,71g/100 g de polpa), e suas características físico-químicas encontraram-se de acordo com os Padrões de Identidade e Qualidade, específicos para polpa de açaí grossa, segundo Instrução Normativa nº 01, 07/01/2000, do Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento (MAPA).
- Quanto à caracterização microbiológica da matéria-prima, a mesma foi considerada imprópria para consumo, ultrapassando os limites de fungos filamentosos e leveduras e de coliformes a 45 °C, exigidos pelo MAPA e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apresentando-se, apenas de acordo, quanto à ausência de salmonela em 25 g do produto.
- A Alta Pressão Hidrostática (APH), em qualquer nível de pressão, temperatura e tempo, eliminou todas as populações de fungos filamentosos e leveduras, e microorganismos do grupo coliforme, nas polpas de açaí. Também reduziu em até 4 ciclos log UFC/g de polpa, de bactérias aeróbias mesófilas, quando tratadas a 500 MPa, 35 °C, por 15 minutos.
- O processamento de Alta Pressão Hidrostática desempenhou efeitos diferentes sobre a atividade das enzimas, peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO). A POD, não teve sua atividade reduzida por nenhum dos tratamentos adotados. Pelo contrário, quando a polpa foi tratada a 500 MPa, a 25 °C, por 5 minutos, houve ativação da POD de 32,98%. A PFO, também teve sua atividade estimulada quando as polpas foram submetidas a 500 MPa, 25 °C, por 5 ou 15 minutos, mas, em geral, processos a 35 °C, juntamente com a pressão, reduziram sua atividade até 53,25%.
- Polpas de açaí pressurizadas foram capazes de manter suas concentrações de antocianinas, que, em média, continham em amostras controles, 78,77 mg de antocianinas/100 g de polpa, dependendo das condições de processo, a exemplo do que ocorreu no tratamento a 300 MPa, a 35 °C por 15 minutos. Da mesma forma, de modo geral, as polpas de açaí pressurizadas não perderam sua coloração, exceto em tratamentos a 500 MPa, a 25 °C, por 5 ou 15 minutos.
- Diante dos resultados, conclui-se que o processamento de APH se mostrou como uma excelente alternativa para tratamentos térmicos, gerando um produto seguro microbiologicamente, com parte de suas enzimas inativada e com a preservação de suas características nutricionais, em termos de antocianinas, e sensoriais, em termos de cor.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugerem-se, como continuidade do trabalho desenvolvido, outros estudos que aprofundem os fundamentos da aplicação da Alta Pressão Hidrostática na indústria de alimentos, de modo a contribuir para a validação desta técnica não-convencional de processamento em polpas de açaí, incluindo os seguintes pontos:

- A partir da identificação do modelo matemático ideal a ser adotado para a interpretação dos resultados, investigar o fator determinante da curvatura dos planos, nos exemplos em que o modelo quadrático se mostrou eficiente na análise dos dados, de forma a gerar modelos quadráticos mais abrangentes.
- Identificar a condição ótima de processo de forma a sugerir um processamento em que se possam obter todos os parâmetros de qualidade preservados ao máximo.
- Adotar um estudo de vida-de-prateleira do produto, analisando os comportamentos dos mesmos parâmetros adotados neste estudo.
- Avaliar, sensorialmente, a polpa de açaí pressurizada e realizar um estudo de aceitação do consumidor, comparados aos tratamentos térmicos convencionais de conservação a que a polpa é submetida.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTRY). **Approved Methods**. St Paul, Minnesota, 1995.

AGUIAR, J. P. L.; MARINHO, H. A.; REBELO, Y. S. SHIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 10, p. 4, p. 755-758, 1980.

ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F.; WIKTOROWICZ. Effect of chill storage and modified atmosphere packing (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. **Food Chemistry**, Oxford, v. 89, p. 69-76, 2005.

ALEMAN, G. D.; TING, E. Y.; MORDRE, S. C.; HAWES, A. C. O.; WALKER, M. FRAKAS, D. F. TORRES, J. A. Pulsed ultra high pressure treatments for pasteurization of pineapple juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, p. 388-390, 1996.

ALEXANDRE, D. **Conservação da polpa de açaí através da Tecnologia de Obstáculos e Caracterização Reológica**. 2002. 161 p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 114-119, 2004.

ANDERSON, L.; DIBBLE, M. V.; TURKKI, P. R.; MITCHELL, H. S.; RYNBERGEN, H. J. **Nutrição**. 17ª ed. Cap. 6. São Paulo, SP, 1998, 737 p.

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

ANSTINE, T. T. High-Pressure Processing for Safe, Quality Foods. **Cereal Food World**, v.48, n. 1, p. 5-8, jan.-feb., 2003.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY). **Official Methods of Analysis**, 16<sup>th</sup> ed, Washington, D. C., 1997.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY). **Official Methods of Analysis**, 17<sup>th</sup> ed, Washington, D. C., 2000.

ARROYO, G.; PRÉTAMO, G. Respuesta de los microorganismos contaminantes de productos vegetales a la acción de las altas presiones. **Alimentaria**, p. 103-108, jun., 1996.

ARROYO, G.; SANZ, P. D.; PRÉSTAMO, G. Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, n. 82, p. 735-742, 1997.

ASAKA, M.; HAYASHI, R. Activation of Polyphenoloxidase in Pear Fruits by High Pressure Treatment. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2439-2440, 1991.

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

BEUCHAT, L. R.; COUSIN, M. A. Yeasts and Molds. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 20, p. 209-215, 2001.

BEZERRA, V. S.; NERY, M. V. S.; LOBATO, M. S. A. Avaliação das características químicas do vinho de açaí comercializado em Macapá e Santana (AP). In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2002, Porto Alegre. **Anais...** Rio Grande do Sul: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002.

BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 238p.

BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. A. **Química do Processamento de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 143p.

BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A.; FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 388-390, 2000.

BOYTON, B. B.; SIMS, C. A.; SARGENT, S.; BALABAN, M. O.; MARSHALL, M. R. Quality and Stability of Precut Mangos and Carambolas Subjected to High-Pressure Processing. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 409-415, 2002.

BRACKETT, R. E. Fruits, Vegetables, and Grains. In: DOYLE, M. P.; BEUCHANT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Cap. 7, Washington, DC: ASM Press, 1997, 768p.

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 jan. 2000.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº 12, de 04 de setembro de 2003. Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade gerais para suco tropical. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 set. 2003.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. London, UK: Academic Press, 1982, 263 p.

BURNETTE, F. S. Peroxidase and its Relationship to Food Flavor and Quality: a review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, p. 1-6, 1977.

BUTZ, P.; EDENHARDER, R.; FERNÁNDEZ GARCÍA, A.; FISTER, H.; MERKEL, C.; TAUSCHER, B. Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. **Food Research International**, v. 35, p. 295-300, 2002a.

BUTZ, P.; FERNÁNDEZ GARCÍA, A.; TAUSCHER, B. Influence of high pressure treatment on sensorial and nutritional quality of fruit and vegetables. In: HAYASHI, R. **Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology**. Elsevier Science B. V., 2002, p. 417-421, 2002b.

BUTZ, P.; FERNÁNDEZ GARCÍA, A.; LINDAUER, R.; DIETERICH, S. BOGNÁR, A.; TAUSCHER, B. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 233-236, 2003.

BUTZ, P. & TAUSCHER, B. Emerging Technologies: chemical aspects. **Food Research International**, v. 35, p. 279-284, 2002.

BUXANT, R.; ROGEZ, H.; AQUINO, A. R.; DE SOUZA, J. N.; SOUSA, C. L. Qualidade Microbiológica do suco de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) comercializado na cidade de Belém-Pará. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, AL-055, 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997.

CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, Ø. M. Colour and stability of the six common anthocyanin 3-glucosides in aqueous solutions. **Food Chemistry**, Oxford, v. 68, p. 101-107, 2000.

CALZAVARA, B. B. G. **Recomendações Básicas**. Boletim. n. 3. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, Pará, 1987.

CAMPOS, F. P.; DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 351-357, jul.-dez., 2003.

CAMPOS, F. P. **Estudo do Processamento de Suco de Laranja através da Tecnologia de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**. 2004. 94 p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CANO, M. P.; HERNÁNDEZ, A.; ANCOS, B. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 1, p. 85-88, 1997.

CARNEIRO, F. R. B. D. **Uso da Tecnologia de Barreiras na Obtenção da Polpa de Açaí e sua Caracterização Reológica.** 2000. 135 p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

CASTELLARI, M.; MATRICARDI, L.; ARFELLI, G.; ROVERE, P.; AMATI, A. Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts. **Food Chemistry**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 647-649, 1997.

CEMEROGLU, B.; VELIOGLU, S.; ISIK, S. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 1216-1218, 1994.

CHEFTEL, J. C. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos Vol. 1.** Zaragoza, España: Ed. Acribia S. A., 333p., 1989.

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

CLEMENTE, E. Peroxidase from oranges (*Citrus sinenses* (L.) Obsbeck). **European Food Research Technology**, n. 215, p. 164-168, 2002.

CLEMENTE, E. & PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 32, n. 2, p.167-171, 1998.

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

COULTATE, T. P. **Alimentos Química de sus componentes.** España: Editorial Acribia, 1984.

DOMINGUES, A. M. **Avaliação do Processo de pasteurização térmica de néctar de abacaxi (*Ananás comosus* L.).** 2003. 91 p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

DRI. Dietary Reference Intakes, 2002. In: **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids.** Washington, D. C.: Academic Press, 2002. Disponível em: <[www.nap.edu](http://www.nap.edu)>. Acessado em: 30/03/2005.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, Oxford, n. 84, p. 23-28, 2004.

ESCRIBANO, J.; CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCÍA-CARMONA, F. Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D. C., v. 45, p. 4209-4214, 1997.

ESHTIAGHI, M. N.; KNORR, D. Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, p. 1371-1374, 1993.

FARKAS, D. F.; HOOVER, D. G. High Pressure Processing. **Journal of Food Science**, Chicago, supplement, p. 47-64, [2000?].

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza, España: Ed. Acribia S. A., 2ª edición, 1258p., 2000.

FERNÁNDEZ GRARCIA, A.; BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Effects of high-pressure processing on carotenoid extractability, antioxidant activity, glucose diffusion, and water binding of tomato puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 7, p. 1033-1038, 2001.

\_\_\_\_\_. Under Pressure. **Food Manufacture**, p. 23-24, nov, 1992.

FRANCIS, F. J. Analysis of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. London, UK: Academic Press, 1982, 263 p.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. São Paulo, SP: Ed. Atheneu, 9ª ed. 1999, 307p.

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

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 33, p. 72-77, 1968.

GALVANO, F.; LA FAUCI, L.; LAZZARINO, G.; FOGLIANO, V.; RITIENI, A.; CIAPPELLANO, S.; BATTISTINI, N. C.; TAVAZZI, B.; GALVANO, G. Cyanidins: metabolism and biological proprieties. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 15, p. 2-11, 2004.

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**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 7-10, nov., 2004.

GOIFFON, J.; MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 382, p. 39-50, 1999.

GOMES, M. R. A.; LEDWARD, D. A. Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 1-5, 1996.

GONNET, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. **Food Chemistry**, Oxford, v. 63 n. 3, p. 409-415, 1998.

GOULD, G. W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 51-64, 1996.

GOULD, G. W.; SALE, A. J. H. Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. **Journal of General Microbiology**, v. 60, p. 335-346, 1970.

GROSS, J. Anthocyanins. In: \_\_\_\_\_. **Pigments in Fruits**. London, UK: Academic Press, 1987. chapter 2, p. 59-85.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Identificação e caracterização de antocianinas de amora (*Morus* sp.) por espectrofotometria UV-visível. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 109, 2004, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, p. 19, código 109.

HAYAKAWA, K.; KANNO, T.; TOMITO, M.; FUJIO, Y. Oscillatory Compared with continuous High Pressure Sterilization. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, p. 164-167, 1994.

HEIJ, W. B. C.; SCHAEFDAEL, J. M. M.; MOEZELAAR, R.; HOOGLAND, H.; MATSER, A. M.; BERG, R. W. high-Pressure Sterilization: Maximizing the Benefits of Adiabatic Heating. **Food Technology**, v. 57, n. 3, p. 37-41, mar., 2003.

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

HERNÁNDEZ, M. J.; BERNALTE, E. S.; VIDAL-ARAGÓN, M. C. Actividad peroxidasa y polifenoloxidasa de dos variedades de cereza durante la maduración. **Alimentaria**, v. 45, p. 45-48, jun, 1997.

HERNÁNDEZ, A.; CANO, M. P. High-pressure and temperature effects on enzyme inactivation in tomato puree. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC., v. 46, p. 266-270, 1998.

HOOVER, D. G. Minimally Processed Fruits and Vegetables: Reducing Microbial Load by Nonthermal Physical Treatments. **Food Technology**, v. 51, n. 6, p. 66-71, jun., 1997.

HOOVER, D. G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A. M.; FARKAS, D. F.; KNORR, D. Biological Effects of High Hydrostatic Pressure on Food Microorganisms. **Food Technology**, mar., 1989.

HUTCHINGS, J. B. **Food Colour and appearance**. London, UK: Blackie Academic & Professional, 1<sup>st</sup> Edition, 1994, 513 p.

IADEROZA, M.; BALDINI, I. S. D.; BOVI, M. L. A.. Anthocyanins from Fruits of Açai (*Euterpe oleracea*, Mart.). **Tropical Science**, n. 32, p. 41-46, 1992.

IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Vol. 1. Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. São Paulo, SP: 1976, 371p.

IFT. Relatório do Instituto de Tecnologia de Alimentos para a *Food and Drug Administration* (FDA) do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América. Washington, D. C.: IFT/FDA. Disponível em: < <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-toc.html> >, jan., 2000.

JACKMAN, R. L. & SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F. & HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colorants**. London, UK: Blackie Academic & Professional, 2<sup>nd</sup> Edition, 1996, 348 p.

KADER, A. A.; BARRET, D. M. Classification, composition of fruits and postharvest maintenance of quality. In: SOMOGYI, L. P.; RAMASWAMY, H. S.; HUI, Y. H. **Biology, principles and applications**. v. 1. USA: Technomic Publishing Company, 1996.

KADER, F.; IRMOULI, M.; NICOLAS, J. P.; METCHE, M. Involvement of blueberry peroxidase in the mechanisms of anthocyanin degradation in blueberry juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 2, p. 910-915, 2002.

KALCHAYANAND, N.; SIKES, A. DUNNE, C. P.; RAY, B. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. **Food Microbiology**, n. 15, p. 207-214, 1998.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. *chamusa*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 46, p. 61-64, 1993.

KNORR, D. Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology. In: GOULD, G. W. **New Methods of Food Preservation**. London, UK: Blackie Academic & Professional, 1995, 324 p.

KNORR, D. Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 485-491, 1999.

KNORR, D. Process Aspects of High-Pressure Treatment of Food Systems. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. & GOULD, G. W. **Food Preservation Technology Series. Innovations in Food Processing**. Lancaster, U. S. A. Technomic Publishing Co., 2000, 260 p.

KONG, J.; CHIA, L.; GOH, N.; CHIA, T.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 64, p. 923-933, 2003.

KORNACKI, J. L. & JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 6, p. 69-82, 2001.

KREBBERS, B.; MATSER, A. M.; HOOGERWERF, S. W.; MOEZELAAR, R.; TOMASSEN, 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, p. 377-385, 2003.

KUSKOSKI, E. M.; FETT, P.; ASUERO, A. G. Antocianos: un grupo de pigmentos naturales. Aislamiento, identificación y propiedades. **Alimentaria**, v. 2, n. 61, p. 61-74, 2002.

LADO, B. H. & YOUSEF, A. E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 433-440, 2002.

LECHOWICH, R. V. Food safety implications of high hydrostatic pressure as a food processing method. **Food Technology**, jun., 1993.

LIMA, V. L. A. G.; GUERRA, N. B. Antocianinas: atividade antioxidante e biodisponibilidade. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, Supl. 37, p. 121-128, dez, 2003.

LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B. G. Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. **Food Research International**, v. 31, n. 8, p. 549-556, 1998.

LOURENÇO, E. J.; NEVES, V. A. Peroxidase solúvel de pêsego: purificação parcial e propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 17, n.1, p. 42-48, 1997.

MARKAKIS, P. Anthocyanins as food additives. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982, p. 245-253, 1982.

MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 195-200, jun., 1995.

MATSER, A. M.; KREBBERS, B.; VAN DEN BERG, R. W.; BARTELS, P. V. Advantages of high pressure sterilization on quality of food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 79-85, 2004.

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidase in plants. Review. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, p. 193-218, 1979.

MAZZA, G. & MINIATI, E. **Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains**. Boca Raton: CRC Press, 1993, 362p.

MENDES, E. Demanda pode tornar açaí raro e caro no Pará. O Liberal. 15/02/2003. Disponível em: <[www.oliberal.com.br](http://www.oliberal.com.br)>. Acessado em: 20/01/2004.

MEYER, R. S.; COOPER, K. L.; KNORR, D. LELIEVELD, H. L. M. High-pressure sterilization of foods. **Food Technology**, v. 54, n. 11, p. 67-72, nov., 2000.

MORALES-BLANCAS, E. F.; CHANDIA, V. E.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxigenase from broccolli, green asparagus and carrots. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 146-154, 2002.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes & solventes. Padronização. Preparação. Purificação.** São Paulo, SP: Ed. Edgard Blücher LTDA., 2<sup>a</sup> ed. 1995, 629p.

MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 7, p. 63-67, 2001.

NIENABER, U. & SHELLHAMMER, T. H. High-Pressure Processing of Orange Juice: Combination Treatments and a Shelf Life Study. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 2, p. 332-336, 2001.

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H. 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.

OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. L. O.; MÜLLER, C. H. **Cultivo do Açaizeiro para Produção de Frutos.** Circular Técnica. n. 26. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, Pará, 2002.

OZELA, E. F.; STRINGHETA, P. C.; LIMA, A. A. S.; FARIAS, M. I. T.; SANTOS, M. V. Estudo comparativo do teor de antocianinas presentes no açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), nos períodos de safra e entressafra. SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2, Campinas, 1997. **Resumos...**Campinas, UNICAMP, 1997.

OZELA, E. F.; STRINGHETA, P. C. Antocianinas em vegetais comestíveis. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 235., 2004, Pernambuco. **Programa Final...** Recife: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004. 156p.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEITI-CHANES, J.; SWANSON, B. G. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 1, p. 42-45, 1999.

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.

PANDYA, Y.; JEWETT, F.; HOOVER, D. Concurrent effects of high hydrostatic pressure, acidity and heat on the destruction and injury of yeasts. **Journal of Food Protection**, Iowa, USA, v.58, n.3, p. 301-304, 1995.

PATTERSON, M. F.; QUIN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. **Journal of Food Protection**. Iowa, USA, v. 58, n. 5, p. 524-529, 1995.

PELLETIER, B. High-pressure treatment for fruit juice. New solutions for low-cost high pressure processing of fruit juice. **Fruit Processing**, v. 6, p.216-217, 2001.

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**, v. 60, p. 21-29, 2003.

PONTES, M. A. N.; MAGNO, P. S. L.; FELIPE, A. M. P. F.; MATTIETO, R. A. Elaboração do néctar de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) com e sem ácido cítrico. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998.

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

PRÉSTAMO, G. & ARROYO, G. High hydrostatic pressure effects on vegetables structure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 5, p. 878-881, 1998.

PÜTER, J. Peroxidases. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. London, UK: Academic Press, vol. 2, 2<sup>nd</sup> Edition, 1994, 1124p.  
RICHARDSON, T. & HYSLOP, D. B. Enzymes. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. New York, USA. Marcel Dekker, INC., 2<sup>nd</sup> Edition, 1985.

RAMOS, E. M.; FONTES, P. R.; RAMOS, A. L. S.; FONTES, E. A. F.; GOMIDE, L. A. M. Tratamento de alimentos por alta pressão hidrostática: 1-Equipamentos e processos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 37, supl., p. 46-53, dez., 2003.

RDA. Recommended Dietary Allowances, 2000. In: **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. Washington, D. C.: National Academic of Sciences. 2000.

RDA. Recommended Dietary Allowances, 2001. In: Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, D. C.: National Academic of Sciences. 2001.

RICHARDSON, T.; HYSLOP, D. B. Enzymes. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. New York, USA. Marcel Dekker, INC., 2<sup>nd</sup> Edition, 1985.

ROGEZ, H.; PASCAL, S.; BUXANT, R.; LOPES, S. Q.; COLSON-CORBISIER, A. M. Identificação dos principais fungos e leveduras presentes na polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.). In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, AL-

027, 1997, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997.

ROGEZ, H.; DE SOUZA, J. N. S.; NASCIMENTO, M. Q.; BUXANT, R. Branqueamento dos frutos de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) para diminuição da carga microbiana do suco. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 45, n. 4, p. 177-184, 1996.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém, PA: Ed. Universidade Federal do Pará – EDUFA, 1ª ed. 2000, 313p.

ROSENTHAL, A. & SILVA, J. L. Alimentos sob pressão. **Engenharia de alimentos**, n. 14, p. 37-39, 1997.

ROSENTHAL, A.; LEDWARD, D.; DEFAYE, A.; GILMOUR, S.; TRINCA, L. effect of pressure, temperature, time and storage on peroxidase and polyphenoloxidase from pineapple. In: HAYASHI, R. **Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology**. Elsevier Science B. V., 2002, p. 525-532, 2002a.

ROSENTHAL, A.; MAC KEY, B.; BIRD, A. Effect of ultra-high pressure on fruit juices contaminant yeasts. In: HAYASHI, R. **Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology**. Elsevier Science B. V., 2002, p. 511-516, 2002b.

ROVERE, P. The third dimension of food technology. **Tecnologie Alimentari Sistemi per produrre**, n. 4, p. 2-8, 1995.

RUSSEL, N. J. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 27-34, 2002.

SABAA-SRUR, A.; TORRES, A. T.; MENEZES, E. M. S. Contribuição ao conteúdo nutricional de polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1351., 2004, Pernambuco. **Programa Final...** Recife: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004. 156p.

SANCHO, F.; LAMBERT, Y.; DEMAZEAU, G.; LARGETEAU, A. BOUVIER, J. M.; NARBONNE, J. F. Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. **Journal of Food Engineering**, v. 39, p. 247-253, 1999.

SANGRONIS, E.; POTHAKAMURY, U.; RAMOS, A. M.; IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos. **Alimentaria**, n. 33, p. 33-43, jun 1997.

SAN-MARTÍN, M. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, 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.

SANTOS, E. R. **Caracterização Bioquímica da Peroxidase e Polifenoloxidase de Açaí (*Euterpe oleracea*)**. 2001. 104 p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SEYDERHELM, I.; BOGUSLAWSKI, S.; MICHAELIS G.; KNORR, D. Pressure induced inactivation of selected food enzymes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, n. 2, p. 308-310, 1996.

SIDDIQ, M.; ARNOLD, J. F.; SINHA, N. K.; CASH, J. N. Effect of polyphenol oxidase and its inhibitors on anthocyanins changes in plum juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 18, p. 75-84, 1994.

SIQUEIRA, G. C. L.; MENEZES, M.; SIQUEIRA, S. L.; SILVA, J. F.; RIVERA, G. R. A.; VICENTE, C. A. R.; NIETO, M. D. **Produtos potenciais da Amazônia**. Brasília, DF, MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, 51p., 1998.

SIZER, C. E.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; TING, E. Validating high-pressure process for low-acid foods. **Food Technology**, v. 56, n. 2, p. 37-42, 2002.

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.

SOJKA, B. & LUDWIG, H. Effects of Pressure Changes on the Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores. **Pharmacology Industry**, v. 59, p. 436-438, 1997.

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.

SUN, N.; LEE S.; SONG, K. B. Effect of high-pressure treatment on the molecular properties of mushroom polyphenoloxidase. **Lebensm.-Wiss. u.- Technol.**, v. 35, p. 315-318, 2002.

SUTHANTHANGJAI, W.; KAJDA, P.; ZABETAKIS, I. The effect of high hydrostatic pressure on the anthocyanins of raspberry (*Rubus idaeus*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, p. 193-197, 2005.

SUZUKI, A. High Pressure-Processed foods in Japan and the world. In: HAYASHI, R. **Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology**. Elsevier Science B. V., 2002, p. 365-374, 2002.

SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L.; HANLIN, J. H. Culture Methods for Enumeration of Microorganisms. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 6, p. 53-62, 2001.

TAKEOKA, G.; DAO, L.; FLESSA, S.; GILLESPIE, D. M.; JEWELL, W. T.; HUABNER, B.; BERTOW, D.; EBELER, S. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D. C., v. 49, p. 3713-3717, 2001.

TEWARI, G.; JAYAS, D. S.; HOLLEY, R. A. High Pressure Processing of Foods: An Overview. **Science des Aliments**, v. 19, p. 619-661, 1999.

THAKUR, B. R.; NELSON, P. E. High pressure processing and preservation of food. **Food Reviews International**, v. 14, n. 4, p. 427-447, 1998.

THATCHER, F. S.; CLARK, D. S. **Microorganisms in Foods 1. Their significance and methods of enumeration. International Commission on Microbiological Specifications for Foods.** Toronto, CA: University of Toronto Press, 2<sup>a</sup> ed. 1978, 434p.

TING, E.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; RAGHUBEER, E. Determining Thermal Effects in High-Pressure Processing. **Food Technology**, v. 56, n. 2, p. 31-35, 2002.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, p. 49-127, 1981.

VAN DEN BROECK, I.; LUDI KHUYZE, L.; WEEMAES, C.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. E. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D. C., v. 46, p. 2001-2006, 1998.

VELOSO, S. S. C.; SANTOS, M. L. S. Aspectos microbiológicos da bebida açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) consumida na cidade de Belém. Trabalho de conclusão de curso da Universidade Federal do Pará, Belém, 1994.

WALLACE, H.; RUSSEL, A.; FLOWERS, S.; SILLIKER, J.; BALLY, J. *Salmonella*. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** Washington, D. C.: American Public Health Association, chapter 37, p. 357-380, 2001.

WEEMAES, C.; DE CORDT, S. V.; LUDI KHUYZE, L.; VAN DEN BROECK, I.; HENDRICKX, M. E.; TOBBACK, P.P. Influence of pH, Benzoic Acid, EDTA, and Glutathione on the Pressure and/or Temperature Inactivation Kinetics of Mushroom Polyphenoloxidase. **Biotechnology Programme**, v. 13, p. 25-32, 1997.

WEEMAES, C.; LUDI KHUYZE, L.; VAN DEN BROECK, I.; HENDRICKX, M. E. High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 5, p. 873-877, 1998a.

WEEMAES, C.; LUDI KHUYZE, L.; VAN DEN BROECK, I.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of Combined Pressure-Temperature Inactivation of Avocado Polyphenoloxidase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 3, p. 292-300, 1998b.

WILLIAMS, A. New Technologies in Food Preservation and Processing: Part II. **Nutrition & Food Science**, n. 1, p. 20-23, jan.-feb., 1994.

WUYTACK, E. Y.; DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 205-212, 2002.

YEN, G. & LIN, H. Comparison of high pressure treatment and thermal pasteurization effects on the quality and shelf life of guava puree. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, n. 2, p.205-213, 1996.

YUYAMA, L. K. O.; ROSA, R. D.; AGUIAR, J. P. L.; NAGAHAMA, D.; ALENCAR, F. H.; YUYAMA, K.; CORDEIRO W. O.; MARQUES, H. O. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) e Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) Mc Vaugh) possuem ação anti anêmica? **Acta Amazônica**, v. 32, n. 4, p. 625-633, 2002.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; MELO, T.; BARROS, S. E.; FILHO, D. F. S.; YUYAMA, K.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M.; PIMENTEL, S. A.; BADOLATO, E. S. G.. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.): Qual o seu potencial Nutricional? In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2004. Florianópolis. **Anais** .... Santa Catarina: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2004.

ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Polyphenol Oxidase. In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative Enzymes in Foods**. London, UK: Elsevier Applied Science, 1991, 314p.

## 8 APÊNDICE

**Anexo I:** Valor p da análise de variância (ANOVA), par a par, para redução de bactérias aeróbias mesófilas.

Processos	MPa	°C	min.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	25	5		0,472131	0,953293	0,774150	0,556937	<b>0,000004</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000023</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
2	0	25	15	0,472131		0,437624	0,318594	0,893397	<b>0,000019</b>	<b>0,000009</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000003</b>	<b>0,000111</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
3	0	30	10	0,953293	0,437624		0,819225	0,518907	<b>0,000004</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
4	0	35	5	0,774150	0,318594	0,819225		0,385289	<b>0,000002</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000013</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
5	0	35	15	0,556937	0,893397	0,518907	0,385289		<b>0,000014</b>	<b>0,000007</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000003</b>	<b>0,411185</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
6	300	25	5	<b>0,000004</b>	<b>0,000019</b>	<b>0,000004</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000014</b>		0,739314	0,069106	<b>0,016971</b>	0,402293	0,253630	<b>0,017448</b>	<b>0,000212</b>	<b>0,000212</b>
7	300	25	15	<b>0,000002</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000007</b>	0,739314		0,128075	<b>0,034133</b>	0,609515	<b>0,012501</b>	<b>0,035052</b>	<b>0,000448</b>	<b>0,000448</b>
8	300	35	5	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,069106	0,128075		0,494445	0,296414	<b>0,003272</b>	0,502516	<b>0,015048</b>	<b>0,015048</b>
9	300	35	15	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,016971</b>	<b>0,034133</b>	0,494445		0,093186	<b>0,003277</b>	0,989651	0,062001	0,062001
10	400	30	10	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,029913</b>	0,067733	0,992132	0,398864		0,207647	0,407539	<b>0,003969</b>	<b>0,003969</b>
11	500	25	5	<b>0,000001</b>	<b>0,000003</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000003</b>	0,402293	0,609515	0,296414	0,093186	0,207647		0,106510	0,095453	<b>0,001425</b>
12	500	25	15	<b>0,000023</b>	<b>0,000111</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000013</b>	<b>0,000083</b>	0,411185	0,253630	<b>0,012501</b>	<b>0,002721</b>	<b>0,003277</b>	0,106510		<b>0,002802</b>	<b>0,000035</b>
13	500	35	5	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,017448</b>	<b>0,035052</b>	0,502516	0,969651	0,407539	0,095453	<b>0,002802</b>		0,060454
14	500	35	15	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000212</b>	<b>0,000448</b>	<b>0,015048</b>	0,062001	<b>0,003969</b>	<b>0,001425</b>	<b>0,000035</b>	0,060454	

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ ).

**Anexo II:** Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para redução de fungos filamentos e leveduras.

Processos	MPa	°C	min.	1	2	3	4	5
1	0	25	5		0,775003	0,352713	<b>0,002179</b>	<b>0,014272</b>
2	0	25	15	0,775003		0,502373	<b>0,002760</b>	<b>0,019681</b>
3	0	30	10	0,352713	0,502373		<b>0,005074</b>	<b>0,045033</b>
4	0	35	5	<b>0,002179</b>	<b>0,002760</b>	<b>0,005074</b>		0,089796
5	0	35	15	<b>0,014272</b>	<b>0,019681</b>	<b>0,045033</b>	0,089796	

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % (p < 0,05).

**Anexo III:** Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para percentual de atividade da POD.

Processos	MPa	°C	min.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	25	5		<b>0,012005</b>	0,254248	0,982369	0,076865	0,933264	<b>0,007042</b>	0,892775	0,229648	<b>0,039197</b>	<b>0,004527</b>	<b>0,040623</b>	0,390837	<b>0,038476</b>
2	0	25	15	<b>0,012005</b>		0,144285	<b>0,011368</b>	0,412562	<b>0,009752</b>	0,831710	<b>0,041908</b>	0,161586	0,276571	<b>0,000002</b>	0,602552	0,083193	0,619700
3	0	30	10	0,254280	0,144285		0,245419	0,510627	0,221983	<b>0,096643</b>	0,539526	0,949711	0,473719	<b>0,000182</b>	0,339486	0,773187	0,327444
4	0	35	5	0,982369	0,113680	0,245419		0,073491	0,950847	<b>0,006655</b>	0,577684	0,221461	<b>0,036915</b>	<b>0,004796</b>	<b>0,038690</b>	0,378952	<b>0,036635</b>
5	0	35	15	0,076865	0,412562	0,510627	0,073491		0,064742	<b>0,005678</b>	0,207599	0,551615	0,928984	<b>0,000026</b>	0,763022	0,346133	0,744378
6	300	25	5	0,933264	<b>0,009752</b>	0,221963	0,950847	0,064742		<b>0,005678</b>	0,536613	0,199781	<b>0,031161</b>	<b>0,005631</b>	<b>0,033722</b>	0,347041	<b>0,031904</b>
7	300	25	15	<b>0,007042</b>	0,831710	0,096643	<b>0,006655</b>	0,303974	<b>0,005678</b>		<b>0,025975</b>	0,109175	0,180258	<b>0,000001</b>	0,464507	0,053641	0,479488
8	300	35	5	0,592775	<b>0,041908</b>	0,539526	0,577684	0,207599	0,536613	<b>0,025975</b>		0,499029	0,147132	<b>0,001059</b>	0,121409	0,743966	0,115907
9	300	35	15	0,229648	0,161586	0,949711	0,221461	0,551615	0,199781	0,109175	0,499029		0,522183	<b>0,000151</b>	0,371696	0,725486	0,358903
10	400	30	10	<b>0,039197</b>	0,276571	0,473719	<b>0,036915</b>	0,928984	<b>0,031161</b>	0,180258	0,147132	0,522183		<b>0,000001</b>	0,646994	0,287612	0,625606
11	500	25	5	<b>0,004527</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000182</b>	<b>0,004796</b>	<b>0,000260</b>	0,005631	<b>0,000001</b>	<b>0,001059</b>	<b>0,000151</b>	<b>0,000001</b>		<b>0,000010</b>	<b>0,000419</b>	<b>0,000010</b>
12	500	25	15	<b>0,040623</b>	0,602552	0,339486	<b>0,038690</b>	0,763022	<b>0,033722</b>	0,464507	0,121409	0,374696	0,646994	<b>0,000010</b>		0,216493	0,980373
13	500	35	5	0,390837	0,083193	0,773187	0,378952	0,346133	0,347041	0,053641	0,743966	0,725486	0,287612	<b>0,000419</b>	0,216493		0,207789
14	500	35	15	<b>0,038476</b>	0,619700	0,327444	0,036635	0,744378	<b>0,031904</b>	0,479488	0,115907	0,358903	0,625606	<b>0,000010</b>	0,980373	0,207789	

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % (p < 0,05).

**Anexo IV:** Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para percentual de atividade da PFO.

Processos	MPa	°C	min.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	25	5		<b>0,010372</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000215</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,005204</b>	<b>0,096382</b>	<b>0,000428</b>	<b>0,031344</b>	0,370353	<b>0,000002</b>	<b>0,000766</b>	<b>0,000471</b>	<b>0,012119</b>
2	0	25	15	<b>0,010372</b>		<b>0,000001</b>	0,162104	<b>0,000314</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000095</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000019</b>	<b>0,021228</b>	<b>0,005747</b>	0,332727	<b>0,000000</b>	<b>0,000006</b>
3	0	30	10	<b>0,000000</b>	<b>0,000001</b>		<b>0,000650</b>	0,056814	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,004592</b>	<b>0,000017</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
4	0	35	5	<b>0,000215</b>	0,162104	<b>0,000065</b>		<b>0,014312</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000201</b>	0,138050	0,658106	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
5	0	35	15	<b>0,000000</b>	<b>0,000314</b>	0,056814	<b>0,014312</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,295293	<b>0,004671</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
6	300	25	5	<b>0,005204</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>		0,210441	0,366010	0,463844	<b>0,000062</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,383982	0,738814
7	300	25	15	0,096382	<b>0,000095</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000000</b>	0,210441		<b>0,035272</b>	0,595742	<b>0,004998</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000005</b>	<b>0,038043</b>	0,353695
8	300	35	5	<b>0,000428</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,366010	<b>0,035272</b>		0,106699	<b>0,000002</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,972891	0,218980
9	300	35	15	0,031344	<b>0,000019</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,463844	0,595742	0,106699		<b>0,000852</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000001</b>	0,113854	0,688210
10	400	30	10	0,370353	<b>0,021228</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000201</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000062</b>	<b>0,004998</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000852</b>		<b>0,000001</b>	<b>0,000950</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000208</b>
11	500	25	5	<b>0,000002</b>	<b>0,005747</b>	<b>0,004592</b>	0,138050	0,295293	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000001</b>		<b>0,057595</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
12	500	25	15	<b>0,000766</b>	0,332727	<b>0,000017</b>	0,658106	<b>0,004671</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000005</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000950</b>	0,057595		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
13	500	35	5	<b>0,000471</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,383982	<b>0,038043</b>	0,972891	0,113854	<b>0,000002</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>		0,231557
14	500	35	15	<b>0,012119</b>	<b>0,000006</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,738814	0,353695	0,218980	0,688210	<b>0,000208</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,231557	

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ ).

**Anexo V:** Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para percentual de retenção de antocianinas.

Processos	MPa	°C	min.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	25	5		<b>0,000373</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000005</b>	<b>0,002851</b>	<b>0,000000</b>	0,945841	<b>0,000000</b>	<b>0,004112</b>	<b>0,000209</b>	0,727210	0,123152	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
2	0	25	15	<b>0,000373</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000162</b>	<b>0,000454</b>	<b>0,000005</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,001006</b>	<b>0,023632</b>	<b>0,000003</b>	<b>0,000000</b>
3	0	30	10	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,000000</b>										
4	0	35	5	<b>0,000005</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,036186</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000004</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,026486</b>	<b>0,019205</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
5	0	35	15	<b>0,002851</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,036186</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,002374</b>	<b>0,000000</b>	0,890483	0,832657	<b>0,001096</b>	<b>0,000031</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
6	300	25	5	<b>0,000000</b>	<b>0,000162</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,000000</b>	0,237809	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,193715	<b>0,000000</b>
7	300	25	15	0,945841	<b>0,000454</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000004</b>	<b>0,000237</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,003435</b>	<b>0,000164</b>	0,778667	0,139647	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
8	300	35	5	<b>0,000000</b>	<b>0,000005</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,237809	<b>0,000000</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,901841	<b>0,000000</b>
9	300	35	15	<b>0,004112</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,026486</b>	0,890483	<b>0,000000</b>	<b>0,003435</b>	<b>0,000000</b>		0,704227	<b>0,001605</b>	<b>0,000047</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
10	400	30	10	<b>0,000209</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,019205</b>	0,832657	<b>0,000000</b>	<b>0,000164</b>	<b>0,000000</b>	0,704227		<b>0,000059</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
11	500	25	5	0,727210	<b>0,001006</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,001096</b>	<b>0,000000</b>	0,778667	<b>0,000000</b>	<b>0,001605</b>	<b>0,000059</b>		0,227435	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
12	500	25	15	0,123152	<b>0,023632</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000031</b>	<b>0,000000</b>	0,139647	<b>0,000000</b>	<b>0,000047</b>	<b>0,000001</b>	0,227435		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
13	500	35	5	<b>0,000000</b>	<b>0,000003</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,193715	<b>0,000000</b>	0,901841	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
14	500	35	15	<b>0,000000</b>													

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ ).

**Anexo VI:** Valor de p da análise de variância (ANOVA), par a par, para o valor de DE.

Processos	MPa	°C	min.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	25	5		<b>0,000136</b>	<b>0,001102</b>	<b>0,002514</b>	<b>0,013320</b>	<b>0,001253</b>	<b>0,001717</b>	<b>0,001958</b>	<b>0,005288</b>	<b>0,015277</b>	<b>0,000000</b>	0,438482	0,880530	<b>0,001581</b>
2	0	25	15	<b>0,001360</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,003670</b>	<b>0,001535</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>							
3	0	30	10	<b>0,001102</b>	<b>0,000000</b>		0,779454	0,373842	0,965571	0,881378	0,846267	0,586704	0,089788	<b>0,000000</b>	<b>0,000095</b>	0,090903	0,903628
4	0	35	5	<b>0,002514</b>	<b>0,000000</b>	0,779454		0,540828	0,812594	0,895862	0,931293	0,791630	0,172128	<b>0,000000</b>	<b>0,000235</b>	0,155434	0,873643
5	0	35	15	<b>0,013320</b>	<b>0,000000</b>	0,373842	0,540828		0,397110	0,458355	0,485661	0,727678	0,530876	<b>0,000000</b>	<b>0,001556</b>	0,412404	0,441616
6	300	25	5	<b>0,001253</b>	<b>0,000000</b>	0,965707	0,812594	0,397110		0,915392	0,880048	0,616511	0,099756	<b>0,000000</b>	<b>0,000109</b>	0,099059	0,937754
7	300	25	15	<b>0,001717</b>	<b>0,000000</b>	0,881378	0,895862	0,458355	0,915392		0,964362	0,692932	0,128323	<b>0,000000</b>	<b>0,000154</b>	0,121812	0,977542
8	300	35	5	<b>0,001958</b>	<b>0,000000</b>	0,846267	0,931293	0,485661	0,880048	0,964362		0,726119	0,142147	<b>0,000000</b>	<b>0,000178</b>	0,132562	0,941942
9	300	35	15	<b>0,005288</b>	<b>0,000000</b>	0,586704	0,791630	0,727678	0,616511	0,692932	0,726199		0,294268	<b>0,000000</b>	<b>0,000541</b>	0,244866	0,672326
10	400	30	10	<b>0,015277</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,089788</b>	0,172128	0,530876	0,099756	0,128323	0,142147	0,294268		<b>0,000000</b>	<b>0,001086</b>	0,704605	0,120180
11	500	25	5	<b>0,000000</b>	<b>0,003670</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>							
12	500	25	15	0,438482	<b>0,001535</b>	<b>0,000095</b>	<b>0,000235</b>	<b>0,001556</b>	<b>0,000109</b>	<b>0,000154</b>	<b>0,000178</b>	<b>0,000541</b>	<b>0,001086</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,014946</b>	<b>0,000141</b>
13	500	35	5	0,088053	<b>0,000000</b>	0,909030	0,155434	0,412404	0,099059	0,121812	0,132562	0,244866	0,704605	<b>0,000000</b>	<b>0,014946</b>		0,115408
14	500	35	15	<b>0,001581</b>	<b>0,000000</b>	0,903628	0,873643	0,441616	0,937754	0,977542	0,941942	0,672326	0,120180	<b>0,000000</b>	<b>0,000141</b>	0,115408	

em **negrito** nível p significativo em nível de confiança 95 % ( $p < 0,05$ ).