

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE DE DOUTORADO

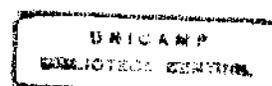
**EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS E EMBALAGENS NAS
CARACTERÍSTICAS DA POLPA DE ACEROLA E NA
DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DAS
ANTOCIANINAS DURANTE O ARMAZENAMENTO**

MARIA DE FATIMA VILHENA DA SILVA

**PROF.^ª DR.^ª HILARY CASTLE DE MENEZES
ORIENTADORA**

Campinas – SP

1999

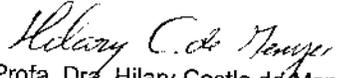


Maria de Fatima Vilhena da Silva

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maria de Fátima Vilhena da Silva, aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de dezembro de 1999.

Campinas, 21 de dezembro de 1999.


Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
Presidente da Banca

**EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS E EMBALAGENS NAS
CARACTERÍSTICAS DA POLPA DE ACEROLA E NA
DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DAS
ANTOCIANINAS DURANTE O ARMAZENAMENTO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Orientador : Prof^a Dr^a. Hilary Castle de Menezes

CAMPINAS
1999

97100002

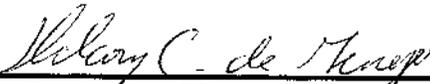
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Si38e Silva, Maria de Fatima Vilhena da
Efeito dos diferentes tratamentos e embalagens nas
características da polpa de acerola e na determinação dos teores
de ácido ascórbico e das antocianinas durante o armazenamento /
Maria de Fatima Vilhena da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Hilary Castle de Menezes
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Frutas tropicais. 2.Vitamina C. 3.Antocianina.
4.Tratamento térmico. 5.Cor. 6.Métodos. 7.Armazenamento.
I.Menezes,Hilary Castle de. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



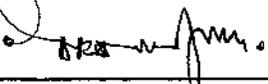
Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
Universidade Estadual de Campinas
Orientadora



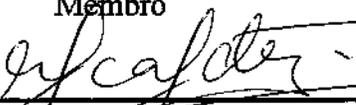
Profa. Dra. Maria do Carmo Santos Guedes
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Profa. Dra. Marisa Hoeltz Jackix
Universidade Estadual de Campinas
Membro

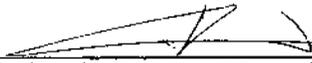
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues dos Anjos
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Profa. Dra. Maria Filomena C.F.A. Valim
Universidade Estadual de São Paulo
Membro



Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Membro

Campinas, 21 de dezembro de 1999

Dedico este trabalho:

Às pessoas que não desistem de seus sonhos e com sabedoria e prudência buscam desde sua juventude cultivar a nobreza da partilha.

Ao meu esposo querido, incansável companheiro, pela tolerância e pela dedicação à família principalmente quando tive de “abdicá-la” em função da tese;

Aos meus mais preciosos pensamentos, os meus filhos, Aline, Marlon e Elaine e à minha netinha, Gabriela, pelo amor, paciência, carinho, e fontes de iluminação da minha vida.

Aos meus pais, Estanislau e Irene, a quem devo tantas conquistas em minha vida, pelo modelo de pessoas humildes e sábias;

Aos meus irmãos, Maria, João, José, Bernadete, Graça e Helder que incessantemente deram-me incentivo, principalmente nos momentos de grandes desafios impostos pela vida.

Aos meus irmãos, Raimundo e Conceição (*in memoria*) que esperavam comemorar desta alegria comigo.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter-me dado o dom da vida.

Em especial agradeço à Prof^a. Dr^a Hilary Castle de Menezes pela orientação, constante apoio, dedicação e especialmente pela nobre amizade;

À Profa. Dra. Maria do Carmo dos Santos Guedes, que numa atitude de total desprendimento contribuiu com importantes orientações, por sua dedicação, paciência e amizade ímpar;

Aos professores Membros da Banca Examinadora que com sua experiência científica e conceituada qualificação enriqueceram as discussões desta Tese;

Ao professor Dr. Gil Eduardo Serra, que me apoiou nesta meta e se fez presente com grande amizade.

À todos os professores da FEA que de algum modo contribuíram para meu aperfeiçoamento profissional, em especial à Profa. Dra. Marisa Jakix e Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy, pela valiosas sugestões no exame de qualificação;

À Celeste Díaz Cónsul, doutoranda do Instituto de Estatística da UNICAMP, pelo auxílio nas análises estatística;

Ao Sr. Klaus J. P. Bouillon, pelo fornecimento irrestrito da matéria prima para esta tese e outros trabalhos afins;

À universidade Federal do Pará pela oportunidade de fazer este curso e aos amigos do NPI-UFGA;

Aos companheiros de jornada, Ana Koon, Mara, Priscila, Cristina Taxi, Akane, Gabriela, Vitória, Ana lúcia, Lília, Gabi, Edy, Sandra, Luis, Eliete, Paulo, Regina, Marcus, Roberta, Edy, Luis, Sandra e tantos outros pelo convívio maravilhoso, pelas importantes momentos discussões intelectuais, de alegria e festa.

Ao Pedro e Flávia pela importantes contribuições durante a preparação para a qualificação Geral;

Aos funcionários e amigos dos laboratórios de Frutas, Hortaliças e Açucarados, de Tecnologia Geral, de Instrumentação, de Microbiologia, do lab. Central do DEPAN-FEA, do lab. de pigmentos do CA-FEA, pela cordialidade e ajuda, em especial ao Valdeci da planta piloto DTA-FEA.

Aos amigos do lab. do CA-FEA, especialmente à Rose, Sandra, Evelise, pela amizade incondicional e que me ajudaram a superar dificuldades experimentais;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ANEXOS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. A acerola	4
1.1. Origem e denominação	4
1.2. Produção e comércio da acerola	5
1.3. A planta	7
2. A vitamina C da acerola	8
2.1. Teores de vitamina C e fatores de influência	8
2.2. Algumas propriedades da vitamina C	11
2.3. Estabilidade da vitamina C	14
3. Métodos de determinação de vitamina C	16
3.1. Determinação titulométrica	16
3.2. Determinação por eletroforese	17
3.3. Determinação por CLAE	17
3.4. Outros métodos	21
4. Antocianinas	26
4.1. Estrutura química das antocianinas	26
4.2. Determinação das antocianinas	28
4.3. Antocianinas como corantes naturais	29
4.4. Potencial efeito biológico das antocianinas e outros flavonóides	31
4.5. Estabilidade das antocianinas	33
4.6. Fatores de degradação das antocianinas	34
5. Referências Bibliográficas	37
CAPÍTULO II	48
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SUCO DE ACEROLA	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1. Material	49
2.1.2. Dimensões e peso médio dos frutos	49
2.2. Preparo da polpa	50
2.3. Métodos	50

2.3.1. Métodos analíticos	50
2.3.1.1. Ácido ascórbico	50
2.3.1.2. ph	51
2.3.1.3. °Brix	51
2.3.2. Métodos físicos	52
2.3.2.1. Cor	52
2.4. Análise estatística	52
3. Resultados e Discussão	56
4. Conclusões	57
5. Referências Bibliográficas	61
CAPÍTULO III	61
MODIFICAÇÃO DO MÉTODO TITULOMÉTRICO COM 2,6-DICLOROFENOL INDOFENOL PARA DETERMINAR O ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMOSTRA COLORIDA	61
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1. Matéria prima	64
2.2. Extração da Polpa	64
2.3. Pasteurização	64
2.4. Ácido ascórbico	65
2.4.1. Método de titulação com 2,6 – diclorofenol indofenol	65
2.4.1.1. Solventes extratores	65
2.4.1.2. Preparo da amostra	65
2.4.1.3. Preparo dos reagentes	66
2.4.1.4. Teste do volume do ácido oxálico na titulação	66
2.4.1.5. Repetibilidade e reprodutibilidade	66
2.4.2. Método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. Teste das alíquotas	67
3.2. Extração do ácido ascórbico	68
3.3. Comparação dos métodos	70
3.4. Repetibilidade e reprodutibilidade	72
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

CAPÍTULO IV	77
ESTUDO CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA POLPA DE ACEROLA	77
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1. Matéria prima	80
2.2. Métodos	81
2.2.1. Preparo da matéria prima	81
2.2.1.1. Seleção	81
2.2.1.2. Lavagem	81
2.2.1.3. Embalagem	81
2.2.1.4. Armazenamento	81
2.2.2. Processamento da polpa de acerola	81
2.2.2.1. Extração em planta piloto	81
2.2.2.2. Extração em laboratório	81
2.2.2.3. Tratamento térmico	82
a. Inativação	82
b. Pasteurização	82
2.2.2.4. Acondicionamento e fechamento	83
2.2.2.5. Armazenamento	83
2.3. Análises químicas, físico-químicas e físicas	85
2.3.1. Acidez total titulável	85
2.3.2. Sólidos totais	85
2.3.3. Ácido ascórbico	85
2.3.4. Antocianinas totais	86
2.3.5. pH	86
2.3.4. Sólidos solúveis	86
2.4. Análise microbiológica	86
2.5. Metodologia estatística	86
	87
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1. Efeito do armazenamento sobre os teores de ácido ascórbico	87
3.2. Efeito do armazenamento sobre os teores de antocianinas	93
3.3. Efeito do armazenamento sobre os valores de acidez total titulável na polpa de acerola	99
3.4. Efeito do no armazenamento sobre os valores de °Brix na polpa de acerola	103
3.5. Efeito do armazenamento sobre os valores de sólidos totais na polpa de acerola	107
3.6. Estudo dos valores do pH na polpa de acerola	109
3.7. Modelos de regressão	113
3.8. Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis experimentais por tratamento da polpa de acerola	115
3.9. Qualidade microbiológica da polpa de acerola	118
	120
4. CONCLUÇÕES	123
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
CAPÍTULO V	128
POLPA DE ACEROLA: ESTUDO DA COR	128
1. INTRODUÇÃO	132
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Matéria prima	132
2.2. Tratamento e armazenamento das polpas de acerola	133

2.3. Análise objetiva da cor	136
2.4. Metodologia estatística utilizada	137
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
3.1. Estudo comparativo dos parâmetros de cor L a b nas polpas de acerola nos tempos inicial (zero) e final de tratamento (seis meses)	139
3.2. Comportamento L a b nas polpas de acerola, sob diferentes tratamentos, do tempo zero até o final do armazenamento de 180 dias	145
3.3. Estudo da influência do tempo de armazenamento, do tipo de embalagem e do tratamento da polpa de acerola em relação aos parâmetros de cor do sistema L a b	148
3.3.1. Cor vermelha (a+)	148
3.3.2. Cor amarela (b+)	149
3.3.3. Luminosidade (L)	149
3.4. Correlação entre as variáveis de cor L a b e as características químicas por tratamento da polpa de acerola e modelos completos de regressão	150
a) Modelo de regressão da polpa sem tratamento térmico (PSTT), considerando as diferentes análises químicas	151
b) Modelo de regressão para a polpa inativada (PI) de acerola em relação às diferentes análises químicas	155
c) Modelo de regressão para a polpa pasteurizada sem desaeração (PPSD) de acerola em relação às diferentes análises químicas	157
d) Modelo de regressão para a polpa pasteurizada de acerola com desaeração (PPCD) em relação às diferentes análises químicas	158
3.5. Avaliação do ton ("hue"), croma (saturação) e diferença de cor da polpa de acerola, submetida a diferentes tratamentos e condições de armazenamento	160
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
CAPÍTULO VI	169
Efeito de tratamentos diversos sobre as antocianinas da polpa de acerola	169
1. INTRODUÇÃO	169
2. MATERIAL E MÉTODOS	174
2.1. Matéria prima	174
2.2. Características dos frutos	174
2.3. Extração da polpa de acerola	175
2.4. Tratamento térmico das polpas	175
a. Pasteurização	175
b. Inativação	175
2.5. Análise das antocianinas	176
2.5.1. Análise qualitativa	176
2.5.1.1. Preparação dos extratos	176
2.5.1.2. Purificação dos extratos das polpas de acerola	177
2.5.1.3. Hidrólise ácida das frações purificadas	177
2.5.1.4. Verificação das hidroxilas vicinais	177
2.5.1.5. Análise por CLAE	177
2.5.2. Análise quantitativa	179
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	179
3.1. Purificação do extrato de antocianina	198
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	204
CONCLUSÕES	206
SUGESTÕES	207
ANEXOS	

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1.	Teor de ácido ascórbico em algumas frutas	6
TABELA 2.	Teores de vitamina A e do complexo B na acerola	6
TABELA 3.	Algumas exigências para exportação da acerola	7
TABELA 4.	Estruturas de antocianinas de ocorrência natural	28

CAPÍTULO II

TABELA 1.	Características dos frutos e das polpas de acerola	53
TABELA 2.	Valores médios de ácido L-ascórbico (mg/100g) em suco de acerola, para os diferentes métodos analíticos	53
TABELA 3.	Recuperação do ácido ascórbico (%) adicionado ao suco de acerola de acordo com o método analítico	56

CAPÍTULO III

TABELA 1.	Condições de processamento da polpa de acerola	64
TABELA 2.	Comparação dos teores de ácido ascórbico entre o solvente extrator e o tempo de extração em polpas de acerola não pasteurizada e pasteurizada	69
TABELA 3.	Comparação das diferenças nos teores de ácido ascórbico, em porcentagem, entre os solventes extratores (água e ácido oxálico) nas polpas de acerola não pasteurizadas e pasteurizadas, dada entre os tempos de extração	69
TABELA 4.	Ácido ascórbico (mg/100g) de polpas não pasteurizada e pasteurizada filtrada em papel de filtro (pigmentada) e filtrada em catucho Sep-pack (despigmentada)	71
TABELA 5.	Recuperação de AA adicionado às polpas de acerola não pasteurizada (NP) e pasteurizada (P)	73

CAPÍTULO IV

TABELA 1.	Parâmetros de temperatura média da inativação, pasteurização e da desaeração da polpa de acerola	83
TABELA 2.	Teores médios de ácido ascórbico e suas respectivas estimativas de desvios padrões em polpa de acerola durante o armazenamento de 180 dias	88
TABELA 3.	Perda dos teores de ácido ascórbico, em porcentagem, em polpa de acerola durante o armazenamento, em meses consecutivos	89
TABELA 4.	Teores médios de antocianinas totais e suas respectivas estimativas de desvios padrões em polpa de acerola armazenada por 180 dias	94
TABELA 5.	Perda dos teores de antocianinas totais, em porcentagem, e suas respectivas estimativas de desvios padrões em polpa de acerola durante o armazenamento, em meses consecutivos	96

TABELA 6.	Valores de acidez total titulável expressa ácido cítrico e em ácido málico da polpa de acerola em diferentes tratamentos, com suas respectivas estimativas de desvios padrões, durante o armazenamento	100
TABELA 7.	Perda de acidez total expressa em ácido málico e em ácido cítrico, perda de ácido ascórbico e relação de perda entre acidez total e ácido ascórbico, em porcentagem, após 180 dias de armazenamento	102
TABELA 8.	Valores de °Brix da polpa de acerola em diferentes tratamentos, durante 180 dias de armazenamento	104
TABELA 9.	Relação °Brix/Acidez da polpa de acerola em diferentes tratamentos, durante 180 dias de armazenamento	106
TABELA 10.	Valores de sólidos totais da polpa de acerola para diferentes tratamentos, durante o armazenamento	108
TABELA 11.	Valores de pH da polpa de acerola para diferentes tratamentos, durante o armazenamento	110
TABELA 12.	Estudo comparativo de algumas características físico-químicas do suco integral (polpa) de acerola sem tratamento térmico	113
TABELA 13.	Correlações (Pearson) entre as variáveis para a polpa de acerola sem tratamento térmico (PST)	115
TABELA 14.	Correlações (Pearson) entre as variáveis para a polpa inativada termicamente (PI)	116
TABELA 15.	Correlações (Pearson) entre as variáveis para a polpa pasteurizada sem desaeração (PPSD)	117
TABELA 16.	Correlações (Pearson) entre as variáveis para a polpa pasteurizada com desaeração (PPCD)	118
TABELA 17.	Contagem total de bactérias (UFC/ml) da polpa de acerola com e sem tratamento térmico	119
TABELA 18.	Contagem de bolores e leveduras (UFC/ml) da polpa de acerola com e sem tratamento térmico	119
CAPÍTULO V		
TABELA 1.	Efeito de diferentes tratamentos térmicos sobre a cor e a atividade enzimática do suco de acerola	131
TABELA 2.	Coloração das acerolas codificadas pelo produtor	133

TABELA 3.	Valores médios de L a b na polpa de acerola processada por diferentes tratamento, no tempo zero (T ₀) e tempo final de armazenamento (T ₆ meses) e as diferenças dos parâmetros de cor em porcentagem (T ₀ -T ₆)	141
TABELA 4.	Coeficientes estatísticos da análise de regressão para antocianinas contra as análises químicas (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)	152
TABELA 5.	Coeficientes estatísticos da análise de regressão para antocianinas contra as análises químicas e cor (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)	152
TABELA 6.	Coeficientes estatísticos da análise de regressão para ácido ascórbico contra as análises químicas (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)	153
TABELA 7.	Coeficientes estatísticos da análise de regressão para ácido ascórbico contra as análises químicas e cor (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)	154
TABELA 8.	Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis de cor (L a b), e as análises químicas da polpa de acerola sem tratamento térmico (PSTT)	155
TABELA 9.	Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis de cor (L a b), e as análises químicas da polpa de acerola inativada (PI)	157
TABELA 10.	Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis de cor (L a b), as análises químicas da polpa de acerola pasteurizada sem desaeração (PPSD)	158
TABELA 11	Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis de cor (L a b), e as análises químicas da polpa de acerola com tratamento térmico (PPCD)	159
TABELA 12.	Valores percentuais das perdas de ácido ascórbico e antocianinas, no período de 3 a 5 meses e de zero as cinco meses de armazenamento das polpas de acerola	164
CAPÍTULO VI		
TABELA 1.	Características dos frutos utilizados no estudo das antocianinas de acerola	174
TABELA 2.	Codificação dos tratamentos utilizados no estudo das antocianinas de acerola	176
TABELA 3.	Picos dos extratos de antocianinas das acerolas 1, 2, 3, e 4, com seus respectivos tempos de retenção e proporções relativas	180
TABELA 4.	Dados espectrais (máximos de absorção e deslocamento por adição de AlCl ₃ na região do UV-Visível dos extratos metanólicos da polpa de acerola de suas frações purificadas em papel e após hidrólise ácida, da polpa pós tratamentos e das agliconas padrões	182

TABELA 5.	Valores de tempo de retenção t'_R (minutos) e concentração relativa dos extratos antociânicos da polpa não tratada termicamente e suas respectivas frações purificadas em papel e polpa tratada termicamente após hidrólise ácida, e das agliconas padrões	183
TABELA 6.	Proporções relativas das frações (agliconas) F-1', F-2', F-3' e F-4' obtidas por CLAE	186
TABELA 7.	Efeito dos tratamentos sobre a absorvância, os teores de antocianinas totais, diferença de cor (ΔE), e "hue" das polpas de acerola nos tempos inicial e final do armazenamento (seis meses)	192

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		
FIGURA 1.	Estrutura do núcleo básicocátion flavilium	27
CAPÍTULO IV.		
FIGURA 1	Fluxograma das etapas realizadas durante o processamento da polpa de acerola	84
FIGURA 2.	Foto das polpas de acerola no tempo zero de processamento	98
CAPÍTULO V		
FIGURA 1.	Fotos dos 4 cultivares de acerola usados para formar a mistura (5) que constituiu a polpa experimental	134
FIGURA 2.	Representação de cor	138
2A.	Representação da cor sólida para cor no espaço L a b	138
2B	Representação de cromaticidade a e b	138
FIGURA 3	Fotos das polpas de acerola no tempo zero de processamento e no tempo final de armazenamento de 6 meses	143
FIGURA 4.	Valores médios dos parâmetros de cor L a b da polpa de acerola após diferentes tratamentos, de zero à seis meses de armazenamento	144
FIGURA 5.	Valores médios de ton, saturação e diferença de cor das polpas de acerola, após diferentes tratamentos térmicos de zero a seis meses de armazenamento	162
CAPÍTULO VI		
FIGURA 1.	Fluxograma das etapas de purificação e obtenção das frações de agliconas (F') das antocianinas da polpa de acerola	178
FIGURA 2.	Perfis Cromatográficos obtidos por CLAE dos extratos de antocianinas das quatro cultivares de acerola e da mistura dessas cultivares. Condições cromatográficas descritas no texto.	181
FIGURA 3.	Perfis cromatográficos obtidos em CLAE das agliconas das frações F-1'(a), F-2'(b), F-3'(c) e F-4'(d)	185
FIGURA 4.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE dos extratos antociânicos da polpa de acerola submetida a diferentes tratamentos térmicos (PSTT, PI, PPSD e PPCD)	187
FIGURA 5.	Espectro dos extratos antociânicos das polpas de acerola no tempo zero de processamento: polpa sem tratamento térmico (PSTT), polpa inativada termicamente (PI), polpa pasteurizada sem desaeração (PPSD) e polpa pasteurizada com desaeração (PPCD).	189
FIGURA 6.	Espectros dos extratos antociânicos da polpa de acerola dos tratamentos PSTT e PI, nos tempos zero (T ₀) e final do armazenamento (T _F) (seis meses)	190
FIGURA 7.	Espectros dos extratos antociânicos da polpa de acerola dos tratamentos PPSD e PPCD, nos tempos zero (T ₀) e final do armazenamento (T _F) (seis meses)	191

LISTA DE ANEXOS

CAPÍTULO II

ANEXO 1.	Análise de variância dos valores médios do ácido L-ascórbico na polpa A de acerola.	208
ANEXO 2.	Intervalo de confiança de 95% para médias individuais baseados no desvio padrão para os métodos utilizados na polpa A de acerola	208
ANEXO 3.	Análise de variância dos valores médios do ácido L-ascórbico da polpa B de acerola	208
ANEXO 4.	Intervalo de confiança de 95% para médias individuais baseados no desvio padrão para os métodos químicos de determinação de ácido ascórbico na polpa B de acerola	209
ANEXO 5.	Resultado comparativo da análise estatística pelo Teste F entre duas médias, de acordo com os métodos para determinação do ácido ascórbico em polpa de acerola	209
ANEXO 6.	Cálculo para determinação do teor de ácido ascórbico	210

CAPÍTULO III

ANEXO 1.	Resultados médios do teste de repetibilidade e reprodutibilidade do método titulométrico com DCFI, para determinação dos teores de AA em polpa de acerola não pasteurizada (NP) e pasteurizada (P)	211
-----------------	--	------------

CAPÍTULO IV

ANEXO 1.	Comparação das médias dos teores de ácido ascórbico e estimativas de desvios padrões, através do valor p , entre as polpas de acerola submetidas a diferentes tratamentos no tempo zero de processamento.	212
ANEXO 2.	ANOVA dos resultados médios do ácido ascórbico nos diferentes tratamentos da polpa de acerola, com a análise do comportamento linear	212
ANEXO 3.	ANOVA para determinação da influência do tempo, tipo de embalagem e de tratamento dado à polpa de acerola e suas interações	213

ANEXO 4.	Comparação entre as médias dos teores de antocianinas, através do valor <i>p</i> , entre as polpas de acerola submetidas a diferentes tratamentos, no tempo zero de processamento	213
ANEXO 5.	Análise de variância para Antocianinas (Acy 1) de polpas de acerola não pasteurizadas e polpas inativadas congeladas	214
ANEXO 6.	ANOVA das análises de Antocianinas (Acy 1) de polpas de acerola sem tratamento térmico e polpas inativadas congeladas, analisadas até 180 dias de armazenamento, incluindo as interações dos principais efeitos envolvidos no processamento	214
ANEXO 7.	Análise de variância das análises de Antocianinas (Acy 2) de polpas de acerola pasteurizadas (sem e com desaeração) armazenadas à temperatura ambiente, analisadas até 150 dias de armazenamento, incluindo as interações dos principais efeitos envolvidos no processamento.	215
ANEXO 8.	Análise de variância para acidez total equivalente à ácido cítrico de polpa de acerola	216
ANEXO 9.	Análise de variância detalhada para acidez total equivalente à ácido cítrico de polpa de acerola	217
ANEXO 10.	Estudo dos coeficientes de regressão para análise de significância de acidez total equivalente ao ácido cítrico para polpa de acerola	217
ANEXO 11.	Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para °Brix em polpa de acerola	217
ANEXO 12.	Avaliação dos coeficientes de regressão para análise de significância de °Brix em polpa de acerola	218
ANEXO 13.	Análise de variância para Sólidos Totais em polpa de acerola	218
ANEXO 14.	Análise dos coeficientes de regressão para determinação de Sólidos Totais em polpa de acerola	218
ANEXO 15	ANOVA dos principais efeitos, tempo de armazenamento de 180 dias, tipo de embalagem e tratamento das polpas de acerola, na determinação do pH	219
ANEXO 16.	Coefficientes do modelo de regressão para determinar a concentração das antocianinas, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)	219

ANEXO 17.	Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração do ácido ascórbico, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)	220
 CAPÍTULO V		
ANEXO 1.	ANOVA sobre a influência dos principais efeitos do processamento (tratamento, embalagem e armazenamento sobre cor vermelha (a)na polpa de acerola	220
ANEXO2.	ANOVA sobre a influência dos principais efeitos do processamento (tratamento, embalagem e armazenamento sobre cor amarela (b)na polpa de acerola	220
ANEXO 3.	ANOVA sobre a influência dos principais efeitos do processamento (tratamento, embalagem e armazenamento sobre a luminosidade(L)na polpa de acerola	221
ANEXO 4.	Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração de antocianinas na polpa PI, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PI, a embalagem e todos os tempos incluídos)	221
ANEXO 5.	Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração de ácido ascórbico na polpa PI, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PI, a embalagem e todos os tempos incluídos)	222
ANEXO 6.	Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração das antocianinas na polpa PPSD, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PPSD, a embalagem e todos os tempos incluídos)	222
ANEXO 7.	Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração de ácido ascórbico na polpa PPSD, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PPSD, a embalagem e todos os tempos incluídos)	223
ANEXO 8.	Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração de antocianinas na polpa PPCD, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PPCD, a embalagem e todos os tempos incluídos)	223
 CAPÍTULO VI		
ANEXO 1.	Padrões de antocianidinas	224

TESE DE DOUTORADO

Autora: Maria de Fatima Vilhena da Silva

Título: **Efeito dos diferentes tratamentos e embalagens nas características da polpa de acerola e na determinação dos teores de ácido ascórbico e das antocianinas durante o armazenamento**

Orientadora: Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes

Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA – UNICAMP

RESUMO

A acerola é uma rica fonte de ácido ascórbico e relativa fonte de antocianinas. A fruta e seus produtos têm sido objeto de grande procura para servir como fonte nutricional individualmente, ou como fonte suplementar desta vitamina para outros alimentos. O ácido ascórbico e as antocianinas apresentam propriedades antioxidantes e têm sido apontados como preventivos para diferentes males que afetam o homem, como câncer, problemas cardiovasculares, e outros.

Um dos problemas na indústria com esse fruto e seus produtos, está relacionado com as perdas do ácido ascórbico e alteração na cor do produto.

Desse modo, este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a degradação do ácido ascórbico e das antocianinas em polpas de acerola submetidas a diferentes tratamentos: polpa sem tratamento térmico, inativação térmica ou branqueamento, pasteurização (HSTT) com e sem desaeração. As polpas foram testadas em embalagens de vidro e de lata, e armazenadas durante seis meses, para melhor avaliar o potencial vitamínico e nível de manutenção de cor dos produtos. Todo trabalho foi desenvolvido a nível de planta piloto.

O segundo capítulo trata dos testes realizados com diferentes métodos para determinação do ácido ascórbico em polpa de acerola para a escolha daquele que oferecesse bons resultados comparáveis à CLAE, e que também fosse rápido, seguro e econômico. O método que se enquadrou com tais características foi o de titulação com 2,6-dicloroindofenol. Porém, como a polpa é bastante colorida, foi necessário estudar um meio para facilitar e tornar mais confiáveis os resultados. Assim sendo, no segundo capítulo é dado a conhecer as modificações deste método para atingir o objetivo proposto. As novas modificações mostraram excelente performance nos dados e que foram estatisticamente similares aos obtidos por CLAE.

No terceiro capítulo é feita uma abordagem sobre as características físico-químicas das polpas de acerola, salientando o efeito do processamento e tipos de embalagens no tempo zero e durante o armazenamento de seis meses. Neste item, mostrou-se estatisticamente os resultados individuais e a correlação entre as análises para ácido ascórbico, antocianinas totais, pH, acidez total titulável expressa em ácido málico e em ácido cítrico, sólidos totais, e °Brix. Os resultados mostraram alta correlação entre ácido ascórbico e antocianinas.

No quarto capítulo realizou-se um estudo minucioso sobre a cor das polpas através do sistema L a b, estudo do "hue", diferença de cor e saturação da cor durante o armazenamento. Pelos resultados foi possível verificar que a cor do produto foi diretamente relacionada com o tipo de processamento e condições de armazenamento.

No quinto e último capítulo, foram identificadas as antocianinas presentes na polpa, sem tratamento térmico e também o efeito dos processamentos sobre esses pigmentos. A antocianina encontrada em maior quantidade foi a cianidina, havendo também a malvidina e pelargonidina. Esta última mostrou-se mais termossensível aos tratamentos térmicos.

O procedimento de desaeração das polpas pasteurizadas, assim como o tipo de embalagem não mostrou diferença significativa.

Palavras-chaves: frutos tropicais, vitamina C, antocianina, tratamento térmico, cor, métodos

Doctorate Thesis

Author: Maria de Fatima Vilhena da Silva

Title: **The effect of different of different treatments and packaging on the characteristics of West Indian cherry pulp and the determination of ascorbic acid and anthocyanin levels during storage.**

Advisor: Prof. Dr. Hilary Castle de Menezes

Department of Food Technology-FEA-UNICAMP

ABSTRACT

West Indian cherry is a rich source of ascorbic acid and a relative source of anthocyanins. The fruit and its products have been objects of great demand to serve individually as a nutritional source, or as a supplementary source of this vitamin for other foods. Ascorbic acid and the anthocyanins present antioxidant and preventative properties of various diseases which affect man, such as cancer, cardiovascular problems and others.

One of the problems in the industrialization of this fruit and its products is related to the losses of ascorbic acid and the color of the product.

Thus, this research was conducted with the objective of investigating the degradation of ascorbic acid and of the anthocyanins in West Indian cherry pulps submitted to different treatments: pulp without heat treatment, thermal inactivation or blanching, pasteurization (HTST) with and without aeration. The pulps were tested in glass and tin packages, and stored for six months for a better evaluation of their vitamin potential and the level of color maintenance of the products. All the experiments were developed at the pilot plant level.

The second chapter considers the tests conducted with different methods for the determination of ascorbic acid in West Indian cherry pulp for the selection of those which offered good results as compared to CLAE, and which are fast, precise and economic. The method which fitted these characteristics, was that of titration with 2,6-dichloroindophenol. However, due to the intense color of the pulp, it was necessary to study a way to facilitate the titration and make the results more precise. The modifications made to this method to reach these objectives are presented in the second chapter. The new modifications showed result in excellent performance and the data were statistically similar to those obtained by CLAE.

In the third chapter, an investigation of the physicochemical characteristics of the West Indian cherry pulps was made, emphasizing the effect of processing and types of package at zero time and during the storage period of six months. In this chapter, the individual results, the correlation amongst the analyses for ascorbic acid, total anthocyanins, pH, total titrable acidity expressed as malic acid and as citric acid, total solids and °Brix were shown. The results showed high correlation between ascorbic acid and anthocyanins.

In the fourth chapter, a detailed study of the color of the pulps was made using the L a b system, that is, a study of the "hue", difference in color and saturation of color during storage. It was possible to verify from the results, that the product color was directly related to the type of processing and storage conditions.

In the fifth and last chapter, the anthocyanins in the pulp without heat treatment were identified, and also the effects of processing on these pigments. The anthocyanin encountered in highest amounts was cyanidine, malvidine and pelargonidine also being present. The latter was shown to be more sensitive to heat treatments.

Deaeration of the pasteurized pulp, and type of package showed no significant difference.

Keywords: West Indian cherry, vitamin C, anthocyanin, heat treatment, color, method,

1. INTRODUÇÃO

A acerola é chamada de maçã em algumas regiões do país, pois contém ácido málico, que confere aroma parecido ao dessa fruta. Extensivas pesquisas têm sido realizadas no sentido de estudar as causas que levam ao amarelecimento de frutos, polpas congeladas, ou não congeladas e outros produtos derivados, bem como formas de armazenamento e conservação para que o produto tenha seu valor comercial garantido.

Devido o alto teor de vitamina C na acerola, e a conquista no mercado de exportação, as investigações têm se intensificado para obter-se produtos derivados desta fruta, tais como sucos, geléia, sorvetes, doces, etc., com assegurado teor da vitamina C e manutenção da cor. Entretanto, um dos maiores problemas encontrados tem sido a perda da vitamina C e mudança de cor desses produtos, inclusive do fruto *in natura*.

Na exportação mundial da acerola, o Brasil vem se destacando e o Japão importa cerca de 60% da produção nacional (BENSIMON, 1991). Isto tem incentivado o país a grandes investimentos, tanto na tecnologia agrícola quanto na industrial.

Na indústria alimentícia, o suco de acerola tem sido utilizado para enriquecer os sucos e néctares de outras frutas, saladas de frutas etc. É utilizado também na indústria de conservas, na preservação de frutos enlatados, secos ou frigorificados como antioxidante natural. Um dos maiores problemas enfrentado, no entanto, está relacionado à rápida perda da vitamina C e mudança de cor nos produtos à base de acerola.

O atributo de cor é importante, porque tem um efeito psicológico para aceitação de um alimento. Por esse motivo, a indústria de alimentos vem se preocupando em investigar meios tecnológicos que não interfiram significativamente na degradação dos pigmentos naturais presentes, por ser um fator atrativo ao consumidor e tenha garantido seu valor nutricional.

O fruto da acerola em plena maturação varia de cor, indo desde o amarelo-laranja até a coloração vermelho púrpura. A coloração vermelha deve-se à presença

de antocianinas e a alteração de cor no suco de acerola pode estar relacionada à decomposição desses pigmentos e produtos de degradação do ácido ascórbico. Baixas temperaturas de armazenamento podem evitar ou minimizar essas alterações; ao contrário da temperatura ambiente, que provoca rápida alteração na cor do suco e seus derivados, e aparecimento de pigmentos escuros, podendo mudar a cor vermelho-brilhante para amarelo-pálido e/ou amarronzado, com notável produção de CO₂ após alguns meses de armazenamento à temperatura ambiente.

Para prolongar a vida de prateleira dos produtos de acerola, novas tecnologias, como pasteurização em sistema HTST e/ou liofilização, são alternativas que têm produzido resultados satisfatórios.

Os estudos sobre acerola revelam que a perda da vitamina C está relacionada a diversos fatores conhecidos, como a temperatura de armazenagem, condições pós-colheita, condições de processamento, embalagem, etc. Além disso, fatores desconhecidos e reações anaeróbicas influenciam predominantemente na degradação da vitamina C, além de promover considerável mudança na cor. A forma como é obtido o suco ou a polpa da acerola pode influenciar nos teores de ácido ascórbico e na conservação de cor do produto final.

Vários estudos reportam que os teores de ácido ascórbico e a cor do fruto de acerola variam devido às inúmeras influências que sofrem, como por exemplo a variedade, condições edafoclimáticas de cultivo da planta, tratos culturais, incidência solar, estágio de maturação, época de colheita e manuseio pós-colheita, localização geográfica e posição da árvore para incidência solar (ASENJO & MOSCOSO,1988; COUCEIRO,1986; CAVALCANTE,1991).

2. OBJETIVOS:

2.1. Geral:

Estudar o efeito de diversos tipos de processamento, da embalagem e das condições de armazenamento sobre as características físicas, químicas, e físico-químicas da polpa de acerola, com vistas a identificação das mudanças ocorridas especialmente sobre os teores de ácido ascórbico, antocianinas e coloração do produto, além de investigar o método mais econômico, prático e seguro para determinar os teores de ácido ascórbico.

2.2. Específicos:

2.2.1. Comparar diferentes métodos de determinação de ácido ascórbico, para eleger o que fornecesse resultado comparável aos obtidos por CLAE, como também propor modificações no método eleito, se necessário, para uma determinação segura;

2.2.3. Determinar os teores de ácido ascórbico, antocianinas totais, °Brix, acidez, sólidos totais e pH nas polpas de acerola tratadas e não tratadas termicamente, acondicionadas em embalagens de vidro e de lata a temperatura de congelamento e ambiente;

2.2.4. Extrair e identificar as antocianinas presentes na polpa de acerola, por meio de estudos cromatográficos, espectrofotométricos, análises físico-químicas e físicas, comparando os resultados com padrões e dados da literatura;

2.2.5. Comparar o efeito da desaeração nas polpas pasteurizadas, por intermédio de resultados analíticos;

2.2.6. Propor modelo estatístico que permita prever os teores de ácido ascórbico e de antocianinas na polpa de acerola, mediante resultados obtidos dentro de um plano experimental.

2.6.7. Realizar análises microbiológicas, periodicamente, para avaliação da inocuidade das polpas de acerola durante o período de armazenamento de 180 dias.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A ACEROLA

1.1. Origem e denominação

De acordo com o país de origem, a acerola recebe diferentes nomes, como por exemplo West Indian cherry, Barbados cherry, Jamaica cherry e outros. Acredita-se que o fruto seja originário do Caribe, nordeste da América do Sul, América Central ou das Índias (OLIVA,1995). Antes da descoberta das Américas, os índios já utilizavam a acerola. Os europeus, então, entusiasmaram-se com o fruto por sua cor atrativa e as tribos encarregavam-se de disseminá-las. Em 1903, as cerejas das Antilhas foram introduzidas na Flórida através de Cuba e, a seguir, em outros países do continente americano (SIMÃO, 1971) e vem sendo cultivada extensivamente em Porto Rico, Havaí, Cuba e Flórida-EUA, face à sua riqueza em vitamina C e uma série de outras qualidades (ACEROLA, 1986)

A acerola apresenta-se na natureza com muitas variedades, e estas são classificadas de acordo com o sabor doce ou ácido dos frutos, sendo que o primeiro apresenta menor teor de ácido ascórbico, ao contrário do segundo. O nome "acerola" é usado tanto no Havaí como no Brasil (NAKASONĒ,1968). No Brasil, a acerola é também conhecida como cereja-das-Antilhas e cereja do Pará.

No Brasil foi introduzida em 1955, no Estado de Pernambuco pela Universidade Federal daquele Estado, procedente de Porto Rico, através da professora Maria Celene Cardoso de Almeida, que trouxe daquele país algumas sementes da variedade B-17, considerada das mais ricas em vitamina C, que deram origem às primeiras plantas de acerola em Pernambuco. Daquela época até hoje, milhares de mudas já foram doadas pela UFRPE aos seus visitantes e às várias pessoas interessadas em cultivar acerola (COUCEIRO, 1985)

A partir da década de 80, a acerola ganhou *status* de pomar comercial no Brasil devido à demanda de países da Europa, Japão e Estados Unidos da América, e mais recentemente, do crescente consumo no mercado interno.

1.2. Produção e comércio de acerola

A acerola desenvolve-se bem em regiões tropicais, porque exige temperaturas em torno de 26°C e precipitação variando de 1200 a 1600mm, razões pelas quais é produzida em quase todos os estados brasileiros. No Brasil, os principais produtores são: Bahia (35% da produção nacional), Pernambuco (17%) e Pará (16%), mas a aceroleira é também encontrada nos estados de São Paulo e no Paraná, embora em menores quantidades. São variedades classificadas como doce (clones Manoa Sweet, Tropical Ruby e Hawaii Quenn) e azedas (J.H. Beaumont, C.F. Rehnoborg, Red Jumbo, F. Haley e Mauunawili) sendo estas as que contêm maior teor de ácido ascórbico (SILVA, et al. 1988).

No Brasil, existem alguns plantios de pequeno e médio porte instalados e outros em fase de implantação nos estados da BA, PB, PE, PA, PR, RN e SP, visando principalmente a exportação da fruta (ALVES, 1993). Segundo ARAÚJO & MINAMI (1994), o Brasil é atualmente o maior produtor e consumidor de acerola no mundo seguido pelos mercados japonês e europeu.

Existe um projeto para produzir acerola no Estado do Ceará, sem utilizar qualquer tipo de adubo químico, podendo chegar a 200ha nos próximos 4 anos. A empresa responsável é a Amway Corporation que produz complementos alimentares e vai investir US\$50 milhões no plantio de frutas (PAIVA & ALVES, 1998)

No mercado interno a acerola é comercializada principalmente na forma *in natura* ou de polpas congeladas, e seu maior mercado está nos sucos naturais. Para definir o preço do quilograma da acerola são utilizados os critérios de coloração, tamanho e uniformidade. A tendência, entretanto, é que os teores de ácido ascórbico passem a estabelecer o preço do produto (ALVES,1996; NEVES et al, 1999). A acerola é uma rica fonte de vitamina C, razoável em caroteno, e pobre em vitaminas do complexo B (ROCHA, 1988, SILVA & MENEZES, 1997; ASENJO, 1980; DERSE & ELVEJHEM , 1954; MILLER et al. 1961, OLIVEIRA, 1997) (Tabelas 1 e 2).

A cultura da acerola, além de representar uma alternativa de diversificação para os pequenos produtores, também é geradora de empregos, em virtude de sua classificação e colheita serem feitas manualmente e exigirem intensivo emprego de mão-de-obra.

Na Tabela 1, está apresentado o teor de ácido ascórbico de diferentes frutas comparando-se aos teores possíveis de ser encontrado em acerola e na Tabela 2 os teores de vitamina A e do complexo B presentes na acerola.

TABELA 1. Teor de ácido ascórbico em algumas frutas

Frutas	Ác. ascórbico (mg/100g)	Frutas	Ác. Ascórbico (mg/100g)
Abacate	15,0	Limão	23 - 60
Abacaxi	27,2	Maçã	5,9 - 8,0
Acerola	1.000 – 4.676	Manga	7,0 – 147
Amora	210,0	Mamão	36 – 109
Banana	10,0	Melão	12,5 – 58,7
Camu-camu	2.950	Melancia	9,0
Cabeludinha	706 – 2.417	Morango	41 – 81
Caju	147 – 548	Pêssego	18,7 – 26,8
Laranja doce	37 – 80	Tangerina	15 -56

FONTE: Adaptada por FIGUEIRÊDO (1998)

TABELA 2. Teores de vitamina A e do complexo B na acerola

Vitaminas	Suco (µg/100g)	Fruta com caroço (µg/100g)	Polpa (mg/100g)
Caroteno	-	-	0,408
Tiamina (vitamina B)	30	30	0,028
Riboflavina(vitamina B ₂)	50	50	0,079
Niacina (vitamina PP)	290	409	0,34
Piridoxina(vitamina B ₆)	4,4	8,7	-

FONTE: ASENJO(1980); DERSE & ELVEJHEM(1954); MILLER et al. (1961)

Dentre os compradores de acerola do Brasil, destacam-se o mercado japonês, seguido dos Estados Unidos e Europa. A empresa Nichirei do Brasil (NIAGRO), cuja matriz no Japão detém 90% dos produtos de acerola, relata que as vendas tiveram altas de 1987 a 1992, quando estacionaram. Porém o mercado vem reanimando e as previsões de exportação para o Japão estão novamente em alta (IBRAF, 1995).

Na Europa, com destaque para Alemanha, França, Bélgica e Hungria, a acerola é bastante usada para enriquecimento de sucos; nos Estados Unidos da América, sua utilização é basicamente na indústria farmacêutica; no Japão, a acerola é processada e utilizada para fabricação de vários produtos. Outro mercado promissor é a América Latina, principalmente Argentina, Chile e Uruguai, que demonstram grande interesse na compra de acerola do Brasil (MUSSER, 1995).

Devido à alta segregação, as características dos frutos são bastante variadas e algumas exigências já começam ser definidas para exportação de acerola (Tabela 3).

TABELA 3. Algumas exigências para exportação de acerola

Características	Exigências
Coloração	Vermelha
Sólidos solúveis (°Brix)	Mínimo de 7,0 (Europa) ou 7,5 (Japão)
Vitamina C (mg/100g)	Mínimo de 1000mg/100g (Europa e Japão)

FONTE: ALVES (1996).

1.3. A planta

Tem o nome científico de *Malpighia glabra* L e pertence à família das Malpighiaceas. É planta arbustiva, que atinge no máximo três metros de altura, muito copada, de folhas permanentes. As flores são pequenas, perfeitas, amarelas ou lilás. Os frutos são vermelhos quando maduros, de polpa macia e sucosa, ácida ou subácida. O seu

desenvolvimento leva 22 dias, em média, da fecundação à maturação do fruto. De forma subglobosa, medindo de 1 a 3 cm de diâmetro e massa variando de 2 a 10 gramas. A massa de sua polpa representa 80% do peso total da fruta. Geralmente cada fruta contém 3 pequenas sementes inclusas em envoltórios de textura rija e apergaminhada (caroço) (ALVES, 1991; BAILEY & BAILEY, 1976))

A planta floresce e frutifica 4 a 7 vezes por ano, com pequenos períodos vegetativos intercalados, o que equivale dizer que frutifica o ano todo. A planta cresce bem em quase todos os tipos de solo preferindo, no entanto, os solos profundos, argilo-arenosos de boa fertilidade e drenagem satisfatória (OLIVEIRA, 1996). A frutificação inicia-se a partir de 2,5 a 3 anos do plantio. Uma aceroleira pode produzir de 20 a 30 Kg de frutos por ano e os frutos devem ser colhidos quando maduros ou em início de maturação, isto é, quando se apresentarem com a coloração vermelho-intenso ou amarelo rosado, respectivamente. Os frutos em início de maturação são mais ácidos e mais ricos em vitamina C, e resistem melhor ao manuseio e comercialização (GONZAGA NETO & SOARES, 1994).

Os produtores de acerola buscam alternativas para garantir boa produção e melhorar a qualidade do fruto. Recentes estudos realizados por SILVA & MENEZES (1998) verificaram que acerola produzida por estaquia apresentou maior concentração de ácido ascórbico do que aquela produzida a partir de sementes. CARVALHO & MANICA (1993) verificaram que o padrão de cultivo influencia diretamente na cor dos frutos e na composição física e química da acerola.

2. A VITAMINA C DA ACEROLA

2.1. Teores de vitamina C e fatores de influência

O teor de vitamina C da acerola está relacionado com localização geográfica, estágio de maturação do fruto, época de colheita e tratos culturais. As perdas de vitamina C são variáveis para distintos frutos, porém são mais acentuadas se observadas as condições extremas de temperaturas e tempo de estocagem (SILVEIRA et al., 1981; ASENJO, 1980). O simples processamento de vegetais pode contribuir para significativa perda da vitamina C (TAPADIA et al., 1995)

No estudo de NAKASONE et al. (1968), com diferentes cultivares de acerola, notou-se que as frutas das variedades doces estudadas apresentaram peso médio de 5,2 a 7,2g, o teor de ácido ascórbico variou de 1.437 a 1.577mg/100g, enquanto as variedades ácidas apresentaram o peso médio dos frutos em torno de 3,3 a 9,3g, e os teores de ácido ascórbico variaram de 1.400-2.300 até 2.200-3.200 mg/100g. Não foi verificada relação entre o peso dos frutos, e o teor de sólidos solúveis com os teores de ácido ascórbico das cultivares de acerola estudadas.

Investigações com acerola em diferentes estádios de maturação mostraram que os teores de determinados compostos são afetados pelo grau de amadurecimento do fruto. FENNEMA (1982) relata que os valores do °Brix são mais baixos nos frutos "de vez" do que nos frutos maduros devido a hidrólise do amido, que produz aumento dos açúcares solúveis à medida que o fruto amadurece. Em relação à vitamina C, foi observado por alguns investigadores decréscimo de 33 a 45% nos teores dessa vitamina ou ainda de 50% ou mais até o início da pigmentação (LÓPEZ, 1963; ITOO et al.,1990; ALVES, 1992). Recentes pesquisas confirmaram esses estudos mostrando que os teores da vitamina C decrescem na ordem de frutos verdes, seguido dos frutos "de vez" e dos frutos maduros (ALDRIGUE, 1998, SILVA & MENEZES, 1997).

Estudo de monitoramento dos teores de ácido ascórbico em polpas de acerola de diferentes cultivares, em três estádios de maturação (verde, "de vez" e maduro) armazenadas durante 90 dias sob congelamento, mostrou uma perda de 1,73% a 9,5%; de 1,78% a 13,4% e ao redor de 15% para as polpas de frutos verdes, "de vez" e maduros, respectivamente. Pelo sistema L a b, verificou-se que a cor vermelha foi sensivelmente degradada, principalmente nas polpas de frutos maduros, e a cor amarela foi aumentada nas polpas dos estádios "de vez" e maduro (SILVA & MENEZES, 1997).

Polpas de acerola foram extraídas em despoldadeira, em planta piloto, com várias condições de pressão e selação de peneira com diferentes aberturas, não tratadas termicamente, estocadas em fracos de vidros de 150 ml transparentes, durante 7 meses a -18°C. O ácido ascórbico foi determinado por titulação com 2,6-dicloroindofenol, e a cor medida em colorímetro MINOLTA pelo sistema L a b. Os resultados mostraram que durante a estocagem, as polpas modificaram sua cor do laranja-avermelhado para laranja-amarelado, e o teor de ácido ascórbico foi reduzido de 22 a 26%. Concluiu-se que o alto

teor de ácido ascórbico na polpa foi correlacionado à maior degradação dos pigmentos vermelhos durante a estocagem (SILVA, KAWASAKI & MENEZES, 1999).

SILVA, KAWASAKI & MENEZES (1997) testaram três diferentes condições de extração de suco de acerola para verificar o efeito do processamento sobre sua composição química. Os sucos foram pasteurizados e armazenados durante seis meses. Os resultados indicaram que as condições de extração influenciaram nos valores de acidez total, °Brix, sólidos totais e teores de ácido ascórbico. A cor do suco mais afetada foi daquele obtido com maior pressão, ficando visivelmente marrom ao final do armazenamento de seis meses. Estudos anteriores realizados por SAMSONOVA et al. (1984) mostraram que o suco de "sea buckthorn berries" obtido por pressão e centrifugação, apresentaram uma perda de 50 - 55 e 35 - 40 % do ácido ascórbico, respectivamente.

Três formulações de néctar de acerola foram preparadas e tratadas sob diferentes processos e condições de estocagem. Os produtos foram armazenados em latas. Um lote foi congelado em túnel de congelamento e armazenado a -18°C ; outro lote foi processado termicamente em trocador de calor de placas ("Hot fill") com enchimento a quente, e o terceiro foi tratado em trocador de calor rotativo ("Spin cooker-cooler") com enchimento a frio. As amostras tratadas termicamente dos lotes 2 e 3 foram armazenadas à temperatura ambiente. Os resultados indicaram que as amostras armazenadas à temperatura ambiente apresentaram alteração de cor, aspecto visual e sabor. Foi concluído que um dos fatores que contribuiu para o escurecimento deve-se à degradação do ácido ascórbico, detectada pela perda dessa vitamina (OLIVA, MENEZES & FERREIRA, 1996). Frutas armazenadas sob refrigeração (8°C) por 168 horas apresentaram uma perda de 44% nos teores de ácido ascórbico e frutas congeladas a -18°C tiveram seus teores de ácido ascórbico diminuído em 21% após 180 dias de estocagem (OLIVA & MENEZES, 1996).

CAMPELO (1996) avaliou as mudanças nos teores de vitamina C em polpas de acerola pasteurizadas ($85^{\circ}\text{C}/1\text{ s}$) e não pasteurizadas armazenadas a -18°C durante 12 meses. Os dados obtidos indicaram que, no tempo zero de processamento, não houve diferença significativa entre os dois tratamentos para os teores da vitamina C. Porém, ao final do armazenamento, ocorreu degradação média dessa vitamina de 38,04% e 43,94% para as amostras não pasteurizadas e pasteurizadas, respectivamente. A autora concluiu que

as condições do tratamento térmico usadas não foram eficazes para preservar a vitamina C durante a estocagem.

Algumas investigações são realizadas com o objetivo de verificar a qualidade do tratamento térmico sobre os produtos de frutos e vegetais que garantam a sua conservação quanto aos padrões microbiológicos e sensoriais e nutricionais.

Polpas de acerola foram inicialmente branqueadas, seguidas de testes de esterilização comercial. O tratamento térmico foi realizado em tacho inox, encamisado com temperatura de 100°C, testado a 10, 15, 20 e 25 minutos. Foi selecionado o menor tempo de tratamento porque proporcionou maior retenção da vitamina C. A polpa, assim processada, foi armazenada à temperatura ambiente (25°C) durante 105 dias. Foi determinado acidez total titulável, °Brix, pH e teor de vitamina C. Os resultados microbiológicos e sensoriais foram de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação federal. Não foi detectado variação significativa à nível de 1% para as análises físico-químicas avaliadas ao final do período de armazenamento, e o néctar elaborado dessa polpa, após 105 dias, apresentou uma aceitabilidade de 79,52% pelos provadores, pelo teste de consumidor (SANTOS et al., 1998).

O processo de microfiltração foi usado para esterilizar o suco de acerola. Os experimentos foram realizados em sistema tubular com membranas de polietersulfona (0,3µm de diâmetro de poro), em diferentes pressões transmembranas, a 30°C, durante 2 horas. Os dados indicaram uma queda na viscosidade aparente do suco obtido, em decorrência da ausência de pectina no permeado, e uma pequena diminuição nos sólidos solúveis. Houve somente uma variação de 4% nos teores de vitamina C. As análises microbiológicas constataram que o processo de microfiltração garantiu a produção de sucos estéreis (NEVES et al., 1998)

2.2. Algumas propriedades da vitamina C

A vitamina C é requerida na dieta humana por apresentar funções importantes como regeneração das membranas e dos tecidos, evitar escorbuto e manter funções vitais. Ela é facilmente encontrada em frutos e vegetais diversos em diferentes concentrações. Na dieta humana exigem-se níveis de concentrações de acordo com a atividade física, sexo, idade e qualidade de vida de cada pessoa.

A vitamina C é solúvel em água e extremamente termolábil oxidando-se facilmente na presença do ar atmosférico, em soluções diluídas. Deve-se ter cuidado para reduzir o efeito de traços catalíticos de íons metálicos. O ácido ascórbico apresenta a maior concentração da atividade vitamínica.

Simple operações tecnológicas como descascar, cortar ralar, filtrar, homogeneizar, espremer, secar, cozinhar, etc, são vias fáceis de oxidação dos alimentos. De acordo com BORONAT & TAMAMES (1997), o processo oxidativo pode ocorrer por três vias: autooxidação, fotooxidação e catálise por lipooxigenase. A adição da vitamina C, ou de ácido ascórbico, tem sido utilizado para evitar processos oxidativos e aumentar a vida de prateleira dos produtos alimentícios processados.

O “stress oxidativo” é considerado um balanço pró-oxidante/antioxidante a favor do anterior, levando a um dano potencial. Na pele, tanto os processos metabólicos normais, quanto os patológicos levam à formação do radical superóxido de hidrogênio e, na presença de metais transicionais (por exemplo, ferro e cobre), do radical hidroxil que, por definição, são radicais livres de oxigênio. Individualmente, ou em conjunto, são moléculas fortemente reativas. Alguns componentes da pele absorvem a radiação UV/Vis, dando origem a um reativo “estado de excitação”, podendo gerar oxigênio livre, prejudicial à pele. A vitamina C tópica pode servir como fotoprotetor, além de ser fortemente antioxidante, capaz de seqüestrar múltiplas espécies reativas de oxigênio e inibir sinergicamente o radical livre, principalmente combinada com vitamina E (DARR, 1997).

Existem substanciais evidências de que antioxidantes dietários são preventivos de doenças cardiovasculares. JACOB (1998) reporta estudos de 5 anos com homens cuja dieta, deficiente em vitamina C, aumentava o risco de enfarte do miocárdio. Em outro estudo, a vitamina C preveniu doenças da artéria coronária e limitou a progressão dessas doenças nos indivíduos com o problema existente. VINSON et al. (1998) demonstraram que extrato obtido de laranja amarga (*Citrus aurantium*) extraído com álcool(30%)-água, rico em flavonóide, suplementado com ácido ascórbico e testado em animais (hamsters), inibiu a aterosclerose e apresentou significativa correlação entre os índices de susceptibilidade oxidativa e aterosclerose.

Semelhantes contribuições acerca do uso de vitamina C, associado aos compostos fenólicos presentes em sucos e bebidas, mostraram resultados favoráveis no papel

antioxidante para o metabolismo humano (MILLER & RICE-EVANS, 1997; SCHMIDT, 1995). Dietas suplementadas com vitamina C podem reduzir o “stress oxidativo” em fumantes, melhorando doenças patogênicas crônicas e diminuindo riscos de câncer pulmonar (AGHDASSI et al, 1999). De acordo com recente estudo (WEBER et al., 1995), o requerimento de vitamina C para fumantes deve ser maior (140 mg/dia) que para não fumantes (60mg/dia), para prevenir doenças cardíacas, câncer e catarata. Outros estudos mostraram que a ingestão de frutos e vegetais ricos em vitamina C podem reduzir o risco de certos tipos de câncer (SINHA et al., 1997).

Alguns estudos mostram uma associação entre infecções e estado nutricional de vitamina C. CASANUEVA et al. (1998) realizaram estudos com mulheres com escolaridade de 2º grau, com menos de 20 semanas de gravidez, comparando as que possuíam infecções vaginais com um grupo controle ausente de infecção. As mulheres receberam uma dieta com alto teor de vitamina C. A avaliação foi realizada determinando-se a contagem de leucócitos e níveis de leucócitos e vitamina C plasmático. Não foi encontrado efeito nos níveis plasmáticos de vitamina C sobre as infecções, possivelmente porque as mulheres tiveram alta ingestão da vitamina. Os autores recomendaram que seja estabelecido os níveis de ácido ascórbico e dehidroascórbico para verificar melhor a participação da vitamina C na redução de radicais livres gerados pelos processos de infecção.

A hiperhomocisteinemia tem sido implicada como um fator de risco de doenças cardiovasculares. Suplementos de ácido fólico de 1 a 2 mg tem sido recomendado para normalizar os níveis de homocisteína. O ácido fólico tem papel importante na conversão da homocisteína para metionina. É conhecido que megadoses de vitamina C (500 mg – 1000 mg) são capazes de inativar a vitamina B-12, especialmente na presença de ferro, precipitando desse modo a vitamina B-12 deficiente. Portanto, uma dose de vitamina na faixa de 500 mg por dia, ou maior, pode interferir na habilidade do ácido fólico em indivíduos que desejam diminuir os níveis de homocisteína (MIX et al., 1999).

Diante dos dados acima descritos acerca das propriedades da vitamina C, esta vitamina não pode ser utilizada sem prévia avaliação do estado geral de saúde do indivíduo. Seu uso indiscriminado ao invés de favorecer um efeito benéfico, poderá implicar em resultados indesejáveis.

2.3. Estabilidade da vitamina C

A vitamina C é uma lactona insaturada. A sua degradação em solução ocorre tanto em condições anaeróbicas como aeróbicas, dando diferentes produtos de degradação. Em condições anaeróbicas, ocorre a oxidação reversível do ácido ascórbico para o ácido dehidroascórbico. Ela poderia ser caracterizada pela propriedade de redução de um grupo funcional enediol (SRIVASTAVA & SING, 1988). Tanto a oxidação aeróbica como anaeróbica da vitamina C leva à formação de furaldeídos, compostos que polimerizam-se facilmente, com formação de pigmentos escuros (BOBBIO & BOBBIO, 1992). A formação do ácido dicetogulônico é quase instantânea a pH alcalino, rápida a pH neutro e lenta em condições ácidas. Existem muitas rotas possíveis para síntese química do ácido ascórbico (COULTATE, 1984). Durante o processamento, pasteurização ou armazenamento, a perda do ácido ascórbico pode ocorrer por diferentes rotas (HOARE et al., 1993).

Algumas investigações têm comprovado que a perda da vitamina C nos alimentos está ligada a vários fatores, tais como: pH, presença do oxigênio, luz, concentração de sal e açúcares, aminoácidos livres, atividade de água e presença da enzima ascorbato-oxidase (LENZ & LUND, 1980). De acordo com NAGY (1980), no suco cítrico envasado há competição do oxigênio dentre um número de reações, incluindo reações de corrosão, oxidação do ácido ascórbico e oxidações que favorecem *off-flavor* e mudança de cor. Na ausência do oxigênio ocorrem reações anaeróbicas que contribuem para a degradação da vitamina C.

Um número de produtos intermediários e finais como furfural, hidroxifurfural, ácido dehidroascórbico e ácido dicetogulônico, foram identificados em produtos cítricos durante seu armazenamento (NAGY, 1980). Vários autores compartilham a idéia de que os teores de vitamina C tendem a diminuir com o aumento do tempo de armazenamento e a temperatura empregada (SILVEIRA et al., 1981; DANCHEV et al., 1980). Dependendo da natureza do produto e das condições de armazenamento pode haver uma perda de 40 a 80% no teor da vitamina C (CID et al., 1991).

Estudo realizado com suco de laranja, pasteurizado e submetido a diferentes formas de estocagem, mostrou que o congelamento é mais efetivo para manter o nível de vitamina

C do que a refrigeração (HOARE et al.,1993). O suco liofilizado, armazenado a 0°C investigado por IRZYNIEC et al. (1993), apresentou uma estabilidade duas vezes maior para a vitamina C do que o armazenado a 30° C. Sucos de maçã e abacaxi pasteurizados, enlatados e armazenados à temperatura ambiente na Arábia Saudita durante 12 meses, tiveram uma perda aproximada de 50% do teor de vitamina C (EWAIDAH, 1992). Foi também observado uma diminuição do ácido ascórbico, e aumento dos açúcares redutores os quais foram linearmente relacionado com o tempo de armazenamento. Segundo o autor, o aumento deste foi devido à hidrólise da sacarose.

Pesquisadores estudaram a qualidade do suco liofilizado de morango e observaram que não houve mudanças significativas quanto aos parâmetros de cor durante a armazenagem, e a meia-vida das antocianinas prolongou-se de 55,6 para 98 semanas (IRZYNIEC et al., 1993). Já nos estudos de suco concentrado de morango estocado a 4°C por 10 meses, houve uma perda de 11-27% de vitamina C e uma mudança de cor de 11-37 %, medida através do índice de degradação das antocianinas, tendo o índice de degradação destas aumentado de 290 para 490 %, medido pelo método diferencial de pH (KWASNIEWSKA et al., 1987).

O modo como é obtido o suco pode alterar a sua composição química. As diferentes perdas de vitamina C podem ser devido ao tipo de suco, tipo de fruto cítrico (variedade e espécie), parâmetros usados no processamento, tipo de contentor para aquecimento do produto processado, manuseio e armazenagem (NAGY, 1980; DANCHEV et al.,1980; FAN- YUNG & RECHITS,1979).

Nos frutos cítricos, geralmente, encontram-se enzimas que oxidam a vitamina C, como a oxidase-citocromo, oxidase-ácido ascórbico e peroxidases, sendo que estas últimas encontram-se em maior quantidade. No processamento do suco, porém, a etapa de desaeração minimiza a quantidade de oxigênio e a alta temperatura de pasteurização destrói radicalmente suas atividades oxidativas (NAGY, 1980). Alguns produtos de frutos tropicais apresentam um amargor após seu processamento. O processo de eliminação do amargor tem demonstrado, através do método em CLAE, também eliminação do ácido ascórbico (UTZ et al.,1982).

Trabalho realizado por EITENMILLER et al., (1977) com suco de “rabbiteye blueberries” mostrou que a inativação das pectinases do fruto, seguida de pasteurização UHT (Ultra-High Temperature) do produto armazenado durante seis meses, contribuiu para 90% de retenção da vitamina C à 4°C e 95% à temperatura ambiente.

3. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C

3.1. Determinação titulométrica

Há muito tempo, procura-se estudar os princípios dos métodos aplicados à determinação de vitamina C. Um estudo de revisão feito por GIELFRICH & BERNARD-GRIFFITHS (1975) mostra algumas diferenças entre eles. No método químico de Barakat, ocorre a oxidação quantitativa do ácido ascórbico. O N-bromosuccinimida, em presença de iodeto de potássio e éter, libera I₂ a partir de iodeto, o qual se dissolve na fase etérea, dando lugar a uma cor marrom quando alcança o ponto final da titulação.

Devido às interferências, causadas nos métodos de determinação de vitamina C, principalmente por compostos contendo enxofre, tem-se procurado evitar tal problema pela precipitação com sais e remoção do excesso do reagente com sulfito antes da determinação e enquanto o método está se realizando. SRIVASTAVA & SING (1988) usaram o N-bromosuccinimida na determinação de vitamina C por titulometria espectrofométrica em amostras químicas, farmacêuticas e biológicas, e os dados mostraram que essa substância foi eficiente no método porque ela reage com metionina, cisteína ou glutatona, dando um resultado mais seguro.

Entre os métodos desenvolvidos para determinar o ácido ascórbico (AA) e o ácido dehidroascórbico (DAA), incluem-se a determinação do DAA por condensação com 2,6-dinitrofenilhidrazina e determinação do ácido ascórbico total (AAT), o qual inclui a determinação do ácido ascórbico e do ácido dehidroascórbico por oxidação do AA e DAA, e subsequente formação de osazonas. Tem sido também indicado o método fluorimétrico, que utiliza a o-fenilenediamina para produzir uma fluorescência facilmente detectável. Para extratos vegetais muito corados também tem sido usado a titulação com N-bromosuccinimida (COULTATE, 1984).

O método titulométrico usando o 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) tem sido muito utilizado para determinação do ácido ascórbico. O princípio deste é baseado na reação de oxidação e determinado pela mudança de cor do DCFI.

A determinação do ácido ascórbico com 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) tem sido extensivamente usada, no entanto o objetivo do método apresenta limitações porque o DCFI também reage com outros redutores, tal como cisteína e a glutatona, os quais podem ser encontrados em fluidos biológicos, ou com ferro(II) que está algumas vezes presente nos produtos alimentícios (COULTATE, 1984). A presença do grupo funcional sulfidrilico presente no aminoácido cisteína e na glutatona concorrem para a oxidação os quais interferem neste método titulométrico (SRIVASTAVA e SING, 1988).

Em produtos cítricos, o método mais comum é o de titulação descrito pela AOAC(1980) com indofenol. Embora seja simples e fácil apresenta duas principais desvantagens: pouca especificidade e está sujeito a interferências (PACHLA et al., 1985). O método titulométrico com DCFI embora seja popular e simples para determinação de vitamina C apresenta também desvantagens quando a amostra contém outras substâncias redutoras tais como redutoras, pigmentos da planta, certos íons metálicos, taninos, além de compostos que apresentem grupos sulfidrílicos (SABHAZ & SOMER, 1992; SALUNKE et al., 1991; NAGY et al., 1977). Apesar de toda especificidade, nenhum procedimento único é capaz de evitar todas as interferências dessas substâncias (COULTATE, 1984; SRIVASTAVA & SING, 1988).

3.2. Determinação por eletroforese

A determinação de vitamina C por eletroforese de zona capilar oferece um recurso muito vantajoso porque há separação de substâncias iônicas. De acordo com CHIARI & NESI (1993), por esse método as substâncias são separadas de acordo com sua mobilidade eletroforética líquida sob a influência de um alto campo potencial. O método permite uma rápida determinação do ácido ascórbico e ácido ascórbico total, baseado no princípio de que a homocisteína reduz completamente o ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico.

CHIARI & NESI (1993) determinaram a vitamina C em suco de laranja, comparando os métodos por eletroforese de zona capilar, sob polaridade reversa (cátodo para porte de injeção e anodo para detecção) e por CLAE. Neste foi usada coluna

empacotada com esferas de Erbasil NH₂ de 5µm de diâmetro, fase móvel constituída por metanol-0.25% KH₂PO₄ (como tampão a pH 3.5) (1:1 v/v), sistema isocrático que separou eficientemente o ácido ascórbico. Os dados indicaram que os dois métodos apresentaram resultados semelhantes; por eletroforese de zona de capilaridade o ácido ascórbico apresentou uma retenção de 4,722 min quando reagiu com DL-homocisteína, enquanto em CLAE o tempo foi de 8,718 min. Os autores concluíram que o método de eletroforese por capilaridade de zona proposto para determinar a vitamina C total é simples e requer um mínimo de preparação de amostra, além de ser um bom método. Outra vantagem do método é que ele mede o ácido ascórbico diretamente, eliminando a necessidade de solventes orgânicos e colunas cromatográficas dispendiosas.

3.3. Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Alguns métodos por CLAE foram descritos para determinação do ácido ascórbico total, baseado em detectores de ultravioleta, fluorimétricos ou eletroquímicos DENNISON (1981); JORGENSON & LUCACS(1981); MACRAE (1990); CONCHA et al (1998).

PACHLA et al. (1985) relata sobre diferentes métodos para determinação de vitamina C em vários produtos, focalizando os procedimentos espectrométricos, eletroquímicos, enzimático e cromatográficos. No mesmo estudo, os autores mostram que o método por CLAE oferece um potencial meio de separação rápida e é específico para vitamina C. Ela pode ser cromatografada com colunas microparticuladas de trocas de ânions, ou com pareamento iônico. Entretanto, a cromatografia em fase reversa usando *cyano*, amino ou colunas de C₁₈ é a mais preferida.

LEE & COATE (1987) desenvolveram um método simples e específico de cromatografia líquida para vitamina C em sucos cítricos. A amostra de suco preparada antecipadamente foi injetada numa alíquota de 10µl na coluna Zorbax, do mesmo modo que o padrão. A vitamina C foi eluída isocraticamente com 2% KH₂PO₄(pH 2,4) e um fluxo de 0,5ml/min . O eluído foi monitorado pelo UV a 245nm. A média de recuperação de vitamina C foi acima de 96% dos níveis testados com um coeficiente de variação de 1,64%. Segundo os autores, a precisão do método de CLAE foi excelente, estimado pelo coeficiente de variação do tempo de retenção, fator de resposta e % de recuperação. Na quantificação, o ácido quínico foi usado como um padrão interno para compensar o efeito

de menor variação nos parâmetros de separação. Nesse trabalho os sucos de laranja e de uva não apresentaram coeluentes ou compostos estritamente eluentes que interferissem na detecção do UV a 245nm.

Muitos autores concordam que a vitamina C sofre uma auto-oxidação em solução, catalizada pela presença de cobre. Já que os sucos cítricos contêm naturalmente cobre (menos que 0,01% das cinzas) e ferro (menos que 1% das cinzas), (NAGY,1977), é de se esperar um efeito catalítico do metal sobre a auto-oxidação da vitamina C. LEE & COATES (1987) ao estudarem quanto à estabilidade da vitamina C em diferentes condições, verificaram diferenças significantes ($p \leq 0,05$) na retenção de vitamina C entre as amostras controle e aquelas testadas com quelantes de metais (ácido metafosfórico e EDTA). Embora a estabilidade da vitamina C, na presença dos dois quelantes de metais, tenha sido semelhante nas condições testadas, o ácido metafosfórico é mais usado porque ele tem a habilidade de precipitar as proteínas e inativar as enzimas oxidases (ROE,1967).

Ao comparar o método de CLAE com o descrito pela AOAC(1980) por titulação do indofenol, LEE & COATES (1987) mostraram valores semelhantes entre os dois métodos para a maioria das amostras, verificadas pelo coeficiente de variação. Somente oito amostras apresentaram valores levemente maiores para o método da AOAC em relação ao CLAE. Os autores explicaram que tais resultados deve-se ao fato de que o método titulométrico, por ser visual, incorra na dificuldade de se determinar o ponto exato de viragem nas amostras coloridas. Semelhantes resultados foram também observados no trabalho realizado posteriormente por HOARE et al. (1993), ao determinar o teor de vitamina C total em suco de laranja, modificando o método de titulação descrito em seu trabalho. Os dados obtidos por este método foram confirmados pelo CLAE com uma recuperação de aproximadamente 99%. A resposta do detector em CLAE foi linear na faixa de 1-100 mL/l.

WIMALASIRI E WILLS (1983) usaram uma coluna amino no método de CLAE com detecção espectrofotométrica. Eles mediram os teores de ácido ascórbico (AA) e ácido isoascórbico (IAA) com boa sensibilidade, porém obtiveram uma resolução parcial nas amostras em alimentos. COUSTARD & SUDRAUD (1981) conseguiram obter uma quantificação seletiva de AA e IAA usando uma fase reversa de íon pareado no sistema de

CLAE, cuja fase móvel constituiu-se de uma solução de metanol-água e brometo de hexadeciltrimetilamoníaco.

ZAPATA & DUFOUR(1992) trabalharam com amostras de laranja *in natura*, na forma de suco, Kiwi e tomate fresco, bebida e tablete de ácido ascórbico. Eles usaram um sistema semelhante de CLAE dos autores anteriormente citados, mudando porém o brometo por 5nM cetrimida e 50nM fosfato de potássio dihidrogênio, com pH final do eluente a 4,59 e fluxo de 1,8mL/min à temperatura ambiente. Como as retenções do AA e IAA são principalmente determinadas pelo mecanismo de íon pareado, a eluição desses compostos são influenciados pela força iônica e características lipofílicas do eluente. Nas condições dessa investigação, tanto o AA quanto o IAA tiveram um tempo de retenção reduzido, com uma concentração aumentada do fosfato; o tempo de retenção reduziu drasticamente, enquanto o DHAA (ácido dehidroascórbico) teve um leve aumento.

No mesmo estudo, usando coluna C₁₈, as amostras foram pretratadas para remover os compostos hidrofóbicos. Os resultados, entretanto, indicaram que o pretratamento de tais amostras não afetaram a análise quantitativa do DHAA, AA e IAA. Os dados mostraram que a aplicação deste método para amostras de alimentos e bebidas apresentam limites de detecção adequados, boa reprodutibilidade e especificidade com interferências não aparentes de outros constituintes. Nesse estudo, o DHIAA (ácido dehidroisoascórbico) não foi detectado, sugerindo que sua resolução deva exigir o desenvolvimento de outros sistemas.

HOARE et al. (1993), tentaram determinar o teor de ácido ascórbico por CLAE, usando coluna C₁₈ e fase móvel constituída de metanol-água-ácido acético. Não obtiveram sucesso devido a insuficiente retenção do ácido ascórbico e instabilidade na linha de base. Modificando a fase móvel por metanol-ácido cítrico, a retenção melhorou, embora outros componentes do suco de laranja tivessem interferido.

Devido a problemas de absorção não-específica com detectores de ultravioleta, foram desenvolvidos métodos com detectores eletroquímicos, os quais oferecem aumento substancial, tanto na sensibilidade quanto na seletividade quando comparado com ultravioleta. Para estudar a eficiência e a estabilidade na determinação de vitamina C, DAILY et al. (1991) conectaram uma célula eletroquímica em série com uma coluna de CLAE (

PL-SAX, 1000A°, 8 μ M, 150MM X 4.6 MM) e um detector UV/VIS a 251nm, e as amostras foram passadas através de uma placa contendo um sistema de enzima empacotada, através do qual o ácido ascórbico é removido pela enzima ativa.

Os resultados deste trabalho mostraram que o eletrodo foi utilizado para realizar 500 análises sem necessidade de limpeza, o que é vital para os métodos de CLAE. O uso de DTT (Dititreitol) para redução do ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico sem separação por CLAE, tem produzido resultados falsos devido à diminuição na concentração de DTT em mais de 8% ao passar pela placa de enzima ativa. Os autores sugerem que isto deva ser causado pela absorção não-específica do DTT pela enzima ativa. Nesse sistema, a enzima imobilizada permaneceu ativa por 6 meses quando armazenada a 4°C entre as análises.

Procurando eliminar interferências de outros constituintes de amostras de alimentos na determinação de vitamina C, KIM (1989) desenvolveu o método de cromatografia por Exclusão de Íon com detecção eletroquímica (IEC-EC). Os resultados mostraram que o método pode servir para determinar vitamina C total, desde que o ácido dehidroascórbico seja reduzido e outros agentes redutores sejam eliminados. Nesse estudo, a redução pelo DTT/IEC-EC foi linear em relação à quantidade de vitamina C presente na amostra. Houve boa separação do ácido ascórbico e DTT porque ambos são eletroativos no potencial aplicado no método, apresentando diferentes tempos de retenção. O presente método, portanto, foi indicado para determinar vitamina C total, mas não para o ácido dehidroascórbico. Sua determinação por diferença está sujeita a erros, uma vez que este último ácido é rapidamente convertido para outros produtos de degradação, quando ele é formado a partir do ácido ascórbico.

Para KIM (1989), uma das vantagens do método IEC-EC para determinação da vitamina C sobre outros métodos indicados pela AOAC é devido sua rapidez, alta sensibilidade, e especificidade, além de ser aplicável a vários alimentos e bebidas, e não requerer pré-coluna ou derivação de pós-coluna.

NISPEROS-CARRIEDO et al. (1992) separaram o ácido dehidroascórbico e ácido ascórbico por CLAE, acoplando colunas de ácido orgânico e fase reversa. Somente a coluna de fase reversa mostrou uma separação veloz, todavia ambos os ácido dehidroascórbico e o ácido oxálico eluíram em 3 minutos. A separação com a coluna de ácido orgânico foi longa; o ácido ascórbico co eluiu com o ácido málico em 13 minutos.

Segundo as análises espectrais reveladas, a eluição padrão das colunas conectadas em série foi melhor do que as individuais. Segundo esses autores, a detecção do ácido dehidroascórbico requer um procedimento mais complicado porque, além de sua absorvidade ser extremamente baixa no UV, há a eluição de substâncias interferentes.

3.4. Outros métodos

Outro método interessante proposto para se determinar a vitamina C é a "colorimetria potencial controlada". Este método é baseado na redução completa do ácido dehidroascórbico para ácido L-ascórbico. No método espectrofotométrico, tal redução ocorre na presença de agentes redutores contendo grupos SH como a homocisteína e ditiotreitól, podendo-se, desse modo, medir diretamente o ácido L-ascórbico. Entretanto, tais agentes redutores são eletroativos na mesma faixa potencial da eletrooxidação do ácido L-ascórbico; desse modo a detecção eletroquímica de tal ácido pode sofrer interferência pelo excesso desses agentes.

Com base nesses princípios UCHIYAMA et al. (1991) determinaram a vitamina C pelo método seletivo de biocolorimetria, convertendo o ditiotreitól usado na reação para um complexo totalmente eletroativo através do N-etilmaleimida, uma vez que ambos (ditiotreitól e ácido ascórbico) são igualmente eletroativos na mesma faixa potencial. Nesse estudo, os resultados mostraram que o tempo de eletrólise do ácido L-ascórbico produzido a partir do ácido dehidroascórbico foi abaixo de 15 seg. e a eficiência da corrente foi próxima a 99% com 2% de desvio padrão relativo. Os autores confirmaram que é possível uma determinação separada do ácido dehidroascórbico e ácido ascórbico através deste método.

No mesmo estudo, comparando-se o método colorimétrico com o método espectrofotométrico, os resultados obtidos (1,6 e 0,9 mg/100g) mostraram que ambos os métodos são igualmente bons, exceto quando o ácido dehidroascórbico se apresentar em pequenas concentrações. Segundo os autores, estas discrepâncias na baixa concentração entre os métodos podem ser causadas principalmente pela baixa precisão do método colorimétrico. Todavia, uma maior concentração do ácido dehidroascórbico (maior que 5mg/100g) poderia obter uma precisa determinação colorimétrica deste ácido. Uma das vantagens descritas é de que o tempo para desenvolver o método é bastante rápido (menos que 10 min) quando comparado com a espectrofotometria convencional e cromatografia

líquida; outra vantagem é poder ser aplicado em outras substâncias como urina, e bebidas naturais e artificiais.

Relatos feitos por SAHBAZ & SOMER (1992) consideram a análise polarográfica como um método específico para ácido ascórbico. Uma inspeção da corrente anódica indicaria a presença de materiais interferentes. No entanto as principais limitações da polarografia seria sua sensibilidade relativamente baixa, limitada voltagem anódica do eletrodo de mercúrio e interferências causadas pelas altas concentrações de cloretos ou tióis.

Os cátions metálicos, especialmente o Fe^{+3} e o Cu^{+2} , catalisam a oxidação da vitamina C. Em função desse fato, na fase preparativa da análise de vitamina C, é usado o EDTA por alguns investigadores (GOWDA & GURUMURTHI, 1984; HOARE et al., 1993; KIM, 1989; LEE & COATES, 1987) por considerar que este complexa o cobre e, conseqüentemente, inibe a oxidação. Por outro lado, o EDTA presente na amostra em solução, não permite que o ácido ascórbico seja polarografado facilmente, porque uma segunda onda polarográfica, considerada como meia-onda potencial, é formada entre $-0,2$ e $+0,1V$ (geralmente em tomate e algumas vezes em laranja) devido à presença de glutatona (SAHBAZ & SOMER (1992). Estes autores afirmam que o método pode ser usado para determinação do ácido ascórbico por ser específico, rápido e aplicável para soluções altamente coloridas, inclusive em frutos e vegetais.

Método por titulação espectrométrica com o-diacetoxiodobenzoato (o-DIB) é baseado na oxidação da vitamina C a pH neutro, e usa o *leuco*-2,6-diclorofenolindofenol com iodeto de potássio como indicador. O ponto final é dado pela cor azul, característica da forma oxidada do indicador. É precisa, estável e reproduzível. A reação do o-DIB com vitamina C em pH neutro é rápida, mas como a reação com iodeto é lenta, forma-se o iodo e este oxida o DCFI (diclorofenolindofenol). É necessário, portanto, titular a solução da amostra lentamente para localizar o ponto de viragem correto (GIELFRICH & BERNARD-GRIFFITHS, 1975).

Para soluções contendo de 9 - 44 μg de vitamina C, o ponto final da titulação mostra ser detectado espectrofotometricamente. Nas amostras contendo ferro(II), o indicador *leuco*-indofenol tem fornecido erros positivos, possivelmente devido à redução

do pigmento quinona, mas o amido-iodeto como indicador promove um ponto final correto e estável. Para a análise, é necessário fazer uma solução de o-DIB como indicador branco (SRIVASTAVA & SINGH, 1988).

Misturas de ácido ascórbico com cisteína ou glutatona têm sido analisadas pelo titulação da mistura, baseada nas reações dos compostos sulfídricos. Aminoácidos sulfurados, tais como cisteína e glutatona, interferem quantitativamente e podem ser mascarados pela cianoetilação; o produto cianoetilado e metionina também pode ser determinado com o-DIB na presença de brometo de potássio acidificado com o vermelho de metila como indicador (COULTATE, 1984; SRIVASTAVA & SINGH, 1988). Hidróxido de sódio, metóxido de sódio ou solução de hidróxido benziltrimetilamônia, os quais são extensivamente usados como catalizadores em cianoetilação, têm mostrado destruir a vitamina C e não estão sendo usados. No tampão fosfato de pH 6 - 7.5 a cianoetilação do grupo sulfidrílico é completa e não tem efeito sobre a vitamina C. (SRIVASTAVA & SINGH, 1988).

A determinação titulométrica direta com o-DIB realizada em diferentes amostras, foi precisa em tampão fosfato de pH 6 - 7.5. A oxidação do iodeto pelo o-DIB a pH 6-7 foi mais rápida do que a pH 7, no entanto o indofenol oxidado torna-se cor de rosa na forma ácida e dá um ponto de viragem pouco distinto. O o-diacetoxidobenzoato (o-DBI) mostrou ser o melhor reagente analítico da série do iodo porque possui as qualidades do o-iodosobenzoato (SRIVASTAVA & SINGH, 1988)

Tiosulfato, sulfitos e hidroquinonas presentes nas amostras, mesmo em pequenas quantidades, interferem na determinação da vitamina C (SALUNKE et al., 1991) Como estes reagem quantitativamente, eles podem ser determinados juntos com o-DIB (SRIVASTAVA & SINGH, 1988).

Os valores dos títulos variam de um conjunto de titulações para outra de maneira não reproduzível, quando tituladas com iodo ou qualquer agente oxidante que seja usado na presença de iodeto de potássio ou brometo de potássio (NAGY et al., 1977)

O método espectrofotométrico tem sido empregado para determinar vitamina C em drogas, frutas e leite baseado na oxidação da vitamina C medida através da absorvância.

SARKAR & SARKAR (1994) determinaram a vitamina C pelo método espectrofotométrico usando dicromato de potássio em meio ácido sulfúrico 9 M. Eles consideraram vários parâmetros, tais como concentração do ácido, temperatura e tempo sobre os dados de absorvância. Os resultados mostraram que a absorvância aumentou gradualmente com o aumento da concentração de ácido sulfúrico e foi obtido o máximo a uma concentração de 9 M. Com o aumento da temperatura, aumentou a absorvância lentamente até 60°C, a partir daí aumentou rapidamente sendo observado o máximo a 80°C. O tempo para alcançar a absorvância máxima ocorreu dentro de 10 minutos.

O método, entretanto, é limitado para amostras que contenham substâncias redutoras, tais como compostos sulfídricos, redutoras e ferro (SALUNKE et al.,1991; SAHBAZ & SOMER,1992). Para contornar tal problema, alguns métodos preferem tratar as amostras com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). No entanto a reação deste composto, segundo ROE (1967), pode ser afetada pela presença de aldoses e ácido glucorônico, quando for utilizada a uma temperatura acima de 37°C.

Na busca de um método quantitativo simples, rápido e eficiente, KIRK & TING (1975) modificaram o método PDA (o-phenilenediamina), proposto pela AOAC (39061) para determinar o ácido dehidroascórbico e ácido ascórbico total, baseado em um teste fluorimétrico usando análise de fluxo contínuo. A modificação do método consistiu em substituir 50µl 2,6-diclorofenolindofenol (DCP) a 0,2% por Norit (carbono ativado) como agente oxidante(AOAC, 1980). O excesso de DCP foi reduzido pela adição de 30µl de tiouréia a 3,0%. Os autores consideraram que a tiouréia previne a descoloração durante a transmissão da fluorescência. No procedimento automatizado, foram também estabelecidas algumas mudanças, descritas em seu trabalho. A partir de uma curva padrão, as concentrações de ácido dehidroascórbico (DAA) e ácido ascórbico total (TAA) foram calculados pela seguinte equação:

$$\frac{\text{fluorescência da amostra - branco}}{\text{fluorescência } 1\mu\text{g vitamina C/ml}} \times \frac{\text{fator de diluição}}{\text{umidade da amostra}} \times 100 = \mu\text{gC/100g}$$

Os resultados desse estudo indicaram que o método fluorimétrico de fluxo contínuo, modificado por KIRK & TING (1975) para determinar o DAA e TAA, foi comparável aos

métodos da AOAC com uma diferença de menos de 1% nos valores de ácido ascórbico reduzido entre o procedimento manual e o automatizado. Contudo, este último representa maior rapidez analítica sem afetar a precisão e exatidão do método fluorométrico descrito pela AOAC.

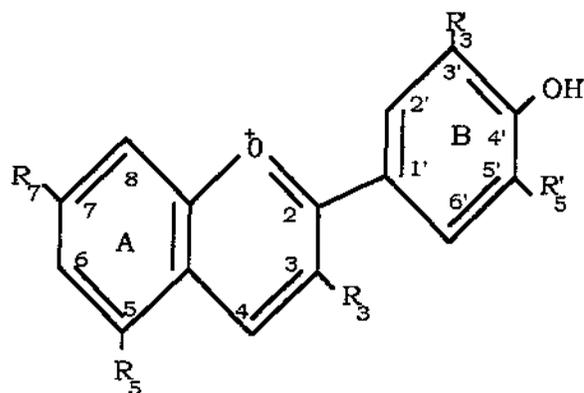
Titulação do ácido ascórbico em tabletes de vitamina C foi determinada com Bromamina -T (BAT) por GOWDA & GURUMURTHY (1984), cujo indicador foi o Naftidina ou 3,3'-dimetilnaftidina. Eles encontraram 87,64 mg de agentes redutores, cujo ponto de viragem de cor foi determinado pela coloração violeta reversível. De acordo com esses autores, a titulação visual dos redutores na faixa de acidez estudada, os indicadores e brometo de potássio levaram a um ponto de viragem prematuro ou muito retardado.

4. ANTOCIANINAS

4.1. Estrutura química das antocianinas

As antocianinas são fenólicos glicosilados que pertencem à classe dos compostos flavonóides, cuja unidade estrutural apresenta 15 carbonos. Diferem dessa classe por apresentarem-se coloridos. São encontrados freqüentemente em flores e frutos, responsáveis por sua coloração.

As antocianinas são os glicosídeos das antocianidinas, cujo núcleo básico é o cátion flavílium (Fig.1). As antocianidinas diferem entre si no número de grupos hidroxilas presentes na molécula e pelo grau de metilação desses grupos. Nas antocianinas, a natureza e o número de açúcares, bem como de ácidos ligados na posição 3 e 6 dos açúcares, constituem as diferenças individuais (GUEDES, 1993).



FONTE: MAZZA E BROUILLARD (1987)

FIGURA 1. Estrutura do núcleo básico do cátion flavilium

As antocianidinas que ocorrem como agliconas na natureza, das quais algumas são importantes fontes de corantes para alimentos, estão apresentados no Quadro 4 (TIMBERLAKE, 1980 e MAZZA & BROUILLARD, 1987). Seis delas são mais importantes na área de alimentos e ocorrem com maior frequência: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina e petunidina (FRANCIS, 1989, MARKAKIS, 1982)

A molécula de antocianina é esterificada em uma ou mais posições por açúcares (mono ou dissacarídeos) acilados ou não, conferindo estabilidade e solubilidade à glicona, ou antocianidina. As antocianinas são solúveis em água e a acidez influi na cor, por causar mudanças na estrutura (TAKAHASHI, 1987).

TABELA 4. Estruturas de antocianinas de ocorrência natural

Sal de Flavílium	Substituição (R)							Cor
	3	5	6	7	3'	4	5'	
Apigenina (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H	laranja
Luteolinidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H	laranja
Triacetidina (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	vermelha
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	laranja
Anrantidina (Ar)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	laranja
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	laranja-averm.
5-metilcianidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	laranja-averm.
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	vermelha
6-hidroxicianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	vermelha
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	vermelha azulada
Petunidina(Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	vermelha azulada
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OH	vermelha azulada
Pulchelicidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	vermelha azulada
Enopidina (Ep)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	vermelha azulada
Capensinidina (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	vermelha azulada
Hirsutidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	vermelha azulada

FONTE: Adaptado de (TIMBERLAKE, 1980 e MAZZA & BROUILLARD, 1987)

4.2. Determinação das antocianinas

As antocianinas são compostos relativamente complexos, e sua inerente instabilidade e grande diversidade, atribuída a um numeroso grupo de constituintes que podem atacar a aglicona, faz com que sua análise seja uma tarefa difícil e complexa. O desenvolvimento de métodos quantitativos e qualitativos tem sido um grande desafio para

os pesquisadores. O uso da CLAE tem aumentado substancialmente, devido à alta resolução para pequenas quantidades (microgramas) de antocianinas, sem necessidade de extensiva purificação.

As técnicas analíticas, desenvolvidas para estudos de antocianinas, poderiam assim desenvolver um padrão no controle de qualidade e programas de qualidade de segurança em adição ao desenvolvimento do produto. Elas produzem um meio pelo qual a estabilidade e a análise dos produtos de antocianinas pode ser monitorada, fornecendo vital informação quanto à natureza e reatividade desses pigmentos no complexo sistema de alimento (JACKMAN et al., 1987a; JACKMAN et al., 1987b).

Há muito tempo vem sendo desenvolvido métodos voltados para a caracterização e identificação das antocianinas (FULEKI & FRANCIS, 1968a.; FULEKI & FRANCIS, 1968b, PETTIPHER, 1986; BAKKER & TIMBERLAKE, 1997). Diversos métodos de análises desses compostos são reportados por LEE (1992). A estrutura das antocianinas pode ser elucidada com emprego de CLAE-espectrometria de massa e H-NMR espectroscopia (MACCARONE et al.,1998), com uso de CLAE em fase reversa e com detector de espectro de fotodiodo (VERSARI et al., 1997), cromatografia de fase-reversa com íon pareado (PEÑA et al., 1997). Todos os métodos, porém, envolvem medidas altamente importantes a partir da preparação da amostra e sua extração, para que os resultados sejam satisfatoriamente interpretados.

4.3. Antocianinas como corantes naturais

As antocianinas são compostos conhecidos por sua instabilidade quando sujeitos ao calor ou longo armazenamento. A pigmentação, ou coloração de alimentos, tem sido considerado como fator inicial e primário sobre a aceitabilidade do produto. Para usar frutos pigmentados com antocianinas, torna-se importante que seus produtos processados sejam feitos a partir de matéria prima de alta qualidade, isto é, que contenham uma relativa concentração do pigmento.

Na legislação brasileira não há limites para emprego de corantes naturais. Como os alimentos são na maioria uma mistura complexa, nem sempre é fácil extrair e identificar o corante (LARA, 1984).

Amostras de antocianinas de rabanetes vermelhos, extraídas com nitrogênio líquido do tecido epidérmico seco e parcialmente purificadas usando mini-coluna C₁₈, foram usadas como corantes naturais em cerejas “Maraschino” branqueadas e em calda. Os resultados mostraram um efeito protetor na estabilidade da cor, semelhante à aparência das cerejas controles, coloridas com o corante sintético (FD&C Red N°40), armazenadas por 6 meses a 25°C (GIUSTI & WROLSTAD, 1996).

Na produção de vinhos é comprovado que as antocianinas são fundamentalmente responsáveis pela diferença de cor dos mesmos. De acordo com MAZZA(1995), a quantidade e a composição de antocianinas presentes nas variedades de uvas vermelhas variam com a espécie, variedade, maturidade, condições sazonais, área de produção e quantidade de produção do fruto. Também as condições de fermentação e envelhecimento do vinho tais como temperatura, tempo, níveis de SO₂ e de álcool, afetam a concentração das antocianinas.

A prática de co-pigmentação tem sido indicada como alternativa para preservar a cor dos alimentos. Neste caso existe uma tendência para utilizar cultura de antocianinas a partir de bioprocessos, como seleção de células, parâmetros nutricionais e físicos para produção de antocianinas, culturas em bio-reatores em escala industrial.

Investigação com suspensão de células de *Vitis vinifera* L. cultivar Gamay Fréaux foi estudada por CORMIER et al. (1997). As células foram recuperadas por filtração da suspensão e extração com etanol-1%/ácido fórmico (85:15,v/v) a 5°C e evaporadas. Diferentes corantes comerciais baseados em antocianinas foram usados. Foi utilizado corante a partir de repolho vermelho, em líquido concentrado, e em pó. A termoestabilidade foi monitorada, usando uma alíquota de 3ml a pH 3,0, em cubeta plástica, selada com parafina a 30°C e estocada por 35 dias e outra a 95°C em banho-maria após 15, 30 e 60 minutos. A cor foi medida por meio dos parâmetros L a b. A degradação das antocianinas não foi possível ser monitorada pela absorvância a 535nm em espectrofotômetro devido a formação de compostos fenólicos oxidados marrons que são absorvidos no mesmo comprimento de onda.

Os resultados deste experimento mostraram que as antocianinas do repolho vermelho foram mais estáveis do que da cultura celular de uva. Os valores de croma indicaram que o extrato de cultura de célula foi semelhante ao corante de repolho vermelho

e superior aos outros corantes testados. A estabilidade da primeira foi atribuída à presença de antocianinas di-aciladas que, interagindo com o núcleo flavílium, estabeleciam uma copigmentação intramolecular. As antocianinas da cultura celular não toleraram a copigmentação intramolecular, entretanto os autores indicaram sua incorporação em alimentos e bebidas na faixa de pH de 3 a 3,5, usando processos onde o calor pode ser evitado como, por exemplo, filtração estéril.

Várias fontes de antocianinas para uso como corantes naturais são indicadas por TIMBERLAKE (1980), reforçando sobre o aumento da cor e mecanismos de estabilização para melhorar as características desejáveis desses compostos como aditivos.

4.4. Potencial efeito biológico das antocianinas e outros flavonóides

Não há informações precisas sobre a ingestão diária de flavonóides; somente poucas estimativas existem na literatura. Nos EUA é indicada uma ingestão diária de flavonóides de 1 a 1,1 g/dia, dependendo da estação. Há, entretanto, diferentes estimativas de acordo com o tipo de flavonóide. Além disso, o teor de polifenóis em alimentos é normalmente subestimado porque as análises omitem os polifenóis insolúveis, os quais podem ser quantitativamente mais importantes do que os flavonóides (HERTOG et al., 1993). A ingestão diária de antocianinas nos E.U.A, em 1971, foi estimada em 215 mg/dia no verão e 180 mg/dia durante o inverno (KUHNAU, 1979) a estimativa exata de ingestão de polifenólicos totais não está disponível na literatura.

O efeito de polifenóis sobre os lipídios tem sido extensivamente estudado. Polifenóis solúveis e taninos contribuem para o aumento da excreção de gordura fecal. Além disso, efeitos hipocolesterolêmicos têm sido reportados em dietas de animais contendo polifenóis, com aumento dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL) e reduzidas concentrações de lipoproteína de baixa densidade (colesterol-LDL). Esta ação hipocolesterolêmica dos polifenóis dietários é mediado por um aumento do transporte reverso do colesterol e por reduzida absorção do colesterol intestinal e aumento da excreção biliar. O exato mecanismo de ação, no entanto, não é conhecido (BRAVO, 1998).

Os flavonóides e outros compostos fenólicos de plantas são atualmente reportados extensivamente por seus múltiplos efeitos biológicos, tais como atividade antioxidante

(MAILLARD et al.,1996; LAPIDOT et al., 1998; TAMURA & YAMAGAMI,1997, OOMAH & MAZZA, 1996), ação antiinflamatória (MORONEY et al., 1988; LANDOLFI et al., 1984) inibição de placas aterosclerótica (CINTRA & MANCINI FILHO, 1998), atividade antimicrobiana (PRATT & HUDSON,1990) e atividade antitumor (FORMICA & REGELSON, 1995).

Alguns trabalhos são reportados por TLJBURG et al. (1997) demonstrando a importância da ingestão de flavonóides em pacientes com fatores de riscos coronários elevados, como alta taxa de colesterol LDL, hipertensão arterial , diabetes e fumantes. Os autores relatam que a ingestão de chá preto “Earl Grey” (10ml/kg), equivalente a três copos para um humano, inibiu *in vivo* a atividade aterosclerótica e preveniu a trombose coronária em cachorros. Apesar de maior atenção aos estudos relacionados com o mecanismo de ação desses compostos para inibir a formação de doenças vasculares. SCHRAMM & GERMAN (1998) apresentam um vasto estudo sobre os mecanismos intrínsecos relacionados ao poder inibidor ou minimizador dos efeitos supracitados.

A ingestão de alimentos que contém antocianinas tem sido recomendada por favorecer a saúde do homem nos diferentes aspectos. Poucos estudos são relatados com humanos, mas há novas evidências da possível presença de antocianinas no plasma humano (PAGANGA & RICE-EVANS,1997). Recentes estudos com antocianinas demonstraram que esses compostos são fontes em potencial para o metabolismo biológico e inibidores de radicais livres (PALE et al., 1997; SATUÉ-GRACIA et al.,1997; TSUDA et al., 1994)

O “Paradoxo francês” é caracterizado pelo fato de que habitantes de algumas regiões da França têm menor taxa de doenças cardiovascular (DCV) apesar do consumo de altos níveis de ácidos graxos saturados e colesterol, os quais são positivamente correlacionados com o risco de DCV. Este paradoxo tem sido atribuído ao uso de compostos não-alcoólicos, os fenólicos antioxidantes, muito abundantes no vinho tinto. Tais compostos têm efeito protetor e preventivo da oxidação de LDL e inibem a formação de placas aterosclerótica. A quantidade significativa de antocianina do vinho tinto favorecem sua poderosa atividade antioxidativa (LAPIDOT et al, 1998).

4. 5. Estabilidade das antocianinas

Estudos sobre cultivares de uvas reportados por LAMIKANRA (1989) indicaram que o aumento da concentração de delphinidina em alguns cultivares é considerado indesejável devido a seu teor relativamente alto de fenol, que a torna menos estável que outras antocianinas. As antocianinas aciladas são relativamente mais resistentes ao efeito do calor e luz quando comparadas às antocianinas não aciladas. No entanto, a acilação não parece ser o fator mais importante para estabilização das antocianinas. Como índice para seleção de uma cultivar, pode-se considerar o teor relativo de diglucosídeos e monoglucosídeos. Os diglucosídeos são considerados mais estáveis e menos suscetíveis ao escurecimento durante o processamento e estocagem. Também foi reportado que ao contrário de outros resultados, antocianinas não-aciladas podem ser aplicadas aos sucos e produtos de uvas esterilizados e/ou processados pelo calor.

O aumento do grau de acilação da molécula permite maior estabilidade das antocianinas. TEH & FRANCIS (1988) demonstraram que a substituição do grupo acil das antocianinas de *Zebrina pendula* e *Ipomoea tricolor* aumentaram a estabilidade no sistema modelo de bebida. Estudos com *Tradescantia pallida* (BAUBLIS et al. 1994; SHI, LIN & FRANCIS, 1992 ; SHI, DAUN & FRANCIS, 1993) têm-na indicada como excepcional fonte de corante natural porque suas antocianinas são altamente aciladas. A extraordinária estabilidade dessas antocianinas são atribuídas ao seu alto grau de acilação e substituição no anel B do cromóforo, e co-pigmentação intramolecular. Outros vegetais são reportados como potencial fonte de pigmentos naturais (PRICE & WROLSTAD, 1995).

Dependendo do processamento, a composição das antocianinas pode sofrer mudanças. GAO et al. (1997) produziram vinhos através de diferentes procedimentos. O tratamento 1, consistiu de fermentação convencional a 20°C, o tratamento 2 foi o mesmo mas a 30°C e tratamento 3 consistiu de corrida passiva livre do suco. Este último foi tratado no sistema HTST (90-95°C/1min), prensado, filtrado e reextraídos os pigmentos de antocianinas e outros fenólicos das uvas. A temperatura e o °Brix foram monitorados durante o processo de fermentação. Os autores concluíram que a temperatura de fermentação de 30°C favoreceu a formação de antocianinas poliméricas e escurecimento do vinho. Após a fermentação, o teor individual de antocianinas monoméricas diminuiu gradualmente, enquanto as antocianinas poliméricas aumentaram. A antocianina

monomérica foi a malvidina 3-glucosídeo. No engarrafamento, as antocianinas monoméricas residuais foram somente as frações da concentração inicial, e o teor total de antocianinas poliméricas alcançou níveis maiores. Os autores sugeriram investigar a natureza química das antocianinas poliméricas e o mecanismo de sua formação durante a vinificação.

4. 6. Fatores de degradação das antocianinas

As antocianinas são facilmente influenciadas pela própria estrutura química, pela temperatura, pH, oxigênio, luz, presença de íons metálicos como cobre e ferro, e outros.

Quando o pH de uma solução de antocianina está abaixo de 3,0, a coloração é mais intensamente vermelha. Em pH na faixa de 4,0 a 5,0, a coloração vermelha tende a desaparecer. Valores maiores de pH levam as antocianinas a apresentarem uma coloração azulada e após a estocagem ou aquecimento, tornam-se amareladas (MAZZA & BROUILLARD, 1987; STRINGHETA, 1991).

Em solução aquosa ácida podem existir quatro formas estruturais de antocianinas em equilíbrio: a base quinoidal A (azul), o cátion flavílium AH^+ (vermelho), a pseudobase ou carbinol B (incolor) e a chalcona C (incolor). A forma AH^+ é a mais importante e mais estável (FRANCIS, 1992). Desse modo, pensar na estabilização de cor das antocianinas passa pelo estudo de manutenção da forma AH^+ que é dependente do pH.

De acordo com STRINGHETA (1991) as variações de pH e a incidência de luz são os fatores que mais contribuem para a degradação da cor das antocianinas, e a associação luz-oxigênio favorece ainda mais essa degradação. Independente do pH, na ausência de luz e em atmosfera de nitrogênio, ocorre a degradação das antocianinas, mostrando existir um mecanismo que não necessita de luz. Nos experimentos de GUEDES (1993), o fator mais destrutivo para as antocianinas e antocianidinas foi a luz, em pH 2,0 comparativamente ao pH 1,5. A pelargonidina foi mais instável do que a delphinidina, mesmo na ausência de luz, calculados pelo tempo de meia-vida. JURD (1972) demonstrou que a quebra do pigmento é fortemente afetada pela ação fotoquímica.

O aumento da acidez tem um efeito protetor na estabilidade do pigmento. Os valores de temperatura e pH apresentam um grande efeito na taxa de perda dos pigmentos antociânicos (SILVA, 1996; GUEDES, 1993). Além disso, o furfural e o

hidroximetilfurfural, que são compostos típicos da degradação de açúcares, aumentam a taxa de perda do pigmento, e esta aceleração é diretamente dependente da temperatura e mais pronunciada em sucos de frutas (DEBICKI-POSPISIL et al., 1983).

Estudos com geléia de framboesa vermelha realizado por GARCÍA-VIGUERA et al. (1998), consideraram a temperatura de processamento e de estocagem como o principal fator responsável pela perda do teor e da cor das antocianinas. Foi concluído que a taxa de degradação das antocianinas aumenta à medida que aumenta a temperatura.

Há décadas, os estudiosos já investigam a participação do ácido ascórbico na degradação das antocianinas. SONDHEIMER & KERTESZ,(1953) verificaram que a adição de ácido ascórbico em sistemas modelos contendo pelargonidina, obtida a partir de suco de morango, produzia uma rápida descoloração, acompanhada de rápida oxidação do ácido ascórbico. Os autores, então, investigaram dois caminhos: no primeiro, um sistema anaeróbico contendo 50 mg de ácido ascórbico/100ml, a perda das antocianinas foi significativamente diferente daquela observada em solução aerada sem ácido ascórbico. Após estocagem a 30°C por 160 horas, a perda dos pigmentos foi de 6% e 4%, respectivamente, demonstrando que a deterioração das antocianinas foi atribuída ao ácido ascórbico.

No segundo sistema, os autores SONDHEIMER & KERTESZ,(1953) adicionaram 0,1% de tiouréia (agente complexante de metal usado para diminuir o íon cúprico catalizado e oxidação aeróbica do ácido ascórbico). A tiouréia na ausência do ácido ascórbico não demonstrou efeito na taxa de destruição das antocianinas, mas diminuiu a taxa de oxidação do ácido ascórbico e reduziu a taxa de descoloração do pigmento. Foi verificado que o espaço livre da embalagem tem um efeito indesejável sobre a estabilidade do pigmento. Também foi concluído que a perda de cor não é devido à direta oxidação do pigmento pelo ar, já que a pelargonidina 3-monoglucosídeo é nitidamente estável a pH 3,4 quando em contato com ar.

Relatos de sistemas modelos a pH 2,8, com antocianinas de “cranberry” e ácido ascórbico mostraram rápida degradação dos pigmentos. Durante um período de 72 horas, a taxa de oxidação aumentou em média 34% quando comparado à solução pura de ácido ascórbico sem antocianinas. (SHRIKHANDE e FRANCIS, 1974).

STARR & FRANCIS, 1968, estudaram a estabilidade de pigmento antociânico de “cranberry” submetido a três concentrações de ácido ascórbico e três níveis de oxigênio no “head-space”. Foi constatado que quanto maior o nível de oxigênio e de ácido ascórbico presentes nas amostras, maior a perda do pigmento.

Existe um consenso de que o ácido ascórbico tem um efeito extremamente importante na degradação das antocianinas, provocando a perda de cor e induzindo ao escurecimento. Esse escurecimento pode ser devido à formação de pigmentos poliméricos marrons, ou produtos de degradação dos pigmentos (POEI-LANGSTON e WROLSTAD, 1981; CONCEIÇÃO, 1997); foi sugerido uma reação de condensação entre o ácido ascórbico e as antocianinas, no qual os produtos dessa condensação são instáveis e degradam-se em compostos incolores (GARCÍA-VIGUERA et al., 1998; DARAVINGAS & CAIN, 1968; SANTINI JR. & HUYKE, 1956), como também a interação de ácido ascórbico e oxigênio mediada por H_2O_2 , onde o peróxido é conhecido por descolorir antocianinas (FRANCIS, 1989, SHRIKHANDE & FRANCIS, 1974).

Ao contrário desses relatos, TAYLOR (1989) não encontrou significativa correlação entre as concentrações de ácido ascórbico e acidez titulável ou qualquer outro parâmetro da qualidade do suco de “blackcurrant” (*Ribes nigrum*). A relação delphinidina/cianidina não foi significativamente correlacionada com algum parâmetro de cor do suco. Houve aumento na relação de absorvância (530 e 430nm) com visível escurecimento da cor dos sucos. FULEKI & FRANCIS (1968a) sugeriram que os produtos de degradação responsáveis pelo escurecimento tem sua absorção na região de 400-430nm.

Para avaliar a degradação das antocianinas em presença de ácido ascórbico, em sistemas modelos, foi verificado que independente da presença do ácido ascórbico, sucos frescos de uva apresentaram mudança na sua aparência, acompanhada de um aumento da intensidade de escurecimento e diminuição dos teores de antocianinas. Entretanto a adição de metabissulfito de potássio ao produto, preveniu a descoloração devido à formação do complexo antocianina- SO_2 (THAKUR & ARYA, 1989). Outras variáveis como processamento, cultivar e fatores ambientais podem influenciar na composição das antocianinas, bem como na sua estabilidade (BOYLES & WROSLTAD, 1993)

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEROLA: a fruta mais rica em vitamina C. (Anônimo). *A Lavoura*, v.88, p.22-26 jan/fev, 1986.
- AGHDASSI, E.; ROYALL, D. & ALLARD, P. Oxidative stress in smokers supplemented with vitamin C. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v. 69, n, 1, p.45-51, 1999.
- ALDRIGUE, M. L. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, utilizando a CLAE, para determinação de vitamina C em frutas e seus principais produtos.** Campinas:UNICAMP, 1998. 160p. Tese (Doutor) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1998.
- ALVES, G. P. **As principais frutícolas da Amazônia, seus potenciais vitamínicos, protéicos, sais minerais e valor econômico.** Piracicaba:ESALQ, 1991. 75p. (Apostila).
- ALVES, R.E. **Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) – Fisiologia da maturação e armazenamento refrigerado sob atmosfera ambiente e modificada.** Lavras: ESAL, 1993. 98 p. Dissertação (Mestrado) em Fisiologia Vegetal, 1993.
- ALVES, R. E. Características das frutas para exportação. **FRUPEX, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária- Sec. Desenv. Rural –SDR. Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita, EMBRAPA-SPI, Brasília, DF, p. 9-12, 1996.**
- ALVES, R. E. Cultura da acerola. In: DONADIO, L. C.; MARTINS, A. B. G.; VALENTE, J. P. **Fruticultura Tropical.** Jaboticabal:FUNEP, 1992. P. 15-37 p.
- AOAC. "Official Methods of Analysis ",11th ed.. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 1980.
- ARAÚJO, P. S. R. & MINAMI, K. **Acerola.** Campinas: Fundação Cargil, 1994, 81 p.
- ASENJO, C.F. Acerola. In: **Tropical and subtropical fruits**, by S. Nagy & P.E.Shaw eds., A.V.I. Publishing Westport, Conn. 120p., 1980.
- BAYLEY, H. L. & BAYLEY, E. Z. Hortus third, a concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada. Macmillan Publ. Co. Inc., New York, 1976. 1290p.
- BAKKER, J. & TIMBERLAKE, C. Isolation, identification, and characterization of new-color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 35-43, 1997.
- BAUBLIS, A. SPBOMER, A. & BERBER-JIMÉNEZ. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal of Food Science*, v. 59, n. 6,p. 1219-33, 1994.
- BENSIMON, C. Ojo al kiwi, llega la *Malpighia puniceifolia*. *Ceres Revista de la FAO*, v.23, n. 6, p. 9-10, 1991.
- BOBBIO, F. O.: BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 2.ed., 1992, 223p.
- BORONAT, M. C. T. & TAMAMES, E. L. El papel de los antioxidantes: 1. En la tecnología de los alimentos, 2. En la biodegradación del organismo. *Alimentaria*, v. 35, n. 283, p. 19-27, jun, 1997.

- BOYLES, M. J. & WROLSTAD, R. E. Anthocyanin composition of red raspberry juice: influences of cultivar, processing, and environmental factors. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 5, p.1135-41, 1993.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- CAMPELO, E. C. S. Variação de teores de vitamina C em polpas de acerola (*Malpighia glabra* L.) congeladas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1996 (Trabalho não publicado), 20p.
- CARVALHO, R. I. N. & MANICA, I. Características físicas, químicas e a respiração de acerolas (*Malpighia glabra* L.) em três estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 15, n. 2, p. 21-26, 1993.
- CASANUEVA, E.; REYES, L.; LUNA, A.; TEJERO, E.; PFEFFER, F. & MEZA, C. Vitamin C and cervico-vaginal infections in pregnant women. **Nutrition Research**, v. 18, n.6, p. 939-944, 1998.
- CAVALCANTE, M. L. Composição de carotenóides e valor de vitamina A na pitanga (*Eugenia uniflora*) e Acerola (*Malpighia glabra* L.). Rio de Janeiro: Inst. de Nutrição, 1991. 86p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1991.
- CHIARI, M.; NESI, M.; CARRERA, G. & RIGGHETTI, P. G. Determination of total vitamin C in fruits by capillary zone eletroforesis. **Journal of Chromatography**, 645(1):197-200, 1993.
- CID, C.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Modificaciones en el contenido de vitamina C en zumos naturales desde su elaboracion hasta su posible consumo. **Alimentaria**, 28(224)41-43, Espanha, jul-ago, 1991.
- CINTRA, R. M. G. C. & MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais presentes nos alimentos e a prevenção das doenças cardiovasculares. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 32, n. 1, p.72-79, 1998.
- CONCEIÇÃO, M. P. J. Cinética da degradação térmica de antocianinas em suco de acerola (*Malpighia glabra* L.). Viçosa, MG, 1997. 59p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. 1997.
- CONCHA, O.; CASTRO, G.; HERNANDES, L. & LOZANO, S. Monitoring of the vitamin C content of frozen green beans and padrón peppers by HPLC. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 76, n. 3, p. 477-480, 1998.
- CORMIER, F.; COUTURE, R. DO, C. B. & TONG, V. H. Properties of anthocyanins from grape cell culture. **Journal Food Science**, v.62, n.2, p. 246- 48, 1997.
- COUCEIRO, E. M. Curso de extensão sobre a cultura da acerola. Recife: UFRPE, 1985, 45p. (Apostila)
- COUCEIRO, E. M. Acerola (*Malpighia glabra* L.). Fabulosa fonte de vitamina C natural. Recife: PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1986. In: **Reunião Nordestina de Botânica**, 10, Natal, 1986.
- COULTATE, T. P. **Alimentos**. Química de seus componentes. Espanha, Ed. Acribia, 1984, 199p.
- COUSTARD, J.M. & SUDRAUD, G. Séparation des acides ascorbique et isoascorbique par chromatographie de paires d'ions sur phase inverse. **Journal chromatographic**, 219:338, 1981.

- DAILY, S.; ARMPFIELD, S. J.; HAGGETT, B.G.D.; DOWNS, M. E. A. Automated enzyme packed-bed system for the determination of vitamin C in foodstuffs. *Analyst*, 116(6):569-572, jun, 1991.
- DANCHEV, M.; TARAN, A.; GUBINA, A.; KIR'YANOVSKAYA, G. Effect of cryoconcentration on some properties of fruits juices. *B'lgarski Plodove Zelenchutsi i Konservi*, 10, 12-15, Bulgaria, 1980.
- DARAVINGAS, G. & CAIN, R. F. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. *Journal Food Science*, v. 33, n. 1, p.138-141, 1968.
- DARR, D. Vitamina C: proteção tópica da pele. *Vitae*, v. 4, n. 13, p.12-13, 1997 (Revista da Roche).
- DEBICKI-POSPISIL, J.; LOVRIC, T.; TRINAJSTIC, N. & SABLJIC, A. Anthocyanin degradation in the presence of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *Journal Food Science*, v.48, n.2, p. 411-16, 1983.
- DENNISSON, D. B.; BRAWLEY, T. G. & HUNTER, L. K. Rapid high- performance liquid chromatography determination of ascorbic acid and combined ascorbic acid-dehydroascorbic acid in beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 29, n. 5, p. 927-929, 1981.
- DERSE, P. H.; ELVEJHEM, C. A. Nutrient content of acerola, a rich source of vitamin C. *Journal of the American Medical Association*, v. 156, p. 1501-1509, 1954.
- EITENMILLER, R.R.; KUHL, R.F.; SMIT, C.J.B. Mineral and water-soluble vitamin content of rabbiteye blueberries. *Journal of Food Science*, 42(5):1311-1315, sep-oct., 1977.
- EWALDAH, E.H. Studies on commercially canned juices produced locally in Saudi Arabia. III. Physicochemical, organoleptic and microbiological assessment. *Food Chemistry*, 44(2) 103-111, 1992.
- FAN-YUNG, A. F. & RECHITS, M.A. Canned rowanberry juice. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii Pishchevaya Tekhnologiya*, 2,14-17, Odessa, 1979.
- FENNEMA, A.O.R. *Introducion a la ciência de los alimentos*. Reverté Ed., Barcelona, v.1, 1982.
- FIGUEIRÊDO, R. M. F. de. Caracterização físico-química do suco e pó de acerola (*Malpighia puniceifolia*, L.). Campinas, 1998. 184p. Tese (Doutora). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- FORMICA, J. V. & REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemistry Toxicology*, v. 33, p. 1061-1080, 1995.
- FRANCIS, F. J. A new group of food colorants. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge, v. 3, p. 27-30, 1992.
- FRANCIS, F. J. Food colorants anthocyanins. *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.28, n. 4, p. 273-314, 1989.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of Total Anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, v. 33, n. 1. p. 72-77, 1968a.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F. J. . Quantitative methods for anthocyanins. 1. Determination of Total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*, v. 33, n. 1. p. 78-83, 1968b.

- GAO, L.; GIRARD, B.; MAZZA, G. & REYNOLDS A. G. Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot Noir wines during different vinification processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2003-2006, 1997.
- GARCÍA-VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P.; ARTES, F.; ROMERO, F. ABELLÁN, P. & TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. **Journal Science Food Agricultural**, v. 78, p. 565-573, 1998.
- GIELFRICH, M-L. & BERNARD-GRIFFITHS, M-A. Observations sur le dosage de la vitamine C. **Science Agronomiques Rennes**, p. 53-58, 1975.
- GIUSTI, M. M. & WROLSTAD, R.E. Radish anthocyanin extract as a natural red colorant for Maraschino cherries. **Journal of Food Science**, v.61, n.4, p.688-694, 1996.
- GONZAGA NETO, L. & SOARES J. M. Acerola para exportação: aspectos técnicos da produção. **FRUPEX**, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Sec. Desenvolvimento Rural – SDR, EMBRAPA, Brasília, DF, 1994, 43p.
- GOWDA, H. S. & GURUMURTHY, Y. Analytical applications of Bromamine-T. **Journal of the Indian Chemical Society**,60(2):179-180, 1984.
- GUEDES, M. C. Influência do anel B na estabilidade das antocianidinas e antocianinas. Campinas: UNICAMP. 1993. 126p. Tese (Doutor). Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 1993.
- HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. & KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study. **Lancet**, v.342, p. 1007-1011, 1993.
- HOARE, M; JONES, S. & LINDSAY, J. Total vitamin C analysis of orange juice. **Food Australia**, v.45, n. 7, p. 341-45, 1993.
- IBRAF, **Acerola**. São Paulo, 1995. 61p. (Coleção Soluções Fruta a Fruta, 02)
- IRZYNIEC, Z.; KLIMEZAK, J.; MICHALOWSKI, Z. Effect of storage temperature on vitamin C and total anthocyanins of free-dried strawberry juices.II. **Bioavailability 93 - nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability**. ISSN 0933-5463, pp.398-403. Poland, 1993.
- ITOO, S.; AIBA, M. & ISHIHATA, K. Comparison of ascorbic acid content in acerola fruit from different production region depend on degree of maturity and it's stability by processing. **Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi**, v37, n. 9. P. 72-29, 1990.
- JACKMAN, R.L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A.; SPEERS, R. A. Anthocyanins as food colorants – A Review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, n.1, p. 201-247, 1987a
- JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y. & TUNG, M. A. A Review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, n.1, p. 279-308, 1987b
- JACOB, R. A. Vitamin C Nutritive and risk of atherosclerotic heart disease. Brief Critical Reviews. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11. p. 334- 343, 1998.
- JURD, L. Some advances in the chemistry of anthocianin-type plant pigments. In: **The Chemistry of Plant Pigments**, Cicester, C. O. (ed) p. 123-142, Academic Press, New York. 1972.+

- KIM, H-J. Determination of total vitamin C by Ion Exclusion Chromatography with electrochemical detection. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 681-86, 1989.
- KIRK, J. R. & TING, N. Fluorometric assay for total vitamin C using continuous flow analysis. **Journal of Food Science**, v. 40, n. 3, p. 463-466, 1975.
- KUHNAU, J. The Flavonoids. A class semi-essential food components: Their role in human nutrition. **World Review Nutrition Dietetic**, v. 24, p. 117-191, 1979.
- KWASNIEWSKA, I.; NADOLNA, I.; LISOWSKA, G. Changes in the color and vitamin C content of blackcurrant juice concentrate during manufacture and storage. **Przemysł Fermentacyjny i Owocowo Warzywny**, 31(7):19-22, Poland, 1987.
- LAMIKANRA, O. Anthocyanins of *Vitis rotundifolia* hybrid grapes. **Food Chemistry**, v. 33, p. 225-237, 1989.
- LANDOLFI, R.; MOWER, R. L. & STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. **Biochemistry Pharmacology**, v. 33, p. 1525-1530, 1984.
- LAPIDOT, T.; HAREL, S.; GRANT, R. & KANNER, J. Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p.4297-4302, 1998.
- LARA, W.H. Coord. **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios**. Padrões de identidade e qualidade. São Paulo:Câm. Bras. do Livro, 1 ed.,1984.
- LEE, H. S. Chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of chromatography**, v. 624, p. 221-234, 1992.
- LEE, H.S. & COATES, A. Liquid chromatographic determination of vitamin C in commercial Florida citrus juices. **Journal of Micronutrient Analysis**, 3(3):199-209, 1987.
- LENZ, M. K. & LUND, D.B. **Food Technology**, 34(2)51, 1980.
- LÓPEZ, A.P. Relation of maturity to some fruit characters of West Indian Cherry. **Journal Agricultural University of Puerto Rico**, 47(3):193, 1963.
- MACCARONE, E.; RAPISARDA, P.; FANELLA, F.; ARENA, E. & MONDELLO, L. Cyanidin - 3 - (6" - Malonyl) - β - glucoside. One the major anthocyanins in blood orange juice. **Italian Journal Food Science**, v. 10, n. 4, p. 367-372, 1998.
- MACRAE, R. HPLC determination of vitamins. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 7, n. 3, p. 247-260, 1990.
- MAILLARD, M. N.; SOUM, M. H. BOIVIN, P. & BERSET, C. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. **Lebensmittel- Wiss. U.- Technology**, v. 29, p. 238-244, 1996.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in food. In: **Anthocyanins as Food Colors**. (Pericles Markakis, ed.) London: Academic Press, 1982. p.163-161.
- MATSUURA, F.C.A.U. **Processamento e caracterização de suco integral e concentrado congelado de acerola**. Campinas, SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Tese de Mestrado. UNICAMP, 141p., 1994.
- MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 35, n.4, p.341-71, 1995.

- MAZZA, G. & BROUILLARD, R. Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 2, pp.422-26, 1987.
- MILLER, N. J. & RICE-EVANS, C. A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 331-37, 1997.
- MILLER, C. D.; WENKAM, N. S.; FITTING, K. O. Acerola nutritive value na home use. **Hawaii Agricultural Experiment Station** (Circular, 59), 1961, 18p.
- MIX, J. A.; D. M. D.; C. N. S. Do megadoses of vitamin C compromise folic acid's role in the metabolism of plasm homocysteine ? **Nutrition of Research**, v.19, n. 2, p. 161—65, 1999.
- MORONEY, M. A.; ALCANAZ, M. J.; FORDER, R. A.; CAREY F. & HOULT, J.R. S. Selectivity of neutroquine 5-lipoxigenase and cyclooxygenase inhibitor by na antiinflammatory flavonoid glycoside and related flavonoids. **Journal Pharm. Pharmacology**, v. 40, p. 787-792, 1988.
- MUSSER, R. S. Situação atual e perspectivas da acerola. In: SÃO JOSÉ, A R.; ALVES, R. E. **Cultura da caerola no Brasil: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, p.04-16, 1995.
- NAGY, S.; SAW, P.E.; VELDHIJS, M.K. **Citrus Science and Technology**. Westport, Con. AVI Publishing Co., vol. 1, 531p. 1977.
- NAGY, S. Vitamin C content of citrus fruit and their products: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n.1,p. 8-18, 1980.
- NAKASONE, N.Y.; YAMANE, G.M.; MIYASHITA, R.K. Selection, evaluation and naming of acerola (*Malpighia glabra L.*) cultivars. **Hawaii Agricultural Experiment Station. Circular**, 65:1-19. 1968.
- NEVES, L. C.; CABRAL, L.M.C; LEITE, S.G.F. & MATTA, V. M. Esterilização de suco de acerola por microfiltração. In: **XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Rio de Janeiro- RJ, 1998 (Trabalho completo). 4p.
- NEVES, M. F.; MACHADO FILHO, C. P. & LAZZARINI, S. G. Mudanças nos negócios agroalimentares. **Preços Agrícolas**, v.13, n.147,P. 7-12, jan,1999. USP/ESALQ-DESR E CEPEA
- NIPEROS-CARRIEDO, M.O.; BUSLIG, B.S.; SHAW,P.E. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic and some organic acids in fruits and vegetable by HPLC. **Journal Agriculture Foof Chemistry**. 40:1127-30, 1992.
- OLIVA, P. B. **Estudo do armazenamento da acerola in natura e estabilidade do néctar de acerola**. Campinas, SP, Faculdade de Engenharia de Ailimentos. Tese de Mestrado. UNICAMP,103p., 1995.
- OLIVA, P. B. & MENEZES, H. C. Estabilidade do ácido ascórbico (Vitamina C) na acerola e no néctar de acerola. In: **XV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas- SP, 1996
- OLIVA, P. B.; MENEZES, H.C. & FERREIRA,V. L. P. Efeito do processamento e armazenamento na qualidade sensorial do néctar de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 16, n. 3, p. 228-232, 1996.
- OLIVEIRA, M. N. S. Comportamento fisiológico de plantas jovens de acerola, carambola, pitanga, cupuaçu, graviola, pupunha e biribá em função da baixa disponibilidade de água no solo. Lavras: UFLA, 1996, 67 p. Dissertação (Mestrado), 1996.

- OLIVEIRA, R. P. S. Determinação de propriedades físicas e de transporte de suco de acerola. Campinas: UNICAMP. 1997. 148p. Dissertação (MS). Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1997.
- OOMAH, B. D. & MAZZA, G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.44, n. 7, p.1746-50, 1996.
- PACHLA, L. A. REYNOLDS, D. L. & KISSINGER, P. T. Review of ascorbic acid methodology: analytical methods for determining ascorbic acid in biological samples, food products, and pharmaceuticals. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, v. 68, n.1, p. 1-12, 1985.
- PAGANGA, G. & RICE-EVANS, C. A. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. **FEBS Lett.** V. 408, p. 78-82, 1997.
- PAIVA, J. R. & ALVES, R. E. Melhoramento genético da Acerola (*Malpighia emarginata DC*) no estado do Ceará. **Informativo SBF**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 6-8, 1998.
- PALE, E.; MOUHOSSINE, N.; VANHAELEN, M. & VANHAELEN-FASTRÉ, R. Anthocyanins from Bambara Groundnut (*Vigna subterranea*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.45, p. 3359-3361, 1997.
- PEÑA, A.; GARCIA, V.; ROMERO, M. L. & CAPELLA, S. Reversed-phase ion-pair chromatography of anthocyanins in red wines. **Journal of chromatographic Science**, v. 35, n. 4, p. 161-64, 1997.
- PETTIPHER, G. L. Na improved method for the extraction and quantitation of anthocyanins in cocoa beans and its use as an index of the degree of fermentation. **Journal Science Food Agricultural**, v. 37, n. 3, p. 289-296, 1986.
- POEI-LANGSTON, M. S., WROLSTAD, R. E. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavonol model system. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 1218-22, 1981.
- PRATT, D. E & HUDSON, B. J. F. Natural antioxidants not exploited commercially. In: **Food Antioxidants**, HUDSON, B.J. F., Ed., Elsevier Appl. Science.: London, 1990, cap.5.
- PRICE, C. L. & WROSLTAD, R. E. Anthocyanin pigments of royal okanogan huckleberry juice. **Journal of Food Science**, v.60, n. 2, p.369-74, 1995.
- ROE, J.H. Ascorbic acid. In: **The vitamins**, 2nd Ed., vol. VII, P. Georgy and W.N. Pearson, (Eds), Academic Press, New York, USA, p.27. 1967
- SAHBAZ, F. & SOMER, G. Determination of ascorbic acid in fruit and vegetables using normal polarography. **Food Chemistry**, v.44, n. 1, p. 141-46, 1992.
- SALUNKHE, D.K.; BOLIN, H.R.; REDDY, N.R. **Storage, Processing, and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables**. Boston, CRC Press, 2nd Ed., v. II, 1991.
- SAMSONOVA, A.M.; TIMOFEEVA, V.N. Vitamin composition of sea buckthorn juice as a function of manufacturing procedure. **Konservnaya i Ovoshchesushil'naya Promyshlennost'**. v.7, p.727-28. USSR, 1984.
- SANTINI JR., R. & HUYKE, A. S. Identification of the polibasic acids presents in guavas and acerola by paper chromatography. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 40, p. 86-90, 1956.
- SANTOS, C. N. P.; ARAÚJO, E. A. F. & RIBEIRO, C. C. Conservação de polpa de acerola (*Malpighia puniceifolia L.*) por tratamento térmico. In: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Rio de Janeiro- RJ, 1998 (Trabalho completo). 5p.

- SARKAR, M. & SARKAR, A.R. Spectrophotometric determination of vitamin C. *Analisis*, 22(3):155-57, 1994.
- SATUÉ-GRACIA, M. T. HEINONEN, M. & FRANKEL, E. N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin – liposome systems. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 3362-3367, 1997.
- SCHMIDT, K. ACE- Vitamins C and E and provitamin A in soft drinks. *Processing Fruit*, v. 10, n. 2, p. 326-29, 1995.
- SCHRAMM, D. D. & GERMAN, J. B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *Journal Nutrition Biochemistry*, v. 9, p. 560-66, 1998.
- SHI, Z.; LIN, M. & FRANCIS, F. J. Stability of anthocyanins from *Tradescantia pallida*. *Journal of Food Science*, v. 57, n. 3, p. 758-760, 770, 1992.
- SHI, Z.; DAUN, H. & FRANCIS, F. J. Major anthocyanin from *Tradescantia pallida*: identification by LSI – MS and chemical analysis. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 5, p. 1068-69, 1993.
- SHRIKHANDE, A. J. & FRANCIS, F. J. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. *Journal of Food Science*, v. 39, p. 904-906, 1974.
- SILVA, M. F. V. & MENEZES, H. C. Influência do tipo de cultivo sobre o teor de ácido ascórbico na acerola. *Simpósio – Avanços Tecnológicos na Indústria Tropical*. Fortaleza: Ceará, 1998, p.240.
- SILVA, M. F. V. & MENEZES, H. C. Estudio de cambios de color y ácido ascórbico en la pulpa de acerola en diferentes etapas de maduración. In: XII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Puerto Varas: Chile, 1997. Resúmenes de Temas Libres.
- SILVA, M. F. V.; KAWASAKI, A & MENEZES, H. C. Influence of content ascorbic acid on the color of West Indian Cherry pulp unpasteurized during frozen storage. In: Ier Congreso Nacional de Ciencia Y Tecnología de Alimentos. San Jose: Costa Rica, 1999.
- SILVA, M. F. V.; KAWASAKI, A & MENEZES, H. C. Efeitos de diferentes condições de extração de suco sobre a composição e a qualidade do suco de acerola pasteurizado e armazenado. II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. UNICAMP, Campinas: SP, 1997. resumo nº 454, p.149.
- SILVA, S. R. Extração e estabilidade de pigmentos antocianícos de frutos de maria-pretinha (*Solanum americanum*, Mill.). Viçosa: UFV. 1996. 76p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SILVA, T. H. S.; PIZZOL, S. J.; GONÇALVES, G.; MARTINEZ FILHO, J. G. A cultura da acerola no Brasil: aspectos gerais. *Preços Agrícolas. Mercados e Negócios Agropecuários*. v.13, n.144, p.44, out. 1988.
- SILVEIRA, M.I.O.C.B.N.; BATISTA, M.T.P.M.; BAETA, M.L.M.A.. Studies on industrially processed foods. II. Vitamin C and preservatives. *Anales de Bromatologia*. 33(1)111-126, España, 1981.
- SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. In: *Manual de Fruticultura*. Ed. Ceres: São Paulo, p. 477-485, 1971.
- SINHA, R.; PATTERSON, B. H.; M. A.; NORKUS, P. & ZIEGLER, R. G. Serum ascorbic acid stability over an extended period: relevance to epidemiological studies. *Nutrition Research*, v. 17, n. 9, p. 1409-1415, 1997.

- SONDHEIMER, E. & KERTESZ, Z. I. Participation of ascorbic acid in the destruction of anthocyanin in strawberry juice and model systems. **Food Research**, v. 18, n. 5, p. 475-79, 1953.
- SRIVASTAVA, A & SINGH, S. K. Determination of vitamin C in chemical , pharmaceutical and biological samples by spectrophotometric titrimetry with 0-Diacetoxiodobenzoate. Analysis of mixture of vitamin C with methionine and cysteine or glutathione. **Analyst**, v. 113, n. 2, p. 259-262, 1988.
- STARR, M. S. & FRANCIS, F. J. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. **Food Technology**, v. 22, n. 10, p. 91-93, 1968.
- STRINGHETA, P. C. Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). Campinas: UNICAMP. 1991. 138p. Tese (Doutor). Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1991.
- TAKAHASHI, M.Y. **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios**. P Padrões de identidade e qualidade. São Paulo: Câm. Bras. do Livro, 2 ed. 1987.
- TAMURA, H. & YAMAGAMI, A. Antioxidative activity of mono-acylated anthocyanins isolated from muscat baily A grape. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.45, p. 3359-3361, 1997.
- TAPADIA, S. B.; ARIA, A. B. & DEVI, P. R. Vitamin C contents of processed vegetables. **Journal Food Science and Technology**, v. 32, n. 6, p. 513-515, 1995.
- TAYLOR, J. Colour stability of blackcurrant (*Ribes nigrum*) juice. **Journal Science Food Agricultural**, v. 49, n. 4, p. 487-491, 1989.
- TEH, L.S. & FRANCIS, F. J. Stability of anthocyanins from *Zebrina pendula* and *Ipomoea tricolor* in a model beverage. **Journal Food Science**, v. 53, p. 1580, 1988.
- THAKUR, B. R. & ARYA, S. S. Studies on stability of blue grape anthocyanins. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 321-26, 1989.
- TILBURG, L. B. M.; MATTERN, T.; FOLTS, J. D. WEISGERBER, U. M. & KATAN, M. B. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 8, p. 771-785, 1997.
- TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins – occurrence, extraction and chemistry. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 69-80, 1980.
- TEH, L.S. & FRANCIS, F. J. Stability of anthocyanins from *Zebrina pendula* and *Ipomoea tricolor* in a model beverage. **Journal Food Science**, v. 53, p. 1580, 1988.
- THAKUR, B. R. & ARYA, S. S. Studies on stability of blue grape anthocyanins. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 321-26, 1989.
- TILBURG, L. B. M.; MATTERN, T.; FOLTS, J. D. WEISGERBER, U. M. & KATAN, M. B. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 8, p. 771-785, 1997.
- TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins – occurrence, extraction and chemistry. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 69-80, 1980.
- TSUDA, T.; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S. W.; KAWAKISHI, S. & OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.42, n. 11, p.2407-2410, 1994
- UCHIYAMA, S.; KOBAYASHI, y. & SUZUKY, S. Seletive biolcolometry of vitamin C using dithiothreitol, N-Ethymaleimide, and ascorbate oxidase. **Analitycal Chemistry**, 63(20):2259-62, oct, 1991.

- UTZ, W.J.; O'CONNELL, P. L.; STOREY, R.; BOWER, N.W. Ascorbic acid content of some tropical fruit products determined by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 30:394-96, 1982.
- VERSARI, A.; BARBANTI, D.; BIESENBRUCH, S. & FARNELL, P. J. Analysis of anthocyanins in red fruits by use of HPLC/Spectral array detection. **Italian Journal Food Science**, v. 9, n. 2, p. 141-48, 1997.
- VINSON, J. A.; HU, S-J.; JUNG, S. & STANSKI, A. M. A citrus extract plus ascorbic acid decreases lipids, lipid peroxides, lipoprotein oxidative susceptibility, and atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1453-1459, 1998.
- WEBER, P.; BENDICH, A. & SCHALCH, W. Vitamin C and human health – A review of recent data relevant to human requirements. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 66, n. 1, p. 19-30, 1995.
- WIMALASIRI, P.; WILLS, R. B. H. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 256, n. 2, p. 368-371, 1983.
- ZAPATA, S. & DUFOUR, J-P. Ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determinations by reverse phase ion interaction HPLC. **Journal of food science**, 57(2):506-11, mar-apr, 1992.

CAPÍTULO II

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NA POLPA DE ACEROLA

1. INTRODUÇÃO

A acerola ou cereja-das-Antilhas (*Malpighia puniceifolia* L.) é uma fruta que recebe diferentes nomes de acordo com a localização em estudo. Ao que tudo indica parece ser originária do Caribe, Nordeste da América do Sul e América do Norte (OLIVA,1995).

De acordo com a variedade, a acerola pode variar quanto a cor podendo se apresentar do amarelo avermelhado ao vermelho púrpura, e em teores de vitamina C.

O teor de vitamina C da acerola está relacionado com a localização geográfica, estágio de maturação do fruto, época de colheita e tratos culturais (ASENJO,1980). As perdas de vitamina C são mais acentuadas em condições extremas de temperaturas e sofre grande influência do fator tempo (SILVEIRA et al., 1981).

Numerosos métodos têm sido desenvolvidos para determinar o ácido ascórbico(AA) e o ácido dehidroascórbico (DAA). Entre eles incluem-se a determinação do DAA por condensação com 2,6-dinitrofenilhidrazina e determinação do ácido ascórbico total (TAA) por oxidação do AA e DAA e subsequente formação de osazonas; o método fluorimétrico usando o-fenilenediamina, para determinar-se o DAA (COULTATE, 1984) e o mesmo método modificado, com fluxo contínuo para determinar o ácido dehidroascórbico e ácido ascórbico total (KIRK & TINGH, 1975).

A titulação com N-bromosuccinimida é considerado um bom método para avaliar a concentração do TAA além de ser usado para extratos vegetais muito corados (COULTATE, 1984); o método de titulação do ácido ascórbico com 2,6-diclorofenol indofenol (DCFIF) (SRIVASTAVA & SING, 1988; SALUNKE et al.,1991; NAGY et al., 1977; SAHBAZ & SOMER, 1992) tem sido muito utilizado para vegetais e diferentes produtos vegetais, com resultados satisfatórios. Alguns autores, entretanto, preferem a

técnica de titulação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (KIRK & TING, 1975; ROCHA, 1988). O ácido metafosfórico tem sido usado no método de titulação do ácido ascórbico porque ele tem a habilidade de precipitar as proteínas e inativar enzimas do grupo oxidase (ROE, 1967).

O método por titulação com o-diacetoxiodobenzoato (o-DIB) baseado na oxidação da vitamina C usando *leuco*-2,6-diclorofenol indofenol com iodeto de potássio como indicador, mostrou ser o melhor reagente analítico da série do iodo, porque ele possui as qualidades do o-iodobenzoato (SRIVASTAVA & SING, 1988). Titulação do ácido ascórbico em tabletes de vitamina C com Bromamina -T (BAT) (GOWDA & GURUMURTHY, 1984) também foi utilizada com bons resultados.

Para determinação de vitamina C em alimentos e outros produtos, vários métodos são descritos na literatura como, procedimentos espectrométricos (SARKAR & SARKAR, 1994; TONO & FUJITA, 1981; TONO & FUJITA, 1982), eletroquímicos, enzimático, fluorométrico e por CLAE (ALDRIGUE, 1998; ARAGÃO et al., 1996; DENNISON et al., 1981; KIM, 1989; PACHLA et al., 1985).

Análise polarográfica baseado na corrente anódica é um método específico para ácido ascórbico; contudo, a presença de materiais interferentes como cloretos ou tióis, e cátions metálicos, especialmente o Fe^{+3} e Cu^{+2} , limita sua sensibilidade. Quando as amostras são tratadas previamente o método pode ser específico, rápido e aplicável para soluções altamente coloridas (SAHBAZ & SOMER, 1992).

A técnica de cromatografia líquida (CLAE), permite realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Apesar de algumas limitações da CLAE o seu emprego tem sido muito difundido devido suas inúmeras vantagens, conforme descreve COLLINS et al. (1995).

O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) oferece um potencial meio de separação rápida e é específico para vitamina C (PACHLA et al., 1985; LEE & COATES, 1987; HOARE et al., 1993).

O método de cromatografia por exclusão de íon com detecção eletroquímica (IEC-EC) desenvolvido por KIM (1989) para determinar vitamina C, foi considerado vantajoso quando comparado a outros métodos indicados pela AOAC (1984). O método apresentou rapidez, alta sensibilidade, especificidade aplicável a vários alimentos e bebidas além de não requerer pré-coluna ou derivação de pós-coluna.

NISPEROS-CARRIEDO et al. (1992), fizeram separação de ácido dehidroascórbico e ácido ascórbico usando CLAE, para detecção de ácidos orgânicos pelo acoplamento de colunas de ácido orgânico e fase reversa. Somente a coluna de fase reversa mostrou uma separação veloz, mas o ácido dehidroascórbico e ácido oxálico co-eluíram em 3 minutos. A separação com a coluna de ácido orgânico foi longa, e o ácido ascórbico co-eluiu com o ácido málico em 13 minutos. Enquanto isso, a eluição padrão das colunas conectadas em série diferiu daquelas individuais. As análises revelaram bons resultados.

Neste trabalho, foram utilizados quatro métodos analíticos (Contreras-Gúzman, Tilmans, Iodato e CLAE) para determinação do ácido ascórbico visando compará-los e daí selecionar aquele que apresentasse resultado comparável ao método por CLAE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

As amostras de frutos de acerola foram obtidas de produtor da região de Campinas-SP. Os frutos foram colhidos aleatoriamente, de diferentes árvores, de dois tipos de cultivares, sem classificação taxonômica os quais foram denominados de lote A e lote B com 5 quilos cada. A cultivar A apresentava coloração vermelha mais intensa que a cultivar B. Os frutos foram selecionados manualmente, separando-se os maduros dos verdes. Esta etapa teve o objetivo de selecionar para o experimento, especialmente, os frutos no estágio de maturação “de vez”. Os lotes foram armazenados, em pacotes de 1kg, sob congelamento a -18°C até o momento das análises.

2.1.2. Dimensões e peso médio dos frutos

Foram determinadas as dimensões tomando-se as medidas do diâmetro transversal (mm) e a altura dos frutos usando um paquímetro manual. O peso foi determinado através

de balança digital semi-analítica. Para estes procedimentos foram usadas 100 unidades dos frutos dos quais fez-se a média.

2.2. Preparo da polpa

De cada lote (A e B) foi retirado 3 amostras (1 kg cada) seguido de descongelamento. Estas foram homogeneizadas em liquidificador separadamente e preparadas suas respectivas polpas: A₁, A₂, A₃ e B₁, B₂, B₃. A seguir, cada amostra foi filtrada em papel de filtro Whatman n° 1, sob vácuo para obter a polpa filtrada, com rendimento aproximado de 50%. A polpa filtrada foi dividida em alíquotas de 100ml, em vidro transparente as quais foram utilizadas como analitos. As análises foram realizadas de imediato à extração da polpa. As alíquotas que seriam utilizadas para os métodos comparativos foram estocadas sob congelamento a -18°C até o momento das análises, para evitar quaisquer perdas do ácido ascórbico.

2.3. Métodos

2.3.1. Métodos analíticos

2.3.1.1. Ácido ascórbico

Para determinação do teor de ácido ascórbico foram usados os seguintes métodos analíticos: a) método espectrofotométrico, descrito por CONTRERAS-GÚZMAN et al. (1984); b) método volumétrico do Iodato de Potássio, que se fundamenta na redução do iodo liberado por uma solução de ácido ascórbico (IAL,1985); c) método de Tilmans, que se baseia no uso do 2,6-diclorofenol indofenol-sódio (DCFI) baseado na redução do DCFI por uma solução de ácido ascórbico (AOAC, 1984), modificado por BENASSI & ANTUNES (1988) e BENASSI (1990) com substituição do ácido metafosfórico por ácido oxálico como solvente extrator; d) método de CLAE, segundo condições descritas abaixo.

Método CLAE. Este sistema consistiu de cromatógrafo Líquido Waters, modelo 480C/1, equipada com detector UV-visível e módulo integrador de dados Waters Associates, Milford U.S.A. A análise foi efetuada usando coluna analítica de fase reversa RP-18 Bondapack (250 x 4,6 mm de diâmetro), empacotada com partículas de 5µm; fluxo de 2,0 ml/min, com fase móvel constituída por metanol-água (40:60 v/v) previamente

filtrada e degaseificada. A eluição foi isocrática e a detecção, a 254 nm; injeções com volume de 25µl, pré-coluna de saturação de sílica.

Preparação da amostra para CLAE. Duplicata de 10 mL de amostra de polpa foram misturadas com ácido oxálico a 1%, q.s.p 100mL, mantido sob agitação à 8°C por 10 min e filtrada em papel de filtro Whatman nº 1. As amostras foram filtradas em cartuchos Sep-Pak com recheio C-18, previamente acondicionados com a fase móvel. A diluição das amostras foi realizada com a fase móvel. Os primeiros 2mL do filtrado foi passado pelo cartucho, pré-condicionado e descartado, recolhendo-se 5mL para ser usado na injeção do cromatógrafo. O padrão foi preparado, tomando 30mg do ácido ascórbico e diluído para 100mL de ácido oxálico, sem necessitar de filtração em papel de filtro. As demais etapas seguiram nas mesmas condições para as amostras de polpas.

O estudo de recuperação do ácido L-ascórbico foi realizado com a determinação do teor de ácido ascórbico original nas polpas preparadas, de acordo com o método escolhido para a investigação e comparados aos valores obtidos nas polpas adicionado de 30mg do padrão de ácido ascórbico em cada amostra. No método de CLAE, comparou-se as áreas de pico do padrão de ácido ascórbico com as áreas do pico das amostras submetidas à este método. As análises de recuperação do ácido L-ascórbico foram desenvolvidas em triplicatas. A porcentagem de recuperação foi calculado do seguinte modo: $\% R = (A_2/A_1) \times 100$, sendo A_1 a área do pico do padrão de ácido L-ascórbico não tratado e A_2 , a área do pico tratado com o padrão.

2.3.1.2. pH

Determinou-se o pH em potenciômetro digital marca Micronal, modelo B-374 calibrado com tampões de pH 7,0 e 4,0, aferido previamente, segundo procedimento descrito pela AOAC (1990).

2.3.1.3. °Brix

Determinou-se por leitura direta em refratômetro marca CARL ZEISS (JENA), modelo 32-G 110d, com correção de temperatura.

2.3.2. Métodos físicos

2.3.2.1. Cor

Foi descrita por comparação visual de acordo com a intensidade de pigmentação, sem uso de equipamentos.

2.4. Análise estatística

A análise estatística dos dados experimentais dos diferentes métodos para determinação do teor de ácido ascórbico foi feita com três repetições, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado. O estudo comparativo entre as médias feito pelo Teste F, e Tukey ao nível de 5% de probabilidade (GOMES, 1990; FISCHER, 1958; THE SAS SYSTEM, 1992). As análises de variância foram feitas usando o software MINTAB (1994).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas características dos frutos e polpas de acerola estão apresentados na Tabela 1. De acordo com os dados obtidos, as amostras de acerolas A e B mostraram pequenas diferenças em tamanhos, porém o peso e a cor apresentaram diferenças significativas. Quanto ao pH e o °Brix apresentaram valores muito próximos para as duas polpas. Com relação à cor a polpa B apresentou uma coloração mais escura devido maior concentração de pigmentos provenientes da casca do fruto. Verificou-se que não houve relação entre valores de °Brix e o peso dos frutos. Semelhantes resultados foram encontrados por NAKASONE et al., (1968) com diferentes cultivares de acerola em que as frutas das variedades doces estudadas apresentaram peso médio de 5,2 a 7,2 g.

TABELA 1. Características dos frutos obtidas a partir de 100 unidades e das polpas de acerola

FRUTOS				POLPAS		
Acerola	Dimensões médias* (mm)		Peso médio (g)	Cor	pH	°Brix
	Diâmetro transversal	altura				
A	20,16 (1,94)	15,07 (0,22)	5,11 (1,62)	Vermelho púrpura	3,38 (0,01)	7,0 (0,0)
B	22,67 (1,29)	17,42 (0,23)	8,32 (1,57)	Vermelho alaranjado	3,36 (0,02)	6,5 (0,0)

*O fruto é arredondado no eixo horizontal e levemente achatado nas bases; resultados entre parênteses correspondem aos respectivos desvios padrões

TABELA 2. Valores médios de ácido L-ascórbico (mg/100g) nas polpas de acerola obtidos de frutos de acerola A e frutos de acerola B, para os diferentes métodos analíticos.

Polpa de acerola	Contreras-Gúzman	Iodato	Tilmans	CLAE
A1	774,24 (8,27)	784,96 (6,87)	756,85 (4,16)	757,09 (3,42)
A2	759,70 (9,63)	775,39 (13,45)	747,17 (11,62)	745,06 (10,78)
A3	735,13 (10,15)	764,06 (17,21)	746,77 (7,64)	752,70 (5,83)
Média A	756,36 (18,95)^b	774,81 (14,60)^a	750,27 (8,78)^b	751,61 (8,26)^b
B1	850,52 (20,47)	897,44 (4,18)	868,36 (5,92)	865,98 (4,60)
B2	863,20 (4,62)	861,76 (6,55)	853,01 (6,09)	856,19 (5,90)
B3	871,54 (18,60)	880,89 (1,93)	856,47 (4,76)	857,19 (3,55)
Media B	861,75 (16,75)^b	880,03 (15,97)^a	859,28 (8,05)^b	859,78 (6,23)^b

Resultados médios de 3 repetições analíticas com suas respectivas estimativas de desvios padrões. Letras minúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

De acordo com os resultados descritos na Tabela 2, a polpa de acerola A mostrou menor concentração de ácido L-ascórbico que a polpa B. Para estudo detalhado desses valores, foi realizada análise estatística a fim de comparar as médias entre os resultados obtidos para cada método analítico usado na determinação do ácido L-ascórbico nas polpas em estudo.

O método de análise por CLAE, apesar de algumas limitações, é considerado um dos mais eficientes, preciso e exato (COLLINS et al., 1995). Por estas características ele foi usado como controle nas comparações entre os métodos.

Neste experimento foram comparados os quatro métodos de determinação de vitamina C para as polpas A e B de acerola (Anexos 1 e 3, Cap.II) pela ANOVA. Os resultados indicaram que existe pelo menos um método que difere significativamente dos demais a 2%. Pela análise gráfica dos intervalos de confiança (Anexos 2 e 4, Cap.II) há indícios de que o método de Iodato se diferencia significativamente dos demais métodos testados tanto para a polpa A quanto para a polpa B.

Os resultados apresentados na Tabela 2 confirmaram que em ambas as polpas de acerola (A e B) o método de Iodato foi significativamente diferente dos métodos de Contreras-Gúzman, Tilmans e CLAE.

Semelhantes resultados foram encontrados em estudos comparativos entre o método por titulação com 2-6, diclorofenol indofenol e CLAE na determinação do teor de vitamina C em diferentes sucos (LEE & COATES, 1987 e HOARE et al., 1993). Os valores obtidos por esses autores mostraram que os dois métodos não apresentaram diferenças significativas (0,05).

O método de titulação com 2-6, diclorofenol indofenol (método de Tilmans) tem sido alvo de muitas polêmicas, uma vez que o DCFI pode reagir com substâncias interferentes, ou quando se trata de amostras coloridas, torna-se difícil a observação do ponto de viragem na titulação (CONTRERAS-GÚZMAN et al., 1984; LEE & COATES, 1987; HOARE et al., 1993).

Os sucos cítricos contêm naturalmente metais como cobre e ferro que, apesar de pequena quantidade (menos que 0,01% e menos que 1% das cinzas, respectivamente), podem provocar a auto-oxidação da vitamina C em solução (LEE & COATES, 1987), e tal ocorrência poderá estar presente tanto na titulação com DCFI quanto em outros métodos, não somente do DCFI. Para BADOLATO et al. (1996), ao comparar os métodos titulométricos (Tilmans e Iodato) e o espectrofotométrico (Contreras-Gúzman), concluíram que não há vantagens expressivas quanto à exatidão e seleção do método a ser escolhido.

BADOLATO et al. (1996) comparando os métodos de Tilmans, Contreras-Gúzman e Iodato para determinar o ácido ascórbico, em diferentes amostras não encontraram diferenças significativas entre os métodos. De acordo com SRIVASTAVA & SINGH (1988), os resultados dos títulos variam de um conjunto de titulações para outra, de maneira não reproduzível, quando tituladas com iodo ou qualquer agente oxidante, que seja usado na presença de iodeto de potássio ou brometo de potássio.

Os teores de ácido L-ascórbico das polpas de acerola A e B, analisados pelos diferentes métodos estudados, apresentaram diferenças significativas entre os mesmos ao nível de 5% de probabilidade. Esse resultado pode ser decorrente das peculiaridades de cada cultivar. Ao testar os métodos par a par (Anexo 5, Cap.II), foi mostrado uma diferença estatística nas interações Iodato x CLAE e Iodato x Tilmans na polpa A de acerola avaliada pelo valor p (Teste F). Supõem-se que a diferença encontrada pode estar relacionada com a concentração de pigmentos coloridos, uma vez que os frutos da acerola A apresentavam coloração mais intensa que os frutos da acerola B, conforme descrição na Tabela 1. Tal pigmentação pareceu influenciar principalmente o método de Iodato.

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, foi escolhido o método de Tilmans por ser rápido, com um mínimo de etapas, além de econômico, comparado ao de Contreras-Gúzman, cujo método é muito longo, embora a titulação com a amostra de acerola tenha merecido muita atenção no ponto de viragem para reduzir os erros experimentais. O método de Iodato seria o menos indicado para a determinação de ácido ascórbico na polpa de acerola.

TABELA 3. Recuperação média do ácido L-ascórbico (%) adicionado* à polpa de acerola de acordo com o método analítico

Polpa de acerola	Contreras-Gúzman (média)	Iodato (média)	Tilmans (média)	CLAE (média)
A	84,76 (3,72)	89,31 (3,28)	94,65 (2,03)	98,42 (1,82)
B	90,49 (3,84)	92,32 (1,31)	99,46 (1,76)	99,62 (1,51)

Resultado médio de 3 repetições analíticas.

* 30µg de ácido L-ascórbico

De acordo com a Tabela 3, os métodos de Tilmans e CLAE apresentaram melhores valores de recuperação do ácido L-ascórbico entre os métodos estudados. Os resultados indicam que o primeiro pode ser usado com segurança para polpa de acerola e garante elevada sensibilidade. O método de Contreras- Gúzman, todavia, foi o que apresentou menor poder de recuperação para a polpa de acerola. Resultado semelhante foi encontrado por BADOLATO et al. (1996) no estudo com diferentes sucos de frutas naturais.

4. CONCLUSÕES

Ao comparar estatisticamente, em conjunto, os métodos de Contreras-Gúzman, Iodato, Tilmans e CLAE para a determinação do ácido ascórbico na polpa de acerola, pelo Teste F ($p \leq 0,05$), os resultados indicaram que houve diferença entre os mesmos. O Teste de Tukey revelou que o método de Iodato foi significativamente diferente dos demais métodos estudados. Os métodos de Tilmans, Contreras-Gúzman e CLAE não apresentaram diferenças significativas.

Ao avaliar os diferentes métodos estudados, em duplas, o valor de p ($\alpha=5\%$) apresentou diferença significativa na comparação Iodato x CLAE e Iodato x Tilmans para a polpa A de acerola. Tal resultado pode ter sido influenciado pela maior concentração de pigmentos vermelhos, as antocianinas, presentes na amostra da polpa. Na polpa B não foi

verificado nenhuma diferença significativa entre os métodos testados na determinação do ácido ascórbico.

Os teores de ácido ascórbico apresentaram diferenças significativas entre as polpas de acerola A e acerola B atribuído à própria natureza de cada cultivar.

Comparando-se em porcentagem a recuperação do ácido L-ascórbico adicionada às amostras de polpa de acerola, foi mostrado que o método Tilmans foi o que melhor se aproximou dos dados obtidos para CLAE, portanto pode-se considerá-lo eficiente na determinação de ácido ascórbico na polpa de acerola, embora tivessem ocorrido algumas dificuldades para visualizar o ponto final da titulação. O método de Contreras-Gúzman mostrou-se menos eficiente, entre os quatro métodos testados, na recuperação do ácido ascórbico.

Uma vez que os métodos testados mostraram pequenas diferenças e foram considerados semelhantes pela comparação entre as médias, pelo Teste de F ($p \leq 0,05$), foi escolhido o método de Tilmans para a continuidade das investigações desta tese, por considerá-lo, sensível, além de rápido e econômico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIGUE, M. L. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, utilizando a CLAE, para determinação de vitamina C em frutas e seus principais produtos.** Campinas:UNICAMP, 1998. 160p. Tese (Doutor) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1998.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Association of Official Analytical Chemists.** Washington, D. C., 1984. p. 627-628 e 844-45.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Association of Official Analytical Chemists.** Washington, D. C., 1990, p. 220-230.

- ARAGÃO, C.; IKEGAKI, M.; SATO, H.; OLIVEIRA, I. & PARK, Y. K. Determination of ascorbic acid concentration in acerola and camu-camu fruit juices by ascorbate oxidase method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas 16(2):175-76, jul-set., 1996.
- ASENJO, C. F. Acerola. In: **Tropical and subtropical fruits**, by S. Nagy & P. E. Sahaw eds., A. V. I. Publishing Westport, Connecticut, 120p., 1980.
- BADOLATO, M. I. C. B.; SABINO, M.; LAMARDO, L. C. A.; ANTUNES, J. L. F. Estudo comparativo de métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas naturais e industrializados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 16(3):206-210, out-dez, 1996.
- BENASSI, M. T. & ANTUNES, A. J. A comparasion of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia eTecnologia**, Campinas, v. 31, n.4, p.507 – 513, 1988.
- BENASSI, M. T. Análise dos efeitos de diferentes parâmetros na estabilidade de vitamina C em vegetais processados. Campinas: UNICAMP, Dissertação (Mestrado), 1990. 166p. Faculdade de Engenharia de Alimentos- FEA/UNICAMP, 1990.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Campinas: Ed. UNICAMP, 1995. Cap. IX, p. 183-238.
- CONTRERAS-GÚZMAN, E.; STRONG III, F. C. & GUERNELLI, O. Determinação de ácido ascórbico (vitamina C), por redução de íons cúpricos. **Química Nova**, São Paulo 7(2):60-64, 1984.
- COULTATE, T. P. **Alimentos**. Química de seus componentes. Espanha, Ed. Acribia, 1984, 199p.
- DENNISON, M. J.; BROWLEY, T. G.; HUNTER, G. L. K. **Journal Agricultural Food Chemist.** 29: 927-29, 1981.
- FISCHER, R. A. **Statistical Methods for Research Workers**. Londres, Oliver & Boyd, 1958 – 356p. (11).
- GOMES, P. F. **Curso de Estatística Experimental**. 13 ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 467p.
- GOWDA, H. S. & GURUMURTHY, Y. Analytical applications of Bromamine-T. **Journal of the Indian Chemical Society**,60(2):179-180, 1984.
- HOARE, M; JONES, S. & LINDSAY, J. Total vitamin C analysis of orange juice. **Food Australia**, v.45, n. 7, p. 341-45, 1993.

- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3ª ed. São Paulo. 1985, v.1. p.392-95.
- KIM, H-J. Determination of total vitamin C by Ion Exclusion Chromatography with electrochemical detection. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 681-86, 1989.
- KIRK, J. R. & TING, N. Fluorometric assay for total vitamin C using continuous flow analysis. **Journal of Food Science**, v. 40, n. 3, p. 463-466, 1975.
- LEE, H.S. & COATES, A. Liquid chromatographic determination of vitamin C in commercial Florida citrus juices. **Journal of Micronutrient Analysis**, 3(3):199-209, 1987.
- MINITAB, Realease 10.1. Software Estatístico, Copyright (c), Minitab Inc. PA, USA. 1994
- NAGY, S.; SAW, P.E.; VELDHUIS, M.K. **Citrus Science and Technology.** Westport, Con. AVI Publishing Co., vol. 1, 531p. 1977.
- NAKASONE, N.Y.; YAMANE, G.M.; MIYASHITA, R.K. Selection, evaluation and naming of acerola (*Malpighia glabra L.*) cultivars. **Hawaii Agricultural Experiment Station. Circular**, 65:1-19. 1968.
- NIPEROS-CARRIEDO, M.O.; BUSLIG, B.S.; SHAW,P.E. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic and some organic acids in fruits and vegetable by HPLC. **Journal Agriculture Food Chemistry**. 40:1127-30, 1992.
- OLIVA, P. B. **Estudo do armazenamento da acerola in natura e estabilidade do néctar de acerola.** Campinas, SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Tese de Mestrado. UNICAMP,103p., 1995.
- PACHLA, L. A. REYNOLDS, D. L. & KISSINGER, P. T. Review of ascorbic acid methodology: analytical methods for determining ascorbic acid in biological samples, food products, and pharmaceuticals. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, v. 68, n.1, p. 1-12, 1985.
- ROCHA, I. C. Suco de acerola: efeito da temperatura de pasteurização e armazenamento. Recife, Universidade Federal de Pernambuco. Tese de Mestrado, 60p., 1988.
- ROE, J.H. Ascorbic acid. In:**The vitamins**, 2nd Ed.,vol. VII, P. Georgy and W.N. Pearson, (Eds), Academic Press, New York, USA, 1967.

- SAHBAZ, F. & SOMER, G. Determination of ascorbic acid in fruit and vegetables using normal polarography. **Food Chemistry**, v. 44, n.1, p.141-46, 1992.
- SALUNKHE, D.K.; BOLIN, H.R.; REDDY, N.R. **Storage, Processing, and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables**. Boston, CRC Press, 2nd Ed., v. II, 1991.
- SARKAR, M. & SARKAR, A. R. Spectrophotometric determination of vitamin C. **Analisis**, v.22, n.3, p.155-57, 1994.
- SILVEIRA, M.I.O.C.B.N.; BATISTA, M.T.P.M.; BAETA, M.L.M.A.. Studies on industrially processed foods. II. Vitamin C and preservatives. **Anales de Bromatologia**. v. 33, n.1, p.111-126, España, 1981.
- SRIVASTAVA, A. & SINGH, S.K. Determination of vitamin C in chemical, pharmaceutical and biological samples by spectrophotometric titrimetry with o-diacetoxyiodobenzoate. Analysis of mixtures of vitamin C with methionine and cysteine ou glutathione. **Analyst**, v.113, n.2, p.259-262, feb,1988.
- THE SAS SYSTEM for Windows 3.95 – Release 6.08. **SAS Institute, Inc.** Cary, NC,USA, 1992.
- TONO, T. & FUJITA, S. Determination of ascorbic acid in foods by spectrophotometric method based on difference spectra. **Agricultural Biology Chemists**. Tokio v.45, n.12, p.2947-49, 1981.
- TONO, T. & FUJITA, S. Spectrophotometric determination based on difference spectra of L-ascorbic acid in plant and animal foods. **Agricultural Biology Chemists**, Tokio, v.46, n. 12, p.2953-59, 1982.

CAPÍTULO III

MODIFICAÇÃO DO MÉTODO TITULOMÉTRICO COM 2,6-DICLOROFENOL INDOFENOL PARA DETERMINAR O ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMOSTRA COLORIDA

1. INTRODUÇÃO

A acerola é uma das fontes em potencial de vitamina C, é uma fonte regular de beta-caroteno (vitamina A), e pobre em vitaminas do complexo B como tiamina, riboflavina e niacina (MILLER et al., 1961). Além disso é fonte de antocianinas, compostos importantes para a saúde do homem.

ITOO et al.,(1990) investigaram os teores de ácido ascórbico em acerola, colhida em três diferentes regiões do Japão nos três estádios de maturação (verde, “de vez” e madura), e verificaram que a proporção de ácido ascórbico, em relação aos teores de vitamina C total, foi de aproximadamente 90%, diminuindo essa proporção no estádio maduro. De acordo com ALDRIGUE (1998), a acerola mostrou ser uma boa fonte de ácido dehidroascórbico (DHAA), tendo seu valor variando de 2 a 20 % do total de vitamina C, o que justifica também sua determinação. Neste estudo foi também concluído que o DHAA tem seus níveis elevados no estádio de maturação intermediário (“de vez”), caindo esses teores no estádio totalmente maduro.

Devido à presença das antocianinas, os produtos de acerola são intensamente coloridos. Quando frescos podem apresentar-se com a cor do vermelho ao laranja, dependendo das condições em foram processados e das cultivares que lhe deram origem. A intensidade de coloração em algumas amostras freqüentemente interfere com a realização de outras análises químicas, principalmente na determinação de vitamina C, principal razão pela procura por acerola.

O método eletrométrico desenvolvido por KIRK & TRESSLER (1939), baseado no ponto de viragem e o fotométrico descrito por BESSEY (1938) medido pelo espectro de absorção, ainda são muito utilizados para determinação de vitamina C.

Um dos métodos mais utilizados para determinar o teor de ácido ascórbico, tem sido a titulação. Este método vem sendo empregado com muita segurança para inúmeros tipos de amostra de alimentos e seus produtos, por ser econômico, rápido e eficiente. TILMANS (1927) desenvolveu o método empregando a titulação com 2,6-diclorofenolindofenol, cujo princípio é baseado em reação de oxi-redução. O ponto final da titulação está associado ao ponto de viragem da cor azul (em meio básico) para rosa persistente (em meio ácido). Com objetivo de aperfeiçoar e tornar o método mais econômico, BENASSI (1990), desenvolveu algumas mudanças.

O método titulométrico para determinação de vitamina C apresenta, entretanto, algumas desvantagens. Substâncias redutoras, tais como açúcares, pigmentos da planta, certos ions metálicos (ferro e cobre), taninos e compostos sulfidrílicos de cisteína (SALUNKE et al.,1991; NAGY et al.,1977) podem interferir no método. O uso de ácido metafosfórico e pH 3,5 ou ácido metafosfórico/metanol, foi indicado para minimizar interferências como a presença de proteínas (PACHLA et al., 1985), ou uso de ácido metafosfórico e EDTA (Ácido etilenodiamino-tetracético) como agentes quelantes de metais (LEE & COATES, 1987).

Agentes quelantes (EDTA, fosfatos, etc) e agentes que se complexam com ácido ascórbico (proteínas, EDTA, histidina) retardam a sua autooxidação, mecanismo que mais acontece na perda de vitamina C em alimentos (ARCHER & TANNENBAUM, 1979).

Apesar de muitas investigações terem sido realizadas no sentido de eliminar os interferentes das amostras nos diferentes métodos de determinação, pouco sucesso tem sido logrado. Algumas metodologias conseguem analisar a vitamina C total, mas exigem restrições, e outras, como na titulação por 2,6-diclorofenol indofenol, conseguem determinar somente a forma do ácido dehidroascórbico.

O método por CLAE é considerado bastante eficiente, rápido, exato e preciso e pode determinar as várias formas da vitamina C e diferentes vitaminas concomitantemente, desde que a metodologia seja desenvolvida para esta finalidade. O uso de CLAE exige uma

padronização das condições cromatográficas e cuidados especiais, indo desde as condições de extração e limpeza da amostra até sua interpretação (POLESELLO & RIZZOLO, 1990; RAPISARDA & INTELISANO, 1996)

ALDRIGUE (1998), desenvolveu uma metodologia por CLAE com duas condições cromatográficas para determinação das formas ativas de vitamina C. Na primeira condição, utilizou a coluna Spherisorb ODS-2, 5 μ m; 150 x 4,6mm; fase móvel aquosa com 2,5 mmol/L de cetrimida e 25 mmol/L de acetato de amônia a pH 5,60, ajustado com ácido acético, vazão de 0,8mL/min e detecção UV a 263nm, que permitiram determinar ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e ácido isoascórbico em frutas e seus produtos. Na segunda condição, o autor usou coluna PRLP-S, 100A $^{\circ}$, 5 μ m; 250 x 4,6mm; fase móvel aquosa com 250 mmol/L de NaH₂PO₄ a pH 3,30, ajustado com HCl, vazão de 0,50mL/min e detecção UV a 263nm, para separar as formas ativas de vitamina C. Foi concluído que, das duas condições cromatográficas, a utilização da coluna C₁₈, da primeira condição foi a que apresentou melhor performance para determinação das formas ativas de vitamina C, no entanto, o tempo de vida útil da coluna foi aproximadamente de 3 meses.

ACAR & GÖKMEN (1996) desenvolveram um único método por CLAE para determinar simultaneamente o ácido ascórbico e o ácido dehidroascórbico, e os resultados mostraram alta exatidão e precisão de acordo com os dados de recuperação e estudos comparativos, além de mostrar ser um método com alta sensibilidade, capaz de detectar 1mg/L de vitamina C.

Os diversos alimentos apresentam uma composição muito complexa e a validação de uma metodologia para determinação de vitamina C de uma ou mais formas ativas, ou ainda destinada a produtos específicos, merece ser comparada com métodos oficiais e/ou métodos que sejam assegurados quanto a sua validade. Sendo a acerola uma fonte excepcional de vitamina C, e seus produtos apresentarem-se ricamente coloridos pela presença de pigmentos oriundos da casca dos frutos, cabe uma investigação analítica especial.

O método de titulação com 2,6-diclorofenol indofenol é amplamente usado para determinação do ácido ascórbico, mas os analistas encontram muitas dificuldades para determinar o exato ponto de viragem em amostras coloridas. Diante do exposto, o propósito

deste trabalho foi realizar uma modificação deste método e contribuir para uma efetiva titulação deste analito. Para efeito de confirmação, foi usado como amostra suco integral de acerola, comparando-se os resultados obtidos com o método de CLAE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria prima

Os frutos foram cedidos por um produtor da região de Campinas-SP, resultado da colheita de vários cultivares, no estágio “de vez”, pois os frutos verdes apresentam maiores teores de ácido ascórbico e à medida que amadurecem esses teores diminuem.

Antes das análises, os frutos foram lavados, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 20 ppm/15min, e colocadas numa peneira até completa drenagem da água. Este tratamento teve por objetivo eliminar sujidade que por ventura possa estar aderida aos frutos, e efetuar uma descontaminação do material.

2.2. Extração da polpa

A extração da polpa foi efetuada em um extrator inclinado marca BERTUZZI com braços de escova, cuja capacidade é de aproximadamente 1000kg/hora, nas condições descritas na Tabela 1.

TABELA 1. Condições de processamento da polpa de acerola

Amostras	Condições de processamento			Pasteurização
	Velocidade de extração (rpm)	Tamanho/tela do extrator (mm)	Rendimento da polpa (%)	
Polpa 1	4000	0,8	66,66	Não
Polpa 2	4000	0,8	66,66	Pasteurizada

2.3. Pasteurização

A operação de pré tratamento de pasteurização foi efetuada colocando-se a polpa de acerola em um tanque inoxidável, encamisado com agitação constante e lenta, até atingir uma temperatura de 70°C (aproximadamente 5 min). Em seguida, procedeu-se à pasteurização onde as polpas foram acondicionadas em latas de folhas de flandres com capacidade de 350 mL, e recravadas em recravadeira da marca John Reine, modelo 710, seguido de imersão em um tanque aberto a 90°C por 20 minutos, onde a água permanecia em turbulência constante. Posteriormente, resfriou-se em outro tanque com água corrente a 25°C até que as amostras atingissem esta temperatura.

2.4. Ácido ascórbico

2.4.1. Método de titulação com 2,6-diclorofenol indofenol

O método proposto neste trabalho foi baseado no método oficial da AOAC (1984) modificado por BENASSI (1990) a qual substituiu o solvente extrator, ácido metafosfórico, indicado pela AOAC pelo ácido oxálico a 1%. Neste experimento foi utilizado o DCFI (2,6-diclorofenol indofenol) com a concentração como indicada no método oficial da AOAC (2,23g/1000mL) e o DCFI (teste) diluído em água na concentração 1:1, da indicada pela AOAC.

2.4.1.1. Solventes extratores

Utilizou-se a água como meio extrator de ácido ascórbico nas amostras das polpas de acerola, para comparar a extração com o ácido oxálico a 1%, como indicado por BENASSI (1990). Também foram comparados diferentes tempos de extração (10, 15 e 20 min) para os dois solventes extratores.

2.4.1.2. Preparo da amostra

a) Foi usado uma quantidade de polpa de acerola de aproximadamente 10mL, diluída para 100 mL em água. As polpas foram colocadas em agitador refrigerado durante 15 minutos, programado para 30 rpm, protegidas da luz. A seguir foram filtradas em papel

Whatman 1 MM. Utilizou-se alíquotas de 2mL, 3mL, 5mL, 10mL e 15mL para análise de titulação. Também foram preparadas soluções padrões de ácido ascórbico com as mesmas alíquotas, para testar o volume gasto de DCFI.

b) Outra condição teste de titulação foi realizada com 10 mL de polpa diluída na proporção 1:2 com água destilada, filtrada em cartucho Sep-Pak, para eliminar parte dos pigmentos. Os primeiros 15 mL foram descartados e recolhido o restante. Os cartuchos foram previamente condicionados com 20 mL de metanol p.a, lavados com 50 mL de água deionizada. Tais cartuchos foram recuperados de 3 a 5 vezes para serem reutilizados, lavando-se na ordem com metanol acidificado com HCl 1% e água destilada. A partir da amostra filtrada, retirou-se alíquotas semelhantes às descritas no item 2.4.1.2.a para a realizar a titulação com DCFI.

2.4.1.3. Preparo dos reagentes

Foram utilizados o ácido oxálico 1%, o DCFI nas concentrações de 2,23g/1000mL e 1,12g/1000mL. A solução padrão de ácido ascórbico foi preparada no momento da análise (aproximadamente 30 mg dissolvido em 100 mL de ácido oxálico 1%). Todos os reagentes foram adquiridos da Merck P.A.

2.4.1.4. Teste do volume do ácido oxálico na titulação

As alíquotas das amostras foram tituladas, usando o ácido oxálico 1% nas quantidades de 50mL, 100 mL e 150mL, em erlenmeyer de 250 ou 300mL. Para maior precisão, foi usado bureta de 10,0mL com divisão de 0,05mL.

2.4.1.5. Repetibilidade e reprodutibilidade

Para análise de repetibilidade do método, foram utilizadas polpas de acerola não pasteurizada e pasteurizada, fazendo-se as determinações analíticas em triplicatas em cada amostra, três vezes ao dia, durante cinco dias por três meses consecutivos. Para o teste de recuperação, adicionava-se à amostra uma concentração conhecida de padrão de ácido ascórbico (50mg) para comparar, ao mesmo tempo, a porcentagem de recuperação.

Para avaliar a reprodutibilidade do método proposto, as determinações foram feitas por dois analistas, usando a mesma amostra de polpa de acerola (mesma origem), e uma terceira pessoa usou polpa (pasteurizada e não pasteurizada, ambas congeladas) de manga, por ser difícil determinar o ponto de viragem da titulação pelo método titulométrico com DCFI.

2.4.2. Método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para comparar o teor de ácido ascórbico obtido pelo método de titulação, foi usado o método de CLAE. Este sistema consistiu de cromatógrafo Líquido Waters, modelo 480C/1, equipada com detector UV-visível e módulo integrador de dados Waters Associates, Milford U.S.A. A análise foi efetuada usando coluna analítica de fase reversa RP-18 Bondapack (250 x 4,6 mm de diâmetro), empacotada com partículas de 5 μ m; fluxo de 2,0 mL/min, com fase móvel constituída por metanol-água (40:60 v/v) previamente filtrada e degaseificada em ultrassom por 20 minutos. A eluição foi isocrática e a detecção, a 254 nm; injeções com volume de 25 μ l, pré coluna de saturação de sílica. As amostras foram filtradas em cartuchos Sep-Pak, previamente condicionadas com a fase móvel.

A extração do ácido ascórbico das polpas foi feita com ácido oxálico a 1% e a solução padrão preparada nas mesmas condições para o método titulométrico com DCFI. As amostras foram diluídas com a fase móvel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste das alíquotas

Após testar as diferentes alíquotas, foi verificado uma resposta linear, cujo coeficiente de correlação variou de 0,9987 a 0,9976, o que levou à escolha da alíquota de 2,0 mL tanto para a amostra diluída em água como para o padrão. Ao testar os diferentes volumes do ácido oxálico, não houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade. Nesse caso, por ser mais econômico, foi indicado, portanto, o uso de 50 mL de ácido oxálico a 1% (o método oficial indica 100mL).

3.2. Extração do ácido ascórbico

Para testar o solvente extrator do ácido ascórbico e o tempo ótimo para efetuar a análise, foi utilizada polpa de acerola sem filtrar em cartucho Sep-Pak, pelo método sugerido nesta investigação.

Na Tabela 2 estão apresentados os teores de AA (ácido ascórbico) de acordo com o solvente extrator e os tempos de extrações utilizados.

De acordo com os resultados estatísticos, não foi verificada diferença significativa ($p \leq 0,05$) em ambos solventes extratores (a água e o ácido oxálico) para extrair o ácido ascórbico, da polpa de acerola não pasteurizada e pasteurizada, nas condições analíticas deste experimento. Com relação ao tempo de extração, os espaços de 10, 15 e 20 min não apresentaram diferenças significativas pelo teste F ($p \leq 0,05$), em ambas amostras e solventes de extração do ácido ascórbico. Os dados obtidos indicaram que o tempo de 15 min para a extração de ácido ascórbico com qualquer dos solventes utilizados, tanto nas amostras não pasteurizadas como nas pasteurizadas, pode ser utilizado com segurança.

O teor de ácido ascórbico da polpa não pasteurizada diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) das pasteurizadas, independente do solvente extrator. Essa diferença é devida ao tratamento térmico sobre as amostras.

TABELA 2. Comparação dos teores de ácido ascórbico entre o solvente extrator e o tempo de extração em polpas de acerola não pasteurizada e pasteurizada.

Amostra	Solvente extrator							
	Água				Ácido oxálico (1%)			
	Tempo de extração (min)/Teor de ácido ascórbico (mg/100g)*				Tempo de extração/ Teor de ácido ascórbico (mg/100g)*			
	10	15	20	25	10	15	20	25
Polpa não-pasteurizada	1545,32 (1,21) _{aA}	1576,09 (0,84) _{aA}	1563,31 (3,39) _{aA}	1438,65 (4,12) _{bA}	1539,16 (1,94) _{aA}	1582,13 (1,42) _{aA}	1558,22 (2,71) _{aA}	1410,42 (2,06) _{bA}
Polpa pasteurizada	1384,92 (1,31) _{aB}	1392,01 (0,18) _{aB}	1350,09 (1,03) _{aB}	1295,97 (1,26) _{bB}	1380,66 (1,30) _{aB}	1390,91 (1,04) _{aB}	1342,07 (1,23) _{aB}	1289,38 (0,70) _{bB}

* Resultado médio de três determinações analíticas e suas respectivas estimativas de desvios padrões; Letras diferentes minúsculas na linha diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$); Letras diferentes maiúsculas na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

TABELA 3. Comparação das diferenças nos teores de ácido ascórbico, em porcentagem, entre os solventes extratores (água e ácido oxálico) nas polpas de acerola não pasteurizadas e pasteurizadas, dada entre os tempos de extração

Tempo de extração(min)*	Polpa não pasteurizada		Polpa pasteurizada	
	Água	Ácido oxálico	Água	Ácido oxálico
T ₁₀ – T ₁₅	- 1,98 (0,14)	-2,80 (0,33)	0,82 (0,34)	0,87 (0,28)
T ₁₀ – T ₂₀	+1,19 (0,54)	+1,31 (0,84)	2,68 (0,91)	2,81 (0,14)
T ₁₀ – T ₂₅	-7,90 (2,52)	-8,93 (1,85)	6,90 (0,97)	6,70 (1,35)

* valores de tempo subscrito em minutos; valores entre parênteses corresponde à estimativa dos desvios padrões

Na Tabela 3 estão apresentados as diferenças das perdas e ganhos do ácido ascórbico, em porcentagem, comparativamente aos tempos de teste (10, 15, 20 e 25min) em relação ao tempo de 10 minutos de análise. Os resultados mostraram que as polpas não pasteurizadas apresentaram maior velocidade de degradação do ácido ascórbico que as pasteurizadas após de 20 minutos de extração, chegando essa diferença a ser aproximadamente de 10% ao atingir 25 minutos.

Os resultados das análises das polpas pasteurizadas indicaram maior estabilidade durante os 15 minutos nesta determinação analítica, porque as enzimas que contribuem para a degradação foram inativadas pelo tratamento térmico. Este fator, todavia, não significa que todos os cuidados no momento da determinação analítica sejam efetivamente assegurados para maior confiabilidade dos resultados.

3.3. Comparação dos métodos

Na Tabela 4 estão apresentados os teores de ácido ascórbico nas polpas de acerola pasteurizada e não pasteurizada comparando-se os métodos titulométricos com DCFI (BENASSI, 1990 e o proposto) e CLAE. Os resultados mostraram que, seguindo os procedimentos do método oficial AOAC (1984) modificado por BENASSI (1990), os teores de ácido ascórbico foram menores, quando comparados ao método proposto, e o método por CLAE. Outro fato importante foi observado com a estimativa de desvios padrões. No método oficial modificado por BENASSI (1990), os desvios padrões foram maiores comparativamente aos demais testes, logo há uma indicação de que o método apresenta maior possibilidade de erro experimental quando se trata de amostra muito colorida, uma vez que o ponto final da titulação está atrelado à mudança de coloração no ponto de viragem.

TABELA 4. Ácido ascórbico (mg/100g) de polpas de acerola não pasteurizada, e pasteurizada filtrada em papel filtro (pigmentada) e filtrada em cartucho Sep-Pak (despigmentada)

Método Amostra	DCF ₁ *	DCF ₂ *		CLAE**	
	Pigmentada	Pigmentada	Despigmentada	Pigmentada	Despigmentada
Polpa não pasteurizada	1518,79 (9,35) _{aA}	1680,48 (0,71) _{bA}	1680,14 (0,53) _{bA}	1687,91 (3,90) _{bA}	1682,99 (4,32) _{bA}
Polpa Pasteurizada	1354,18 (6,19) _{n.s B}	1369,43 (0,77) _{n.s B}	1365,17 (0,29) _{n.sB}	1367,06 (4,48) _{n.s B}	1366,67 (3,03) _{n.s B}

* média de três determinações analíticas; valor entre parênteses corresponde à estimativa de desvio padrão

** média de duas determinações analíticas

Média com letras diferentes minúsculas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$);

letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$); n.s= não significativo (lido na mesma linha)

DCF₁ – BENASSI (1990); DCF₂ – modificações propostas

Sendo o DCFI mais concentrado, no método oficial, este fator provoca dúvidas quanto ao momento exato de viragem, além de ficar altamente condicionado com o treino e sensibilidade do analista. A introdução de modificações no método proposto no trabalho permitiu minimizar as dúvidas citadas. Indicou também que as mudanças na fase de preparação da amostra e as condições de titulação proporcionaram resultados mais seguros, como também favoreceu maior extração do ácido ascórbico.

Na determinação dos teores de ácido ascórbico, foi observado maior erro experimental para polpa não pasteurizada em relação à pasteurizada pelo método oficial. Este dado sugere que o efeito do tratamento térmico na amostra, o qual induz à degradação dos pigmentos, pode ter sido um fator de melhor julgamento na titulação para esse método.

Foi verificado que os valores de ácido ascórbico na amostra não pasteurizada, analisada pelo método de BENASSI (1990) apresentou diferença significativa ao nível de 5% em relação ao método proposto e CLAE. Nesta amostras, os resultados do método proposto, também não mostrou diferença significativa quando comparado ao da CLAE. Já, a amostra

pasteurizada não apresentou diferença significativa entre os três métodos utilizados neste trabalho. No capítulo anterior, não foi verificada diferença significativa entre a determinação dos teores de ácido ascórbico pelo método de titulação com DCFI modificado por BENASSI (1990) e CLAE. Pode-se sugerir que as variações encontradas para essas medidas poderiam estar relacionadas com o teor de DHAA, que em alguns casos pode chegar até a 20% deste ácido na fruta de acerola, como aquele encontrado por ALDRIGUE(1998).

Nos resultados do método proposto (Tabela 4) não foi verificada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre amostras pigmentadas e as despigmentadas. Este recurso, portanto, não mostrou ser altamente necessário, podendo ser usado opcionalmente em casos de amostra de difícil titulação. Estudos realizados por RAPISARDA & INTELISANO (1996) mostraram que amostras de suco de laranja pasteurizado despigmentado, filtrando-as em cartucho Sep-Pak, mostraram resultados comparáveis com o método oficial da AOAC e o método realizado por CLAE.

Estudos realizados por ALDRIGUE (1998) mostraram diferença significativa para os valores de vitamina C total, analisados pelos métodos da AOAC e CLAE em polpa comercial de acerola mas para néctar de acerola, os métodos não apresentaram diferenças significativas. É conhecido, entretanto, que quanto maior o número de replicações na determinações, maior é a precisão analítica.

3.4. Repetibilidade e reprodutibilidade

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de recuperação do AA na polpa de acerola não pasteurizada e na pasteurizada.

O coeficiente de variação (CV) do teste de repetibilidade das análises nas polpas de acerola não pasteurizadas durante um mesmo dia, variou de 0,06 a 0,18%, entre os três meses variou de 0,10 a 0,21% e a reprodutibilidade entre os três meses teve CV médio de 0,10 a 0,21%. Nas polpas pasteurizadas, a repetibilidade durante um mesmo dia o CV variou de 0,06 a 0,19%, e entre os três meses foi de 0,12 a 0,34%. A reprodutibilidade apresentou CV que variou entre os três meses de 0,12 a 0,65%. A repetibilidade e reprodutibilidade da solução

padrão entre os três meses apresentou um CV que foi de 0,08 a 0,19% e 0,06 a 0,25%, respectivamente.

Os resultados das médias, e coeficientes de variação do método mostraram, portanto, que a repetibilidade e a reprodutibilidade do método proposto apresentaram bom nível de confiabilidade, com um coeficiente de variação baixo (< de 1%).

A escolha de um novo produto (polpa de manga) para teste foi devido ao fato do mesmo apresentar grande quantidade de pigmento que confunde o analista entre a coloração do reagente (DCFI) com mudanças no ton da amostra no momento da análise. Os resultados das análises com este produto foram semelhantes aos obtidos para polpas de acerola (SILVA, TOREZAN & MENEZES, 1999).

Para calcular os teores de ácido ascórbico pelo método proposto neste experimento ver exemplo no Anexo 3 (Cap.III).

TABELA 5. Recuperação de AA adicionado às polpas de acerola não pasteurizada (NP) e pasteurizada (P)

Amostra	Teores de AA(mg/100g)	CV (%)	Recuperação de AA (%)
NP ₁	1571,17 (0,81)	0,05	98,12
NP ₂	1502,37 (0,56)	0,04	98,07
NP ₃	1584,33 (3,74)	0,24	98,80
Média			98,33 (0,28)
P ₁	1412,04 (1,24)	0,09	101,39
P ₂	1348,62 (1,45)	0,11	100,75
P ₃	1348,64 (1,64)	0,11	101,31
Média			101,15 (0,54)

Resultados médios de três determinações analíticas; valores subscritos (1,2,3) representam os meses de análises

Os resultados apresentados na Tabela 5, mostraram uma recuperação média do ácido ascórbico de 98,33 (0,54)% e 101,15 (0,54)% nas polpas não pasteurizada e pasteurizada, respectivamente. Os valores de recuperação do método proposto foram semelhantes àqueles encontrados no capítulo anterior deste trabalho e em recentes publicações (ALDRIGUE, 1998 e BADOLATO et al., 1996).

De acordo com o padrão ISO 5725, (1986) citado por MARTIN (1996), R (reprodutibilidade) e r (repetibilidade) são limites estatisticamente definidos pela variação dos resultados analíticos dentro de um laboratório (r) e, entre alguns laboratórios, (R) estabelecidos a um nível de 95% de confiança. A repetibilidade é dada por consecutivas medidas independentes do mesmo parâmetro e mesmo equipamento, no mesmo laboratório, com a mesma amostra e pelo mesmo operador. A reprodutibilidade é resultante de medidas do mesmo parâmetro com mesma amostra, em diferentes equipamentos, em pelo menos dois laboratórios por diferentes operadores, usando o mesmo método.

É importante que seja estabelecido um intervalo de confiança a partir das repetições para tornar confiável os resultados analíticos. Muitas vezes, pode haver julgamento com menor rigor do que merece um determinado resultado; em outros casos, o julgamento não está somente aliado a uma análise estatística, deve também ter uma avaliação por um conjunto de especialistas do assunto e levar em consideração a discussão consensual, sem permitir abusos ou conclusões tendenciosas.

Internacionalmente, o limite de confiança para dados estatísticos em sucos de frutas é de 95% para definir R e r. No entanto o limite de confiança de 90 % ($R_{90\%}$) diminuiria em 18% e $R_{99\%}$ aumentaria o nível de confiança em 29%. Para interpretar estatisticamente a reprodutibilidade, R só é aplicado para comparar duas medidas individuais, com replicatas, porém se se trata de uma única análise, a interpretação deve considerar $R/\sqrt{2}$ (MARTIN, 1996).

As modificações propostas neste trabalho no método da AOAC, modificado por BENASSI (1990) indicaram uma validade satisfatória da técnica em sucos com altos teores de pigmentos coloridos, como no caso de acerola, que dificultariam a visualização do ponto final da titulação. O uso de cartucho Sep-Pak pode ser opcional para despigmentar soluções

coloridas com baixos teores de ácido ascórbico. A técnica é fácil e econômica e pode servir como um método de rotina na determinação de ácido ascórbico em polpa e outros produtos de acerola.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAR, J. & GÖKMEN, V. A simple HPLC method for the determination of Total Vitamin C in fruit juices and drinks. *Fruit Processing*, n. 5, v. 6, p. 198-201, 1996.
- ALDRIGUE, M. L. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, utilizando a CLAE, para determinação de vitamina C em frutas e seus principais produtos.** Campinas:UNICAMP, 1998. 160p. Tese (Doutor) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1998.
- A.O. A. C. (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis**; Ed. Sidney William S. 14 ed. Washington, 1984. 1141p.
- ARCHER, M. C. & vitamins. In: TANNENBAUM, S. R. (ed.) **Nutritional and safety aspects of food processing.** New York: Marcel Dekker, 1979. p.53-60.
- BADOLATO, M.I.C.B.; SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; ANTUNES, J. L. F. Estudo comparativo de métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico em suco de frutas naturais e industrializado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n. 3, v.16, p. 206-210, 1996.
- BENASSI, M. T. **Análise dos estudos de diferentes parâmetros na estabilidade de vitamina C em vegetais processados.** Campinas: UNICAMP, 1990. 159p. Tese (Mestre) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1990.
- BESSEY, O. A. A method of the determination of small quantities of ascorbic and dehydroascorbic acid in turbid and colored solutions in the presence of other reducing substances. *The journal of Biological Chemistry*, v. 126, p. 771-784, 1938.
- ITOO, S.; AIBA, M. & ISHIHATA, K. Comparison of ascorbic acid content in acerola fruit from different production region depend on degree of maturity and it's stability by processing. *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi*, v37, n. 9. P. 72-29, 1990.
- KIRK, M. M. & TRESSLER, D. K. **Industrial and Engineering Chemistry: Analytical Edition**, n.1, v.11, p.332-334, 1939.
- LEE, H. S. & COATES, A. Liquid chromatographic determination of vitamin C in commercial Florida citrus juices. *Journal of Micronutrient Analysis*, n. 3, v. 3, p. 199-209, 1987.
- MARTIN, G. G. Discussion of some statistical concepts applied to fruit juice analysis. *Fruit Processing*, n.5, v.6, p.186-194, 1996.
- MILLER, C. D.; WENKAM, N. S.; FITTING, K. O. Acerola-Nutritive value and home use. **Hawaii Agricultural Station.** Circular n. 59, p. 1-18, 1961.
- NAGY, S.; SAW, P.E.; VELDHUIS, M.K. **Citrus Science and Technology.** Westport, Com. AVI Publishing Co., v.1. 531p. 1977.

- PACHLA, L. A. REYNOLDS, D. L. & KISSINGER, P. T. Review of ascorbic acid methodology: analytical methods for determining ascorbic acid in biological samples, food products, and pharmaceuticals. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, v. 68, n.1, p. 1-12, 1985.
- POLESELLO, A.; RIZOLLO, A. Applications of HPLC to the determination of Water-soluble vitamins in foods. 2. A Review (1985-9). **Journal of Micronutrient Analysis**, n.1, v.8, p. 105-158, 1990.
- RAPISARDA, P. & INTELISANO, S. Sample preparation for vitamina C analysis of pigmented orange juices. **Italian Journal Food Science**, n.3, v. 8, p. 252-256, 1996.
- SALUNKE, D. K. ; BOLIN, H. R. & REDDY, N. R. **Storage, Processing and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables**. Boston, CRC Press, 2nd Ed., v.2, 1991.
- SILVA, M. F. V.; TOREZAN, G. A. & MENEZES, H. C. Determinação do ácido ascórbico em polpa de manga com dicloroindofenol: comparação entre as modificações do método. **III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**. Educação, Pesquisa e Desenvolvimento. UNICAMP, Campinas:SP- Brasil, novembro, 1999. Trabalho apresentado na forma de Poster. Resumo nos Anais n°165, p. 48.
- TILMANS, J. Über die Bestimmung der elektrischen Reduktions-Oxydaions-Potentiale und ihre Anwendung in der Lebensmittelchemie. **Zeitschr. F. Untersuchung der Lebensmittel**, n.54, v.1, p.33-39, 1927.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA POLPA DE ACEROLA

1. INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia glabra* L. ou *Malpighia puniceifolia* L.) é uma planta de grande destaque na fruticultura do Caribe, de onde parece ser originária, e no nordeste da América do Sul. Sua importância está relacionada principalmente à qualidade nutritiva de seus frutos, especificamente pelos teores de vitamina C que dispõem.

Acrescido aos teores de vitamina C, a fruta tem um rico aporte de caroteno, e baixas concentrações de vitaminas B1, B2, B6, ferro e cálcio (fontes adaptadas por QUINTEROS, 1995 & OLIVEIRA, 1997). Na área da saúde, a demanda de produtos à base de frutas com altos teores de vitamina A, C e fibras está associado à prevenção de diversas doenças como câncer, distúrbios coronários, excesso de colesterol etc. (COUNSELL & HORNING,1981)

O tamanho da fruta pode variar de 1 a 2,5 cm, o diâmetro de 1 a 4cm e o peso de 2 a 15 g (ALVES & MENEZES, 1995). O tamanho e outros atributos de qualidade da acerola, tais como: sólidos solúveis, acidez total e vitamina C, além de serem afetados pela desuniformidade dos plantios, sofrem influência de fatores ambientais, principalmente precipitações pluviais excessivas e de fatores pós-colheita (ALVES,1996). A intensidade do sabor ácido da acerola está diretamente relacionado com o teor de ácido ascórbico presente no fruto.

A cultura da acerola representa uma alternativa de diversificação para os pequenos produtores, e também é geradora de empregos, pois sua classificação e colheita são feitas manualmente e exigem intensivo emprego de mão-de-obra.

Os níveis de ácido ascórbico na fruta dependem de fatores como: mecanismos de produção e condições climáticas; estágio de maturação e posição para receber a luz na árvore, espécie e variedade; parâmetros usados para processamento dos seus produtos, condições de manuseio e armazenamento dos frutos e dos produtos processados (NAGY,1980).

No mercado interno, a acerola é comercializada principalmente na forma *in natura* ou de polpas congeladas, e seu maior mercado está nos sucos naturais. Para definir o preço do kg da acerola são utilizados os critérios de coloração, tamanho e uniformidade. A tendência, entretanto, é que os teores de ácido ascórbico passem a estabelecer o preço do produto (VIGLIO, 1993).

A cor dos produtos de acerola é muito apreciada pelos consumidores. Dependendo da variedade, o fruto pode apresentar cores vermelhas, amarelas-laranjadas, vermelho-púrpura e até cor de rosa.

De acordo com o processamento da fruta encontram-se diferentes produtos como: sucos (integral, concentrado, e liofilizado), refrigerantes, geléia, balas, licores, bombons, goma de mascar, néctares, purês, sorvetes, cremes, cápsulas de vitamina C, compotas, xarope, conserva (BENSIMON, 1991; OLIVEIRA, 1997; OLIVEIRA, 1996; ROCHA, 1988).

Na indústria alimentícia, o suco tem sido utilizado para enriquecer os sucos e néctares de outras frutas com menor teor de ácido ascórbico, saladas de frutas, alimentos infantis etc. É utilizado também na indústria de conservas como antioxidante natural, na preservação de frutos enlatados, secos ou congelados, de iogurtes (ARAÚJO & MINAMI, 1994; COUCEIRO, 1985; ASENJO & MOSCOSO, 1950 citado por FIGUEIRÊDO, 1998).

Embora o mercado interno e externo esteja acreditando nos investimentos com produtos de acerola, existe o fantasma da perda da qualidade do produto ao longo da estocagem. De acordo com o processamento, acondicionamento, condições e tempo de armazenagem, o produto de acerola perde sua coloração e também diminui seu teor de ácido ascórbico, chegando em alguns casos a ser maior que 50%.

Os principais mecanismos de degradação do ácido ascórbico: enzimático (pela enzimas como citocromo oxidase, ácido ascórbico oxidase e peroxidases) e não enzimático (reações aeróbicas e anaeróbicas), diminuem o potencial da vitamina no fruto e em seus produtos. Desta forma são necessárias operações tecnológicas como desaeração, pasteurização, uso de antioxidantes etc, que minimizem essas perdas (NAGY,1980). Os açúcares influenciam na estabilidade da vitamina C. Dos três maiores açúcares encontrados na fruta (frutose, sacarose e glicose), a frutose reage com os grupos de carbono do ácido ascórbico, quebrando e reduzindo o potencial de vitamina C (NAGY et al., 1977).

Ao final de longo tempo de armazenamento, é visível a mudança de coloração dos produtos de acerola, passando de vermelho ou alaranjado para amarelo e tornando-se finalmente escuro com tonalidade marrom. Esse escurecimento é resultado da degradação da vitamina C e dos pigmentos vermelhos, as antocianinas, encontrados na composição química da acerola. Segundo BOBBIO & BOBBIO (1992), tanto a oxidação aeróbica quanto a anaeróbica da vitamina C leva à formação de furaldeídos, compostos que polimerizam-se facilmente, com a formação de pigmentos escuros. Torna-se necessário desenvolver melhores meios para controlar as interações entre os constituintes dos sucos para reduzir as mudanças deletérias (HANDWERK & COLEMAN,1988).

Várias pesquisas têm sido realizadas para elucidar os fatores que levam à mudanças do conteúdo de vitamina C em produtos de frutas (ACHINEWHU & HART, 1994; ASENJO, 1959; CID et al.,1991; EWALDAH, 1992; FIGUEIREDO et al., 1986; GOLDONI et al., 1981; JOHNSON et al., 1995). Também têm-se intensificado muitos estudos acerca das interações entre a vitamina C e as antocianinas (FRANCIS,1989; LAN et al., 1996; POEI-LANSTON & WROLSTAD, 1981; SHRIKHANDE & FRANCIS, 1974; SKREDE et al., 1992). Alguns estudos mostraram que a presença de açúcares como frutose, em soluções ou produtos contendo antocianinas, apresentaram efeitos deletérios para o pigmento (LAN et al., 1996) e a adição de tanino e/ou ácido ascórbico em um modelo de bebida com antocianinas incorporadas resultaram em marcada perda do pigmento e, portanto, da cor (SHI, LIN & FRANCIS, 1992).

Os principais pigmentos responsáveis pela coloração vermelha ou laranja da fruta e dos produtos de acerola são antocianinas. Tais pigmentos, entretanto, são fortemente afetados pelo processamento, especialmente tratamento térmico.

Os pigmentos da acerola estão concentrados particularmente na casca do fruto. Algumas variedades de acerola apresentam a casca bastante pigmentada e a polpa quase branca e outras apresentam a polpa amarela ou laranja com a casca vermelha, enfim a coloração principal do produto é devida à pigmentação da casca.

As antocianinas, substâncias fenólicas, são glicosídeos de antocianidinas, derivados polihidroxiados do íon flavilium. Pertencem à classe de compostos contendo uma estrutura básica de 15 carbonos, conhecidos coletivamente como flavonóides (SILVA, 1996; GUEDES, 1993).

Existe na literatura um vasto estudo acerca da estabilidade das antocianinas (MARKAKIS, 1982; STRINGHETA, 1991; CHANDRA et al., 1993; CHAN & YAMAMOTO, 1994; BAKKER & TIMBERLAKE, 1997; GARCIA-VIGUERA et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi a determinação de características físicas e químicas da polpa de acerola submetida à diferentes tratamentos e verificar a estabilidade da sua composição e a influência do tipo de embalagem e tipo de armazenamento durante 180 dias.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria prima.

Para este trabalho foram utilizadas frutas de acerola, obtidas de produtores da região de Campinas em diferentes épocas quase totalmente maduros. Os frutos, após seleção e acondicionamento, foram armazenados a -18°C até a data de processamento da polpa, 7 dias após a colheita.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo da matéria prima

2.2.1.1. Seleção

Após a colheita dos frutos, no mesmo dia, foram selecionados manualmente, no laboratório, somente os que estavam maduros e sem injúrias.

2.2.1.2. Lavagem

Após uma lavagem inicial com água potável, para retirada das impurezas, as frutas foram imersas em um tanque de aço inoxidável contendo solução de hipoclorito de sódio na concentração de 20 ppm, durante 15 minutos.

2.2.1.3. Embalagem

As frutas foram acondicionadas em sacos de polietileno contendo 1000 gramas em cada saco.

2.2.1.4. Armazenamento

As amostras de frutas foram armazenadas em câmara a -18°C até o processamento da polpa de acerola.

2.2.2. Processamento da polpa de acerola

2.2.2.1. Extração em planta piloto

Esta operação foi efetuada em um extrator inclinado com braços de escova da marca BERTUZZI, cuja capacidade é de aproximadamente uma 1000kg/h, com peneira de 0,8mm de diâmetro de furo. As polpas obtidas por este procedimento foram designadas no estudo de polpas obtidas em extrator (industrial) ou polpas obtidas em planta piloto.

2.2.2.2. Extração em laboratório

Esta operação foi efetuada em liquidificador doméstico, em seis amostras de 500 gramas de cada vez e posteriormente passadas por uma peneira de 0,8mm de diâmetro de

furo e acondicionadas em vidros para as análises físico-químicas imediata à extração. As amostras cujas análises não foram possíveis de realizá-las no mesmo dia de extração foram jateadas com N₂ e armazenadas a -18°C.

As polpas obtidas por este procedimento foram identificadas neste estudo como “polpa doméstica”.

2.2.2.3. Tratamento térmico

a) Inativação

Parte da polpa extraída no extrator foi destinado ao tratamento térmico chamado neste experimento de inativação térmica (branqueamento). A polpa foi colocada de uma só vez no tacho inoxidável, encamisado, até atingir $85 \pm 2^\circ\text{C}$ e aí permanecendo por 5 minutos, sendo imediatamente envasada, recravada e resfriada.

b) Pasteurização

Parte da polpa extraída na despoldadeira (extrator) foi tratada termicamente em um pasteurizador com trocador de calor tubular a uma temperatura de $94 \pm 1,20^\circ\text{C}$ por 45 segundos de tempo de retenção. A polpa pasteurizada foi dividida em duas partes: uma foi desaerada (PPD) e a outra não desaerada (PPSD) (Fig 1).

O fluxograma (Fig. 1) indica as etapas em que se procederam todos os tratamentos dados à polpa de acerola. Na Tabela 1, estão apresentados os valores médios de temperatura utilizados nos tratamentos térmicos das polpas de acerola. Para medir as temperaturas foi utilizado um termômetro digital, exceto para entrada de pasteurização cuja leitura é dada automaticamente pelo equipamento.

TABELA 1. Parâmetros de temperatura média da inativação, pasteurização e da desaeração da polpa de acerola

Inativação		Pasteurização			Desaeração ¹		
°C final	Envase	Entrada	Saída	Envase (PPSD ²)	Entrada	Saída	Envase (PPCD ³)
85±2°C	80±2°C	80±2°C	94±1,2°C	90±0,2°C	92 ±1,3°C	89±2°C	85±2°C

1-procedimento realizado em túnel de exaustão; 2- polpas pasteurizadas sem desaeração; 3- polpa pasteurizada com desaeração

2.2.2.4. Acondicionamento e fechamento

Cada polpa obtida na extração após os tratamentos devidos foi dividida em duas partes: uma foi acondicionada em latas com capacidade de 350 mL (89,3mm x 92,9 mm) e a outra em vidros transparentes com capacidade de 150mL. As latas tinham o corpo revestido internamente com uma primeira camada de 2,5 mg/m² de verniz epóxi-fenólico e uma segunda camada de 4,0 mg/m² de verniz resinoso, enquanto a tampa e o fundo eram revestidos por 6,0 mg/m² de verniz resinoso. O fechamento das latas foi em recravadeira da marca JOHN REINE, modelo 710. O fechamento dos vidros foi manual com tampa garra-torção.

As embalagens das polpas tratadas termicamente foram invertidas por 3 minutos imediatamente após o fechamento, seguido de imersão em tanque inoxidável com corrente de água a uma temperatura ambiente (20°C) até seu resfriamento, para depois proceder-se o armazenamento das amostras.

As latas e os vidros foram lavados e esterilizados em estufa à 100°C/45min antes de serem usados para acondicionamento das polpas.

2.2.2.5. Armazenamento

Os lotes das polpas sem tratamento térmico e inativação foram armazenados a -18°C e os lotes das polpas pasteurizadas com e sem desaeração foram armazenadas à temperatura ambiente. Todas as amostras acondicionadas em vidro foram armazenadas em ambientes protegidos de luz.

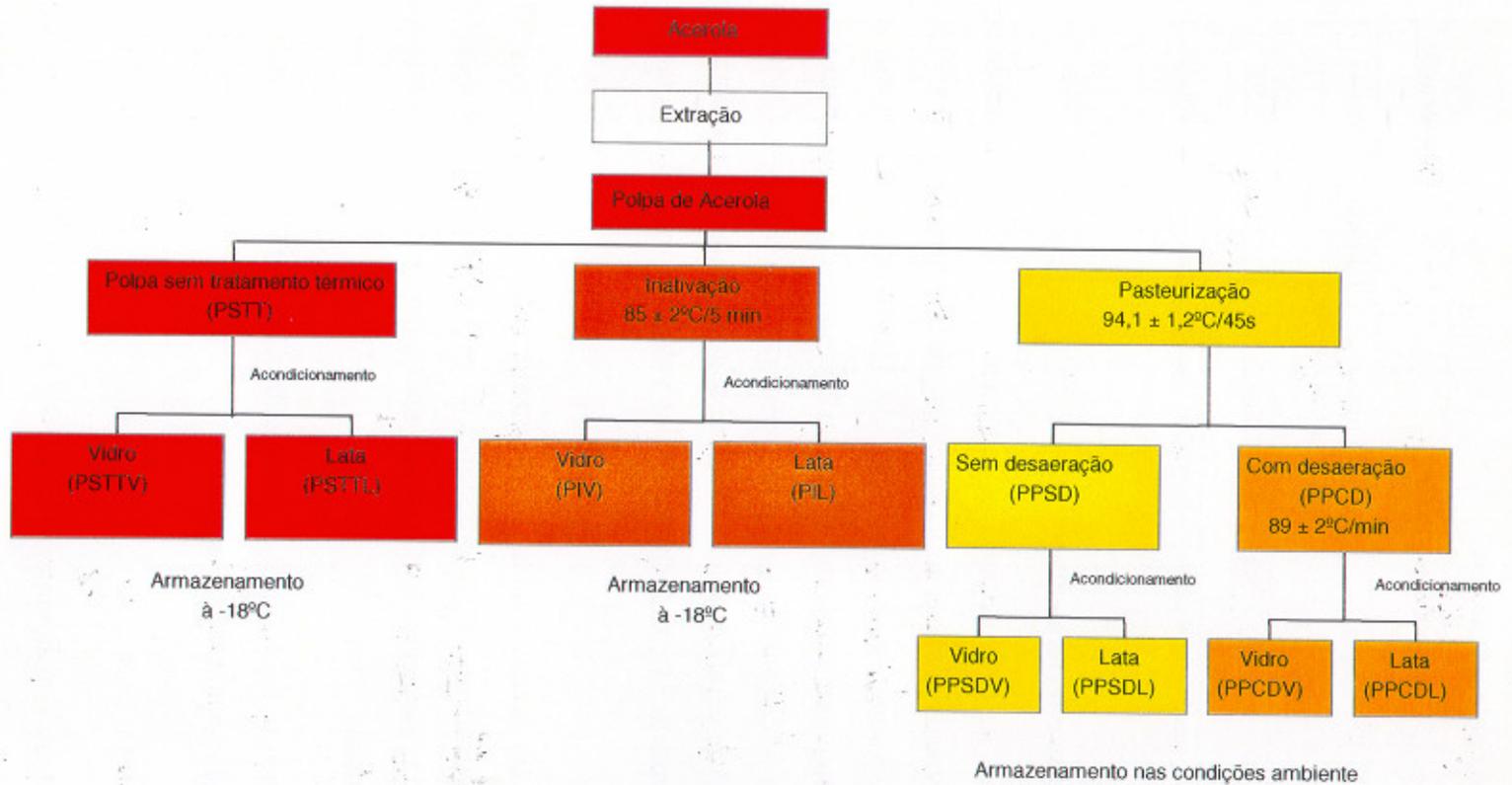


FIGURA 1. Fluxograma das etapas realizadas durante o processamento da polpa de acerola

Após todos os tratamentos dados às polpas de acerola, o experimento contou com 8 tipos de amostras, as quais serão abordadas no trabalho com os seguintes códigos:

PSTTV	polpa sem tratamento térmico armazenada em vidro
PSTTL	polpa sem tratamento térmico armazenada em lata
PIV	polpa inativada armazenada em vidro
PIL	polpa inativada armazenada em lata
PPSDV	polpa pasteurizada sem desaeração armazenada em vidro
PPSDL	polpa pasteurizada sem desaeração armazenada em lata
PPCDV	polpa pasteurizada com desaeração armazenada em lata
PPCDL	polpa pasteurizada com desaeração armazenada em lata

Além dessas polpas foram também realizadas algumas análises comparativas à “polpa doméstica” que aparecerá no texto com a sigla PD.

Para mostrar a diferença entre os tempos de armazenamento, em algumas tabelas foram usadas as siglas: T₀, T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, e T₆ as quais indicam os tempos zero, e 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente, meses após o processamento.

2.3. Análises químicas, físico-químicas e físicas

2.3.1. Acidez total titulável

Segundo o método 22.038 da AOAC (1984), associada a leitura potenciômetro e considerando-se o ponto de viragem em pH 8.1. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico e ácido málico.

2.3.2. Sólidos totais

Foi realizado de acordo com o método 22.018 da A.O.A.C. (1984).

2.3.3. Ácido ascórbico

Foi determinado pelo método de titulação com 2,6-diclorofenol indofenol (AOAC, N° 43.056, 1984), modificado por BENASSI (1990), com novas modificações descritas no capítulo III sobre o método.

2.3.4. Antocianinas totais

Foi determinada segundo a metodologia descrita por FULEKI & FRANCIS (1968).

2.3.5. pH

O pH foi determinado em potenciômetro da marca MICRONAL, tipo B-374, com calibração feita com soluções tampões de pH 4.0 e 7.0.

2.3.4. Sólidos solúveis (°Brix)

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado por leitura direta em refratômetro marca CARL ZEISS (JENA), modelo 32-G 110d, com correção de temperatura (20°C).

2.4. Análise microbiológica

As amostras foram analisadas quanto à contagem total de fungos e leveduras usando o meio RDBC (Dichloran-Bengalrot-Chloramphenicol-Ágar-Base, meio específico para sucos cítricos), incubando-se a 23°C por 5 dias; bactérias mesófilas em placas (Plate Count Agar) usando-se incubação a 35°C e diluições 10^{-1} a 10^{-3} por 48 horas e contagem de coliformes totais e fecais por diluições em tubos.

A metodologia seguiu padrões descritos pelo MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (1974). O armazenamento do RDBC foi em recipientes envolvidos com folha de alumínio, para proteger de possível contato com a luz do refrigerador. O preparo e inoculação no meio RDBC foram realizados em ambiente com o mínimo de luz. As análises foram realizadas nos tempo 0, 60, 120 e 180 dias após data de processamento.

2.5. Metodologia estatística

Segundo o planejamento do experimento, foi considerado um plano fatorial com dois fatores, embalagem e tratamento das polpas, variando em dois (0 e 1) e quatro níveis (0, 1, 2, e 3), respectivamente. Devido à suspeitas da possível influência do tempo nas medições das análises químicas, ele foi introduzido no experimento como um fator de blocagem. A magnitude desta influência foi testada nas análises. As análises estatísticas foram feitas testando a influência da embalagem, do tratamento das polpas e do tempo de

armazenamento. Além disso, foi realizado um estudo de correlação ampla entre as análises químicas testadas, tempo de armazenamento e embalagem usada. Para avaliação dos resultados de caracterização das polpas e dados experimentais com três repetições, foi empregada a análise de variância (ANOVA) e a significância determinada pelo emprego do teste F ($p \leq 0,05$). A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (DRAPER & SMITH, 1981; GOMES, 1990; MEAD & CURNOW, 1987; MONTGOMERY, 1991; MONTGOMERY & PECK, 1992; THE SAS SYSTEM, 1992; STATISTICA, 1995)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do armazenamento sobre os teores de ácido ascórbico

Os teores de ácido ascórbico, foram monitorados nos diferentes processados. Os resultados destas análises estão apresentados na Tabela 2. A partir da Tabela 2, os tratamentos dados às polpas de acerola que apresentarem ao final das siglas a letra **V** ou **L**, designará o tipo de embalagem das referidas polpas, que corresponderá à vidro(**V**) ou lata (**L**).

Para se verificar o nível de degradação dos teores de ácido ascórbico pelos diferentes tratamentos dados às polpas de acerola, tomou-se como padrão a polpa PSTT. Na comparação entre médias (Anexo 1, cap. IV) de um tratamento contra outro acerca da, pelo teste de Tukey, incluindo-se a polpa doméstica verificou-se que somente a comparação entre a polpa PSTT (polpa sem tratamento térmico) e a polpa PI (polpa inativada) não mostrou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade. No entanto, nesta comparação, o valor de probabilidade foi $p = 0,0552$ por isso é considerado muito arriscado para se afirmar que não há significância entre os tratamentos, por estar no limite do nível de 5% de probabilidade.

TABELA 2. Teores médios de ácido ascórbico e suas respectivas estimativas de desvios padrões em polpa de acerola durante o armazenamento de 180 dias

Teores de ácido ascórbico (mg/100g)	Tempo (dias)	Tratamentos da polpa de acerola								
		Polpa doméstica	PSTTV (%)	PSTTL (%)	PIV (%)	PIL (%)	PPSDV (%)	PPSDL (%)	PPCDV (%)	PPCDL (%)
	0	1078,07 (5,67) _a	1167,52 (8,35) _b	1167,52 (8,35) _b	1146,64 (9,51) _b	1146,64 (9,51) _b	1112,13 (2,93) _c	1112,13 (2,93) _c	1030,67 (2,84) _d	1030,67 (2,84) _d
	30		1103,66 (11,68)	1116,00 (4,14)	1075,54 (7,17)	1086,00 (9,09)	1010,30 (2,98)	1016,36 (2,49)	971,33 (2,33)	974,91 (2,42)
	60		1083,64 (8,32)	1099,31 (10,40)	1054,27 (9,05)	1060,00 (6,95)	946,11 (3,99)	957,13 (4,55)	911,16 (2,63)	922,07 (6,07)
	90		1037,33 (12,16)	1065,30 (8,14)	1038,36 (6,11)	1041,28 (10,74)	839,60 (6,91)	845,13 (8,80)	797,39 (6,85)	800,10 (4,37)
	120		976,66 (3,44)	1007,47 (12,65)	1025,30 (6,07)	1020,48 (3,91)	819,98 (2,94)	825,61 (3,20)	776,53 (6,70)	781,44 (2,98)
	150		969,59 (3,31)	995,94 (3,16)	950,40 (3,15)	958,90 (4,74)	775,44 (3,94)	777,11 (4,65)	749,32 (4,36)	756,33 (3,26)
	180		908,78 (6,32)	946,73 (6,27)	909,15 (3,43)	923,70 (6,78)	744,04 (2,60)	753,53 (1,11)	720,56 (1,38)	728,42 (2,07)

PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTT - polpa sem tratamento térmico em lata congeladas
 PIV - polpa inativada em vidro e PIL- polpa inativada em lata congeladas
 PPSDV - polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL - polpa pasteurizada sem desaeração em lata
 PPCDV - polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPCDL - polpa pasteurizada desaerada em lata
 Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$);

De acordo com a Tabela 2, a comparação entre os teores de AA (ácido ascórbico) da polpa doméstica e da polpa obtida pelo extrator, sem tratamento térmico indicaram um aumento de 7,67 % de ácido ascórbico. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a polpa produzida em laboratório apresenta um rendimento muito menor do que aquela produzida em maior escala; além disso, o extrator é muito mais eficiente na retirada da polpa do que o um processador doméstico. Isto significa que os resultados de laboratório podem subestimar os valores obtidos em escalas industriais, especialmente se não for seguido uma amostragem estatisticamente adequada.

Na tabela 2 os resultados mostraram os valores de degradação do ácido ascórbico de zero a seis meses de acordo com o tratamento dado às polpas de acordo com seus respectivos tipos de embalagens (vidro e lata). Nessa tabela, as polpas congeladas sem tratamento térmico, em vidro e em lata (PSTTV e PSTTL) apresentaram degradação do ácido ascórbico de 22,16% e 18,91%, respectivamente; nas polpas congeladas, inativadas termicamente (PIV e PIL) degradação foi de 20,71 e 19,44%, respectivamente; nas polpas pasteurizadas sem desaeração, armazenadas à temperatura ambiente (PPSDV e PPSDL), a degradação foi de 33,10 e 32,24%, respectivamente; e nas polpas pasteurizadas com desaeração, armazenadas à temperatura ambiente (PPDV e PPDL) a degradação foi de 30,09 e 29,33%, respectivamente.

TABELA 3. Perda dos teores de ácido ascórbico, em porcentagem, em polpa de acerola durante o armazenamento, em meses consecutivos

Diferença entre Tempo (dia)	Tratamentos da polpa de acerola								
	PSTTV	PSTTL	PIV	PIL	PPSDV	PPSDL	PPDV	PPDL	
$T_{30}-T_0$	-5,47 (6,15)	-4,62 (6,59)	-6,20 (3,88)	-5,29 (6,30)	-9,16 (2,96)	-8,61 (2,72)	-5,76 (2,60)	-5,41 (2,64)	
$T_{60}-T_{30}$	1,81 (5,36)	1,52 (7,92)	-0,68 (8,13)	-2,39 (8,02)	-6,35 (3,52)	-5,83 (3,67)	-6,19 (2,49)	-5,42 (4,62)	
$T_{90}-T_{60}$	-4,27 (5,55)	-3,19 (4,79)	-1,51 (4,15)	-1,77 (6,08)	-11,26 (5,64)	-11,70 (7,01)	-12,49 (5,19)	-13,23 (5,29)	
$T_{120}-T_{90}$	-5,85 (4,94)	-5,43 (5,64)	-1,26 (6,09)	-1,99 (4,08)	-2,34 (5,31)	-2,31 (6,62)	-2,61 (6,78)	-2,33 (3,74)	
$T_{150}-T_{120}$	-0,72 (3,38)	-1,14 (6,22)	-7,31 (4,48)	-6,03 (4,35)	-5,43 (3,48)	-5,87 (3,99)	-3,50 (5,65)	-3,21 (3,12)	
$T_{180}-T_{150}$	-6,27 (5,05)	-4,94 (4,97)	-4,34 (3,29)	-3,67 (5,85)	-4,05 (3,34)	-3,03 (3,38)	-3,84 (3,23)	-3,69 (2,73)	
Total de Perda (0-6meses)	22,16	18,9	20,71	19,44	33,09	32,24	30,09	29,33	

$T_{30}-T_0$ - significa diferença entre 30 dias e o dia zero de armazenamento...
 PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTTL - polpa sem tratamento térmico em lata congeladas
 PIV - polpa inativada em vidro e PIL- polpa inativada em lata congeladas;
 PPSDV - polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL - polpa pasteurizada sem desaeração em lata
 PPDV - polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPDL - polpa pasteurizada desacerada em lata

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados médios de degradação em meses consecutivos, dos teores de ácido ascórbico, em porcentagem, durante o armazenamento de 180 dias.

De acordo com a Tabela 3, as amostras de polpa de acerola, congeladas, (PSTTV, PSTTL, PIV, PIL) apresentaram uma redução acentuada nos teores de ácido ascórbico a partir de 90 dias de armazenamento, enquanto as amostras pasteurizadas, armazenadas à temperatura ambiente (PPSDV, PPSDL, PPDV, PDDL), começam a mostrar acentuada redução do ácido ascórbico a partir de 30 dias de armazenamento. Portanto, as polpas pasteurizadas, as quais foram submetidas ao tratamento térmico de pasteurização, apresentaram tendência a degradar mais o ácido ascórbico a cada 30 dias de armazenamento, nas condições ambientes.

Pelos dados da Tabela 3, também pode-se observar a variação nos teores de ácido ascórbico da polpa de acerola durante o armazenamento. Os resultados foram analisados pela diferença entre meses consecutivos de armazenamento. As amostras congeladas, sem tratamento térmico (PSTTV e PSTTL), mostraram menor diminuição do ácido ascórbico nos períodos de 30 para 60 dias e de 120 para 150 dias.

As amostras pasteurizadas (PPSDV, PPSDL, PPCDV e PPCDL) apresentaram perdas mais acentuadas até 90 dias de armazenamento. Após esse período, nota-se que as perdas do ácido ascórbico ocorreram em porcentagem menor, com valores semelhantes às amostras não pasteurizadas, congeladas. Ao final de seis meses, as amostras congeladas sem tratamento térmico e as congeladas inativadas tiveram uma perda de 18,9 a 22,16 % do ácido ascórbico, enquanto as amostras de polpa pasteurizadas tiveram uma perda que variou de 29,33 a 33,09 %. Estas últimas também apresentaram maior perda na coloração e maior formação de pigmentos escuros, possíveis de ser visualizadas.

A oxidação da vitamina C produz compostos com radical carbonila que reagem com grupos amino e por polimerização produzem pigmentos escuros, os quais são responsáveis pelo escurecimento dos sucos que contêm ácido ascórbico (GRAUMALICH et al., 1986). Apesar do efeito acelerador do oxigênio sobre a degradação do ácido ascórbico, esta ocorre preferencialmente em condições anaeróbicas e produz igualmente reações de escurecimento (GARCIA & ALVES, 1993).

Ao final dos seis meses de armazenamento houve uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) na degradação do ácido ascórbico entre as amostras congeladas e as não congeladas, tratadas termicamente. Os valores obtidos nesta investigação são semelhantes aos valores encontrados por SANCHEZ-NIEVA (1955), ROCHA(1988) nos estudos com suco de acerola pasteurizados, estocados à temperatura ambiente. Quanto à polpa sem tratamento térmico, congelada a -18°C , os resultados para as perdas de ácido ascórbico deste estudo foram relativamente menores quando comparado aos valores encontrados por OLIVA (1995).

Um dos fatores que tem influência direta na degradação do ácido ascórbico na acerola é o estágio de maturação do fruto e os tratos pós colheita. Vários autores encontraram valores mais altos para frutos mais verdes e à medida que amadurecem os teores do ácido ascórbico diminuem (SILVA & MENEZES, 1997; CARVALHO & MANICA, 1993; MEDEIROS,1969; NAKASONE et al., 1968; ITOÓ et al., 1990). Como a acerola tem uma vida pós colheita curta (ALVES,1996; LOPÉZ, 1963) exige ser condicionada adequadamente para diminuir o risco de perecibilidade mais rápido.

No manuseio das frutas pode haver ruptura do material celular, promovendo a liberação de enzimas como ascorbase oxidase e polifenoloxidase, que em presença de oxigênio, catalizam a oxidação do ácido ascórbico, diminuindo o teor da vitamina C (ASENJO, 1959; ASENJO, 1980). As ortoquinonas, produtos da atividade da polifenoloxidase, parecem estar relacionadas à oxidação do ácido ascórbico e outros constituintes (NAKASONE et al., 1966; PANTASTICO, 1975). Para NOGUEIRA et al. (1997), a presença do elevado teor de tanino na acerola pode ter grande importância na conservação da vitamina C, mesmo depois da polpa ser submetida a tratamento de alta temperatura.

Neste estudo, a análise de degradação do ácido ascórbico, considerando-se o tempo zero até o final de 6 meses de armazenamento, comparando-se as amostras congeladas (sem tratamento térmico e inativadas termicamente) e não congeladas tratadas termicamente houve diferença significativa a nível de 0,05%. Não houve diferença significativa no total de perdas do ácido ascórbico, nas polpas de acerola congeladas sem tratamento térmico e nas polpas inativadas termicamente. As polpas pasteurizadas desaeradas apresentaram

valores menores de degradação do ácido ascórbico comparativamente às polpas sem desaeração.

Vale ressaltar, que durante o armazenamento das polpas de acerola, ocorreu um estufamento das latas, observável a partir do segundo mês de armazenamento nas polpas a temperatura ambiente e após o quarto mês nas polpas congeladas. As polpas acondicionadas em vidros transparentes com tampa tipo garra-torção não permitiram verificar claramente esse fenômeno, nesse mesmo período, talvez devido a tampa ser mais resistente. Entretanto, ao final de seis meses, foi possível notar uma mudança na pressão para abrir a embalagem, provavelmente pelo vácuo formado após o enchimento à quente e posterior resfriamento.

As polpas enlatadas também apresentavam a polpa mais separadas do soro e maior dificuldade para homogeneizá-la do que as acondicionadas em vidro. As análises microbiológicas mostraram ausência de microrganismos produtores de gases. De acordo com GARCIA E ALVES (1993), a estabilidade dos sucos de frutas está relacionada com a ocorrência de reações químicas complexas que comprometem suas qualidades organolépticas (aroma, sabor, cor, consistência, estabilidade da turbidez, separação das fases sólido/líquido, etc.) e que também acarretam perdas nutricionais de vitaminas.

Dados experimentais têm indicado que o estufamento apresentado nas embalagens de polpa de acerola, está relacionado com a produção de CO₂ oriundos da decarboxilação do ácido 2,3-dicetogulônico (ASENJO, 1959; SANCHEZ-NIEVA, 1955), formado a partir da degradação do ácido ascórbico (NAGY, 1980) utilizando o oxigênio livre. De acordo com POLLARD & TIMBERLAKE (1971), em condições anaeróbicas, o ácido ascórbico rende aproximadamente quantidade equimolar de dióxido de carbono (CO₂) e furfural, sendo o primeiro o principal responsável pelo estufamento de produtos enlatados que continham grandes quantidades de ácido ascórbico.

De acordo com os resultados estatísticos (Anexo 2, cap.IV), o tempo de armazenamento influenciou significativamente à nível de 5% nos valores do ácido ascórbico, sendo o comportamento essencialmente linear, indicando que à medida que aumenta o tempo de armazenamento, também aumenta a degradação do ácido ascórbico.

Para verificar as interações dos principais efeitos do processamento nos teores de AA foi feita uma ANOVA detalhada (Anexo 3, cap. IV) com rigorosa análise de resíduo onde há evidência de normalidade nas provas diagnósticas (Anexo 3.1, cap.IV). Os resultados desta ANOVA mostraram que o tempo de armazenamento, o tipo de embalagem e o tipo de tratamento dado às polpas de acerola foram significativos. Todavia, analisando-se as interações pode-se verificar que os efeitos tempo *versus* tratamento e embalagem *versus* tratamento foram significativos, porém a interação tempo *versus* embalagem, mostrou não ser significativa; logo, o tipo de acondicionamento da polpa de acerola (vidro e de lata) nos diferentes tratamentos, influenciou significativamente os teores de AA.

3.2. Efeito do armazenamento sobre os teores de antocianinas

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram os valores de antocianinas totais da polpa de acerola submetidas a diferentes tratamentos durante o tempo de armazenamento de 180 dias. Considerando-se o período de armazenamento, verifica-se que, à medida que aumenta o tempo e quanto maior for o tratamento térmico nas polpas de acerola maior é a diminuição do valor das antocianinas. Posteriormente, será discutida a questão da influência de todas as variáveis envolvidas no processamento e armazenamento da polpa de acerola, por intermédio das análises estatísticas.

Ao final de 180 dias de armazenamento, não foi possível calcular o teor de antocianinas totais para as polpas pasteurizadas porque os valores encontrados através da espectroscopia mostravam resultados muito baixos, não confiáveis para cálculos, por estarem fora do previsto pela Lei de Beer.

De acordo com a Tabela 4, os valores médios das antocianinas, comparando-se a polpa doméstica e a produzida em planta em planta piloto (no extrator) sem tratamento térmico, apresentaram diferença significativa, no tempo zero de processamento. A polpa doméstica obtida em laboratório apresentou menor concentração de antocianinas quando comparada com a obtida no extrator. Essa significativa diferença ($p \leq 0,05$) pode ser explicada pelo fato de que o rendimento proporcional da polpa doméstica, é muito reduzido quando comparado ao da polpa sem tratamento térmico (PSTT) obtida em extrator. Outra explicação pode ser dada ao fato da despulpa em extrator ter maior efeito de pressão pelo

equipamento industrial que o equipamento doméstico. Assim, quanto maior a pressão no extrator industrial, maior o volume de polpa obtido, e maior a concentração das substâncias que compõem o fruto. Sendo a extração mais eficiente maior, é a concentração de pigmentos também.

TABELA 4. Teores médios de antocianinas totais e suas respectivas estimativas de desvios padrões, em polpa de acerola armazenada por 180 dias

	Tempo (dias)	Tratamentos da polpa de acerola								
		Polpa doméstica	PSTTV (%)	PSTTL (%)	PIV (%)	PIL (%)	PPSDV (%)	PPSDL (%)	PPDV (%)	PPDL (%)
Teor de antocianinas (mg/100g)	0	21,17 _a (0,10)	25,48 _b (0,01)	25,48 _b (0,01)	17,09 _c (0,001)	17,09 _c (0,001)	10,21 _d (0,04)	10,21 _d (0,04)	10,23 _d (0,01)	10,23 _d (0,01)
	30		24,90 (0,02)	24,76 (0,01)	16,28 (0,01)	16,35 (0,03)	8,63 (0,01)	8,79 (0,001)	9,16 (0,02)	9,15 (0,001)
	60		23,77 (0,22)	23,54 (0,17)	15,56 (0,09)	15,60 (0,08)	4,94 (0,04)	4,96 (0,05)	3,83 (0,05)	3,67 (0,03)
	90		22,89 (0,44)	22,57 (0,19)	14,71 (0,01)	14,85 (0,09)	3,17 (0,02)	3,20 (0,01)	2,93 (0,02)	2,67 (0,02)
	120		21,95 (0,18)	21,60 (0,02)	14,06 (0,01)	14,18 (0,09)	1,38 (0,04)	1,55 (0,01)	1,61 (0,02)	1,20 (0,02)
	150		20,61 (0,02)	20,25 (0,20)	13,25 (0,03)	13,37 (0,07)	1,26 (0,01)	1,43 (0,02)	1,47 (0,005)	1,10 (0,02)
	180		19,94 (0,01)	19,63 (0,02)	12,61 (0,004)	12,80 (0,003)	nd	nd	nd	nd

PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTTL - polpa sem tratamento térmico em lata, congeladas

PIV - polpa inativada em vidro e PIL- polpa inativada em lata, congeladas

PPSDV - polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL - polpa pasteurizada sem desaeração em lata

PPDV - polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPDL - polpa pasteurizada desaerada em lata

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

nd - não determinado

Para estudar o efeito do tratamento das polpas de acerola no tempo zero sobre os teores de antocianinas, foi feita uma comparação das médias. O resultado indicou uma

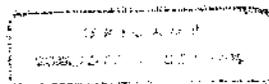
diferença altamente significativa entre os cinco tratamentos à nível de 0,05 % de probabilidade dado pelo teste de Tukey. Quando se compara um tratamento contra outro (Anexo 4,cap.IV) verifica-se que todos os tratamentos influenciaram diretamente nos teores de antocianinas, exceto a comparação entre a polpa pasteurizada não submetida a desaeração (PPSD) contra a polpa pasteurizada com desaeração (PPD), que não apresentaram diferenças significativas entre si. Portanto, o efeito de desaeração na polpa pasteurizada não foi importante no tempo zero.

Os resultados da Tabela 5, mostram as diferenças, em porcentagem, dos teores de antocianinas totais nos períodos consecutivos de armazenamento. De acordo com os resultados apresentados nesta tabela, os teores de antocianinas totais das polpas congeladas apresentaram perdas muito inferiores em relação às polpas não congeladas pasteurizadas, sendo que as primeiras mostraram maior degradação das antocianinas no período de 120 a 150 dias de armazenamento.

As polpas congeladas sem tratamento térmico (PSTTV e PSTTL) tiveram uma perda de antocianinas de 2,28 a 2,82% no período de zero a 30 dias de armazenamento, enquanto que as polpas inativadas congeladas (PIV e PIL) nesse período tiveram uma perda de 4,74 e 4,33%.

Analisando-se os resultados das polpas pasteurizadas não congeladas, sem e com desaeração (PPSD e PPCD) observou-se uma perda que variou de 13,91 a 15,48% e 10,48 a 10,56%, respectivamente, no primeiro mês de armazenamento. Estas últimas tiveram maior porcentagem de perdas de antocianinas nos períodos de 30 a 60 dias e 90 a 120 dias, respectivamente. Ao final de seis meses de armazenamento as polpas sem tratamento térmico (PSTTV e PSTTL) apresentaram perdas de 21,74 e 22,96%, respectivamente, das antocianinas totais e as polpas inativadas termicamente (PIV e PIL) tiveram uma perda de 26,21 e 25,10 %, respectivamente; essas diferenças foram significativas a nível de 5% de probabilidade. A polpa inativada, teoricamente, está mais protegida da ação enzimática, no entanto o efeito térmico da inativação permitiu grande vulnerabilidade à degradação das antocianinas.

As antocianinas são severamente danificadas durante o processamento de frutas (MARKAKIS, 1982). A velocidade de degradação das antocininas em sistemas modelos e



sistemas naturais é significativamente influenciada pela temperatura de processamento e de estocagem (STRINGHETA,1991; SIMARD et al.,1982). No entanto, a estabilidade da cor das antocianinas depende, da natureza dos açúcares ligados, assim os galactosídeos de cianidina e peonidina são mais estáveis que os respectivos arabinosídeos (STARR & FRANCIS,1968).

TABELA 5. Perda dos teores de antocianinas totais, em porcentagem, e suas respectivas estimativas de desvios padrões da polpa de acerola em meses consecutivos de armazenamento

	Diferença entre Tempo (dia)	Tratamentos da polpa de acerola							
		PSTTV	PSTTL	PIV	PIL	PPSDV	PPSDL	PPDV	PPDL
Perda de antocianinas totais (mg/100g)	T ₃₀ -T ₀	2,28 (0,01)	2,82 (0,01)	4,74 (0,007)	4,33 (0,02)	15,48 (0,03)	13,91 (0,03)	10,48 (0,01)	10,56 (0,007)
	T ₆₀ -T ₃₀	4,82 (0,09)	4,92 (0,08)	4,42 (0,02)	4,59 (0,02)	42,76 (0,03)	43,57 (0,03)	58,21 (0,03)	59,89 (0,02)
	T ₉₀ -T ₆₀	3,41 (0,18)	4,12 (0,11)	5,46 (0,02)	4,81 (0,05)	35,83 (0,03)	35,48 (0,04)	23,46 (0,03)	27,25 (0,02)
	T ₁₂₀ -T ₉₀	4,11 (0,17)	4,26 (0,08)	4,42 (0,01)	4,51 (0,04)	56,47 (0,02)	51,56 (0,01)	54,79 (0,02)	55,06 (0,02)
	T ₁₅₀ -T ₁₂₀	6,10 (0,06)	5,77 (0,06)	5,76 (0,01)	5,71 (0,04)	8,70 (0,02)	9,67 (0,01)	8,47 (0,01)	8,33 (0,02)
	T ₁₈₀ -T ₁₅₀	3,25 (0,01)	3,06 (0,06)	4,91 (0,02)	4,26 (0,02)	nd	nd	nd	nd
	Total de Perda (0-6 meses)	21,74 (0,16)	22,96 (0,09)	26,21 (0,03)	25,10 (0,04)				

PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTTL - polpa sem tratamento térmico em lata, congeladas
 PIV - polpa inativada em vidro e PIL - polpa inativada em lata, congeladas
 PPSDV - polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL - polpa pasteurizada sem desaeração em lata;
 PPCDV - polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPCDL - polpa pasteurizada desaerada em lata
 nd- não determinado

De acordo com os resultados da Tabela 5 as polpas de acerola pasteurizadas apresentaram uma progressiva e grande perda dos teores antociânicos à medida que aumentou o tempo de estocagem. Segundo ADAMS & ONGLEY (1973), o aquecimento das antocianinas em pH de 2,0 a 4,0 provoca inicialmente a hidrólise da ligação glicosídica das antocininas, que é o principal efeito de perda de cor do pigmento. Pode-se afirmar, então, que a temperatura de pasteurização, embora esta tenha sido realizada em pasteurizador tubular e em tempo relativamente curto, teve efeito altamente destrutivo sobre a cor das antocianinas da polpa de acerola, como se pode ver na Figura 1.

Na Figura 2 pode-se verificar que a cor da polpa de acerola foi modificando-se de vermelho alaranjado, sem tratamento térmico, tornando-se menos vermelha com a inativação, e cada vez mais amarela com a pasteurização e desaeração. Portanto, à medida que a polpa foi submetida à maior temperatura, a cor foi sendo mais degradada, havendo uma relação inversamente proporcional entre temperatura e cor.

As polpas de acerola, em todos os períodos de armazenamento apresentaram pequenas diferenças quando acondicionadas em lata ou em vidro. Para analisar as diferenças e a influência do tempo de armazenamento e dos tratamentos dados às polpas foram empregados alguns métodos estatísticos discutidos a seguir.

Devido à ausência dos teores das antocianinas para o tempo de 6 meses, relativo aos tratamentos que envolvem a pasteurização das polpas de acerola, a análise foi dividida em duas partes. Uma trata dos resultados de antocianinas para as polpas não pasteurizadas (polpas sem tratamento térmico (PSTTV e PSTTL) e polpas inativadas pelo calor (PIV e PIL), codificada nesta seção como **Acy1** e outra parte destina-se ao estudo das antocianinas das polpas pasteurizadas sem desaeração (PPSDV e PPSDL) e com desaeração (PPDV e PDDL), codificada como **Acy2**.

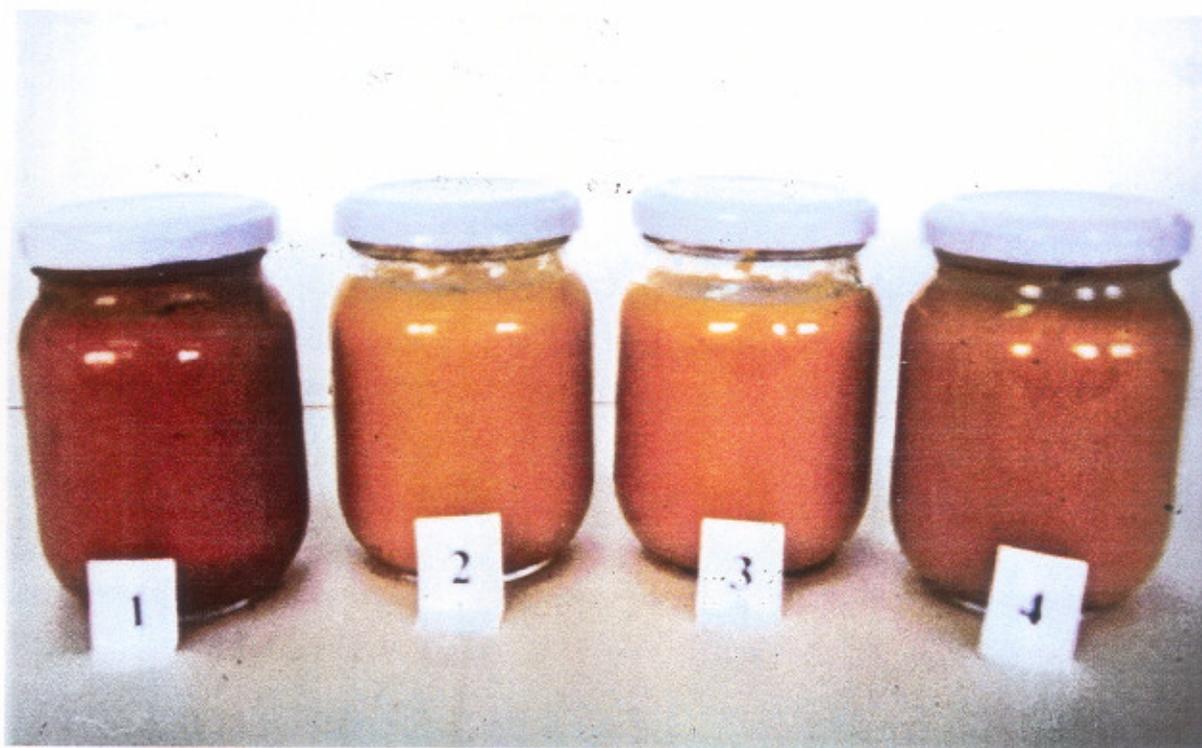


FIGURA 2. Fotos das polpas de acerola no tempo zero de processamento . Da esquerda para direita: PSTT, PI, PPSD, PPCD.

De acordo com os resultados da ANOVA apresentados no Anexo 5 (cap.IV), pode-se verificar que o tempo de armazenamento é uma variável com influência altamente significativa nos teores de antocianinas. A análise mostra um comportamento essencialmente linear, indicando que à medida que aumenta o tempo de armazenamento, diminuem os teores de antocianinas. Os resultados obtidos na ANOVA detalhada (Anexo 6, cap.IV), cuja análise contemplou todos os possíveis efeitos das variáveis envolvidas no processamento da polpa de acerola, em concordância com a análise dos resíduos (Anexo 6, cap.IV), mostraram que o tempo de armazenamento, o tipo de embalagem e o tipo de tratamento influenciaram significativamente nos teores das antocianinas (Acy 1), além da interação tempo *versus* tratamento.

Conclui-se, portanto, que os teores de antocianinas (Acy 1) das polpas de acerola PSTT e PI, congeladas, variaram no decorrer do tempo de armazenamento de modo decrescente. A embalagem lata, forneceu maiores resultados nesta determinação analítica. Foi também verificado diferença significativa em relação aos tratamentos aplicados nas polpas PSTT e PI.

A ANOVA que trata dos teores das antocianinas das polpas pasteurizadas (com e sem desaeração), analisadas nos 5 primeiros meses, codificadas de Acy 2, (Anexo 7, cap.IV) mostrou que os fatores significativos foram: o tempo de armazenamento e o tipo de tratamento dados às polpas, além da interação tempo *versus* tratamento. Os resultados da análise dos resíduos confirmaram a hipótese de normalidade requerida (Anexo 7.1, cap.IV). Na análise dos principais efeitos apontados como significativos na ANOVA, confirmou-se que existe uma tendência para valores menores de antocianinas (Acy 2) no decorrer do tempo de armazenamento, e, a desaeração na polpa pasteurizada, ao final de 150 dias de armazenamento teve um efeito significativo, porém o tipo de embalagem não influenciou nos teores das antocianinas das referidas polpas.

3.3. Efeito do armazenamento sobre os valores de acidez total titulável na polpa de acerola

Os valores médios de acidez total titulável expressa em % de ácido málico e de ácido cítrico, estão apresentados na Tabela 6. Os resultados da acidez total expressa em ácido cítrico mostraram que, no tempo zero, as polpas domésticas e as extraídas no

extrator sem tratamento térmico (PSTT) mantiveram o valor de 0,77% e as polpas processadas, inativadas e pasteurizadas apresentaram uma pequena perda da acidez.

TABELA 6. Valores de Acidez total titulável em ácido cítrico e em ácido málico da polpa de acerola em diferentes tratamentos, com suas respectivas estimativas de desvios padrões, durante o armazenamento

Determinações	Armazenamento (dias)	Tratamentos da polpa de acerola								
		Polpa doméstica	PSTTV	PSTTL	PIV	PIL	PPSDV	PPSDL	PPDV	PPDL
Acidez titulável/ ac.cítrico (%)	0	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,75 (0,01)	0,75 (0,01)	0,74 (0,01)	0,74 (0,01)	0,74 (0,00)	0,74 (0,01)
	30		0,76 (0,00)	0,76 (0,01)	0,74 (0,01)	0,73 (0,01)	0,73 (0,01)	0,73 (0,02)	0,73 (0,01)	0,74 (0,01)
	60		0,74 (0,01)	0,74 (0,01)	0,74 (0,01)	0,73 (0,01)	0,72 (0,01)	0,72 (0,01)	0,73 (0,01)	0,74 (0,02)
	90		0,74 (0,01)	0,75 (0,01)	0,74 (0,01)	0,74 (0,01)	0,72 (0,02)	0,71 (0,01)	0,72 (0,01)	0,72 (0,02)
	120		0,74 (0,01)	0,75 (0,02)	0,74 (0,01)	0,74 (0,02)	0,71 (0,01)	0,72 (0,01)	0,71 (0,01)	0,71 (0,00)
	150		0,73 (0,01)	0,74 (0,01)	0,73 (0,02)	0,73 (0,01)	0,70 (0,02)	0,71 (0,02)	0,70 (0,02)	0,71 (0,01)
	180		0,73 (0,01)	0,73 (0,01)	0,71 (0,01)	0,70 (0,02)	0,69 (0,02)	0,69 (0,02)	0,69 (0,02)	0,69 (0,01)
Acidez titulável/ ácido málico (%)	0	0,80 (0,01)	0,81 (0,01)	0,81 (0,01)	0,79 (0,01)	0,79 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)
	30		0,80 (0,01)	0,80 (0,01)	0,77 (0,01)	0,76 (0,01)	0,75 (0,01)	0,76 (0,02)	0,76 (0,01)	0,76 (0,01)
	60		0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,75 (0,01)	0,75 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,02)
	90		0,77 (0,01)	0,78 (0,01)	0,77 (0,01)	0,78 (0,01)	0,75 (0,01)	0,74 (0,01)	0,75 (0,01)	0,75 (0,01)
	120		0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,77 (0,01)	0,76 (0,01)	0,74 (0,01)	0,74 (0,01)	0,74 (0,02)	0,74 (0,01)
	150		0,76 (0,01)	0,77 (0,01)	0,76 (0,02)	0,77 (0,01)	0,73 (0,02)	0,74 (0,01)	0,73 (0,01)	0,74 (0,01)
	180		0,76 (0,01)	0,76 (0,01)	0,74 (0,01)	0,73 (0,01)	0,72 (0,01)	0,72 (0,01)	0,72 (0,01)	0,72 (0,01)

PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTTL- polpa sem tratamento térmico em lata, congeladas
 PIV – polpa inativada em vidro e PIL- polpa inativada em lata, congeladas
 PPSDV – polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL – polpa pasteurizada sem desaeração em lata
 PPCDV – polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPCDL – polpa pasteurizada com desaeração em lata

No tempo zero de armazenamento, parece haver uma relação entre o valor da acidez total e a perda do ácido ascórbico pelo processamento. Todavia, esse comportamento não é bem definido ao longo do tempo de armazenamento nas polpas processadas que sofreram ação da temperatura. Os valores de acidez total expressa tanto em ácido cítrico quanto em ácido málico, sofreram pequenas variações no período de armazenamento.

Ao final do período de seis meses de armazenamento, pode-se notar uma perda aproximadamente de 5% da acidez total expressa em ácido málico e em ácido cítrico, em todas as polpas, quando considerados os desvios padrões.

Os valores de acidez total expressa em ácido cítrico e em ácido málico durante o período de armazenamento de seis meses, mostrou diferença significativa à nível de 5% de probabilidade. Daí, torna-se necessário decidir se os valores devem ser expressos em ácido málico ou em ácido cítrico.

De acordo com as análises de variância (Anexos 8 e 9), os resultados de acidez expressa em ácido cítrico mostraram que o tempo de armazenamento e o tratamento apresentaram uma influência altamente significativa nesta análise. Quanto ao tipo de embalagem não houve influência nos resultados de acidez expressa em ácido cítrico.

Foram realizadas análises de regressão para estudar a significância dos principais efeitos do processamento (tempo de armazenamento, embalagem e tratamento das polpas de acerola). Como é mais comum na literatura os valores de acidez total em sucos de frutas, serem expressos em ácido cítrico, os resultados obtidos nessa determinação foram tomados para calcular a análise de variância.

Os parâmetros de regressão apresentados no Anexo 10 (cap.IV) confirmam que o tempo e tratamento são variáveis altamente significativas na determinação da acidez total expressa em ácido cítrico na polpa de acerola e o tipo de embalagem não influenciou nos resultados. Os coeficientes de regressão mostraram que a interação das variáveis estudadas pode ser explicada por $R_{ajust} = 74,4\%$.

No estudo sobre a fisiologia de frutos de acerola realizado por GUADARRAMA (1984) foi observado que a acidez total diminuía com a diminuição do conteúdo de ácido ascórbico principalmente quando o fruto passa do estágio “de vez” para o maduro. Tal relação também já havia sido investigada por SANTINI (1953) onde ele observou que a perda da acidez total variava proporcionalmente em relação à perda do ácido ascórbico na acerola, embora esta relação não ocorresse linearmente. Esse comportamento é devido à influência dos outros ácidos orgânicos que estão presentes, particularmente o ácido málico, que constitui 50% do total dos ácidos presentes na acerola (ASENJO, 1959; SANTINI, 1953).

Considerando-se o tempo de armazenamento, os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes aos obtidos por MATSUURA (1994). Também foi observado uma crescente diminuição nos teores de ácido ascórbico acompanhada da diminuição da acidez total em suco integral de acerola congelado a -18°C .

Para destacar estas variações foi realizada uma análise para mostrar a relação entre perda de acidez total e de ácido ascórbico nas polpas de acerola, em porcentagem, obtidas neste experimento. Os resultados desta análise estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. Perda de acidez total expressa em ácido málico e em ácido cítrico, perda de ácido ascórbico e relação de perdas entre acidez total e ácido ascórbico, em porcentagem, após 180 dias de armazenamento

	PSTT	PI	PPSD	PPCD
Acidez total *	5,19	5,33	6,76	6,76
Acidez total **	6,17	6,33	6,49	6,49
AA	20,53	20,08	32,66	29,71
$\text{AcT}_{\text{cítrico}}/\text{AA}$	0,25	0,26	0,21	0,23
$\text{AcT}_{\text{málico}}/\text{AA}$	0,30	0,31	0,20	0,22

PSTT- polpa sem tratamento térmico, armazenado a -18°C ; PI- polpa com inativação térmica, armazenado a -18°C ; PPSD- polpa pasteurizada sem desaeração, armazenada a temperatura ambiente; PPCD- polpa pasteurizada com desaeração, armazenada a temperatura ambiente; AA- ácido ascórbico;
* expressa em ácido cítrico; ** expressa em ácido málico

Os valores de acidez total das polpas de acerola (Tabela 7), correspondem às médias absolutas, em porcentagem, dos resultados de cada tratamento independente da embalagem, uma vez que esta variável não parece ter influência nas polpas em estudo. Na relação acidez total/AA (com acidez expressa em ácido cítrico e em ácido málico) pôde-se verificar que os produtos congelados apresentaram resultados maiores que os produtos não congelados, indicando, portanto, que houve menor degradação do ácido ascórbico nas primeiras, ao contrário das polpas não congeladas, conseqüentemente menor diminuição da acidez total. Logo, os resultados anteriormente discutidos sobre as perdas do ácido ascórbico nas polpas de acerola ao longo do armazenamento parecem estar intimamente relacionados com os valores de acidez total desses produtos.

Outro dado a ser discutido está na forma como se expressa a acidez total. Os resultados (Tabela 7) mostram que a acidez total expressa em ácido cítrico parece mais adequada nos produtos de acerola congelados. Já os produtos não congelados, pasteurizados parecem não ser influenciados, quando observada a relação acidez total/ AA, embora os valores tenham sido maiores na acidez total expressa em ácido cítrico. No estudo de correlação, discutido posteriormente, os produtos armazenados sob congelamento apresentaram maior correlação negativa do pH com a acidez expressa em ácido cítrico e maior correlação positiva do pH com a acidez expressa em ácido málico para as polpas de acerola pasteurizadas armazenadas a temperatura ambiente.

3.4. Efeito do armazenamento sobre os valores de °Brix em polpa de acerola

Na Tabela 8 estão demonstrados os valores de °Brix da polpa de acerola armazenada durante 180 dias. Os resultados mostraram que a polpa doméstica apresentou menor valor de °Brix que as polpas processadas em extrator. Notou-se também que, o efeito térmico da inativação, promoveu maior aumento nos valores de °Brix comparados às polpas sem tratamento térmico e as pasteurizadas.

Ao final do período de armazenamento de 180 dias, foi verificado que todas as polpas tratadas termicamente apresentaram aumento nos resultados de °Brix, sendo superiores nas pasteurizadas sem desaeração ($\cong 2,3\%$). Embora o efeito da inativação tenha sido favorável no processamento (no tempo zero de processamento) para aumentar os valores do °Brix, o efeito da temperatura de armazenamento (congelamento) pareceu não

permitir que tal aumento ocorresse em proporções semelhante às polpas tratadas termicamente pela pasteurização.

TABELA 8. Valores de °Brix da polpa de acerola em diferentes tratamentos, durante 180 dias de armazenamento

	Tempo (dias)	Tratamentos da polpa de acerola								
		Polpa doméstica	PSTTV	PSTTL	PIV	PIL	PPSDV	PPSDL	PPDV	PPDL
° Brix (20°C)	0	7,05 (0,05)	7,45 ±0,00	7,45 (0,00)	7,64 (0,01)	7,64 (0,01)	7,50 (0,00)	7,50 (0,00)	7,51 (0,00)	7,51 (0,00)
	30		7,66 (0,00)	7,66 (0,00)	7,66 (0,00)	7,63 (0,00)	7,63 (0,00)	7,66 (0,00)	7,66 (0,00)	7,65 (0,01)
	60		7,59 (0,01)	7,62 (0,01)	7,73 (0,01)	7,74 (0,00)	7,59 (0,02)	7,61 (0,01)	7,62 (0,01)	7,62 (0,01)
	90		7,66 (0,00)	7,66 (0,00)	7,80 (0,01)	7,81 (0,00)	7,62 (0,00)	7,62 (0,01)	7,62 (0,02)	7,61 (0,01)
	120		7,65 (0,00)	7,65 (0,00)	7,81 (0,01)	7,80 (0,01)	7,56 (0,0)	7,42 (0,00)	7,59 (0,02)	7,58 (0,00)
	150		7,61 (0,00)	7,63 (0,01)	7,80 (0,01)	7,81 ±0,01	7,55 (0,01)	7,42 (0,00)	7,62 (0,01)	7,63 (0,00)
	180		7,57 (0,01)	7,58 (0,01)	7,78 (0,01)	7,78 (0,00)	7,65 (0,01)	7,69 (0,01)	7,65 (0,00)	7,65 (0,01)
	Varição* (0-6 meses) (%)		+ 1,61	+ 1,74	+ 1,85	+ 1,88	+ 2,03	+ 2,57	+ 1,89	+ 1,89

PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTTL - polpa sem tratamento térmico em lata congeladas
 PIV - polpa inativada em vidro e PIL- polpa inativada em lata congeladas
 PPSDV - polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL - polpa pasteurizada sem desaeração em lata
 PPCDV - polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPCDL - polpa pasteurizada com desaeração em lata

O aumento nos valores de °Brix estão relacionados às transformações ocorridas nas polpas durante a estocagem, onde a presença de açúcares, embora em pequena concentração pode sofrer hidrólise em meio ácido, o que poderia ser responsável pelo aumento dos sólidos solúveis.

Resultados contrários foram encontrados por TJIN AKWIE et al.,(1998) ao estudarem bebidas mistas de maracujá-acerola (13:17%), refinadas em moinho coloidal e em moinho refinador, ambas pasteurizadas em sistema batch e pasteurização direta ao fogo. As condições de pasteurização foram de 90°C/1s e 90°C/10min. Os resultados destes autores mostraram que não houve diferença na leitura de °Brix antes e depois das diferentes condições de pasteurização. As variações ocorridas nos valores de °Brix no processamento das polpas de acerola supõem-se, no entanto, que estão mais relacionadas com as variáveis do processamento e com a composição do produtos.

Neste experimento foi verificado que as polpas que apresentaram maior aumento de °Brix (PPSD e PPCD) corresponderam às polpas que também apresentaram maior índice de perda de ácido ascórbico ao final de 180 dias de armazenamento. De acordo com RAHMAN et al.,(1964) existem menores perdas de vitamina C nos produtos com maior teor de sólidos solúveis.

Os sólidos solúveis totais têm sido utilizados como índice de maturidade para alguns frutos, como por exemplo laranja, e indicam a quantidade de sólidos que se encontram dissolvidos no suco, sendo constituído na sua maior parte por açúcares. Na acerola, nas condições climáticas brasileiras, encontra-se valores de 5 até no máximo de 12°Brix, sendo a média em torno de 7-8°Brix . As chuvas ou irrigação excessiva na acerola, na maioria das vezes reduz o conteúdo de açúcares (°Brix), como é o caso de plantios no Nordeste, onde o °Brix atinge valores próximos a 5,0 por ocasião das chuvas (ALVES,1996). Segundo o mesmo autor, uma das exigências para exportação de acerola com relação °Brix é de que este deve ser no mínimo 7,0 para Europa ou 7,5 para Japão.

Na Tabela 9, estão apresentados os valores da relação °Brix /acidez total. Os resultados entre 9,16 e 10,99 °Brix, indicam que as polpas estão dentro dos parâmetros normais de qualidade quanto ao equilíbrio doce-ácido. Esses valores estão relacionados com o ponto de colheita dos frutos, e a acerola destinada a este estudo estava no estágio de maturação com a cor mais vermelha. Nesse estágio, afirmam BLEINROTH et al.(1996), o fruto apresenta o máximo de qualidade, ou seja, elevado teor de açúcar e baixa acidez.

TABELA 9. Relação °Brix/Acidez da polpa de acerola em diferentes tratamentos, durante 180 dias de armazenamento

	Tempo (dias)	Tratamentos da polpa de acerola								
		Polpa doméstica	PSTTV	PSTTL	PIV	PIL	PPSDV	PPSDL	PPDV	PPDL
°Brix/Acidez Titulável	0	9,16	9,67	9,67	10,18	10,18	10,00	10,00	10,00	10,00
	30		10,08	10,08	10,35	10,45	10,45	10,49	10,49	10,34
	60		10,26	10,30	10,44	10,60	10,54	10,57	10,44	10,30
	90		10,35	10,21	10,57	10,58	10,58	10,73	10,58	10,57
	120		9,94	10,20	10,58	10,58	10,65	10,31	10,69	10,45
	150		10,34	10,31	10,75	10,73	10,79	10,45	10,81	10,45
	180		10,37	10,38	10,80	10,94	10,94	10,99	10,88	10,88

PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTTL- polpa sem tratamento térmico em lata, congeladas
 PIV – polpa inativada em vidro e PIL - polpa inativada em lata, congeladas
 PPSDV – polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL – polpa pasteurizada sem desaeração em lata
 PPCDV – polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPCDL – polpa pasteurizada com desaeração em lata

Pelos resultados estatísticos (Anexo 11 e 12, cap.IV), pode-se verificar que os valores de °Brix deste experimento não apresentaram um comportamento linear. Segundo a análise de regressão foi mostrado que o tempo de estocagem e o tipo de embalagem do produto não influenciaram os resultados obtidos. Os dados estatísticos ($R-sq=10,3\%$) também mostram que o modelo da regressão não foi bom. Isto pode ser devido ao comportamento não linear de alguma variável envolvida. Portanto, os parâmetros da regressão não podem servir como preditivos para o comportamento dos valores de °Brix, nas condições experimentais analisadas.

Na investigação realizada por NAKASONE et al., (1968) com acerola, acerca dos valores de °Brix, concluíram que os valores de °Brix não têm relação com o peso do fruto, nem com os conteúdos de ácido ascórbico. Entretanto, foi observado uma correlação positiva entre os valores de °Brix com o estágio maduro da acerola e correlação negativa entre a maturidade do fruto com o teor de ácido ascórbico (LÓPEZ, 1963). No estudo com suco de laranja para verificar a influência de °Brix e teor de polpa sobre a viscosidade do produto, concluiu-se que cuidados devem ser tomados com as extrapolações ou

interpolação quando se tratam dessas variáveis, para condições muito diferentes dos dados experimentais, principalmente de temperatura, pois a precisão do modelo pode ser afetada (MARQUES & MEIRELLES, 1996).

3.5. Efeito do armazenamento sobre os valores de sólidos totais em polpa de acerola

Na Tabela 10 estão os valores de sólidos totais para polpas de acerola. Verificou-se que os resultados obtidos na polpa doméstica são menores do que nas polpas processadas em planta piloto. Isto é devido às diferenças de como se obteve a polpa em ambos os casos, conforme discussões anteriores.

Comparando-se os valores de sólidos totais, nota-se que o processamento da polpa provocou uma alteração nos resultados, que serão estudados estatisticamente adiante. Notou-se também que, durante a estocagem, os valores de sólidos totais não mantiveram uma tendência crescente linear com pequena oscilação. Isto pode ser explicado pela própria dificuldade de execução do método, pois essa determinação analítica segundo CARVALHO et al.(1990), envolve evaporação de água e ação do calor podendo ocorrer caramelização de compostos tipo açúcares e proteínas, além da degradação de outros componentes. Assim, o teor de sólidos totais de um produto representa, teoricamente, valor igual ou inferior ao valor real.

Ao final do período de seis meses de armazenamento, pôde-se verificar que os sólidos totais em todas as polpas, em estudo, diminuíram, sendo que as polpas congeladas sem tratamento térmico foram as que tiveram um menor índice de diminuição que variou de 1,43 a 1,90%, seguido das polpas inativadas, congeladas e polpas pasteurizadas sem desaeração, que tiveram uma diminuição aproximadamente de 5,25 a 8,40% e 5,30 a 5,93%, respectivamente. Já as polpas pasteurizadas desaeradas tiveram uma perda de sólidos totais maiores que variou de 9,96 a 10,21%.

Para investigar os efeitos do tempo, embalagem e tratamento dado às polpas de acerola em relação aos valores de sólidos totais, foi feito estudo estatístico descrito nos Anexos 13 e 14.

TABELA 10. Valores de sólidos totais da polpa de acerola para diferentes tratamentos, durante o armazenamento

Sólidos totais (%)	Tempo (dias)	Tratamentos da polpa de acerola								
		Polpa doméstica	PSTTV	PSTTL	PIV	PIL	PPSDV	PPSDL	PPDV	PPDL
	0	7,36 (0,01)	8,41 (0,02)	8,41 (0,02)	8,57 (0,01)	8,57 (0,01)	7,92 (0,01)	7,92 (0,01)	8,13 (0,01)	8,13 (0,01)
	30		8,46 (0,01)	8,45 (0,02)	8,56 (0,02)	8,47 (0,01)	7,87 (0,01)	7,93 (0,03)	8,13 (0,01)	8,05 (0,11)
	60		8,35 (0,02)	8,41 (0,02)	8,53 (0,03)	7,73 (0,03)	7,89 (0,05)	8,09 (0,06)	8,03 (0,05)	7,66 (0,02)
	90		8,00 (0,37)	7,66 (0,01)	7,45 (0,02)	7,44 (0,02)	7,47 (0,02)	7,54 (0,03)	7,68 (0,02)	7,53 (0,03)
	120		7,95 (0,02)	7,90 (0,04)	7,66 (0,37)	7,66 (0,09)	7,67 (0,09)	7,49 (0,29)	7,56 (0,03)	7,58 (0,04)
	150		7,92 (0,07)	7,78 (0,03)	7,75 (0,01)	7,88 (0,05)	7,54± (0,10)	7,38 (0,03)	7,47 (0,13)	7,43 (0,05)
	180		8,25 (0,11)	8,29 (0,02)	8,12 (0,03)	8,06 (0,04)	7,50 (0,04)	7,45 (0,05)	7,32 (0,08)	7,30 (0,08)

PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTTL - polpa sem tratamento térmico em lata, congeladas
 PIV - polpa inativada em vidro e PIL- polpa inativada em lata, congeladas
 PPSDV - polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL - polpa pasteurizada sem desaeração em lata
 PPCDV - polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPCDL - polpa pasteurizada com desaeração em lata

De acordo com a ANOVA (Anexo 13), existe alta influência do tempo de armazenamento nos sólidos totais. O tipo de embalagem não influenciou nos resultados desta análise química.

Pelos resultados da análise de regressão (Anexo 14), onde estão detalhadas as informações sobre as variáveis envolvidas na análise, pode-se confirmar que o tempo de armazenamento e os diferentes tratamentos dados às polpas de acerola influenciaram diretamente nos resultados dos sólidos totais. O valor ajustado de R= 60,2%, indica que os parâmetros de regressão não podem servir rigorosamente para valores de extrapolação dos dados. Algumas explicações para esses dados devem ser cuidadosamente discutidas.

Reportando-se aos resultados mostrados na Tabela 10, ao comparar os valores de sólidos totais, no tempo zero de armazenamento, da polpa sem tratamento térmico (PSTT) com as polpas submetidas aos tratamentos térmicos (polpas inativada e pasteurizadas), pode-se dizer que o aumento de 1,90% dos valores de sólidos totais na polpa inativada está relacionado à ação da temperatura de inativação por evaporação rápida e pequena sobre a polpa, concentrando os sólidos totais.

Ao comparar as diferenças nos teores de sólidos totais da polpa sem tratamento térmico (PSTT) com a pasteurizada sem desaeração, a diminuição foi de 5,83%, e na polpa desaerada, a diminuição foi de 3,33%. Portanto, a desaeração favoreceu o aumento de sólidos totais. O processo de desaeração facilitou a concentração da polpa de acerola, com isso aumentou o conteúdo de sólidos totais em relação à polpa não desaerada.

Os resultados de sólidos totais desta investigação na polpa sem tratamento térmico foram inferiores aos encontrados por MATSUURA (1994) que foi de 9,63% e superiores aos encontrados por OLIVA (1995) que foi de 7,40%. As diferenças entre os valores são resultados da influência de inúmeros fatores como variedade, época de colheita, clima, solo etc, semelhantes aos fatores descritos anteriormente para sólidos solúveis, além de variáveis interferentes a que está sujeito o próprio método, como por exemplo o tempo e temperatura da análise e a higroscopicidade da amostra que leva a erros no momento da medição.

3.6. Estudo dos valores do pH na polpa de acerola

Na Tabela 11 estão apresentados os valores de pH das polpas de acerola submetidas a diferentes tratamentos. Notou-se que a polpa doméstica obtida em laboratório não diferiu nos valores de pH para a polpa obtida no extrator, em planta piloto. Os dados, no período zero de armazenamento, indicaram que o tratamento térmico sobre a polpa de acerola promoveu um aumento do pH em 1,48% que, segundo as análises estatísticas, essa diferença não foi significativa ($p \geq 0,05$). Semelhante resultado foi encontrado por OLIVA(1995) ao investigar o efeito do processamento em néctares de acerola congelada e processados em aquecedor-esfriador (“Spin Cooker”) e processo e enchimento a quente (“Hot Fill”). Ao comparar o primeiro (congelado), verifica-se que o tratamento térmico

aumentou os valores de pH em 1,14 e 0,85%, para os dois processos, respectivamente. Há de se considerar também que pequenas oscilações podem estar relacionadas com as variações do equipamento utilizado nessa medida, porém pequenos desvios das médias pode resultar em diferença significativa.

TABELA 11. Valores de pH da polpa de acerola para diferentes tratamentos, durante o armazenamento

Determinações	Tempo (dias)	Tratamentos da polpa de acerola								
		Polpa doméstica	PSTTV	PSTTL	PIV	PIL	PPSDV	PPSDL	PPDV	PPDL
pH	0	3,37 (0,01)	3,37 (0,01)	3,37 (0,01)	3,42 (0,01)	3,42 (0,01)	3,42 (0,01)	3,42 (0,01)	3,42 (0,01)	3,42 90,01)
	30		3,37 (0,01)	3,36 (0,01)	3,36 (0,01)	3,36 (0,01)	3,36 (0,01)	3,36 (0,01)	3,37 (0,01)	3,37 (0,01)
	60		3,37 (0,00)	3,36 (0,00)	3,36 (0,01)	3,37 (0,01)	3,37 (0,01)	3,37 (0,01)	3,37 (0,00)	3,37 (0,01)
	90		3,36 (0,01)	3,36 (0,01)	3,41 (0,02)	3,41 (0,02)	3,42 (0,02)	3,43 ±0,010)	3,43 (0,02)	3,43 (0,02)
	120		3,40 (0,01)	3,39 (0,02)	3,44 (0,01)	3,44 (0,01)	3,46 (0,02)	3,46 (0,01)	3,47 (0,02)	3,47 (0,02)
	150		3,41 (0,01)	3,40 (0,01)	3,46 (0,02)	3,45 (0,01)	3,51 (0,02)	3,52 (0,01)	3,55 (0,01)	3,53 (0,01)
	180		3,40 (0,01)	3,40 (0,01)	3,47 (0,00)	3,47 (0,00)	3,59 (0,00)	3,59 (0,01)	3,62 (0,01)	3,61 (0,00)

PSTTV- Polpa sem tratamento térmico em vidro e PSTT - polpa sem tratamento térmico em lata congeladas
 PIV - polpa inativada em vidro e PIL- polpa inativada em lata congeladas
 PPSDV - polpa pasteurizada sem desaeração em vidro; PPSDL - polpa pasteurizada sem desaeração em lata
 PPDV - polpa pasteurizada com desaeração em vidro; PPDL - polpa pasteurizada com desaeração em lata

De acordo com as análises estatísticas, os principais efeitos na ANOVA (Anexo 15, cap.IV), tempo de armazenamento, tipo de embalagem e tratamento das polpas

apresentaram influência significativa nos resultados de pH da polpa de acerola, além das interações tempo *versus* tratamento e tipo de embalagem *versus* tratamento. A polpa armazenada na embalagem vidro apresentou valores de pH superiores à armazenada na embalagem lata. Do mesmo modo, as polpas PSTT mostraram menores valores de pH do que a polpa PPCD. Os tratamentos de inativação (PI) e pasteurização sem desaeração (PPSD) mostraram valores de pH similares.

Observou-se que os primeiros 30 dias de armazenamento houve um efeito de diminuição nas medições de pH. A partir do primeiro mês até o quinto mês, o efeito é praticamente constante, elevando-se no último mês, quando as medições de pH alcançam o máximo valor no experimento. É importante salientar que embora os principais efeitos, da embalagem e do tratamento, não pareçam ser muito diferentes, a ANOVA (Anexo 15) considerou-os altamente significativos.

De acordo com os resultados da análise estatística, não houve um ajuste linear razoável para pH, provavelmente porque a medida de pH não tenha um comportamento linear nas variáveis que envolvem a análise.

Estudos feitos por OLIVA(1995) com a fruta de acerola congelada mostraram uma diminuição no valor de pH de 3,6 para 3,3 no período de 180 dias de armazenamento. Todavia, MATSUURA(1994), estudando as características do suco integral e suco concentrado de acerola, armazenados a -18°C , mostrou que os valores de pH não sofreram variação durante o período de armazenamento de 180 dias. ROCHA(1988), estudando o efeito da temperatura de pasteurização e armazenamento da polpa de acerola, verificou que o pH não variou na polpa pasteurizada durante o armazenamento de 150 dias.

Estudos realizados por QUINTEROS (1995) com néctares de acerola-cenoura (néctar I = 3acerola:3cenoura:4xarope e néctar II = 2,5 acerola:3,5 cenoura:4xarope) mostraram um leve aumento, não significativo, do pH 3,8 para 3,9, correspondente a 2,63% para o néctar I no período de 3 meses de armazenamento, e o néctar II não teve qualquer aumento, permanecendo o pH 4,0. Embora pequena, a proporção aumentada de acerola nos néctares parece ter influenciado os valores de pH do néctar I.

Os resultados obtidos nesta investigação, no entanto, mostraram que a polpa de acerola tratada e a não tratada termicamente aumentaram os valores de pH ao final de 180 dias de armazenamento. Contrariamente, o armazenamento de néctares de acerola produzidos por OLIVA(1995), sem tratamento térmico (congelado a -18°C) e tratados termicamente (armazenados à temperatura ambiente e refrigerado) apresentaram diminuição do pH ao final de 180 dias de armazenamento que variou de 2,25 a 3,41%, sendo maior para o néctar congelado sem tratamento térmico.

Poder-se-ia sugerir que durante o tempo de armazenamento, neste experimento, os ácidos orgânicos seriam destruídos por alguma rota bioquímica uma vez que a acidez total foi diminuída e isso afetaria o pH. O aumento do pH parece estar intimamente relacionado com a degradação do ácido ascórbico durante o armazenamento. As polpas armazenadas durante 180 dias, sob congelamento apresentaram uma degradação do ácido ascórbico em aproximadamente 20% e aumento de pH de 0,88 a 1,44%, (valores que foram considerados significativos, que merecem ser bem avaliados por encontrarem-se dentro da faixa permitida às possíveis variações dessa medição); as polpas pasteurizadas armazenadas à temperatura ambiente tiveram aproximadamente 31% de perda de ácido ascórbico contra um aumento de 4,74 a 5,39% no pH, prováveis valores que promoveram uma significância nas análises estatísticas. Para confirmar estes dados seriam necessários estudos mais detalhados sobre o comportamento dos ácidos orgânicos que compõem a acerola. Provavelmente, essa explicação poderia servir de suporte para a oscilação dos valores de pH observados em diferentes investigações.

A Tabela 12 apresenta um quadro comparativo dos resultados obtidos em diferentes investigações com polpa ou suco integral de acerola. Os resultados das análises físico-químicas desta investigação, encontram-se dentro dos limites encontrados por outros pesquisadores citados, nas determinações realizadas com diferentes variedades de acerola. Somente o valor para acidez total está um pouco abaixo do menor valor citado na tabela. Há de se considerar, no entanto, que os frutos utilizados neste experimento apresentavam-se no estágio mais próximo à plena maturação, fator este que leva à diminuição da acidez total.

TABELA 12. Estudo comparativo de algumas características físicas e químicas do suco integral (polpa) de acerola sem tratamento térmico

Determinações	1	2	3	4	5	6	7 ¹	7 ²	8
Umidade (%)	92,6	---	90,37	93,50	---	92,9	---	---	91,59
Sólidos Totais (%)	7,40	---	9,63	6,5	---	7,1	---	---	8,41
Acidez (%)*	1,16	---	0,83	---	1,79*	1,07	1,65*	0,95*	0,77
°Brix(20°C)	6,50	8,3	7,5	6,10	6,0	5,4	8,7	7,0	7,45
Ph	3,45	3,1	3,46	3,3	3,3	3,5	3,8	4,10	3,37
Á A (mg/100g)**	1634	1197	1364	1640	1457	745,87	1736	1051	1167

(1) OLIVA (1995); (2) QUINTEROS (1995); (3) MATSUURA (1994); (4) CAVALCANTE (1991); (5) ROCHA (1988); (6) FIGUEIRÊDO (1998); (7¹, 7²) MUTHUKRISHNAN & PALANISWAMY (1972); (8) Valores médios de 3 determinações analíticas nesta investigação

7¹ - acerola de cor púrpura e 7² - acerola de cor rosa

* resultados de acidez expressa em ácido cítrico; ** Ácido ascórbico

3.7. Modelos de regressão

Para calcular os valores de antocianinas ou de ácido ascórbico, tomando-se os dados experimentais de outras análises químicas realizados com polpa de acerola, é possível prever os resultados, fazendo-se uso de um modelo de regressão, como os que se seguem.

As variáveis independentes podem usadas no modelo para verificar o efeito delas na resposta da variável dependente (ácido ascórbico ou antocianinas). Este tipo de relação é muito importante porque além de poder estudar o efeito, nos permite, dentro da região experimental estudada, prever simultaneamente resultados para a variável dependente e as outras análises químicas envolvidas no modelo experimental.

Foi proposto um modelo empírico, cuja forma é o produto das contribuições individuais de cada variável dependente. Para obter os resultados da equação foi utilizado a concentração do ácido ascórbico e das antocianinas totais em mg/100g de amostra e os valores relativos aos dados experimentais das demais análises químicas. Os coeficientes foram obtidos através de análise de regressão linear desenvolvido no software MINITAB (1994).

Após o ajuste das equações dos modelos de regressão propostos (Anexos 16 e 17, cap. IV) foram obtidos os resultados apresentados nas equações 1 e 2. Pode-se considerar o ajuste linear proposto nos modelos, adequado.

a) Modelo de regressão para prever o resultado para antocianinas, nas condições experimentais:

Modelo 1:

$$\text{Acy} = -44,5 + 7,50 \text{ pH} - 13,6 \text{ brix} + 93,9 \text{ ac.cit} + 23,1 \text{ ac.mal} + 2,84 \text{ s} + 0,0265 \text{ ac}$$

$$s = 0,6900$$

$$R\text{-sq} = 99,0\%$$

$$R\text{-sq (ajust)} = 98,1\%$$

b) Modelo de regressão para prever o resultado para ácido ascórbico, nas condições experimentais:

Modelo 2:

$$\text{Ac. Ascórbico} = 742 - 255 \text{ pH} + 213 \text{ °Brix} - 763 \text{ ac.cit} - 199 \text{ ac.mal} - 5,7 \text{ s} + 19,4 \text{ acy}$$

$$s = 18,66$$

$$R\text{-sq} = 97,2\%$$

$$R\text{-sq(ajust)} = 94,7\%$$

Códigos usados nas equações:

Acy antocianina

ac.cit acidez total, expressa em ácido cítrico

ac.mal acidez total, expressa em ácido em ácido málico

ac ácido ascórbico

s sólidos totais

A validade do modelo proposto é assegurada pelos altos valores dos coeficientes de determinação obtidos, de 98,1% e de 94,7%, para determinar as concentrações de antocianinas e do ácido ascórbico, respectivamente. Portanto, são modelos que podem ser usados como preditivos de acordo com os dados experimentais.

3.8. Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis experimentais por tratamento da polpa de acerola

As Tabelas (13, 14, 15 e 16) tratam-se das correlações entre as análises químicas e tratamentos dados às polpas de acerola. Para estes cálculos foram considerados os resultados das análises químicas e físicas obtidos nos tratamentos dados às polpas acondicionadas em embalagem de vidro, por ter sido anteriormente demonstrado que esta variável não influenciou nos resultados. Neste estudo os resultados mostram as correlações de forma linear entre as variáveis. Valores muito próximos de (1) significam alta correlação linear, ou seja, quando um valor de uma das variáveis cresce, o valor da outra também cresce. Valores muito próximos de (-1) também significam alta correlação linear, porém quando uma das variáveis cresce o valor da outra variável decresce.

TABELA 13. Correlações (Pearson) entre as variáveis para a polpa sem tratamento térmico (PSTT)

	pH	°Brix	AcCítrico	AcMálico	SolidosTotais	Antocianinas
°Brix	-0,168					
AcCítrico	-0,812	-0,174				
AcMálico	-0,691	-0,431	0,881			
SolidosTotais	0,118	-0,465	0,128	0,436		
Antocianinas	-0,526	-0,563	0,836	0,939	0,575	
ÁcidoAscórbico	-0,660	-0,383	0,876	0,938	0,505	0,962

AcCítrico- acidez em ácido cítrico; AcMálico- acidez em ácido málico

Os resultados da Tabela 13 apresentam correlações das análises para a polpa de acerola sem tratamento térmico (PSTT). Nesta análise foi encontrada uma alta correlação negativa entre pH e acidez em ácido cítrico ($r = -0,812$) e baixa correlação negativa com a acidez em ácido málico, estes dados indicam que os valores de pH foram mais influenciados pelo ácido cítrico do que pelo ácido málico. Os teores de antocianinas e de ácido ascórbico tiveram uma alta correlação positiva com a acidez em ácido cítrico e a acidez em ácido málico, sendo muito maior ($r=0,939$). Correlações inversas entre os valores

de pH x antocianinas e pH x ácido ascórbico confirmam que, quanto mais baixos os valores de pH, maiores os teores encontrados para antocianinas e ácido ascórbico. Os valores de sólidos totais mostraram uma correlação direta com os teores de antocianinas e de ácido ascórbico.

Nota-se, uma alta correlação positiva ($r=0,962$) entre os valores de ácido ascórbico com os valores de antocianinas para polpa de acerola sem tratamento térmico (PSTT). Estes dados indicam que existe uma direta influência nos valores para essas duas variáveis. Uma correlação inversa foi observada entre os valores de °Brix com as demais análises químicas para a polpa sem tratamento térmico.

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados das correlações entre as análises químicas da polpa de acerola inativada termicamente (PI).

Os resultados apresentados na Tabela 14 mostram alta correlação negativa ($r=-0,836$) entre os valores de °Brix e dos sólidos totais na polpa PI. Foi também verificado maior correlação positiva entre os valores de acidez total, expressa em ácido cítrico e os teores de ácido ascórbico ($r=0,788$) do que a correlação acidez total, expressa em ácido málico x ácido ascórbico ($r=0,604$). Para a mesma polpa (PI), a correlação ácido ascórbico x antocianina foi altamente positiva ($r=0,941$).

TABELA 14. Correlações (Pearson) entre as variáveis para a polpa inativada termicamente (PI)

	pH	°Brix	AcCítrico	AcMálico	SólidosTotais	Antocianinas
°Brix	-0,489					
AcCítrico	-0,672	0,061				
AcMálico	-0,476	0,087	0,657			
SólidosTotais	0,138	-0,836	0,342	0,143		
Antocianinas	-0,282	-0,577	0,655	0,545	0,690	
Ácido Ascórbico	-0,494	-0,357	0,788	0,604	0,544	0,941

AcCítrico- acidez em ácido cítrico; AcMálico- acidez em ácido málico

TABELA 15. Correlações (Pearson) entre as variáveis para a polpa pasteurizada sem desaeração (PPSD)

	pH	°Brix	AcCítrico	AcMálico	SólidosTotais	Antocianinas
°Brix	-0,740					
AcCítrico	0,322	-0,064				
AcMálico	0,856	-0,559	0,385			
SólidosTotais	0,288	0,190	0,738	0,435		
Antocianinas	0,528	-0,056	0,877	0,604	0,775	
Ácido Ascórbico	0,602	-0,130	0,876	0,657	0,846	0,979

AcCítrico- acidez em ácido cítrico; AcMálico- acidez em ácido málico

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados das correlações obtidas para as análises da polpa de acerola pasteurizada sem desaeração (PPSD).

Os resultados (Tabela 15) mostram alta correlação positiva entre os valores de pH e acidez expresso em ácido málico ($r=0,856$), sendo menor a correlação, porém direta com os valores de acidez expressos em ácido cítrico. Por outro lado, os valores de acidez para ácido cítrico, em relação as antocianinas e ácido ascórbico, apresentaram alta correlação positiva ($r=0,877$ e $0,876$, respectivamente). Os valores de ácido ascórbico ainda mostraram alta correlação positiva com os resultados de sólidos totais e antocianinas ($r=0,846$ e $0,979$, respectivamente). Os valores de antocianinas também apresentaram uma correlação direta com os sólidos totais ($r=0,775$).

Na Tabela 16 estão apresentados os resultados das correlações entre as variáveis relativas à polpa de acerola pasteurizada com desaeração (PPCD). Os dados mostram que houve uma alta correlação positiva entre os resultados de antocianinas com acidez expressa em ácido cítrico ($r=0,840$) e com sólidos totais ($r=0,905$). Outro dado importante é a alta correlação positiva encontrada entre os teores de ácido ascórbico e sólidos totais ($r=0,934$) e com as antocianinas ($r=0,949$). O pH apresentou uma correlação inversa com os valores de sólidos solúveis, e uma correlação direta com os valores de acidez total, sólidos totais, antocianinas e ácido ascórbico.

TABELA 16. Correlações (Pearson) entre as variáveis para a polpa pasteurizada com desaeração (PPCD)

	PH	°Brix	AcCítrico	AcMálico	SólidosTotais	Antocianinas
°Brix	-0,656					
AcCítrico	0,376	0,116				
AcMálico	0,446	-0,579	-0,484			
SólidosTotais	0,524	0,013	0,803	0,489		
Antocianinas	0,669	-0,129	0,840	0,576	0,905	
Ácido Ascórbico	0,617	-0,072	0,909	0,595	0,934	0,949

AcCítrico- acidez em ácido cítrico; AcMálico- acidez em ácido málico

3.9. Qualidade microbiológica da polpa de acerola

A avaliação da qualidade higiênico sanitária de um produto é geralmente acompanhada desde a etapa de seleção, higienização, preparo, processamento acondicionamento, até sua distribuição. O produto final deve assegurar o consumo isento de microrganismos patogênicos ao homem.

Os alimentos podem contaminar-se durante as etapas de processamento devido ao mau funcionamento ou limpeza inadequada dos equipamentos, uso de material de limpeza não indicado para esta finalidade, infestações de insetos e roedores, ou ainda devido a um armazenamento inadequado (ALMEIDA, 1998).

Segundo recomendações da ABIA (1992), polpas de frutas devem ser preparadas com frutas sãs, limpas e isentas de parasitos e de detritos animais e vegetais. Não deve conter fragmentos das partes não comestíveis da fruta, nem substâncias estranhas à sua composição normal, exceto as previstas pelas normas oficiais.

Segundo os padrões microbiológicos estabelecidos pelo MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (1974), o suco simples congelado deve apresentar ausência de microrganismos patogênicos, ausência de coliformes fecais em 1 ml, contagem de bolores e leveduras não superiores a $2,0 \times 10^6$ UFC/1g. De acordo com a ABIA(1992), a polpa de fruta envasada tratada ou não-tratada termicamente deve obedecer ao seguinte padrão: ausência de microrganismos patogênicos e de coliformes fecais em um grama, bactérias

do grupo coliformes (máximo: 10^2 /g), contagem de bolores e leveduras, não superior a 10^3 UFC/g, microorganismos mesófilos não superiores a $5,0 \times 10^4$ UFC/g.

Nas Tabelas 17 e 18 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas das polpas de acerola tratadas e não tratadas termicamente durante 180 dias de armazenamento.

TABELA 17. Contagem total de bactérias (UFC/ml) da polpa de acerola com e sem tratamento térmico

POLPA	Período de armazenamento (dias)			
	0	60	120	180
PSTTV	$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^3$	$0,2 \times 10^3$	$0,5 \times 10^3$
PSTTL	$0,5 \times 10^3$	$0,3 \times 10^3$	$0,5 \times 10^3$	$0,5 \times 10^3$
PIV	0	0	0	0
PIL	0	0	0	0
PPSDV	0	0	0	0
PPSDL	0	0	0	0
PPCDV	0	0	0	0
PPCDL	0	0	0	0

UFC/g ou ml – unidades formadoras de colônias por grama ou mililitro

TABELA 18. Contagem de bolores e leveduras (UFC/ml) da polpa de acerola com e sem tratamento térmico

POLPA	Período de armazenamento (dias)			
	0	60	120	180
PSTTV	$1,3 \times 10^2$	7×10	$1,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10$
PSTTL	$1,2 \times 10^2$	$0,8 \times 10^2$	$0,9 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
PIV	0	0	0	0
PIL	0	0	0	0
PPSDV	0	0	0	0
PPSDL	0	0	0	0
PPCDV	0	0	0	0
PPCDL	0	0	0	0

UFC/g ou ml – unidades formadoras de colônias por grama ou mililitro

Todas as polpas analisadas no tempo zero e a cada 2 meses, nesta investigação, apresentaram resultados satisfatórios, conforme pode ser visto nas Tabelas 17 e 18. Os valores obtidos estão de acordo com as exigências preconizadas pelos padrões

microbiológicos oficiais. Assim sendo, pode-se afirmar que o tratamento térmico aplicado assegurou a esterilidade comercial, e as condições de armazenamento garantiram a inocuidade do produto.

4. CONCLUSÕES

- 4.1. Os tratamentos térmicos de pasteurização e inativação, nas polpas de acerola, promoveram perdas significativas nos teores de antocianinas e nos teores de ácido ascórbico, quando comparados às polpas não tratadas termicamente. Todavia, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) na degradação do ácido ascórbico da polpa submetida ao tratamento de inativação térmica (PI) comparativamente degradação ocorrida na polpa sem tratamento térmico (PSTT), mas houve uma significativa degradação das antocianinas em ambas as polpas.
- 4.2. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos teores de ácido ascórbico e de antocianinas entre a polpa extraída em escala laboratorial e a polpa obtida em escala industrial, devido à maior pressão do equipamento e o volume obtido nesta última.
- 4.3. A degradação média do ácido ascórbico durante o armazenamento de 180 dias das polpas congeladas (sem tratamento térmico e inativadas) foi de aproximadamente 20%, e das polpas pasteurizadas sem desaeração e com desaeração, armazenadas a temperatura ambiente foi de aproximadamente 33% e 30%, respectivamente. Não houve diferença significativa na degradação do ácido ascórbico entre as polpas sem tratamento térmico e as inativadas ao final do período de armazenamento de seis meses. Este resultado indica que a inativação térmica da polpa de acerola e o congelamento, asseguraram os teores do ácido ascórbico durante o armazenamento.
- 4.4. Ao final do período de armazenamento de seis meses, a degradação média das antocianinas nas polpas inativadas congeladas ($\cong 25,5\%$) foi significativamente maior do que nas polpas sem tratamento térmico congeladas ($\cong 22\%$). Os resultados indicaram que a inativação enzimática dada pelo tratamento não impediu a vulnerabilidade de degradação de tais compostos por outros mecanismos.

- 4.5. A redução do ácido ascórbico nas polpas congeladas e não congeladas pasteurizadas foi muito altas a partir de 30 de armazenamento em todos os tratamentos, sendo que as polpas pasteurizadas apresentaram redução mais acentuada a 90 dias de armazenamento. As maiores perdas de antocianinas nas polpas congeladas ocorreram entre 120 a 150 dias de armazenamento. O maior nível de degradação das antocianinas das polpas pasteurizadas ocorreram entre 30 e 120 dias de armazenamento
- 4.6. O tipo de embalagem influenciou nos teores de ácido ascórbico e antocianinas, quando se verifica a relação embalagem x tratamento, porém o efeito do tratamento e do tempo de armazenamento foram altamente significantes nos resultados. A embalagem lata mostrou melhor resultado de preservação do ácido ascórbico e das antocianinas nas polpas sem tratamento térmico e inativadas que foram congeladas, mas não influenciou os resultados destas determinações nas polpas pasteurizadas não congeladas.
- 4.7. A degradação de antocianinas no primeiro mês de armazenamento, nas polpas congeladas sem tratamento térmico e inativadas, foi de aproximadamente 2,5% e 4,5%, respectivamente; nas polpas pasteurizadas sem desaeração e com desaeração foi de aproximadamente 14,6% e 10%, respectivamente. Isto indica que o congelamento foi um meio eficaz para a manutenção das antocianinas, enquanto a pasteurização, mesmo com desaeração foi um fator significativo para a degradação das mesmas.
- 4.8. O tratamento e o tempo de armazenamento tiveram efeito significativo no nível de degradação das antocianinas. Até o 3º mês de armazenamento a cor das polpas pasteurizadas apresentava-se levemente alaranjada. Já no quarto e quinto meses, a concentração de antocianinas totais foi muito baixa e no sexto mês houve completa degradação desses compostos..
- 4.9. A inativação térmica teve maior efeito nos valores de °Brix das polpas do que a pasteurização. Porém, ao longo do período de armazenamento as polpas pasteurizadas armazenadas à temperatura ambiente aumentaram significativamente o valor de °Brix da polpa de acerola, embora não tenha apresentado um comportamento linear. O maior aumento nos valores de °Brix ocorreram no terceiro

mês de armazenamento. Este comportamento pode ser devido à degradação de compostos, em consequência do tratamento térmico associado a outros fatores, que pode ter favorecido a hidrólise de compostos como açúcares (carboidratos) e/ou outros, durante o armazenamento.

- 4.10. O tempo de armazenamento e o tratamento influenciaram os resultados obtidos para acidez total e os teores de sólidos totais. A acidez total, ao final de seis meses, apresentou uma perda em torno de 5% para as polpas congeladas, e em torno de 6,7% para as polpas pasteurizadas. Essa diminuição possivelmente se deve à degradação de ácido ascórbico descritas nas correlações de Pearson, e/ou outros ácidos orgânicos presentes na polpa de acerola.
- 4.11. O tipo de tratamento utilizada influenciou os valores de pH das polpas de acerola. Este parâmetro (pH) sofreu aumento significativo com o tempo de armazenamento, embora não tenha havido um comportamento linear, no entanto o tipo de embalagem não influenciou os resultados desta medição.
- 4.12. A acidez em ácido cítrico e os sólidos totais apresentaram alta correlação direta com os teores de ácido ascórbico e de antocianinas para todos os tratamentos. Em todas as polpas testadas, houve uma correlação positiva muito alta entre ácido ascórbico e antocianinas.
- 4.13. O tratamento de exaustão (com a função de desaeração) das polpas pasteurizadas não teve influência significativa ($p \leq 0,05$) nos resultados obtidos para ácido ascórbico, antocianinas totais, acidez total, °Brix e pH, embora tenham ocorrido pequenas diferenças nos dois primeiros mais favorável ao armazenamento na embalagem de lata.
- 4.14. Modelos de regressão podem ser usados como preditivos para estimar os valores de ácido ascórbico e antocianinas, desde que utilizando-se as demais análises químicas nos coeficientes do modelo, e desde que sejam rigorosamente obedecidas as condições experimentais.
- 4.15. Os testes microbiológicos comprovaram a inocuidade das polpas de acerola durante o período de 180 dias de armazenamento .

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHINEWHU, S. C.; HART, A. D. Effect of processing and storage on the ascorbic acid (vitamin C) content of some pineapple varieties grown in the Rivers States of Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**, Amsterdam, v.46, p.335-337, 1994.
- ADAMS, J. B. & ONGLEY, M. H. The degradation of anthocyanins in canned strawberries. Part II. The effect of various additives on the retention of pelargonidin-3-glucoside. **Journal Food Technology**, v. 8, n. 3, p. 305-307, 1973.
- ALMEIDA, C. R. O sistema HACCP como instrumento para garantir a inocuidade dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.12, n.53, p.12-14, 1998.
- ALVES, R. E. Características das frutas para exportação. In: *Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. Ágide Congatti Netto...(et al.); Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais. - Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996 .p.9-12 (Série Publicações Técnicas FRUPEX;21
- ALVES, R. E. & MENEZES, J. B. Botânica da aceroleira. In: SÃO JOSE, A. R.; ALVES, R. E. **Cultura da acerola no Brasil: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1995. p.07-14.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Association of Official Analytical Chemists. **Washington, D. C., 1984. p. 627-628 e 844-45.**
- ARAÚJO, P. S. R. de; MINAMI, K. **Acerola**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. 81p.
- ASENJO, C. F. Aspectos químicos y nutritivos de la acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Ciência**. Revista Hispano-Americana de Ciências Puras y Aplicadas, v.19, n.6-7, p.109-118, 1959.
- ASENJO, C.F. Acerola. In: **Tropical and subtropical fruits**, by S. Nagy & P.E.Shaw eds., A.V.I. Publishing Westport, Conn. 120p., 1980.
- ASENJO, C. F.; MOSCOSO, C. G. Ascorbic acid content and other characteristics of the West Indian cherry. **Food Research**, v.15, p.103-106, 1950.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 1992.
- BAKKER, J. & TIMBERLAKE, C. Isolation, identification, and characterization of new-color-stable anthocyanins occurring in some red wines. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 35-43, 1997.
- BENASSI, M. T. Análise dos efeitos de diferentes parâmetros na estabilidade de vitamina C em vegetais processados. Campinas: UNICAMP, Dissertação (Mestrado), 1990. 166p. Faculdade de Engenharia de Alimentos- FEA/UNICAMP, 1990.
- BENSIMON, C. Ojo al kiwi, llega la *Malpighia puniceifolia*. **Ceres Revista de la FAO**, v.23, n. 6, p. 9-10, 1991.
- BLEINROTH, E.W.; MENEZES, J. B. & ALVES, R. E. Colheita e beneficiamento. In: *Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. Ágide Congatti Netto...(et al.); Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças,

- Flores e Plantas Ornamentais. – Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996, p.13-23 (Série Publicações Técnicas FRUPEX;21).
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2.ed., 1992, 223p.
- CARVALHO, R. I. N. & MANICA, I. Características físicas, químicas e a respiração de acerolas (*Malpighia glabra* L.) em três estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 15, n. 2, p. 21-26, 1993.
- CARVALHO, C.R.L.; MANTOVAN, D. M. B.; CARVALHO, P. R. N. & MORAES, R. M. **Análise químicas de Alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos.Campinas:ITAL, 1990, 121p. (Manual Técnico).
- CAVALCANTE, M. L. Composição de carotenóides e valor de vitamina A em Pitanga (*Eugenia uniflora*) e Acerola (*Malpighia glabra* L.).Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestre), 1991. 90p.
- CID,C.; ASTIASARÁN, I. & BELLO, J. Modificaciones en el contenido de vitamina C en zumos naturales desde suelaboracion hasta su posible consumo. **Alimentaria**, v.28, n.224, p.41-43, 1991
- CHAN, H. T. & YAMAMOTO, H. Y. Kinetics of anthocyanin decomposition in acerola juice. **ASEAN Food Journal**, v.9, n. 4, p. 132-135, 1994.
- CHANDRA, A.; NAIR, M. G. & IEZZONE, A. F. Isolation and stabilization of anthocyanins from tart cherries (*Prunus cerasus* L.). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1062-65, 1993.
- COUCEIRO, E. M. **Curso de extensão sobre a cultura de acerola**. Recife: Ed. UFRPE, 1985. 45p.
- COUNSELL, J. N. & HORNING, P. H. **Vitamin C (Ascorbic acid)**. London: Applied Science Publishers, 1981.
- DRAPER, N. R. & SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 2^a ed., 1981.
- EWALDAH, E. H. Studies on commercially canned juices produced locally in Saudi Arabia. III. Physicochemical, organoleptic and microbiological assessment. **Food Chemistry**, v.44, n.2, p.103-111, 1992.
- FIGUEIRÊDO, R. M. F. de. Caracterização físico-química do suco e pó de acerola (*Malpighia puniceifolia*, L.). Campinas, 1998. 184p. Tese (Doutora). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; FROTA, L. F. & MONTEIRA, J. C. Processamento e estabilidade de néctares de jenipapo submetidos a diferentes métodos de conservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, n.10, p.1077-84, 1986.
- FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, n.4, p.273-314, 1989.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of Total Anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 1. p. 72-77, 1968.
- GARCIA, E. E. C. & ALVES, R. M. V. Embalagem para sucos de frutas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n. 2, p. 105-121, 1993.

- GARCÍA-VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P.; ARTES, F.; ROMERO, F. ABELLÁN, P. & TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *Journal Science Food Agricultural*, v. 78, p. 565-573, 1998.
- GOLDONI, J. S.; CEREDA, M. P.; CEREDA, E. & CAGLIARI, A.M. Variação do teor de ácido ascórbico em suco integral durante o armazenamento pelo frio. I. Morango (*Fragaria sp*) *ABIA*, n.55, p.24-30, 1981.
- GOMES, P. F. Curso de Estatística Experimental. 13 ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 467p.
- GRAUMLICH, T. R.; MARCY, J. E.; ADAMS, J. P. Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 34, n. 3, p. 402-405, 1986.
- GUADARRAMA, A. Algunos cambios químicos durante la maduración de frutos de semeruco (*Malpighia puniceifolia* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Centr. Venezuela*, vol. 13, n.1/4, p. 111-128, 1984
- GUEDES, M. C. Influência do anel B na estabilidade das antocianinas e antocianidinas. Campinas: UNICAMP, 1993. 126 p. Tese (Doutor) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1993.
- HANDWERK, R. L. & COLEMAN, R. L. Approaches to the citrus browning problem. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.36, n.1, p.231-236, 1988.
- ITOO, S.; AIBA, M. & ISHIHATA, K. Comparison of ascorbic acid content in acerola fruit from different production region depend on degree of maturity and it's stability by processing. *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi*, v37, n. 9. P. 72-29, 1990.
- JOHNSON, J. R.; BRADDOCK, R. J. & CHEN, C. S. Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: experimental rate constants. *Journal of Food Science*, v.60, n.3, p.502-505, 1995.
- LAN, S. L.; JONG, W. R.; SEON, J.K. & BYEONG, C. C. Study on the stability of anthocyanin pigment extracted from purple sweet potato. *Korean Journal of Food Science and Technology*, v.28, n.2, p.352-359, 1996.
- LOPÉZ, A. P. Relation of maturity to some fruit characters of the West Indian Cherry. *Journal University Puerto Rico*, v. 47, n.3, p. 193- 200, 1963.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocianins in food. In: *Anthocyanins as Food Colors*. (Pericles Markakis, ed.) London: Academic Press, 1982. p.163-161.
- MARQUES, D. S. & MEIRELLES, M. A. A. Estudo da influência da concentração em sólidos solúveis e da porcentagem de polpa suspensa sobre a viscosidade do suco de laranja concentrado produzido no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.16, n.3, p.260-4, 1996.
- MATSUURA, F.C.A.U. **Processamento e caracterização de suco integral e concentrado congelado de acerola.** Campinas, SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Tese de Mestrado. UNICAMP, 141p., 1994.
- MEAD, R. & CURNOW, R. N. Statistical methods in agricultural and experimental Biology, Chapman and Hall, 1987
- MEDEIROS, R. B. Teores de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e ácido deketogulônico na acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) verde e madura. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 26, n. 7, p. 398-400, 1969.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA – Padrões Microbiológicos. Regulamento Geral de Bebidas. Portaria nº 410 de 27/09/74. Diário Oficial de 08/10/74. 1974.
- MONTGOMERY, D. C. Diseño y analisis de experimentos. Espanha: Grupo editorial Ibero-América, 1991.
- _____ & PECK, E. A. Introduction to linear regression analysis. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- MUTHUKRISHNAN, C. R. & PALANISWAMY, K. P. A study on the West Indian Cherry products. **Indian Food Packer**, n.4, p. 34-37, jul/aug, 1972.
- NAGY, S. Vitamin C content of citrus fruits and their products. A Review. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.28, p.8-18. 1980
- _____; SHAW, P.E. & VELDHUIS, M. K. Citrus Science and Technology, Avi. Publishing Co., Westport, CT, 1977.
- NAKASONE, N. Y.; MIYASHITA, R.K.; YAMANE, G.M. Factors affecting ascorbic acid content of the acerola (*Malpighia glabra* L.). **American Society for Horticultural Science**, v. 89, n.1, p. 161-166, 1966.
- NAKASONE, N.Y.; YAMANE, G.M.; MIYASHITA, R.K. Selection, evaluation and naming of acerola (*Malpighia glabra* L.) cultivars. **Hawaii Agricultural Experiment Station. Circular**, 65:1-19. 1968.
- NOGUEIRA, C. M. D.; MAIA, G. A. FIGUEIREDO, R. W.; OLIVEIRA, G. S. F. & ORIÁ, H. F. Estabilidade físico-química e química da polpa de acerola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 19, n. 1, p. 139-144, 1997.
- OLIVA, P. B. **Estudo do armazenamento da acerola in natura e estabilidade do néctar de acerola**. Campinas, SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Tese de Mestrado. UNICAMP, 103p., 1995.
- OLIVEIRA, R. P. S. Determinação de propriedades físicas e de transporte de suco de acerola. Campinas, 1997. 148p. Dissertação (Mestre). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- OLIVEIRA, M. N. S. Comportamento fisiológico de plantas jovens de acerola, carambola, pitanga, cupuaçu, graviola, pupunha e biribá em função da baixa disponibilidade de água no solo. Lavras, 1996. 67p. Dissertação (Mestre). Universidade Federal de Lavras.
- PANTASTICO, E. B. Postharvest physiology handling and utilization of tropical and subtropical fruits and vegetables. The A.V.I. Publications, Conn., 560p. 1975.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13 ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 467p.
- POEI-LANGSTON, M. S. & WROLSTAD, R. E. Color degradation in the ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. **Journal of Food Science**, v.46, p.1218-22, 1981.
- POLLARD, A & TIMBERLAKE, C. F. Fruit juices in the biochemistry of fruits and their products. A. C. Hulme Ed., Academic Press Inc. London. 573p. 1971.
- QUINTEROS, E. T. T. Processamento e estabilidade de néctares de acerola-cenoura. Campinas, 1995. 96p. Dissertação (Mestre). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- RAHMAN, A. R.; ANZIANI, I; CRUZ-CAY, J. R. Factors affecting the stability of vitamin C in tropical fruit and nectars. **Journal Agricultural of University of Puerto Rico**, v.48, n.1, p.1-12, 1964.

- ROCHA, I. C. Suco de acerola: Efeito da temperatura de pasteurização e armazenamento. Recife, PE: Centro de Ciências da Saúde, 1988. 105p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, 1988.
- SANCHES-NIEVA, F. Extraction, Processing, Canning and Keeping Quality of acerola juice. **Journal Agricultural of University of Puerto Rico**, v. 39, n. 4, p. 175-183, 1955.
- SANTINI Jr., R. Identification and determination of polibasic organic acids presentes in West Indian (*Malpighia punicifolia* L.) and in three varieties of guava (*Psidium guajava*). **Journal Agricultural of the University of Puerto Rico**, v.37, p. 195-198, 1953
- SILVA, M. F. V. & MENEZES, H. C. Estudio de cambios de color y ácido ascórbico en la pulpa de acerola en diferentes etapas de maduración. In: XII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Puerto Varas: Chile, 1997. Resúmenes de Temas Libres.
- SHI, Z. L.; LIN, M. & FRANCIS, F.J. Stability of anthocyanins from *Tradescantia pallida*. **Journal of Food Science**, v.57, n.3, p.758-760,770, 1992.
- SHRIKHANDE, A. J. & FRANCIS, F.J. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. **Journal of Food Science**, v.39, p.904-6, 1974.
- SILVA, S. R. Extração e estabilidade de pigmentos antocianícos de frutos de maria-pretinha (*Solanum americanum*, Mill.). Viçosa: UFV. 1996. 76p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SIMARD, R. E.; BOURZEIX, M. & HEREDIA, N. Factors influencing color degradation in blueberry juice. **Lebensm. – Wiss. U. Technology**. v. 15, p. 177-180, 1982.
- SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. & ENERSEN, G. Color stability os strawberry and blackcurrant syrups. **Journal of Food Science**, v.57, n.1, p.172-177, 1992.
- STARR, M. S. & FRANCIS, F. J. Oxigen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. **Food Technology**, v. 22, n. 10, p. 91-93, 1968.
- STATÍSTICA for Windows – Release 5.0 A. StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA, 1995.
- STRINGHETA, P. C. Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). Campinas: UNICAMP. 1991. 138p. Tese (Doutor). Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1991.
- THE SAS SYSTEM for Windows 3.95 – Release 6.08. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA, 1992.
- TJIN AKWIE, S. Estabilidade de bebidas mistas de frutas tropicais a base de maracujá). XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Alimento, População e Desenvolvimento. SBCTA- Sociedade Brasileira de Ciência e tecnologia de Alimentos: Rio de Janeiro, Anais (CD- Rom) - Trabalho completo, julho, 1998
- VIGLIO, E. C. B. L. O potencial de acerola. **Conjuntura Econômica**, Rio de Janeiro, v.47, n. 9, p. 53-54, set. 1993.

CAPÍTULO V

POLPA DE ACEROLA: ESTUDO DA COR

1. INTRODUÇÃO

A escolha de um alimento está relacionado, na maioria das vezes, com sua cor e brilho. A cor é um parâmetro importante para a escolha de um produto pelo consumidor. Apresenta significado de qualidade e segurança. O rótulo “natural” em um alimento induz à sua preferência.

Fisicamente a cor é uma característica de luz mensurável em termos de intensidade (energia radiante e comprimento de onda). A cor é dada em função da presença de luz, com reflexão pelo objeto de alguns comprimentos de onda, em detrimento de outros (RIGHETTO,1996).

A acerola é um fruto de grande repercussão no mercado internacional devido possuir várias qualidades, como valor nutricional, aspecto e cor. No Brasil, principalmente no Nordeste têm-se investido na agricultura para obter-se variedades de acerola que reúnam certas características essenciais como por exemplo, um alto nível de produtividade (próximo a 100 kg/planta/ano) e a produção de frutas com película de coloração vermelha, peso superior a 8-10 gramas/fruto e teor de vitamina C acima de 2.000 mg/100 g de polpa (NETO & SOARES, 1994). Atualmente, um dos problemas enfrentados pelos produtores é a presença de plantas que produzem apenas frutos amarelados que, apesar de apresentarem características internas iguais aos frutos vermelhos, são pouco aceitos pelos consumidores e compradores que preferem frutos, ou produtos fabricados da acerola vermelha, característica indispensável para o comércio de exportação (ALVES, 1996).

Vários são os pigmentos responsáveis pela cor dos alimentos como, por exemplo, as antocianinas, os carotenóides, além de outros. As antocianidinas são compostos coloridos que ocorrem na natureza na forma de glicosídeos em muitos frutos e vegetais.

Em geral, as antocianidinas (agliconas) são caracterizadas na sua estrutura básica, por um cátion flaviliun e diferentes substituintes no anel B. A deficiência de elétrons na sua estrutura torna as antocianidinas altamente reativas, e sua estabilidade é altamente dependente do pH. Os glicosídeos são muito mais estáveis do que as agliconas (FRANCIS, 1989). Tais compostos pertencem à classe dos flavonóides. Podem contribuir, pelo menos em parte, com propriedades antioxidantes de muitos frutos e vegetais e também como fontes naturais de cor dado pelas antocianinas (SATUÉ-GRACIA et al., 1997).

GUYOT et al. (1998) reporta que, as antocianinas podem ser consideradas como uma classe adicional de compostos fenólicos e estão presentes na casca de algumas variedades de frutos, como em algumas variedades de maçã.

Na acerola, os pigmentos encontram-se principalmente na casca. A polpa muitas vezes é quase incolor ou levemente amarelada, havendo poucas cultivares com polpa vermelha. Os produtos frescos de acerola variam de cor, do amarelo avermelhado até o vermelho intenso. Essa coloração, entretanto, sofre conseqüente degradação, tornando o produto, após determinado tempo de armazenamento, menos atraente, com visível escurecimento. No caso do fruto inteiro, torna-se gradativamente amarelado, descolorido.

Alguns trabalhos de pesquisa têm mostrado a importância do tipo de antocianinas presentes em frutos e vegetais e a sua estabilidade. De acordo com BROUILLARD (1982), as antocianinas com resíduos de glicose são mais estáveis à temperatura e à luz quando aciladas. Seus cátions flavíliuns são mais estáveis em soluções mais ácidas.

Muitos fatores relacionados ao processamento e ao armazenamento, podem influenciar na degradação dos pigmentos, responsáveis pela cor do produto. Os principais fatores que provocam a degradação das antocianinas são temperatura, pH, compostos fenólicos, açúcar e produtos da degradação dos açúcares.

CEMEROGLU et al. (1994) investigaram a degradação das antocianinas em suco concentrado de cereja ácida, com 71° Brix, após exaustão de todo espaço vazio da embalagem, colocadas em banho-maria à 50°C, 60°C, 70°C e 80°C, estocados a -18°C, 5°C, 20°C e 37°C, a diferentes tempos de armazenamento (8-48 horas e 0 - 160 dias). Os resultados indicaram que, as antocianinas no suco concentrado (71°Brix) foram mais

suscetíveis à degradação térmica do que no suco a 15°Brix. Na temperatura de 20°C (71° Brix), a meia-vida da cor do suco foi cerca de 38 dias, na temperatura de 37°C foi de 11 dias, e na temperatura de 50-60°C, a degradação de cor foi duas vezes maior que à 20°C. Os autores concluíram que seria possível aumentar dez vezes mais a estabilidade da cor dos sucos concentrados de cereja, armazenados à temperatura ambiente, estocando-se a 5°C onde a meia-vida foi estendida para cerca de 1 ano.

Para estudar a degradação dos pigmentos (antocianinas) responsáveis pela cor vermelha do fruto de morango, extrato antociânico foi submetido à temperaturas de 45°C a 110°C a pH de 2,0 e 3,4, em sistemas modelos. Os resultados mostraram que, na ausência de oxigênio o principal pigmento sozinho, ou ácido ascórbico sozinho, são relativamente estáveis, sendo o pigmento menos estável que a vitamina. Na presença de oxigênio, o pigmento sozinho, ou ácido ascórbico sozinho, são relativamente instáveis, sendo o pigmento mais estável que a vitamina. Já, na ausência de oxigênio, a simultânea presença do pigmento e ácido ascórbico levou a uma rápida degradação de ambos do que quando sozinhos. Não foi verificada degradação do pigmento quando estocado seco, na forma cristalina, indicando que a água parece estar envolvida na reação de descoloração (MARKAKIS et al., 1957).

Na acerola, o principal pigmento responsável pela cor vermelha, são as antocianinas (SANTINI & HUYKE, 1956; ASENJO, 1978; SILVA et al., 1998), além desses pigmentos também foram identificados os carotenóides α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina e fitoflueno, sendo o principal o β -caroteno, responsável por mais de 90% do teor de carotenóides totais (CAVALCANTE, 1991). Esses compostos mostraram-se estáveis em purê e flavêdo de laranja Valência provenientes da Espanha, após pasteurização de 99°C por 30 segundos (VALADON & MUMMERY, 1981), e em sucos de goiaba o β -caroteno permaneceu estável e apresentou perda não significativa durante o armazenamento (PADULA & RODRIGUES-MAYA, 1986)

Estudos sobre os efeitos do tratamento térmico em suco de acerola mostraram que, o principal fator de degradação da cor do suco pasteurizado, estava relacionado com a presença do oxigênio, seguido do pH, temperatura, ácido ascórbico e enzimas (ROCHA, 1988). De acordo com relato de MATSUURA (1994), o tempo e temperatura de

armazenamento em sucos de frutas coloridas, e a quantidade de oxigênio são os principais responsáveis pela deterioração da cor durante o armazenamento dos sucos.

No tratamento térmico de pasteurização em suco de acerola (88°C/45 segundos) concentrado e não-concentrado congelado a -18°C, os teores totais de antocianinas foram mantidos em ambos. Comparando-se os parâmetros de cor pelos sistema L a b Hunter, foi observado que nos dois tratamentos ocorreu uma diminuição da intensidade de vermelho e aumento dos valores de amarelo para ambos tratamentos, durante o período de armazenamento de 180 dias. Porém, o maior aumento foi verificado no suco não tratado termicamente. Essas diferenças foram apontadas em testes sensoriais (MATSUURA, 1994).

TABELA 1. Efeito de diferentes tratamentos térmicos sobre a cor, e atividade enzimática do suco de acerola

Tratamento térmico	Cor	Pectina Esterase
Testemunha	Laranja avermelhado ++++	+
Até atingir 68°C	Ídem +++	+
Até atingir 70°C	Ídem +++	+
70°C x 10 min	Ídem ++	+
70°C x 15 min	Ídem ++	+
70°C x 20 min	Ídem +	+
70°C x 23 min	Laranja amarelado +++	+
70°C x 26 min	Ídem ++	+
70°C x 30 min	Ídem +	+
80°C x 1 min	Ídem ++	+
80°C x 3 min	Ídem ++	+
80°C x 5 min	Ídem +	+
Até atingir 90°C	Amarelado	+
70°C x 15 min/ pH 4	Ídem	+
70°C x 30 min / pH 4	Ídem	+
80°C x 1 min/ pH 4	Ídem	-
80°C x 5 min /pH 4	Ídem	-

FONTE: ROCHA (1988)

(+ grau de intensidade de cor)

ROCHA (1988) testou a eficiência da pasteurização pelo binômio temperatura x tempo, verificando ao mesmo tempo a mudança de coloração e atividade enzimática do suco de acerola. Foi colocado 50 ml da amostra em erlenmeyer e aquecido em banho-maria sob diferentes temperaturas encontrando os resultados descritos na Tabela 1.

Cerejas tratadas por osmodesidratação usando xarope de milho (24% glucose, 29% maltose, 12% polissacarídeos, 35% água)- sucrose – água (5:3:1, w/w/w) e ácido ascórbico (1%) como antioxidante, foram pasteurizados por imersão direta (PD) no xarope, (85°C/3 minutos) e pasteurização convencional, PC (85°C/ 25 minutos). Os resultados mostraram que a PD afetou somente a cor da casca do fruto, enquanto a PC produziu degradação de antocianinas no fruto como um todo (FORNI et al., 1993)

Trabalhos realizados por JANSER (1997), mostraram que a acerola quando tratada com misturas de enzimas pode produzir maior rendimento de suco (80%) e melhoria da qualidade para o aroma, e “flavour” e aumento de cor no suco.

O objetivo deste trabalho foi investigar as alterações de cor na polpa de acerola tratada e não-tratada termicamente através de análise instrumental utilizando colorímetro Minolta

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria prima

Quatro cultivares de acerola não classificados taxonomicamente com diferentes colorações (Figura 1) de casca, foram obtidas de um produtor da cidade de Indaiatuba-SP, região de Campinas (Tabela 2) com códigos atribuídos pelo próprio produtor.

Os frutos foram selecionados no laboratório, eliminando-se aqueles danificados. Após a seleção, procedeu-se a limpeza dos frutos com água corrente, seguida de higienização com hipoclorito de sódio a 20 ppm (mg/L) durante 15 minutos, deixando escorrer totalmente a água. O armazenamento dos frutos foi feito em sacos plásticos, com peso de 1 kg, congelados a -18°C até o momento da extração da polpa no extrator da marca

BERTUZZI, cuja capacidade é de aproximadamente 1000kg/h, com peneira de 0,8mm diâmetro de furo.

TABELA 2. Coloração das acerolas codificadas pelo produtor

Frutos	Código	Coloração
Acerola 1	19/37	Vermelha
Acerola 2	28/39	vermelho-laranja
Acerola 3	21/41	vermelho e vermelho escuro
Acerola 4	Jumirim	vermelho-púrpura

2.2. Tratamento e armazenamento das polpas de acerola

Para a produção da polpa de acerola, os quatro cultivares foram misturados para constituir uma única amostra. A polpa foi extraída em planta piloto e dividida em quatro partes: a primeira, não tratada termicamente; a segunda, inativada em tanque encamisado, onde a polpa permaneceu sob homogeneização até atingir 85°C deixando-se por 5 minutos, (semelhante ao branqueamento) para inativação das enzimas; a terceira, parte foi pasteurizada em pasteurizador tubular, a uma temperatura de 95°C ± 1,20 por 25 segundos; a quarta parte foi retirada da terceira que, além de pasteurizada, foi submetida à exaustão para retirada do excesso do oxigênio presente na polpa. Todas as polpas tratadas termicamente foram envasadas à quente. As duas primeiras polpas (sem tratamento térmico e inativadas) foram imediatamente armazenadas a -18°C, e as pasteurizadas armazenadas à temperatura ambiente. Todas as amostras foram acondicionadas em vidro e em lata para comparar a qualidade do produto em relação ao tipo de embalagem (Fluxograma no capítulo IV, item 2).

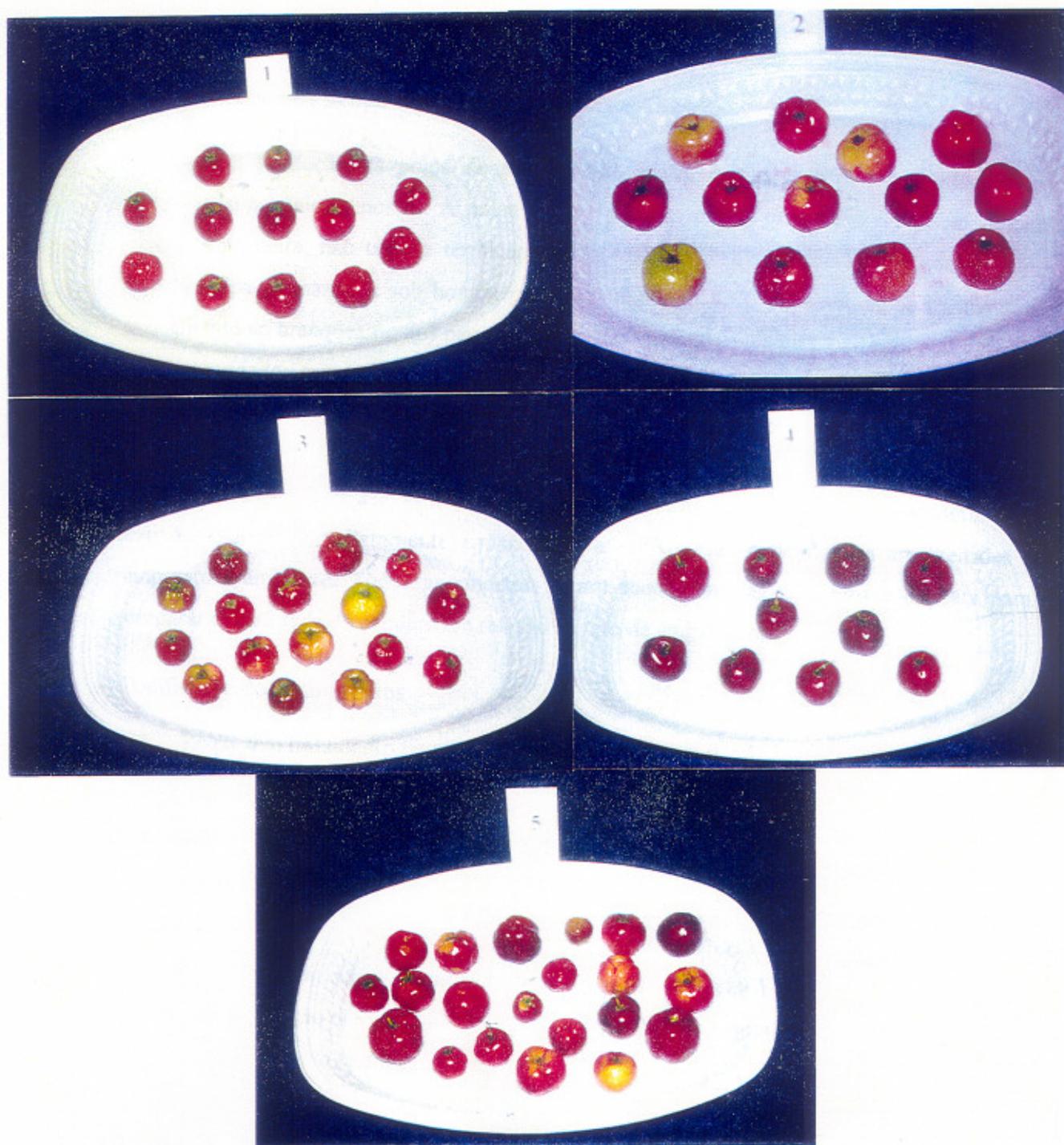


FIGURA 1. Fotos dos 4 cultivares de acerola usados para formar a mistura (5) que constituiu a polpa experimental

Codificação dos tratamentos:

PSTT	Polpa sem tratamento térmico
PI	Polpa inativada
PPSD	Polpa pasteurizada sem desaeração
PPCD	Polpa pasteurizada com desaeração

Codificação das embalagens

Para identificar o tipo de embalagem, foi adicionada a letra **V** para vidro e **L** para lata no final da codificação dos tratamentos. Por exemplo, PSTTV, significa que se trata da polpa sem tratamento térmico acondicionada em vidro.

Codificação dos Tempos de medição:

0	0 dia
1	30 dias
2	60 dias
3	90 dias
4	120 dias
5	150 dias
6	180 dias

Codificação da Cor:

L	Luminosidade
a	Vermelho
b	Amarelo

2.3. Análise objetiva da cor

A cor das polpas de acerola foi avaliada objetivamente em colorímetro, marca Minolta, modelo CR-300, com iluminante C (luz do dia) e ângulo de 2°. Os parâmetros utilizados foram os valores de L (Luminosidade), a (intensidade de vermelho) e b (intensidade de amarelo) também denominado de CIELAB, definido pela CIE (Comissão Internacional de Iluminação) em 1976. Os valores de a e b representam a cromaticidade, que podem ir de valores positivos a negativos (de b⁺=amarelo ao b⁻ = azul, ou de a⁺ = vermelho ao a⁻ = verde) (Figura 2A e 2B). O centro é acromático, e o aumento da cromaticidade segue a direção do centro para fora (MINOLTA, 1994).

Para calibrar o equipamento foi utilizada uma placa de azulejo branca padronizada pelo fabricante e padrões internos de cor Y= 94,20, x = 0,3134 e y = 0,3207.

Para determinar os valores de L a b foram testadas cápsulas plásticas foscas e cápsulas de vidro óptico. Optou-se por esta última acompanhada de fundo branco, semelhante ao padrão do aparelho com espessura de camada de 3mm. As análises tiveram cinco repetições, com 10ml de polpa e uso de uma espátula para aplainar a superfície externa da amostra que entraria em contato com o equipamento. A leitura da cor foi diretamente sobre a amostra sem que a luz atravessasse a cápsula.

Para eliminar os gases formados na polpa de acerola durante o armazenamento, as amostras foram homogeneizadas e degaseificadas em ultrassom, de 15 a 20 minutos, em

Δ
banho gelado para evitar degradação da cor durante esse procedimento.

Para avaliação de cor foram determinados os valores de L, a e b, o “hue” (H) ou coloração, a saturação (S) e a diferença da cor (ΔE) para todos os tratamentos. Foi comparado o resultado da polpa sem tratamento térmico (PSTT) com as demais, imediatamente após o processamento (tempo zero) e a cada 30 dias de armazenamento durante 180 dias. Os cálculos seguiram as fórmulas descritas por HUNTER (1975).

$$H = \sqrt{a/b} \quad S = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

2.4. Metodologia estatística utilizada

De acordo com a estrutura do experimento, foi considerado um plano fatorial com dois fatores, embalagem e tratamento (tratamento), variando em dois (0 e 1) e quatro níveis (0, 1, 2 e 3) respectivamente.

Devido a suspeitas de possível influência do tempo nas medições da análise de cor, este foi introduzido no experimento como um fator de blocagem. A magnitude desta influência foi testada nas análises.

Análises estatísticas aplicadas:

As análises testaram a influência da embalagem, do tratamento e do tempo nos diferentes parâmetros de cor.

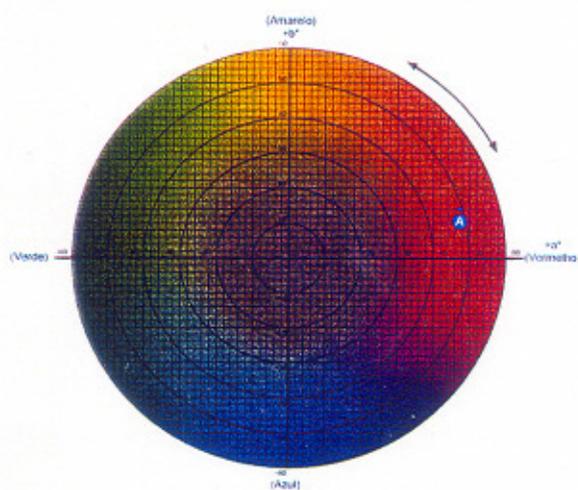
Para avaliar os dados experimentais foi empregada a análise de variância (ANOVA), determinando-se a significância pelo Teste F e comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o software SAS (THE SAS SYSTEM, 1992).

Os parâmetros da cor dados pelo sistema L a b foram medidos no tempo zero de processamento da polpa, para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos empregados. A cor foi avaliada também, no tempo final do armazenamento.

No tempo zero de processamento, os valores de L, a e b obtidos dizem respeito apenas aos tratamentos das polpas, independente do tipo de embalagem. Para análise final (tempo de seis meses de armazenamento), os dados calculados levaram em consideração o tipo de embalagem e o tratamento inicial.



2A



2B

FIGURA 2. Representação da cor

A – Representação da cor sólida para cor no espaço $L a b$

B – Representação de cromaticidade a e b

FONTE: Adaptado de MINOLTA (1994)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo comparativo dos parâmetros de cor L a b nas polpas de acerola nos tempos inicial (zero) e final de tratamento (seis meses)

Tomando-se a polpa PSTT (polpa sem tratamento térmico) como controle, os dados da Tabela 1 mostram que o tratamento térmico no tempo zero (T_0) provocou significativo aumento ($p \leq 0,05$) da luminosidade e da cor amarela (b^+), ao contrário da cor vermelha (a^+) que sofreu significativa diminuição ($p \leq 0,05$) nas polpas tratadas termicamente.

A pasteurização foi o processo mais drástico no tempo zero, sobre a cor vermelha promovendo uma perda de 64,60% e 73,31% nas polpas pasteurizadas sem desaeração (PPSD) e com desaeração (PPCD), respectivamente. A inativação teve 58,68% de degradação. Semelhantes resultados foram encontrados por MATSUURA (1994) ao tratar o suco de acerola termicamente pelo processo de pasteurização a 88°C/45 seg..

Os processamentos térmicos experimentais (pasteurização e inativação), provocaram visível mudança de cor do vermelho para amarelo-alaranjado nas polpas imediatamente após tratamentos (Figura 3A).

A cor vermelha na acerola e em seus produtos é atribuída à concentração de antocianinas. Experimento realizado por CONCEIÇÃO (1997) mostrou que a cinética de degradação das antocianinas obedecia à reação de primeira ordem, e a presença do ácido ascórbico elevava a velocidade da reação. CHAN e YAMOTO (1994) reportaram que, a energia de ativação (E_a) para destruir um microrganismo é de 50kcal/mol e a E_a para as antocianinas de acerola é de 12-16kcal/mol. Portanto, a degradação das antocianinas ocorre antes da destruição de microrganismos, sob condições de tratamento térmico comercial. Foi determinado empiricamente que o valor obtido da razão da E_a por 10^3 seria semelhante à temperatura mínima em °C, em que uma reação começava a ser significativa em alimentos. Logo a temperatura crítica para iniciar da degradação das antocianinas é de 12-16°C.

Assim, pode-se dizer que destruição maior ou menor dos pigmentos vermelhos dos produtos de acerola, são dependentes da temperatura dos tratamentos térmicos como

branqueamento ou esterilização comercial. Novas tecnologias têm sido testadas para evitar a perda de cor do suco de acerola entre as quais, a secagem por atomização e o uso de microencapsulação (FIGUEIRÊDO, 1998), a pasteurização “flash” realizadas em trocadores de calor a temperatura de 90°C/45-60s (GAVA, 1985) como alternativas para garantir as propriedades físico-químicas, se a temperatura de armazenamento for baixa (refrigeração ou congelamento) para assegurar a estabilidade dos pigmentos.

A Tabela 3 mostra os valores médios de cromaticidade para L a b nos tempo inicial e final de armazenamento da polpa de acerola. Também estão apresentadas as diferenças com respeito ao período de armazenamento.

Ao final de seis meses de armazenamento (T_6) das polpas, os resultados (Tabela 3) indicaram perdas em todos os parâmetros de cor L a b. Considerando-se a ordem de tratamento das polpas como PSTT, PI, PPSD, PPCD, foi calculado em média, a perda de luminosidade de aproximadamente 3,25 %; 2,99%; 7,12% e 7,89%, respectivamente; a perda da cor vermelha foi cerca de 67,36%; 65,77%; 44,13% e 29,32%, respectivamente. Portanto, a polpa pasteurizada com desaeração(PPCD) apresentou maior retenção da cor vermelha. Tais dados indicam que a retirada do oxigênio dessas polpas facilitou a preservação da cromaticidade do vermelho (a) durante o armazenamento (seis meses).

A intensidade da cor amarela (b^+) no final de seis meses de armazenamento (T_6), apresentou um aumento na ordem de 5,14% nas polpa sem tratamento térmico (PSTT), ao contrário das polpas tratadas termicamente que apresentaram diminuição de b^+ nesse período de aproximadamente 5,43%, 1,46% e 5,94% nas polpas inativadas (PI), pasteurizadas sem desaeração (PPSD) e pasteurizadas com desaeração (PPCD), respectivamente. Isto indica que os pigmentos amarelos presentes no produto parecem ser mais estáveis que os vermelhos durante o período de armazenamento. Também pode ter havido uma descoloração dos pigmentos vermelhos e este fato contribuiu para manter os valores de b, principalmente nas polpas pasteurizadas sem desaeração (PPSD).

Ao comparar as diferenças entre tempo inicial e final de armazenamento (T_0 e T_6) em relação às coordenadas de cromaticidade a e b foi observado que as polpas pasteurizadas sem desaeração (PPSD), apresentaram uma perda de 44% para a, e 1,46% para b, não sendo este último significativo. As polpas pasteurizadas desaeradas (PPCD)

tiveram degradação de 29,32% para **a**, e de 5,94% **b**, ambas diferenças foram significativas.

TABELA 3. Valores médios de **L a b** na polpa de acerola processada por diferentes tratamentos, no tempo zero (T_0) e tempo final de armazenamento (T_6 meses) e as diferenças dos parâmetros de cor em porcentagem ($T_0 - T_6$)

Amostra / Tratamento	L		a+		b+		$T_0 - T_{6\text{meses}}$ (%)		
	T_0	T_6	T_0	T_6	T_0	T_6	L	a	b
PSTTV	44,31 (0,13)	43,02 (0,66)	17,57 (0,07)	6,70 (0,41)	29,56 (0,50)	31,39 (1,03)	-2,91 (0,40)	-66,48* (0,24)	+6,19* (0,32)
PSTTL		42,72 (0,89)		7,00 (0,22)		30,77 (0,96)	-3,59 (0,51)	-68,24* (0,15)	+4,09 (0,73)
PIV	52,50 (0,23)	50,91 (0,14)	7,26 (0,04)	2,60 (0,11)	42,10 (0,40)	40,00 (0,26)	-3,03 (0,18)	-64,19* (0,07)	-4,99* (0,33)
PII		50,95 (0,26)		2,37 (0,05)		39,63 (0,36)	-2,95 (0,24)	-67,35* (0,05)	-5,87* (0,38)
PPSDV	50,15 (0,08)	46,27 (0,09)	6,22 (0,06)	3,48 (0,06)	37,01 (0,13)	36,46 (0,16)	-7,74* (0,09)	-44,05* (0,05)	-1,48 (0,12)
PPSDL		46,89 (0,11)		3,47 (0,19)		36,48 (0,29)	-6,50* (0,10)	-44,21* (0,13)	-1,43 (0,21)
PPCDV	50,24 (0,26)	46,32 (0,16)	4,69 (0,22)	3,25 (0,09)	37,52 (0,37)	35,29 (0,25)	-7,80* (0,21)	-30,70* (0,16)	-5,94* (0,31)
PPCDL		46,23 (0,17)		3,38 (0,10)		35,29 (0,20)	-7,98* (0,22)	-27,93* (0,16)	-5,94* (0,29)

PSTT- Polpa sem tratamento térmico

PI - Polpa inativada

PPSD - Polpa pasteurizada sem desaeração

PPCD - Polpa pasteurizada com desaeração

$T_0 - T_{6\text{meses}}$ - diferença entre o tempo zero e seis meses de armazenamento

* diferença significativa

Pequenas variações podem ser decorrentes de desvios nas medições mais diretas como esta que foi manualmente realizada em colorímetro, embora o equipamento, de acordo com o manual apresente alta performance nos seus sensores que definem as coordenadas de cromaticidade.

A diferença entre as médias pelo teste de Tukey nos resultados de L a b (Tabela 3) mostrou que as polpas PSTTV E PSTTL não apresentaram diferença significativa para a luminosidade, mas foi estatisticamente diferente para a em ambas embalagens. Quanto ao parâmetro b, este apresentou diferença significativa na polpa acondicionada em vidro, mas não a teve na polpa acondicionada em lata, indicando que a embalagem de lata preservou melhor os pigmentos amarelos do que a de vidro.

As polpas inativadas (PIV e PIL) (Tabela 3) ao final do armazenamento de seis meses não apresentou diferença significativa na luminosidade tanto nas polpas acondicionadas em lata quanto em vidro, entretanto os parâmetros de a e b, sofreram influência significativa com o tempo de armazenamento em ambas polpas, independente do tipo de acondicionamento (em lata e em vidro). Já as polpas pasteurizadas sem e com desaeração mostraram diferença significativa na luminosidade e cromaticidade a, nas polpas acondicionadas em vidro e nas acondicionadas em lata. Com relação à cromaticidade b, nas polpas PPSDV e PPSDL não apresentou diferença significativa ao contrário nas polpas PPCDV e PPCDL.

As figuras 3A e 3B mostram as fotos das polpas de acerola e a mudança de coloração das mesmas nos tempos inicial e final do período de armazenamento de seis meses. Na figura 4 estão apresentados os valores médios de L a b da polpa de acerola durante o armazenamento (de zero dia a seis meses).



FIGURA 3. Fotos das polpas de acerola no tempo zero de processamento (foto superior)(5A), e no tempo final de armazenamento de 6 meses (foto inferior)(5B). Da esquerda para direita: PSTT, PI, PPSD, PPCD.

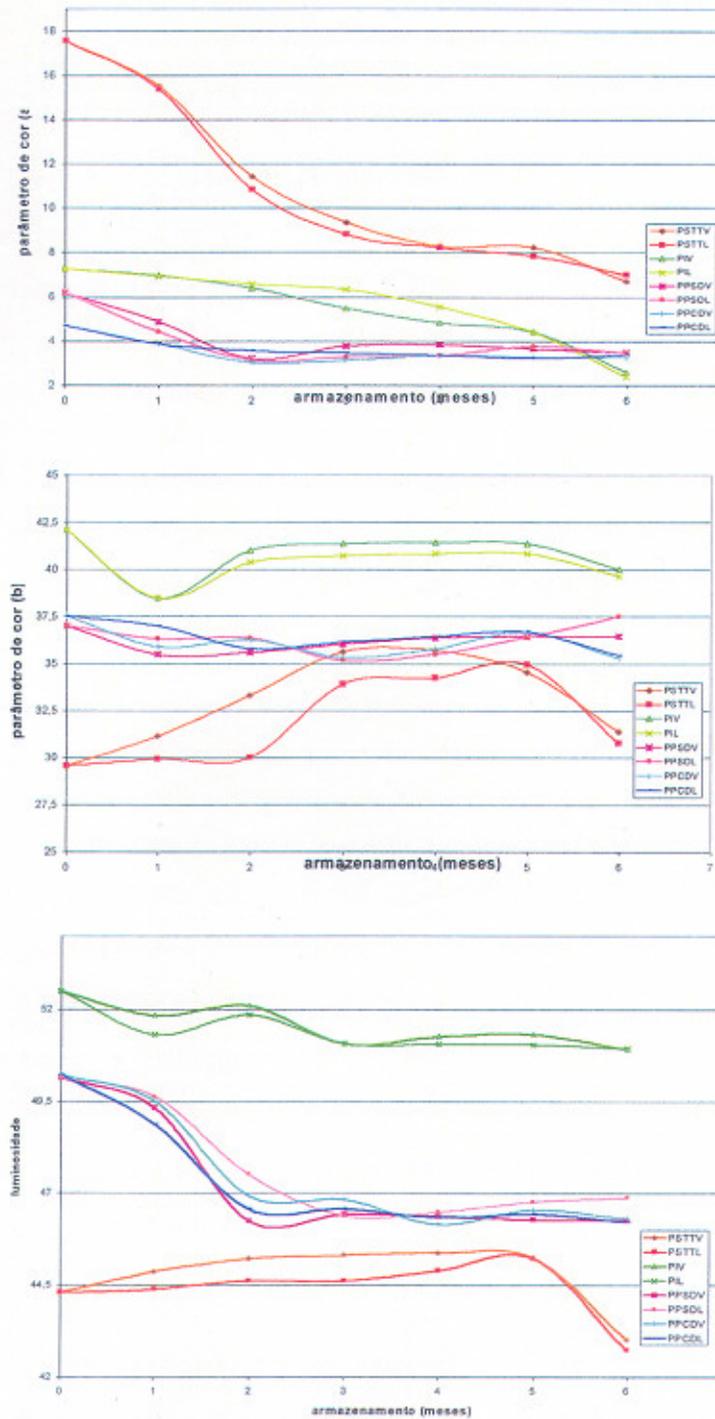


FIGURA 4. Valores médios dos parâmetros de cor L a b da polpa de acerola após diferentes tratamentos, de zero a seis meses de armazenamento

3.2. Comportamento de L a b nas polpas de acerola, sob diferentes tratamentos, do tempo zero até o final do armazenamento de 180 dias

Para se verificar as mudanças ocorridas no sistema de cor L a b, é necessário um estudo mês a mês, pois a análise estanque somente do tempo zero e do final de seis meses, poderia não trazer informações que por ventura viriam somar às discussões anteriormente realizadas. Diante desse fato, a Figura 4 informa todo o processo de mudança com cada parâmetro de cor (Luminosidade, cor vermelha (a^+) e cor amarela (b^+) durante o armazenamento das diferentes polpas tratadas neste experimento.

De acordo com MINOLTA (1994) as cores podem ser separadas em claras e escuras quando comparadas. A luminosidade pode ser medida independentemente do "hue"- termo usado no mundo das cores para classificações de vermelho, amarelo, azul, etc. No entanto, a luminosidade é um parâmetro medido verticalmente (Fig. 2 A, ilustrado no item 2.3), e os valores L^+ estão relacionados com cores mais claras, para o branco, enquanto L^- , para o mais escuro porque a medida se faz da superfície para o fundo da amostra.

De acordo com a Figura 4, as polpas tratadas termicamente (inativação e pasteurização) apresentaram uma diminuição da luminosidade e da cor amarela do primeiro ao segundo mês, exceto a polpa inativada que aumentou a luminosidade do nesse período. As polpas inativadas mostram que, a coordenada de cromaticidade **b** apresenta um aumento muito discreto, do 2º ao 5º mês, parecendo bastante estável nesse período. Do 5º ao 6º mês houve uma diminuição ficando abaixo dos níveis encontrados no tempo zero de processamento. Enquanto isso, a luminosidade a partir do 2º mês de armazenamento iniciou uma diminuição, permanecendo mais ou menos estável do 3º até o 6º mês, e depois ficando abaixo dos valores do tempo zero.

As polpas pasteurizadas apresentaram uma diminuição da luminosidade e da cor amarela (**b**) até o 2º mês, mantendo-se estáveis, em ambos parâmetros, até o 6º mês de armazenamento.

As polpas sem tratamento térmico, mostraram aumento de luminosidade e cor amarela até o 2º mês de armazenamento, à exceção da polpa sem tratamento térmico, em lata (PSTTL). Isto pode ser atribuído a um erro de medida, devido ao maior desvio padrão neste

ponto médio. Foi verificado ainda que, a luminosidade pareceu ser estável do 2º ao 5º mês nas polpas PSTTV e PSTTL, seguido de uma brusca diminuição ao final do armazenamento.

O parâmetro de cor amarela nessas polpas foi estável do 3º ao 5º mês, apresentando semelhantes valores de **b** nas polpas pasteurizadas, com brusca diminuição do 5º ao 6º mês. Foi observado também que o perfil do parâmetro de cor **b** (Figura 4) é semelhante ao da luminosidade, o que indica forte relação entre esses parâmetros, isto é, a luminosidade do produto é influenciada pela cromaticidade amarela.

A partir do tempo zero de processamento, foi verificado uma diminuição acentuada e constante do parâmetro de cor vermelha (a^+) nas polpas sem tratamento térmico (PSTT) e inativadas (PI), conforme reportado na Tabela 3 e Figura 4. A curva de maior declínio do vermelho ocorreu do tempo zero ao 3º mês para tais tratamentos. E as polpas pasteurizadas apresentaram rápido declínio do vermelho até o 2º mês, ficando estável deste ao 6º mês.

Foi visível, entretanto, que as polpas pasteurizadas ao final do armazenamento apresentaram leve coloração marrom. É conhecido que, compostos de coloração marrom podem ser provenientes da degradação dos pigmentos antociânicos, como também dos produtos de degradação formados a partir desses pigmentos, ou do ácido ascórbico presente na acerola, ou da reação de Maillard que ocorre no momento do tratamento térmico. Tais compostos podem ter influenciado os valores da coordenada de cromaticidade a^+ .

Os parâmetros do sistema L a b, demonstrado graficamente (Figura 4), apesar do efeito drástico no tempo zero de pasteurização e inativação da polpa, indicaram que após o tratamento térmico da pasteurização ocorreu maior estabilidade do parâmetros de cromaticidade **a** e **b**, principalmente este último observada no período de armazenamento de 2 a 5 meses. A Figura 4 também indica que para assegurar a qualidade da cor, o armazenamento das polpas nos diferentes tratamentos, e nas condições experimentais de armazenagem não deve ultrapassar cinco meses. Pois a partir desse período os parâmetros de cor sofrem alterações que podem ser comprometidos visualmente na escolha do produto pelo consumidor.

Ameixas Stanley processadas na forma de purês e de pastas foram concentradas pelo calor até 25 e 30°C, respectivamente, e armazenadas a 4 e 22±2°C no escuro por 24 semanas. Os resultados mostraram maior retenção de antocianinas nas amostras estocadas sob refrigeração do que àquelas não refrigeradas. Foi também observada correlação entre o total de pigmentos antociânicos e os valores de cor (sistema Hunter CDM). Os valores de a_{hunter} , croma (saturação) e L_{hunter} , em ambas as amostras com alto e baixo °Brix, tiveram correlação positiva com o teor de antocianinas (WANG et al., 1995).

Estudos realizados por ROCHA (1988) para verificar o efeito de diferentes temperaturas e armazenamento (150 dias) no suco de acerola mostrou alterações do ponto de vista organoléptico, principalmente na cor do suco que apresentou visualmente pigmentos escuros no decorrer do tempo, modificando consideravelmente a coloração em relação à inicial, indo do laranja avermelhado (antes do processamento) ao amarelo.

O estudo com suco de acerola tratado e não-tratado termicamente, sob pasteurização, desenvolvido por MATSUURA (1994) mostrou que a cor amarela em ambas amostras apresentou crescentes valores do parâmetro b_{hunter} , sendo maior para a amostra tratada termicamente, armazenada sob congelamento. OLIVA (1995) estudando néctares de acerola sob diferentes tratamentos térmicos, envasadas em latas, verificou que as amostras refrigeradas à 8°C, mantiveram os valores do parâmetro de cor b_{hunter} . Pequenas variações encontradas não foram significativas ao longo de 180 dias. As amostras armazenadas à temperatura ambiente apresentaram pequenas flutuações nos valores de b_{hunter} ao longo do armazenamento, com tendência a diminuir.

O efeito térmico contribui para degradação de cor (WANG et al., 1995) e para o escurecimento não-enzimático, favorecendo a Reação de Maillard (LESZKOWIAT et al., 1990).

Compostos fenólicos estão presentes na acerola, e segundo BARÓN et al. (1997) esses compostos podem contribuir para a cor amarela, como ocorre em vinhos brancos. Compostos amarelo-marron são lidos no mesmo comprimento de onda. Parece, então, que esses compostos aliados a outros mecanismos de reação poderiam contribuir para as variações observadas nas medidas de b^+ nas polpas estudadas neste experimento. Para

confirmar essa hipótese seria necessário desenvolver estudos neste sentido, como também maiores estudos com os carotenóides presentes nestes produtos.

RIGHETTO (1996) comparou a cor (amarela) do suco de maracujá adoçado e não adoçado e congelados, durante 8 meses de armazenamento. Os resultados mostraram que o suco adoçado não apresentou variação de cor ao longo do tempo do armazenamento, ao contrário do suco não adoçado que mostrou uma diminuição linear na cor durante o armazenamento. A degradação da cor foi avaliada pelo deslocamento do comprimento de onda para uma região mais clara. A autora sugeriu que a perda da cor está associada à degradação de β -carotenos, uma vez que dos carotenóides presentes no maracujá, 34% é β -caroteno, quantidade suficiente para influenciar a cor. A adição de açúcar reduziu a perda do β -caroteno e a modificação da cor, além de maior retenção dos atributos sensoriais do suco, os quais foram totalmente alterados no suco puro.

Neste experimento, a degradação da cor das polpas de acerola não é função apenas da temperatura de processamento ou do armazenamento, como também de outros fatores importantes como a presença de altas concentrações de ácido ascórbico e o pH, visto em capítulos anteriores. O pH de cada polpa estudada estava próximo de 4,0 o que pode facilitar a degradação das antocianinas. A partir de pH 4 ou próximo a este para mais inicia-se uma mudança para antocianinas incolores. De acordo com CHAN e YAMAMOTO (1994) a grande instabilidade do pigmento da acerola é devido à alta concentração de ácido ascórbico na fruta, confirmado em trabalho realizado por CONCEIÇÃO (1997).

3. 3. Estudo da influência do tempo de armazenamento, do tipo de embalagem e do tratamento da polpa de acerola em relação aos parâmetros de cor do sistema L a b

3.3.1. Cor vermelha (a+)

De acordo com a análise de variância (Anexo 1,Cap.V) o tempo de armazenamento e o tipo de tratamento dado à polpa de acerola influenciaram significativamente na cor vermelha. O comportamento dessa variável foi significativamente linear. O efeito do tipo de embalagem, no entanto não teve influência significativa na cor vermelha.

Os resultados estatísticos mostraram que o tempo de armazenamento provocou uma diminuição nos valores da cor vermelha. No caso dos tratamentos, de acordo com a mudança deles produziu diferentes valores nesse parâmetro de cor, sendo maiores na polpa sem tratamento térmico (PSTT) e menores na polpa pasteurizada com desaeração. Estes valores são resultados da ação do calor no tratamento; a polpa PPCD, foi sujeita a dois tratamentos térmicos, o da pasteurização e da desaeração. Fato que produziu maior degradação dos pigmentos vermelhos, isto pode ser verificado no capítulo anterior que trata das determinações dos teores de antocianinas, onde os diferentes tratamentos provocaram maior destruição desses compostos, responsáveis pela coloração vermelha.

Quanto às análises das interações dos principais efeitos do processamento (tratamento, embalagem e tempo de armazenamento), verificou-se que a interação tempo *versus* tratamento foi altamente significativa, mudando o padrão de comportamento de a em cada tempo de armazenamento, dependendo do tipo de tratamento.

3.3.2. Cor amarela (b⁺)

A análise de variância para o parâmetro de cor b⁺ (amarela) da polpa de acerola relacionando os diferentes tratamentos, tempo de armazenamento por seis meses e tipo de embalagem estão apresentados no Anexo 2.

De acordo com os resultados da ANOVA (Anexo 2, cap.V) o tempo de armazenamento e o tipo de tratamento dado às polpas de acerola influenciaram e nos valores experimentais da cor amarela (b), bem como a interação desses dois efeitos que mostrou ser altamente significativa. O tipo de embalagem não teve qualquer influência nesse parâmetro de cor, bem como as interações tempo *versus* embalagem e embalagem *versus* tratamento. As análises confirmaram um aumento da cor amarela com o tempo de armazenamento, atingindo maiores valores no 5º mês.

3.3.3. Luminosidade (L)

Os resultados estatísticos relativos à determinação da luminosidade das polpas de acerola estão apresentados no Anexo 3 (cap. V). De acordo com os resultados obtidos pode-

se verificar que o tempo de armazenamento e o tipo de tratamento utilizados, além da interação tempo *versus* tratamento foram altamente significativos. O tipo de embalagem não mostrou ser significativo nas medições da luminosidade dos produtos, entretanto, os resultados estatísticos mostraram que a interação embalagem *versus* tratamento mostrou-se significativa. Isto sugere que a cada tipo de tratamento os resultados podem mudar se considerado o tipo de embalagem.

Foi encontrado maiores valores de luminosidade nas polpas acondicionadas em vidro. O comportamento dos valores de luminosidade (L) nas condições experimentais, não foi linear.

3.4. Correlação entre as variáveis de cor L a b e as características químicas por tratamento da polpa de acerola e modelos de regressão

Para fazer uma possível estimativa dos teores de antocianinas totais (Acy) e dos teores de ácido ascórbico (AA), baseada nas análises químicas e parâmetros de cor investigados neste experimento. Foi fixado o tratamento dado às polpas de acerola, o fator embalagem e o fator tempo de armazenamento, e obtiveram-se os modelos de regressão a seguir descritas por tratamento.

Vale ressaltar que os resultados estatísticos das equações tem a propriedade de mostrar que é possível, a partir de resultados de outras análises envolvidas no estudo, estimar o valor para uma análise que, por ventura, não tenha sido realizada ou que pretenda ser confirmada. Todavia, este procedimento **só é válido na região experimental** em que se procedeu a investigação .

O modelo torna-se inválido se por acaso qualquer análise fuja às condições experimentais. Por exemplo, se os resultados referem-se a uma seqüência de análises a cada 30 dias e um período de armazenamento de 6 meses, não seria correto estimar valores fora dessas condições. A regressão é restrita aos parâmetros estabelecidos pelo modelo experimental.

Códigos usados nos modelos de regressão e correlações (Pearson):

acCit – acidez titulável expresso em ácido cítrico

acMal – acidez titulável expresso em ácido málico

S = sólidos totais

Acy = antocianinas totais

AA- ácido ascórbico

L = luminosidade

a – cor vermelha

b – cor amarela

a) Modelo de regressão da polpa sem tratamento térmico (PSTT), considerando as diferentes análises químicas:

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentados os valores dos coeficientes estatísticos que deram origem aos modelos de regressão para determinar os teores de antocianina, incluindo os resultados das análises químicas experimentais (modelo 3), e o modelo para avaliar a concentração das antocianinas, incluídos os resultados obtidos nas análises químicas e nos parâmetros de cor L a b (modelo 4). Estes modelos são relativos aos valores das análises obtidos na polpa PSTT .

TABELA 4. Coeficientes estatísticos da análise de regressão para antocianinas contra as análises químicas (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coeficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	-44,47	68,49	-0,65	0,537
pH	7,503	8,082	0,93	0,384
°Brix	-13,606	4,553	-2,99	0,020
AcCit	93,92	34,10	2,75	0,028
AcMal	23,13	35,32	0,66	0,533
S	2,837	1,487	1,91	0,098
AA	0,026540	0,009734	2,73	0,029

s = 0,6900 R-sq =99,0% R-sq ajust = 98,1%

Modelo 3:

$$\text{Acy}_{\text{PSTT}} = -44,47 + 7,5 \text{ pH} - 13,606 \text{ °Brix} + 93,92 \text{ acCit} + 23,13 \text{ acMal} + 2,87 \text{ S} + 0,0265 \text{ AA}$$

TABELA 5. Coeficientes estatísticos da análise de regressão para antocianinas contra as análises químicas e cor (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coeficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	25,8	247,8	0,10	0,922
PH	6,37	18,75	0,34	0,751
°Brix	-24,18	22,28	-1,09	0,339
AcCit	120,16	92,53	1,30	0,264
AcMal	-17,23	96,64	-0,18	0,867
S	8,037	7,830	1,03	0,363
AA	0,04065	0,02160	1,88	0,133
L	-1,889	2,968	-0,64	0,559
a	0,0603	0,2893	0,21	0,845
b	1,598	2,181	0,73	0,504

s = 0,7999 R-sq =99,2% R-sq ajust = 97,4%

Modelo 4:

$$\text{Acy}_{\text{PSTT}} = 26 + 6,4 \text{ pH} - 24,2 \text{ }^\circ\text{Brix} + 120 \text{ acCit} - 17,2 \text{ acMal} + 8,04 \text{ S} + 0,0406 \text{ AA} - 1,89 \text{ L} + 0,060 \text{ a} + 1,60 \text{ b}$$

Após os ajustes das equações representativas dos modelos propostos (3 e 4) aos dados experimentais e os valores teóricos obtidos estatisticamente, os resultados mostraram concordância com os valores experimentais e podem ser utilizados como preditivos para estimar as concentrações de ácido ascórbico na polpa de acerola, comprovado sua validade pelos altos coeficientes de determinação (98,1% e 94,7%).

Os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7, tratam das análises dos coeficientes do modelos obtidos para estimar a concentração do ácido ascórbico relativo às determinações das outras análises químicas experimentais (modelo 5) e para estimar a concentração do ácido ascórbico, em relação às análises químicas e físicas envolvidas no experimento (modelo 6).

TABELA 6. Coeficientes estatísticos da análise de regressão para ácido ascórbico contra as análises químicas (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coefficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	742	1886	0,39	0,706
pH	-254,6	210,7	-1,21	0,266
°Brix	213,3	167,3	1,27	0,243
AcCit	-763	1299	-0,59	0,575
AcMal	-198,9	981,0	-0,20	0,845
S	-5,68	49,52	-0,11	0,912
AA	19,406	7,117	2,73	0,029

s= 18,66

R² = 97,2%

R²_{ajust} = 94,7%

Modelo 5:

$$\text{Asc}_{\text{PSTT}} = 742 - 255 \text{ pH} + 213 \text{ }^\circ\text{Brix} - 763 \text{ acCit} - 199 \text{ acMal} - 5,7 \text{ S} + 19,4 \text{ acy}$$

TABELA 7. Coeficientes estatísticos da análise de regressão para ácido ascórbico contra as análises químicas e cor (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coefficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	- 4473	3536	- 1,26	0,275
pH	132,0	313,8	0,42	0,696
°Brix	638,6	284,2	2,25	0,088
AcCit	- 1510	1700	- 0,89	0,425
AcMal	1665	1408	1,18	0,302
S	- 208,1	105,8	- 1,97	0,120
AA	11,555	6,139	1,88	0,133
L	81,80	32,93	2,48	0,068
a	- 2,992	4,670	- 0,64	0,557
b	- 62,96	23,31	- 2,70	0,054

s= 13,49

R-sq = 99,2%

R-sq(adj) = 97,2%

Modelo 6:

$$\text{Asc}_{\text{PSTT}} = - 4473 + 132 \text{ pH} + 639 \text{ }^\circ\text{Brix} + 1510 \text{ acCit} + 1665 \text{ acMal} - 208 \text{ S} + 11,6 \text{ acy} + 81,8 \text{ L} - 2,99 \text{ a} - 63,0 \text{ b}$$

Os modelos propostos (5 e 6) após ajustes, demonstraram que os valores experimentais estão de acordo com os teóricos obtidos estatisticamente. Esses modelos, portanto, são comprovada validade representados pelos altos coeficientes de determinação (94,7% e 97,2%).

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos das correlações envolvendo as análises químicas e os parâmetros de cromaticidade (L a b) da polpa de acerola PSTT.

TABELA 8. Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis de cor (L a b) com as análises químicas da polpa de acerola sem tratamento térmico (PSTT)

Parâmetros de cor	PH	°Brix	Ac.Cit	Ac.Mal	Sólidos totais	Acy	AA	L	a
L	-0,44	0,08	0,12	-0,02	-0,56	-0,12	-0,07		
a	-0,42	-0,56	0,76	0,82	0,62	0,92	0,86	-0,16	
b	-0,14	0,47	-0,26	-0,47	-0,86	-0,662	-0,55	0,82	-0,65

De acordo com os dados obtidos pela correlação de Pearson (Tabela 8), foi observado que na polpa PSTT existe uma alta correlação positiva entre os parâmetros de cromaticidade a e os teores de antocianinas totais ($r=0,92$), ácido ascórbico($r=0,86$) e acidez total($r=,80$). Os valores de cromaticidade de b apresentaram nessa polpa alta correlação positiva com a luminosidade ($r=0,82$). Foram observadas correlações negativas de b com os sólidos totais($r=-0,86$) e a coordenada de cromaticidade a ($r=-0,65$). Em relação ao pH, houve correlação negativa com L e a ($r= -0,42$) e baixa correlação negativa com b ($r=-0,14$). Este dado indica que, à medida que diminui o pH aumenta, principalmente, a luminosidade e a cor vermelha.

b) Modelo de regressão para a polpa inativada (PI) de acerola em relação às diferentes análises químicas:

Os modelos de regressão 7 e 8, são resultados dos coeficientes estatísticos obtidos a partir dos valores experimentais obtidos nas análises químicas e físicas da polpa inativada (PI) para estimar a concentração de antocianinas totais (modelo 7) e para estimar a concentração do ácido ascórbico (modelo 8) cujas análises estatísticas estão demonstradas nos Anexos 4 e 5 (cap.V).

Os resultados dos modelos propostos, após ajustes para determinar as concentrações das antocianinas da polpa inativada de acerola, mostraram que esses modelos podem ser usados

para interpolação, ou estimativa. A validade dos modelos foi representativo demonstrada pelos altos coeficiente de determinação (92,4% e 88,8%).

Modelo 7:

$$\text{Acy}_{\text{PI}} = -35 + 14,5\text{pH} - 3,3^{\circ}\text{Brix} - 6,4\text{acCit} + 18,4 \text{ acMal} + 0,25 \text{ S} + 0,0133 \text{ AA} - 0,208 \text{ L} + 1,37 \text{ a} + 0,042 \text{ b}$$

$$s = 0,7885$$

$$R^2 = 97,7\%$$

$$R^2_{\text{ajust}} = 92,4\%$$

Modelo 8:

$$\text{Asc}_{\text{PI}} = 4006 - 205 \text{ pH} - 350 ^{\circ}\text{Brix} + 1261 \text{ acCit} - 739 \text{ acMal} - 45,1 \text{ S} + 13,2 \text{ acy} - 1,5 \text{ L} + 11,3 \text{ a} + 7,03 \text{ b}$$

$$s = 24,86$$

$$R^2 = 96,5 \%$$

$$R^2_{\text{ajust}} = 88,8 \%$$

A Tabela 9 apresenta os resultados estatísticos obtidos das correlações entre os parâmetros de cor (L a b) e as análises químicas realizadas na polpa de acerola inativada (PI).

Na polpa de acerola inativada (PI) termicamente (Tabela 9), foi observado alta correlação positiva entre luminosidade e a acidez total ($r = 0,70$). Foi verificado maior correlação com os valores de cromaticidade b ($r = 0,74$) do que a ($r = 0,57$). A coordenada de cromaticidade a (cor vermelha) apresentou alta correlação positiva com os teores de ácido ascórbico ($r = 0,94$) e antocianinas totais ($r = 0,88$). Foi também observada correlação negativa dos parâmetros de cor L a b com o pH, sendo maior para a cor vermelha (a).

TABELA 9. Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis de cor (L a b), e as análises químicas da polpa de acerola inativada (PI)

Parâmetros de cor	pH	°Brix	AcCit	Ac.Mal	Solidos totais	Acy	AA	L	a
L	-0,36	0,07	0,74	0,70	0,28	0,49	0,58		
A	-0,69	-0,20	0,83	0,63	0,45	0,88	0,94	0,57	
b	-0,23	0,35	0,45	0,64	-0,10	0,14	0,26	0,74	0,21

c) Modelo de regressão para a polpa pasteurizada sem desaeração (PPSD) de acerola em relação às diferentes análises químicas:

Os modelos de regressão (9 e 10) propostos são relativos aos resultados dos coeficientes estatísticos, incluindo os valores experimentais obtidos nas análises químicas e parâmetros de cor da polpa de acerola pasteurizada sem desaeração (PPSD). O modelo 9, é resultado das análises dos coeficientes obtidos (Anexo 6) para estimar a concentração de antocianinas na polpa PPSD, e o modelo 10, é resultado dos coeficientes obtidos (Anexo 7) para estimar a concentração do ácido ascórbico na polpa PPSD.

Ambos os modelos (9 e 10), após ajustes mostraram que podem ser preditivos, indicando sua validade pelo alto coeficiente de determinação (99,9%).

Modelo 9:

$$Acy_{PPSD} = 152 - 44,4 \text{ pH} + 1,79 \text{ °Brix} - 47,2 \text{ acCit} + 5,28 \text{ acMal} - 4,78 \text{ S} + 0,0415 \text{ AA} + 0,211 \text{ L} + 0,103 \text{ a} + 0,214 \text{ b}$$

$$s = 0,1255$$

$$R^2 = 100,0 \%$$

$$R^2_{ajust} = 99,9 \%$$

Modelo 10:

$$Asc_{PPSD} = - 3853 + 1105 \text{ pH} - 37,8 \text{ }^\circ\text{Brix} + 1177 \text{ acCit} - 128 \text{ acMal} + 115 \text{ S} + 23,7 \text{ acy} - 4,52 \text{ L} - 2,64 \text{ a} - 5,49 \text{ b}$$

$s = 3,001$

$R^2 = 100,0 \%$

$R^2_{ajust} = 99,9 \%$

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados das análises de correlações entre os parâmetros de cor (L a b) e as análises químicas experimentais obtidas na polpa de acerola pasteurizada sem desaeração (PPSD).

TABELA 10. Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis de cor (L a b), e as análises químicas da polpa de acerola pasteurizada sem desaeração (PPSD)

Parâmetros de cor	PH	°Brix	AcCit	AcMal	Solidos totais	Acy	AA	L	a
L	0,58	-0,21	0,82	0,67	0,65	0,94	0,91		
a	0,84	-0,61	0,44	0,79	0,24	0,60	0,61	0,65	
b	0,51	-0,22	0,29	0,51	0,30	0,47	0,44	0,62	0,30

d) Modelo de regressão para a polpa pasteurizada de acerola com desaeração (PPCD) em relação às diferentes análises químicas:

O modelo 11 foi proposto para estimar a concentração de antocianinas na polpa de acerola PPCD, de acordo com os resultados experimentais obtidos. Este modelo é relativo aos resultados dos coeficientes estatísticos (Anexo 8), utilizando os dados experimentais das análises químicas e parâmetros de cor da polpa PPCD.

De acordo com os resultados obtidos, o modelo 11 apresentou-se válido para estimar os teores de antocianinas na polpa pasteurizada com desaeração, o qual pode ser explicado pelo alto coeficiente de determinação (96,5%).

Modelo 11:

$$Acy_{PPCD} = -219 + 6,0 \text{ pH} + 0,86 \text{ }^\circ\text{Brix} + 156 \text{ acCit} + 39,5 \text{ acMal} - 1,58 \text{ S} + 0,0008 \text{ AA} + 1,73 \text{ L} - 1,47 \text{ a} - 0,290 \text{ b}$$

$s = 0,6987$

$R^2 = 99,4 \%$

$R^2_{ajust} = 96,5 \%$

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados obtidos nas correlações entre os parâmetros de cor (L a b) e as análises químicas determinadas na polpa pasteurizada com desaeração (PPCD).

TABELA 11. Estudo das correlações (Pearson) entre as variáveis de cor (L a b) as análises químicas da polpa de acerola pasteurizada com desaeração (PPCD)

Parâmetros de cor	pH	°Brix	AcCit	AcMal	Sólidos totais	Acy	AA	L	a
L	0,73	-0,26	0,69	0,15	0,85	0,96	0,89		
A	0,82	-0,50	0,57	0,31	0,59	0,81	0,73	0,86	
B	0,59	-0,53	0,36	0,28	0,34	0,50	0,41	0,55	0,57

Os resultados das correlações obtidas entre a análise da cor e as análises químicas relativas às polpas de acerola pasteurizadas sem e com desaeração (PPSD, PPCD) apresentadas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente, mostrou alta correlação positiva da luminosidade com os teores de ácido ascórbico ($r = 0,90$), e de antocianinas totais ($r = 0,95$) em ambas as polpas. A correlação da luminosidade com os resultados de acidez total expressa em ácido cítrico foi maior na polpa PPSD ($r = 0,82$) do que na polpa PPCD ($r = 0,69$); esta correlação mostrou-se menor quando expressa em ácido málico em ambas as polpas pasteurizadas ($r_{PPSD} = 0,67$ e $r_{PPCD} = 0,15$). Logo, as polpas pasteurizadas expressa desta forma (em ácido cítrico) não apresentou uma boa correlação.

A coordenada de cromaticidade **a** mostrou maior correlação, com a luminosidade na polpa PPCD ($r = 0,86$) do que na polpa PPSD ($r = 0,65$), este fato deve-se, provavelmente, ao

tratamento de desaeração que promoveu maior brilho na polpa PPCD, pela descoloração dos pigmentos vermelhos.

Foi verificada correlação positiva dos parâmetros de cor **L a b** com o pH em ambas as polpas pasteurizadas. Isto sugere que a estabilidade de cor das polpas pasteurizadas dependem do pH, isto é, quanto menor o pH, maior a estabilidade da cor na polpa de acerola.

Concluiu-se que resultados dos coeficientes estatísticos os quais deram origem aos modelos de regressão para estimar os teores de antocianinas totais e de ácido ascórbico no período de zero a seis meses de armazenamento, das polpas PSTT, PI, PPSD e PPCD (modelos de 3 a 11), mostrou que esses modelos (após os ajustes) incluídos os resultados obtidos nos parâmetros de cor de **L a b** e os resultados obtidos nas análises químicas experimentais, apresentaram altos coeficientes de determinação, variando de 88,8 a 99,9%. Todos os modelos de regressão aqui apresentados foram considerados válidos como preditivos.

3.5. Avaliação do ton (“hue”), croma (saturação) e diferença de cor da polpa de acerola, submetida a diferentes tratamentos e condições de armazenamento

No sistema de Munsell, os três atributos das cores são sempre descritos em termos de TOM, VALOR, e CROMA (“Hue”, Value, e Chroma”). **Ton** é o nome da cor. É a qualidade pela qual se distingue uma família de outra de cores cromáticas, como o vermelho do amarelo, ou verde do azul ou do roxo. Portanto, a tonalidade é a qualidade pela qual se distinguem cores de igual luminosidade e croma. **Valor** é a luminosidade da cor, é a qualidade pela qual se distingue uma cor clara de outra escura. **Croma** (saturação) é a força da cor, é a qualidade pela qual se distingue uma cor fraca de uma forte, é a intensidade de um ton distinto ou a intensidade da cor (FERREIRA,1981)

Croma fornece uma medida de intensidade de cor, enquanto o ângulo do ton (0°= vermelho púrpura, 90° = amarelo, 180° = verde azulado, e 270° = azul) indica a própria cor da amostra (McGUIRE, 1992).

Na Figura 5 estão mostrados os valores médios de “hue” (ton), croma (saturação) e diferença de cor (ΔE) da polpa de acerola submetida a diferentes tratamentos e armazenada durante seis meses.

O ton e a saturação são medidas que dependem dos valores das coordenadas de cromaticidade **a** (vermelho) e **b** (amarelo). A diferença de cor além de **a** e **b**, também depende da luminosidade (**L**).

De acordo com a Figura 5, verifica-se que todos os tratamentos apresentaram uma tendência semelhante para os valores de ton, mostrando que houve aumento da cromaticidade amarela (**b**) em detrimento da vermelha (**a**), exceto para o tratamento de inativação (PIV e PIL) que teve a propriedade de mostrar uma tendência diferente. Ao comparar as Figuras 4 (discutido anteriormente) e 5, verifica-se que os valores de **b** (Figura 4) apresentam perfis semelhantes à saturação (Figura 5), e os valores de **a** (Figura 4) têm semelhante perfil ao ton (Figura 5). Logo, há forte influência do vermelho sobre o ton da cor e o amarelo sobre a saturação da cor.

A Figura 5.b, indica que o efeito térmico de inativação promoveu maior saturação de cor comparada aos demais tratamentos. O resultado sugere que, tal tratamento térmico pode ter favorecido uma modificação de cor nos compostos. Tais compostos modificados podem ter sido medidos pelo equipamento. Outra possibilidade é que o tratamento poderia ter um efeito direto sobre flavonóides opticamente inativos transformando-os em compostos ativos, isto é, passando do estado incolor para o amarelado o que proporcionaria maior saturação da cor da polpa.

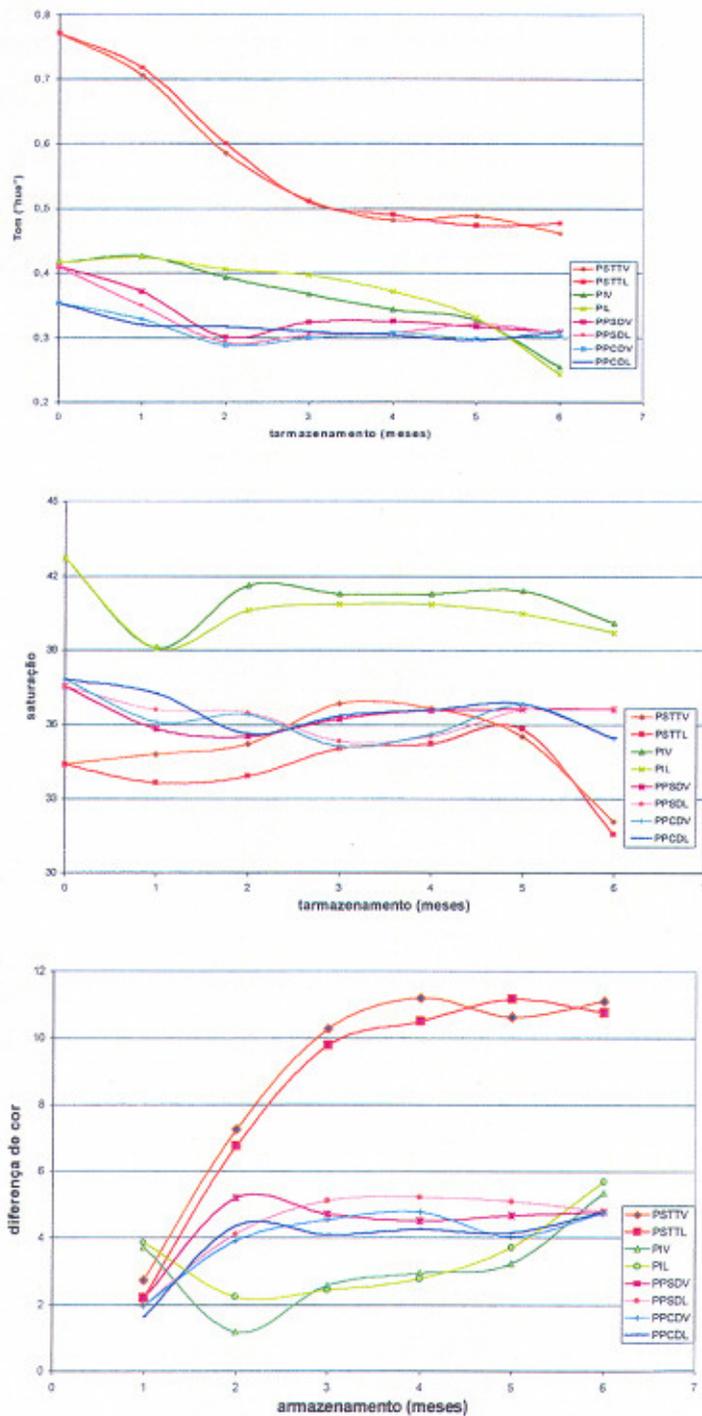


FIGURA 5. Valores médios de ton, saturação e diferença da cor nas polpas de acerola após diferentes tratamentos térmicos, de zero a seis meses de armazenamento

Pelos resultados apresentados na Figura 5, foi verificado também que, as polpas sem tratamento térmico apresentaram um nível de saturação semelhante a das polpas pasteurizadas entre o 3º e 5º meses de armazenamento. Tais resultados podem ter ocorrido provavelmente porque, nesse período houve maior degradação dos pigmentos das polpas, o que facilitou a mudança de cor das mesmas. Tal degradação pode ser verificada quando nos reportamos ao capítulo IV, onde foram estudadas estas questões, em relação ao ácido ascórbico e antocianinas, a partir dos seus teores encontrados nas referidas polpas (ver Tabelas 2 e 5, cap. IV).

Outro indicativo é que os dois primeiros meses de armazenamento, parece ser um período “latente”. Nesse período, pode haver formação de novos compostos que podem ser oriundos de interações químicas, ou produtos de degradação, compostos esses que passam a ser críticos, interferindo na coloração ou saturação do produto, principalmente, no período entre o 3º e 5º meses de armazenamento.

Na Figura 5.c, verifica-se que as polpas sem tratamento térmico apresentaram maior diferença de cor do que os outros tratamentos deste experimento. No mesmo gráfico, todos os tratamentos indicaram maior degradação de cor nos três primeiros meses de armazenamento, à exceção da inativação (PIV, e PIL) que teve um comportamento atípico. A inativação indicou um aumento da concentração de cor nos dois primeiros meses de armazenamento, portanto, diminuiu a diferença de cor ao invés de aumentar a diferença como ocorreu nos demais tratamentos. Porém, a partir do terceiro mês, as polpas inativadas mostraram gradativo aumento na diferença de cor que se manteve até o final do armazenamento.

Ao comparar as Figuras 5a e 5c, notou-se uma relação inversa entre o perfil gráfico do ton com a diferença de cor das polpas. Os resultados indicaram portanto que, a diferença de cor observada nas polpas durante o armazenamento, foi inversamente relacionada, principalmente, com a coordenada de cromaticidade a.

Como os valores de a determinam a coordenada de cromaticidade da cor vermelha e esta cor é devida às antocianinas foi estabelecida uma análise, a seguir, reportando-se aos valores encontrados para tais compostos durante o armazenamento, associado aos teores de ácido ascórbico, cujo estudo no capítulo IV mostra haver uma alta correlação positiva entre

os mesmos. Já que os parâmetros de cor (Figura 5) mostraram evidências de estabilidade entre o 3° e 5° meses de armazenamento, foi tomado esse período como amostragem para uma breve discussão a seguir.

Na Tabela 12, estão apresentados os valores de perdas de ácido ascórbico e de antocianinas no período de 3 a 5 meses, e de zero a 5 meses de armazenamento, para todos os tratamentos da polpas de acerola.

TABELA 12. Valores percentuais das perdas de ácido ascórbico e antocianinas no período de 3 a 5 meses e de zero a cinco meses de armazenamento das polpas de acerola

Polpas	Ácido ascórbico		Antocianinas	
	Perda do 3° ao 5° meses (%)	Perda relativa* (%)	Perda do 3° ao 5° meses (%)	Perda relativa* (%)
PSTTV	5,80	16,95	8,95	46,83
PSTTL	5,90	14,70	9,10	44,32
PIV	6,93	17,11	8,54	38,01
PIL	7,18	16,37	8,66	39,77
PPSDV	5,77	30,27	39,75	45,35
PPSDL	6,12	30,12	44,69	51,97
PPCDV	4,66	27,30	50,17	58,59
PPCDL	4,25	26,62	41,20	46,16

* corresponde à perda desde o tempo zero até o final do 5° mês de armazenamento

Os resultados sugerem que os parâmetros de cor dados pelo ton, saturação e diferença de cor estão relacionados, em parte, com a degradação do ácido ascórbico e das antocianinas, principalmente com estas últimas. As polpas pasteurizadas não congeladas, armazenadas no período do 3° ao 5° mês à temperatura ambiente, mostraram uma alta degradação das antocianina (39,75% a 50,17%) quando comparada à degradação dos teores de ácido ascórbico, no mesmo período (4,25% a 6,12%). No referido período de armazenamento, as polpas congeladas PTSS e PI (sem tratamento térmico e inativadas) apresentaram uma degradação de 5,80% a 7,18% do ácido ascórbico e degradação de 8,54% a 9,10% das antocianinas, nas respectivas polpas.

Se for considerada a perda relativa percentual desses compostos, para o período de zero a 5 meses de armazenamento, pode-se verificar (Tabela 12) que, o armazenamento a - 18°C foi eficiente na manutenção do ácido ascórbico, mas não para as antocianinas. Todavia, as polpas pasteurizadas armazenadas a temperatura ambiente, mostraram uma

degradação relativa de 26,62% a 30,27% do ácido ascórbico e de 45,35% a 58,59% das antocianinas.

Diante dos diferentes tratamentos e das condições de armazenamento das polpas de acerola, os dados experimentais indicaram que o tratamento de pasteurização (HTST), apesar de ter provocado grande mudança na cor no tempo inicial do processamento, promoveu uma retenção mais estável da cor das polpas no período de 3 a 5 meses de armazenamento.

Na figura 5, é possível observar a mudança de cor das polpas, pelo efeito dos processamentos térmicos e do armazenamento nos tempos inicial e final.

A grande taxa de degradação da cor dessas polpas foi devida à degradação das antocianinas. A temperatura ambiente de armazenamento, foi outro fator que contribuiu efetivamente para essa perda de cor. Tal perda, em parte, pode estar relacionada à presença de compostos de degradação tanto do ácido ascórbico quanto das antocianinas que vão se acumulando ao longo do armazenamento e/ou outros compostos formados que concorrem para as mudanças de cor, inclusive responsáveis pelo escurecimento dos produtos de acerola. Este estudo de cor, entretanto não pode ser considerado conclusivo, uma vez que exige a análise de outros compostos que possam interferir neste atributo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. E. Características das frutas para exportação. In: *Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. NETTO, A. G. ...[et al.]. **FrupeX**, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais – Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. p.9-12, 1996
- ASENJO, C. F. Nutrient composition, flavor qualities and other characteristic of West Indian Cherry (WIC). **Abstracts of Papers American Chemical Society** 176AGFD49, 1978.
- BARÓN, R.; MAYEN, M. & MERIDA, J. Changes in phenolic compounds and colour in pale Sherry wines subjected to fining treatments. **Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und – Forschung A**, v.205, n. 6, p.474-478, 1997.

- BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P., (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 1-40.
- CAVALCANTE, M. L. Composição de Carotenóides e valor de vitamina A na pitanga (*Eugenia uniflora*) e acerola (*Malpighia glabra L.*). Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, 1991. 86 p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- CHAN, H. T. & YAMAMOTO, H. Y. Kinetics of anthocyanin decomposition in Acerola juice. **ASEAN Food Journal**, v.9, n. 4, p. 132-135, 1994.
- CEMEROGLU, B.; VELIOGLU, S. & ISIK, S. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1216-1218, 1994.
- CONCEIÇÃO, M. P. J. **Cinética da degradação térmica de antocianinas em suco de acerola (*Malpighia glabra L.*)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Tese (Mestrado), 1997.
- FIGUEIRÊDO, R. M. F. **Caracterização físico-química do suco e pó de acerola (*Malpighia puniceifolia, L.*)**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1998. 184p. Tese (Doutor) - Universidade Estadual de Campinas.
- FERREIRA, V. L. P. Princípios e aplicações da colorimetria em alimentos. Secretaria de Agricultura e Abastecimentos: Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária. Instituto de Tecnologia de Alimentos- Campinas, SP. **Instruções Técnicas**, n.19, p.1-86, 1981
- FORNI, E.; POLESELLO, A. & TORREGGIANI, D. Changes in anthocyanins in cherries (*Prunus avium*) during osmodehydration, pasteurization and storage. **Food chemistry**, v. 48, n. 3, p. 295-299, 1993.
- FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Review Food Science Nutrition**, n.28, p. 273-314, 1989.
- GAVA, A. Processamento asséptico de sucos de frutas. **Alimentação**, v. 76, n. 1, p.32-44, 1985
- GUYOT, S.; MARNET, N.; LARABA, D.; SANONER, P. & DRILLEAU, J-F. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.46, n. 5, p. 1698-1705, 1998.
- HUNTER, R. S. Scales for the measurement of colour difference. In: **The Measurements of Appearance**. John Wiley, New York, pp. 133-40.
- JANSER, E. Enzyme applications for tropical fruits and citrus. **Fruit Processing**, v.7, n.10, p.388-393, 1997.
- LESZKOWIAT, M. J.; BARICHELLO, V.; YADA, RY.; COFFIN, R. H.; LOUGHEED, E. C. AND STANLEY, D. W. Contribution of sucrose to non-enzymatic browning in potato chips. **Journal Food Science**, v. 55, n. 1, p.281-284, 1990.

- MARKAKIS, P., LIVINGSTON, G. E. & FELLERS, C. R. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation. **Food Research**, v. 22, p. 117-129, 1957.
- MATSUURA, F. C. A. U. Processamento e caracterização de suco integral e concentrado congelado de acerola. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1994. 141 p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
- MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, v. 27, n.2, p. 289-295, 1992.
- MINOLTA. **Precise color communication**: color control from feeling to instrumentation. MINOLTA Co., Ltd. 1994.
- NETO, L. G. & SOARES, J. M. Acerola para exportação; aspectos técnicos da produção. **Frupex**, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais – Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.17
- OLIVA, P. B. **Estudo do armazenamento da acerola in natura e estabilidade do néctar de acerola**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1995. 103p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
- PADULA, M. & RODRIGUES-MAYA, D. B. Characterization of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guavas. **Food Chemistry**, v. 20, n.1, p. 11-20, 1986.
- PHIPPEN, W. B. & SIMON, J.E. Anthocyanins in basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.46, n. 5, p. 1734-1738, 1998.
- RIGHETTO, A. M. **Estabilidade físico-química e sensorial de suco de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**, puro e adoçado, congelado. Londrina: Centro de Ciências Agrárias, 1996. 107p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina.
- ROCHA, I. C. **Suco de acerola: efeito da temperatura de pasteurização e armazenamento**. Recife, PE: Centro de Ciências da Saúde, 1988. 105p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
- SANTINI Jr., R. & HUYKE, A. S. Identification of the anthocyanin present in the acerola which produces color changes in the juice on pasteurization and canning. **Journal of Agricultural of the University of Puerto Rico**, n. 40, p. 171-178, 1956.
- SATUÉ-GRACIA, M. T.; HEINONEN, M. & FRANKEL, E. N. Anthocyanins as antioxidants on human low- density lipoprotein and lecithion-liposome systems. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 33-62-3367, 1997.
- SILVA, M. F. V.; GUEDES, M. C. & MENEZES, H. C. Caracterização dos pigmentos antocianínicos de diferentes cultivares de acerola (*Malpighia glabra*) por CLAE. **Book of Abstracts**. Seventh Latin American Congress on Chromatography. Águas de São Pedro: São Paulo, p.155, 1998.
- THE SAS SISTEM for Windows 3.95 – Release 6.08. **SAS Institute, Inc.** Cary, NC, USA, 1992.

- WANG, W-M.; SIDDIQ, M. SINHA, N.K. & CASH, J. N. Physicochemical and sensory characteristics of Stanley plum paste. **Journal os Food Processing and Preservation**, v. 19, n. 1, p. 65-81,1995.
- WANG, W-M.; SIDDIQ, M. SINHA, N.K. & CASH, J. N. Effect of storage conditions on the chemical, physical and sensory characteristics of stanley plum pastes. **Journal of Food Quality**, v. 18, n. 1, p.1-18,1995.
- VALADON, L. R. G. & MUMMERY, R. S. Effect of canning and storage on carotenoids, vitamin A activity and vitamin C in Spanhis and Turkish oranges. **Journal of the Science of Food and Agriculture** , n. 32, p. 7373-745, 1981.

CAPÍTULO VI

EFEITO DE TRATAMENTOS DIVERSOS SOBRE AS ANTOCIANINAS DA POLPA DE ACEROLA

1. INTRODUÇÃO

Os pigmentos responsáveis pela cor ocorrem na natureza em muitos organismos desde as bactérias até às plantas superiores. Pode-se encontrar uma grande variedade de cores de acordo com a concentração e tipo de pigmentos presentes nos vegetais. Uma das cores mais atrativas nas plantas é originada pelas antocianinas, ocorrendo sob diferente pigmentação como azul, vermelho, púrpura e violeta. São pigmentos típicos de frutos, folhas e flores.

As antocianinas, substâncias fenólicas, são glicosídeos de antocianidinas constituídas pelo núcleo de íon flavílium. Sua estrutura básica é formada por uma aglicona (antocianidina), a qual é esterificada com um ou mais açúcares e estes, por sua vez, podem ser acilados com uma ou mais moléculas de ácidos orgânicos (HARBONE, 1967). As antocianidinas podem ser glicosiladas por diferentes açúcares nas posições 3, 5 e 7, sendo a posição C-3 uma constante. Os açúcares, componentes encontrados frequentemente ligados à antocianidinas, são glicose, rarnnose, xilose, galactose, arabinose e frutose. Os ácidos orgânicos mais comuns que acilam os resíduos de açúcares são: cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, sináptico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico (FRANCIS, 1992).

As antocianinas estão representadas por 27 famílias, 73 gêneros e várias espécies. Existem na natureza duzentos e sessenta e sete antocianinas conhecidas, e somente seis de importância para uso em alimentos (GUEDES & RODRIGUES, 1998).

As antocianinas podem ser usadas para diversos fins, porém sua utilização pode estar restrita a algumas vantagens ou desvantagens. Algumas vantagens podem ser citadas: têm sido consumidas pelo homem por várias gerações sem apresentar efeitos adversos aparentes à saúde; são coloridas na região do vermelho, geralmente solúveis, o que facilita sua incorporação em sistemas aquosos. Suas desvantagens: não são muito estáveis quimicamente,

são difíceis para purificar e seu poder tintorial é 100 vezes menor do que a tintura de carvão mineral (MAZZA & BROUILLARD, 1987).

Algumas investigações têm sido desenvolvidas para encontrar novas fontes de corantes naturais e novas tecnologias que garantam sua estabilidade. O capim napier foi considerado como fonte promissora de antocianina (67,7 mg/100g), cuja estabilidade foi sensivelmente aumentada com a adição de β -ciclodextrina na proporção de 1:3 (MANSILLA, 1998). O pó da polpa de acerola obtida por atomização, demonstrou maior estabilidade de cor e propriedade nutritivas (FIGUEIRÊDO, 1998) e sua microencapsulação proporciona grande capacidade de retenção dos compostos voláteis responsáveis por seu aroma (SANTOS, 1997). Estas propriedades caracterizam a acerola como fonte de corante natural e composto de enriquecimento para outros produtos alimentícios, além de infundir seu aroma especial, característico, no produto final.

Experimentos em humanos, embora restritos ao estudo de flavonóides, mostraram parcial absorção de polifenóis. Foi administrado oralmente quercitina em indivíduos ileostomizados sadios e a absorção variou de 24% e 52% da ingestão de aglicona e glicosídeos, respectivamente. O principal órgão envolvido no metabolismo de polifenóis é o fígado, embora outros órgãos participem como os rins e mucosa intestinal, uma vez que eles contêm enzimas envolvidas no metabolismo dos polifenóis (HACKET, 1986).

Os flavonóides não estão presentes em alimentos de origem animal. A ingesta dietária varia de 23 mg/dia a 1000 mg/dia, mas o número de compostos e classes variam. Estudos de casos controles sugerem que os flavonóides podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares e derrame cerebral (PETERSON & DWYER, 1998). O metabolismo e sua absorção ainda é obscuro. Estudos *in vitro* e com animais demonstraram que as antocianinas não são tóxicas e apresentam atividade antimutagênica e antioxidante (SAIJA, 1994; POURRAT et al., 1967). Outros compostos fenólicos têm sido reportados como inibidores ativos da oxidação de LDL (lipoproteína de baixa densidade) humano (DONOVAN et al., 1998; WANG et al., 1999). Frutas, vinho, uvas e alguns grãos (*Vigna subterrânea*) são especialmente benéficos para atividades biológicas devido às antocianinas presentes como cianidina, delfinidina e malvidina glicosídeos (BRAVO, 1998; MAZZA, 1995; PALE et al., 1997).

Investigação com antocianinas foi realizada para verificar atividades antioxidantes. Amostras de LDL (250 μ L) foram incubadas a 37°C com cada 10 ou 80 μ M de solução sulfato de cobre em várias concentrações de antocianinas, em frascos com 6mL de "headspace". A inibição da formação de compostos conjugados dienos e hexanal por antocianinas foi determinada após 3 horas para μ M de cobre e após 2 horas para 80 μ M de cobre. A atividade antioxidante testada aumentou com a concentração das antocianinas. No sistema LDL, todos os compostos foram mais eficientes na inibição do hexanal do que na formação do conjugado dieno. A malvidina mostrou maior atividade antioxidante na inibição da formação de hexanal para todas as concentrações testadas (59% a 2,5 μ M e 78,8% a 5 μ M), seguida pela cianidina (56,6% e 60,9%), delphinidina (36,9% e 65,3%) e pelargonidina (15,8% e 44,4%) (SATUÉ-GRACIA et al., 1997). De acordo com esses autores a atividade antioxidante das antocianinas é grandemente afetada pelo sistema usado como substrato e as condições catalíticas de oxidação (nível de cobre, pH e fatores interfaciais).

Antocianina isolada de feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*), cianidina 3-O- β -D-glucosídeo (C3G), testada em sistema biológico, em modelos *in vitro* tais como lipossomos, membranas de eritrócitos de coelhos e sistemas microssômicos de fígado de rato, mostrou forte atividade antioxidante (TSUDA et al,1994a). Como a C3G é amplamente encontrado na dieta humana, em muitas sementes e vegetais, tem sido indicada como importante fonte antioxidante dietária, e sua ingestão pode servir como prevenção de peroxidação dos lipídios de membranas celulares, induzidas por radicais ativo de oxigênio em sistemas biológicos (TSUDA et al,1994b).

Nem todas as antocianinas parecem ter a mesma resistência aos efeitos de vários agentes. Torna-se necessário conhecer não somente a estrutura desses compostos, como investigar a interação dos diversos fatores que seriam responsáveis por sua estabilidade. A ciência e a tecnologia investem em estudos que possam trazer benefícios para área de alimentos, saúde humana e farmacologia.

Estudos com antocianinas diglicosiladas de vinhos relatados por MARKAKIS (1982), mostraram ser mais estáveis à descoloração do que as monoglicosiladas correspondentes, porém estes últimos foram menos propensos ao escurecimento. Estudos com suco de uva mostraram que a estabilidade da antocianidina 3,5-diglicosídeo aumentou com o grau de

metoxilação, mas diminuiu com um aumento de hidroxilação da aglicona (HRAZDINA, 1970), e dentre as antocianidinas 3,5- diglucosídeos de suco de uva muscadine, a malvidina 3,5- diglucosídeo foi a mais afetada, na ordem de 53% de destruição, após 2 horas quando submetida ao aquecimento de 72°C (FLORA, 1978).

Um grande número de fatores envolvem o processo de destruição dos pigmentos, como temperatura, oxigênio, valores de pH maiores que 4,0, enzimas, luz, atividade de água, metais de transição, ácido ascórbico e compostos complexantes (CZAPSKI, 1988; KATSABOXAKIS, PAPANICOLAOU & MELANITOU, 1998; GUEDES & PEREIRA, 1998).

Ameixas tratadas com vapor para inativação de enzimas de escurecimento e armazenadas por 90 dias em soluções de sucrose/benzoato a pH 2,95; 3,45 e 3,95 apresentaram retenção de antocianinas em 77%, 29% e 8%, respectivamente. Marmeladas, feitas a partir de ameixa, armazenadas a pH 3,3 por 90 dias, apresentaram uma perda de 27% de antocianinas do conteúdo original (HERNANDEZ et al., 1995).

O tratamento, o tempo e as condições de armazenamento são fatores limitantes para as antocianinas. GIUSTI & WROLSTAD (1996) realizaram estudos com extrato de antocianina obtida de rabanete vermelho (cultivar Fuego), parcialmente purificada usando mini-coluna C-18. Foi adicionado 600 mg e 1200 mg de antocianina/L em sistemas contendo cerejas branqueadas em calda (xarope). Os sistemas foram denominados de RAE C1 e RAE C2, respectivamente, com pH ajustado para 3,5, mantidas por 4 dias a 40°C para o equilíbrio. Ambos foram envasados em vidro, passados por túnel de vapor, e pasteurizados em água a 85°C/ 20 minutos e armazenados durante 53 semanas, no escuro à 25°C. Os resultados mostraram que não houve mudança de intensidade de cor (croma) até 40 semanas, e as cerejas e caldas tratadas com 600mg Antocianina/L tiveram maior taxa de diminuição do croma do que com 1200mgAcy/L. A meia-vida das antocianinas monoméricas foi de 29 e 33 semanas para amostras coloridas com RAE C1 e RAE C2, respectivamente. Os autores concluíram que elevada taxa de concentração de antocianinas e o tempo de armazenamento exercem efeito protetor na estabilidade da cor. Esta alta estabilidade foi atribuída à presença de grupos acilantes.

Tortas de cerejas vermelhas foram misturadas durante 30 minutos em duas condições: na primeira, existia a presença do ar ou oxigênio e na segunda nitrogênio. Foram observadas severas perdas na cor das antocianinas, na ordem de 65 a 70% na primeira, comparativamente à segunda, de 50-55%. As cerejas não branqueadas perderam cor durante um descongelamento lento e o branqueamento a vapor preveniu a descoloração das antocianinas por 4 horas de descongelamento a temperatura ambiente (SIEGEL, MARKAKIS & BEDFORD, 1971).

JACKMAN et al. (1987) relatam que há interação de oxigênio, ácido ascórbico e pigmento em sistemas modelos e o oxigênio e ácido ascórbico são altamente prejudiciais ao pigmento. Esses dois agentes combinados causam mais destruição do que a soma de um único efeito. Foi sugerido por SANTINI & HUYKE (1956) que o alto teor de ácido ascórbico presente na acerola é um dos constituintes de grande participação na reação de descoloração das antocianinas do suco.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito térmico do processamento sobre as antocianinas da polpa de acerola, submetida a diferentes tratamentos, e ao final do período de armazenamento de seis meses, por intermédio das características físicas e químicas e físico-químicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria-prima

As amostras de acerola foram obtidas de um produtor da região de Campinas-SP. Os frutos foram oriundos de quatro diferentes cultivares e estavam em estágio “de vez” para maduro, predominando este último para que se pudesse obter maior conteúdo de antocianinas. De cada cultivar foi extraída polpa, manualmente, em laboratório a fim de ser identificado o perfil cromatográfico das antocianinas. Para estudar o efeito dos tratamentos térmicos, as quatro variedades de frutos foram juntados para formar um único lote (“pool”) na extração da polpa na despoldadeira e para a realização das análises físicas, químicas e físico-químicas. O objetivo desta mistura foi tornar o mais semelhante possível às condições da indústria de alimentos.

2.2. Características dos frutos

Por falta de identificação taxonômica das cultivares, foram estabelecidos os seguintes códigos pelo produtor: 19/37(acerola 1); 28/39(acerola 2); 21/41(acerola 3) e jumirim (acerola 4), as quais apresentaram as características descritas na Tabela 1.

TABELA 1. Características dos frutos utilizados no estudo das antocianinas de acerola

Fruto*	Peso médio (g)	Tamanho médio dos frutos (mm)		Coloração
		diâmetro transversal	altura	
Acerola 1	5,02	20,37	15,1	Vermelha
Acerola 2	8,41g	22,9	17,95	vermelho- laranjado
Acerola 3	8,51	24,91	21,75	vermelho e vermelho escuro
Acerola 4	7,10	22,56	16,33	vermelho- púrpura

* fruto arredondado no eixo horizontal e levemente achatado nas bases (Figura 1, cap.V)

2.3. Extração da polpa de acerola

Os quatro cultivares de acerola, após seleção, lavagem e higienização com hipoclorito de sódio a 20 ppm por 15 minutos, foram misturadas perfazendo um conjunto ("pool") de frutos, donde foi extraída a polpa de acerola. A extração deu-se em despoldadeira de escovas inclinada da marca Bertuzzi, com capacidade de extração para aproximadamente 1000kg/h, com peneiras de 0,8 mm de diâmetro de furo.

2.4. Tratamento térmico das polpas

A polpa extraída foi dividida em três porções: uma parte foi destinada para amostra controle, sem tratamento térmico e congelada imediatamente em câmara fria a -18°C ; a segunda parte, para ser submetida ao tratamento térmico, semelhante a um branqueamento para inativação enzimática; a terceira parte foi pasteurizada (Fluxograma, cap. IV).

- a) **Pasteurização.** A pasteurização da polpa de acerola foi realizada em um pasteurizador com trocador de calor tubular a uma temperatura de $94 \pm 1,20^{\circ}\text{C}$ por 45 segundos de retenção. Metade desta polpa foi submetida à desaeração.
- b) **Inativação.** A polpa foi colocada no tacho inoxidável, encamisado, até atingir 85°C e aí permanecendo por 5 minutos, sendo imediatamente envasado e recravado. O armazenamento da polpa inativada foi em câmara fria a $-18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

As polpas foram acondicionadas em vidro de 150 mL com tampa metálica tipo garra-torção. Ao final, foi obtido um total de 4 polpas. De acordo com o tratamento, as polpas obtidas foram designadas pelos seguintes códigos que serão assim descritos neste trabalho (Tabela 2):

TABELA 2. Codificação dos tratamentos utilizados no estudo das antocianinas de acerola

Polpa	Tratamento	Embalagem	Armazenamento
PSTT	----	Vidro	- 18°C ± 2°C
PI	Inativação	Vidro	- 18°C ± 2°C
PPSD	Pasteurização sem desaeração	Vidro	Temperatura ambiente
PPDV	Pasteurização com desaeração	Vidro	Temperatura ambiente

Após o acondicionamento, todas as embalagens foram colocadas em caixas de papelão, fechadas, permanecendo em ambiente isento de iluminação. A temperatura ambiente do laboratório, onde foram armazenadas as polpas pasteurizadas, variou durante a estocagem de seis meses, entre 15^oC a 35^oC.

2.5. Análise das antocianinas

2.5.1. Análise qualitativa

2.5.1.1.Preparação dos extratos

Antocianinas de polpas de acerola tratadas e não-tratadas termicamente (50 – 100 g) foram extraídas com metanol acidificado com 100 mL de HCl 1% por 12 horas, sob agitação a 8°C, ao abrigo da luz. A seguir, foi filtrado em filtro interno do saco do stomacher, filter bags, Stomacher '400', marca Eserward. O resíduo foi submetido a uma segunda extração por 1 hora nas mesmas condições e juntado ao primeiro. O extrato foi centrifugado, em centrífuga marca FANEM, modelo 204-N, a 3000 rpm por 30 minutos. O extrato antociânico obtido foi concentrado a vácuo a 38°C ± 2° C, usando um rota vapor, até obter uma redução de 90% do volume inicial. O concentrado final foi submetido a um fluxo de nitrogênio por cinco minutos e armazenado a temperatura de -18 ± 2° C, ao abrigo da luz, para a etapa de purificação do extrato.

2.5.1.2. Purificação dos extratos das polpas de acerola

O extrato obtido em 2.5.1.1 foi previamente purificado por cromatografia em papel filtro tipo mata-borrão, e os cromatogramas desenvolvidos em HCl 1%, por 12 horas ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. As zonas coloridas obtidas foram separadamente eluídas em metanol-HCl 0,1%. Cada zona foi evaporada a vácuo, conforme as condições descritas no item 2.5.1.1. e cromatografadas em papel Whatman 3 MM, empregando-se a fase móvel constituída por BAW (n-butanol- ácido acético- água, 6:1:2, v/v/v) em corrida descendente por 72 horas. As zonas coloridas separadas foram eluídas e recolhidas em metanol-HCl 0,1%. O extrato foi evaporado nas condições anteriormente citadas, depois passado em um fluxo de nitrogênio gasoso por 5 minutos e congelado a -18°C para etapas posteriores.

As frações isoladas de antocianinas purificadas em papel, em HCl 1% e BAW, foram denominadas de F1, F2, F3, e F4, após hidrolisadas (agliconas) foram denominadas de F1', F2', F3', e F4' como apresentado no fluxograma de purificação das antocianinas (Figura 1).

2.5.1.3. Hidrólise ácida das frações purificadas

As soluções das antocianinas das frações purificadas (item 2.6.1) foram hidrolisadas segundo o método descrito por GUEDES (1993).

2.5.1.4. Verificação das hidroxilas vicinais

Foi adicionado AlCl_3 para verificar presença de antocianinas com hidroxilas vicinais conforme método descrito por GEISSMAN (1953).

2.5.1.5. Análise por CLAE

A análise por CLAE foi realizada empregando-se cromatógrafo Líquido Waters, modelo 480C/1, acoplado a detector UV-visível, Spectromonitor II, LDC U.S.A. Foi usada coluna analítica de fase reversa RP-18 Bondapack (250 x 4,6 mm), empacotada com partículas de $5\mu\text{m}$. As condições de operação consistiram de uma vazão de fase móvel de 1,5 ml/min, com fase móvel constituída por MeOH- H_2O -HCl (50:50:1, v/v/v), em eluição

isocrática e detecção a 530 nm, sistema de injeção em injetor manual *Rheodyne* (Modelo 7125) para volume de 20µl, pré-coluna de saturação de sílica. As amostras foram previamente filtradas em cartuchos Sep-Pak com recheio C-18 e os solventes, filtrados em membrana FH, Millipore, 0,50µm de poro, 47 de diâmetro e degaseificada.

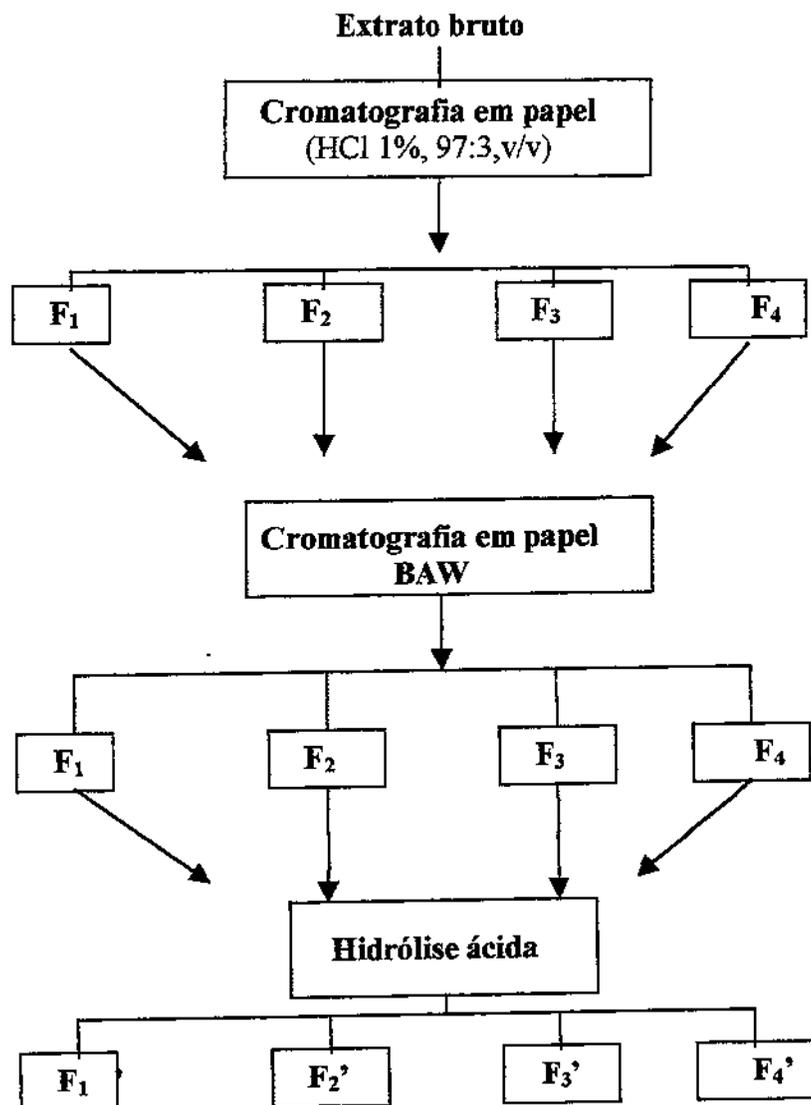


FIGURA 1. Fluxograma das etapas de purificação e obtenção das frações de agliconas (F') das antocianinas da polpa de acerola

2.5.2. Análise quantitativa

O teor de antocianinas totais foi determinado, empregando-se o método descrito por FULEKI & FRANCIS (1968).

As antocianinas das polpas de acerola, submetidas aos diferentes tratamentos, foram extraídas com Etanol-HCl 1,5N (85:15) e centrifugadas. Dos extratos antociânicos sobrenadantes foram obtidos os espectros de absorção e medida de absorvância nos seus respectivos comprimento de onda máximos, em espectrofotômetro marca BECKMAN, modelo DU Series 70.

Os extratos de antocianinas para quantificação e obtenção dos espectros foram mantidos a pH 2,0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação do extrato de antocianina

A separação e purificação das antocianinas é uma etapa que apresenta suas dificuldades particulares, pois a planta possui uma grande quantidade de compostos que devem ser isolados para que se obtenha um material satisfatoriamente purificado quando se utiliza técnicas como cromatografia em papel, placa ou coluna. Foi testada a separação em cromatografia em coluna aberta de PVP (polivinilpirrolidona), em resina de troca iônica em Amberlite ICR-120, forma H e cromatografia em papel. Optou-se por esta última, porque permitiu separação nítida das antocianinas e suas frações, embora exigisse um tempo relativamente longo. Nesta operação, foram também testados diferentes solventes como AWH (ácido acético – água – ácido clorídrico, 15:82:3), BFW (n-butanol – ácido fórmico – água, 100: 25:60) e BAW (n-butanol – ácido acético – água, 6: 1: 2).

Após testes preliminares, optou-se por cromatografia em papel Whatman n°3 MM para separação das antocianinas do extrato de acerola e BAW (n-butanol- ácido acético – água, 6: 1:2) como solvente, por ter sido bastante eficaz na separação, tendo as zonas sido separadas nítidas e compactas.

Na Figura 2 e Tabela 3, estão representados os perfis cromatográficos obtidos por CLAE dos extratos dos quatro cultivares de acerola individualmente, e também do extrato dos quatro cultivares que juntos formaram a mistura, a qual deu origem à polpa de acerola para o desenvolvimento deste trabalho. Os extratos foram purificados em HCl 1% e filtrados em cartuchos Sep-Pack, lavados com água destilada e recuperados com metanol acidificado (HCl 0,01%). Os quatro cultivares de acerola mostram um perfil cromatográfico semelhante entre si.

TABELA 3. Picos dos extratos de antocianinas das acerolas 1, 2, 3, e 4, com seus respectivos tempos de retenção e proporções relativas

Picos	Acerola 1		Acerola 2		Acerola 3		Acerola 4	
	t _R	Área %						
1	Solv	---	Solv	---	Solv	---	solv	---
2	1,73	18,85	1,68	3,49	1,74	16,05	1,74	8,82
3	2,10	3,89	1,83	7,45	2,10	9,68	2,15	5,31
4	2,85	60,88	2,24	69,99	2,85	42,72	2,88	50,94
5	3,26	10,63	3,03	4,40	3,29	8,24	3,27	6,68
6	4,38	8,83	4,65	12,69	4,37	18,89	4,42	24,33
7	5,96	1,90	6,35	1,98	5,94	4,39	6,02	3,89

t_R- tempo de retenção (min)

O pico 1 não foi integralizado, e trata-se do pico do solvente.

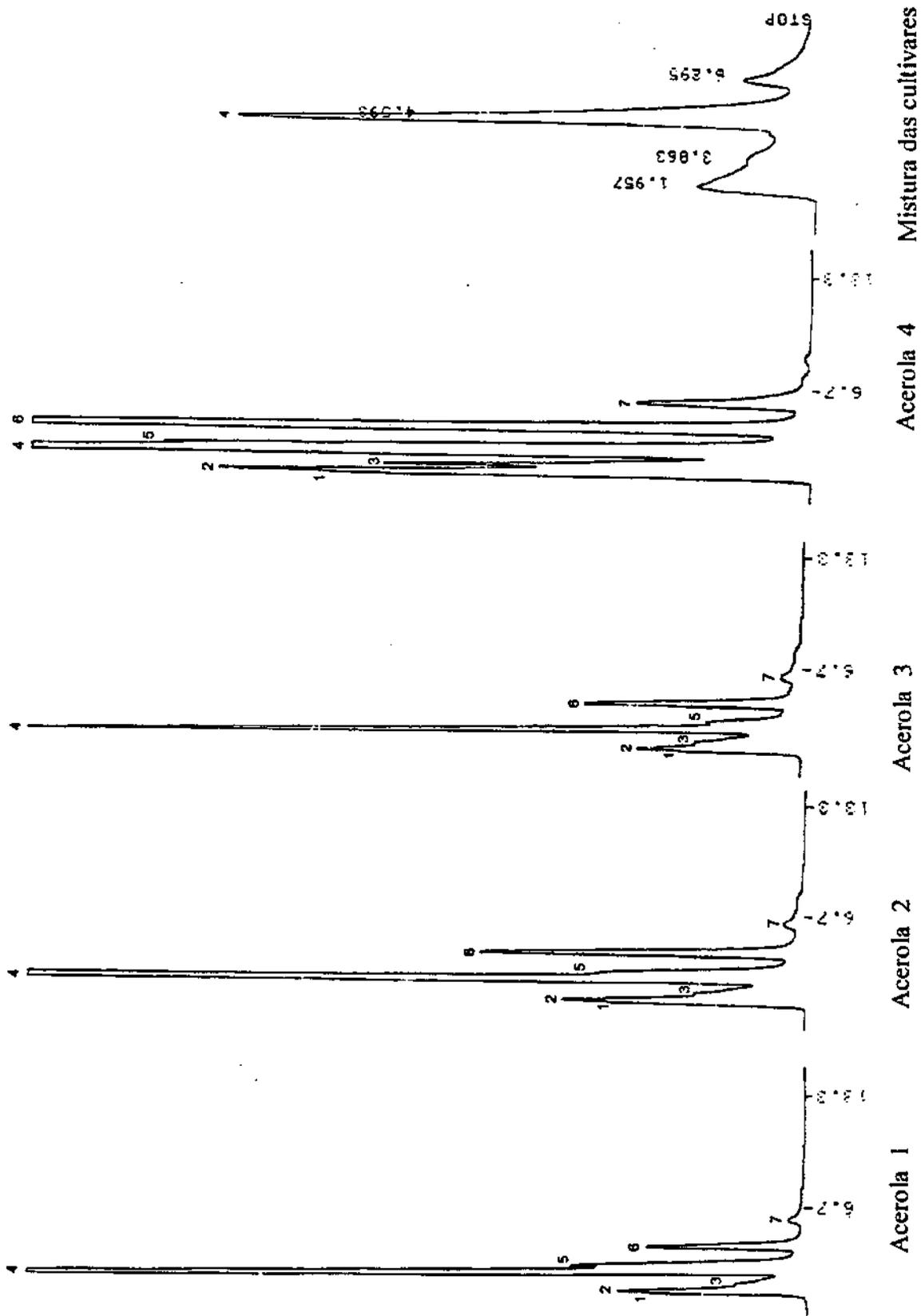


FIGURA 2 : Perfis Cromatográficos obtidos por CLAE dos extratos de antocianinas das quatro cultivares de acerola e da mistura dessas cultivares. Condições cromatográficas descritas no texto.

As características espectrais dos extratos de antocianinas da polpa de acerola submetida a diferentes tratamentos e suas respectivas agliconas (F1', F2', F3', e F4') estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4. Dados espectrais (máximos de absorção e deslocamento por adição de $AlCl_3$ na região do UV-Visível dos extratos metanólicos da polpa de acerola, de suas frações purificadas em papel e após hidrólise ácida, da polpa após tratamentos e das agliconas padrões

Amostra	λ máx (nm)	$\Delta\lambda$ $AlCl_3$ (nm)
Polpa (PSTT)	524, 280	22
Fração F -1	523, 280	20
Fração F -2	530, 280	24
Fração F -3	510, 278	0
Fração F -4	538, 280	0
Frações hidrolisadas		
F -1'	530, 280	18
F -2'	535, 282	16
F -3'	518, 278	0
F -4'	542, 280	0
Polpas após Tratamentos		
PI	526, 282	24
PPSD	522, 278	22
PPCD	524, 278	22
Padrões*		
Pelargonidina	520, 270	0
Cianidina	535, 277	18
Delfinidina	546, 277	23
Malvidina	542, 275	0

* HARBONE (1967)

PPST (Polpa sem tratamento térmico)

PI (Polpa inativada)

PPSD (Polpa pasteurizada sem desaeração)

PPCD (Polpa pasteurizada com desaeração)

esta hipótese merece ser confirmada com estudos de maior purificação das frações de antocianinas.

Os resultados deste experimento não confirmaram os dados obtidos por outros autores (SANTINI & HUYKE, 1956; CONCEIÇÃO, 1997) que, ao estudar os pigmentos vermelhos presentes na acerola, concluíram que o maior pigmento foi a malvidina. Os dados revelam, portanto, que a presença ou a concentração desses pigmentos podem estar relacionados especialmente com o tipo de cultivar, ou mesmo com as condições edafoclimáticas.

Os espectros das frações dos extratos da polpa de acerola revelaram a presença de picos de absorção na região de 310-340 nm que, de acordo com HARBORNE (1967), é característico de ácidos aromáticos, ligados à porção glicosídica da aglicona, cujas identidades foram confirmadas em frações totalmente purificadas, descritas por SILVA, GUEDES & MENEZES (1998). Estes autores confirmaram a presença de malvidina, cianidina e pelargonidina em cultivares de acerola investigadas.

O espectro na faixa UV-visível é a forma mais comum para verificar o comprimento de onda máximo das antocianinas além das relações espectrais $A_{uv,max}/A_{vis,max}$ e $A_{440}/A_{vis,max}$. Tal leitura contribui com mais informações para identificar as antocianinas, uma vez que cada antocianina apresenta um espectro característico. Outra relação está associada à análise do espectro, após adição de $AlCl_3$. Esta é uma prática onde se pode avaliar a presença de hidroxilas vicinais na antocianina e ou em sua respectiva aglicona. De acordo com MARKAKIS (1982), a relação A_{440}/A_{max} é normalmente cerca de 24 para glicosídeos de cianidina substituídos na posição 3 e 13 para glicosídeos de cianidina substituídos na posição 5. Para delphinidina, os valores correspondentes são 18 e 11.

A completa hidrólise ácida das antocianinas, resultando na aglicona, modifica o tempo de retenção da primeira. De acordo com GAO & CAHOON (1995) e HEBRERO (1989), na coluna de fase-reversa C_{18} a delphinidina elui primeiro, seguida em ordem pela cianidina, petunidina, peonidina e malvidina. A ordem de eluição das antocianinas em coluna C_{18} está baseada na sua polaridade, onde o tempo de retenção das antocianinas diminui, quanto mais polar elas são. As antocianinas são mais polares com mais grupos hidroxilas e menos polares com mais grupos metila no seu anel B. Segundo GOIFFON et al. (1991), a retenção da aglicona está relacionada à hidrofobicidade da molécula.

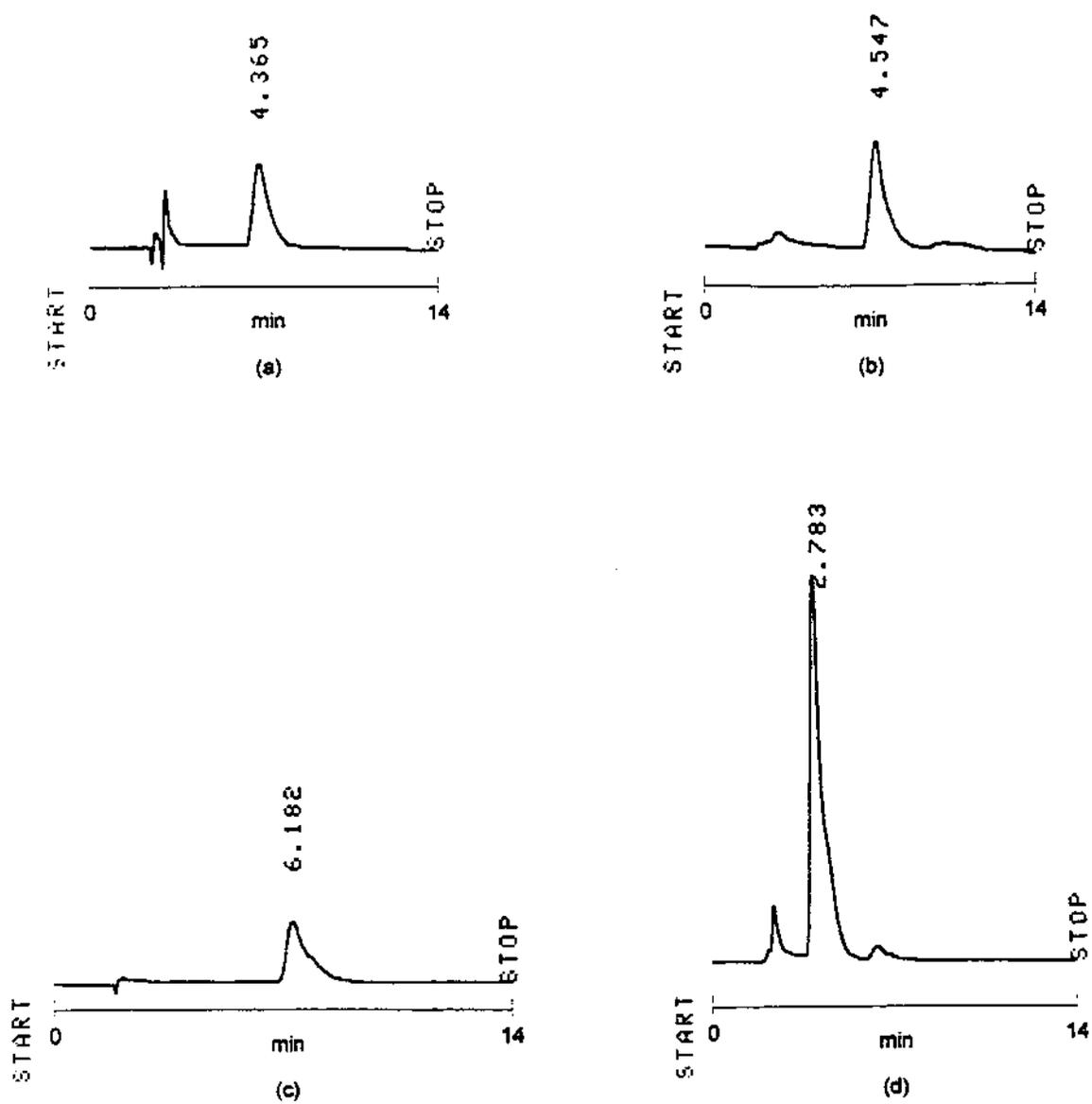


FIGURA 3. Perfis cromatográficos obtidos em CLAE das agliconas das frações F-1' (a), F-2' (b), F-3' (c) e F-4' (d)

Na Figura 3, estão apresentados os perfis cromatográficos das frações F-1', F-2', F-3' e F-3'. As proporções relativas de cada cromatograma, associado aos dados da Tabela 6, indicaram que a cromatografia em papel é uma boa técnica para a separação das antocianinas.

TABELA 6. Proporções relativas das frações (agliconas) F-1', F-2', F-3' e F-4' obtidas por CLAE

	Fração 1'	Fração 2'	Fração 3'	Fração 4'
A (%)	72,35	100,0	100,0	90,48

As polpas de acerola submetidas a diferentes tratamentos (Figura 4) mostraram que o tratamento térmico utilizado nos processamentos, nas condições experimentais, teve muita influência nas antocianinas. Na polpa pasteurizada o cromatograma mostrou uma melhor separação dos picos e, nessas polpas pode-se observar que o terceiro pico (t'_R de 4,45 a 4,55), sofreu uma degradação bem acentuada e o quarto pico (t'_R de 6,25 a 6,58) quase desapareceu, sendo o efeito térmico mais drástico para as antocianinas indicada nesses picos que, segundo as análises anteriores, tratam-se da cianidina e da pelargonidina, respectivamente. Portanto, estas antocianinas foram menos termorresistente em comparação as outras antocianinas correspondentes aos demais picos que se mostram presentes tanto no tratamento de inativação térmica como nos tratamentos de pasteurização. Concluiu-se, assim, que temperatura é um fator de grande influência na degradação das antocianinas.

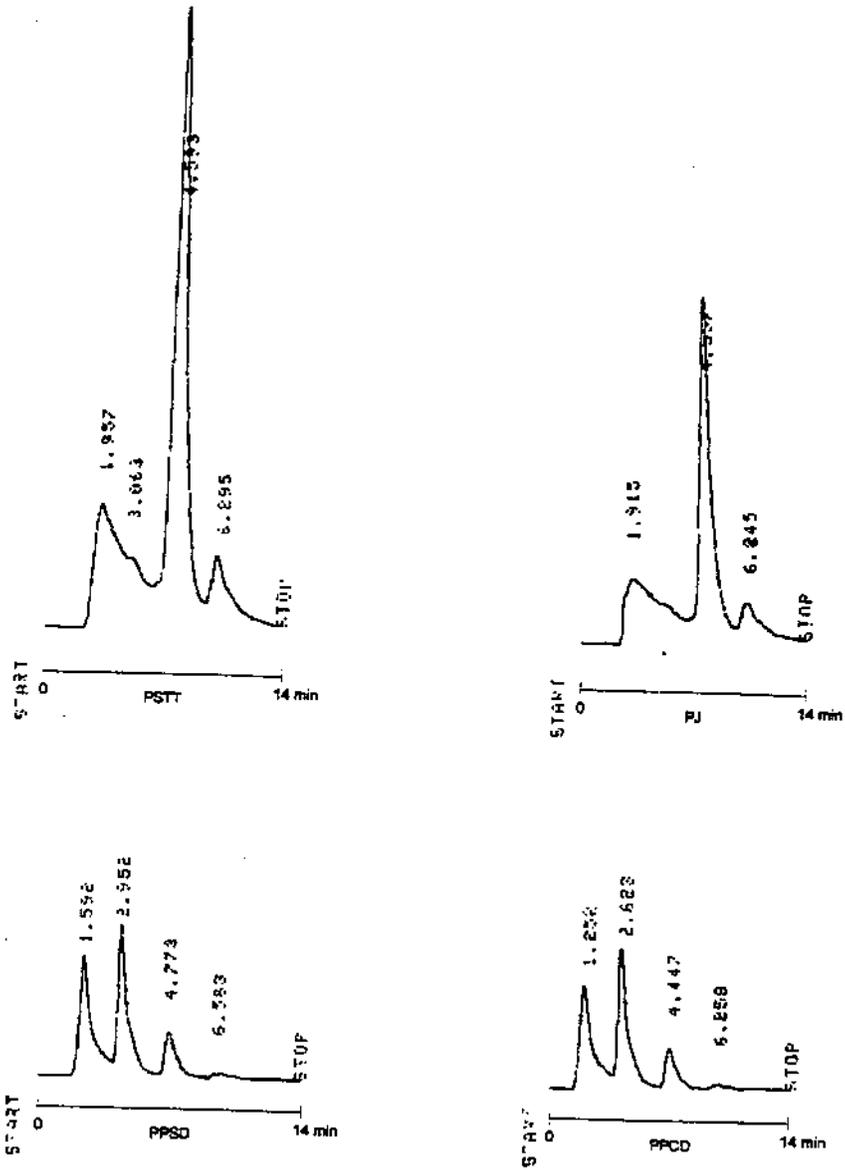


FIGURA 4. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE dos extratos antocianínicos da polpa de acerola submetida a diferentes tratamentos térmicos (PSTT, PJ, PPSD e PPCD).

Na Figura 5 pode ser verificado o efeito dos diferentes tratamentos sobre as antocianinas da polpa de acerola neste experimento, através da análise espectral.

Para comparar o efeito dos tratamentos térmicos (Figura 5), as amostras foram tratadas nas mesmas condições analíticas. Tomando-se a polpa PSTT como controle, os espectros, portanto, revelam que os processos térmicos promoveram degradação nos teores totais de antocianinas na polpa de acerola. Assim, por ordem de menor para maior degradação das antocianinas observadas pelo espectro, foi a inativação térmica enzimática (PI), a pasteurização sem desaeração (PPSD), e a pasteurização com desaeração (PPCD). Estes dados confirmam os resultados encontrados no capítulo anterior que trata das características físico-químicas da polpa de acerola, onde os teores de antocianinas totais, no tempo zero de processamento, comparados à polpa sem tratamento térmico, mostraram uma redução de 32,92%, 60,92% e 59,85% nas polpas PI, PPSD e PPCD, respectivamente. A desaeração não teve influência nos resultados dos teores antociânicos totais no tempo zero de tratamento e a diferença não foi significativa ($p \leq 0,05$).

A perda de pigmento antociânico da polpa de acerola, submetida ao tratamento de pasteurização (sem e com desaeração), embora tenha sido um processo de alta temperatura em curto tempo, foi aproximadamente duas vezes maior do que pelo processo de inativação térmica enzimática.

Há um consenso geral entre os pesquisadores de que os pigmentos antociânicos são facilmente destruídos pelo calor durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Alguns autores reportam um aumento logarítmico na destruição das antocianinas com um aumento aritmético na temperatura (ADAMS & ONGLEY, 1973; CHAN & YAMAMOTO, 1994; MARKAKIS, 1982).

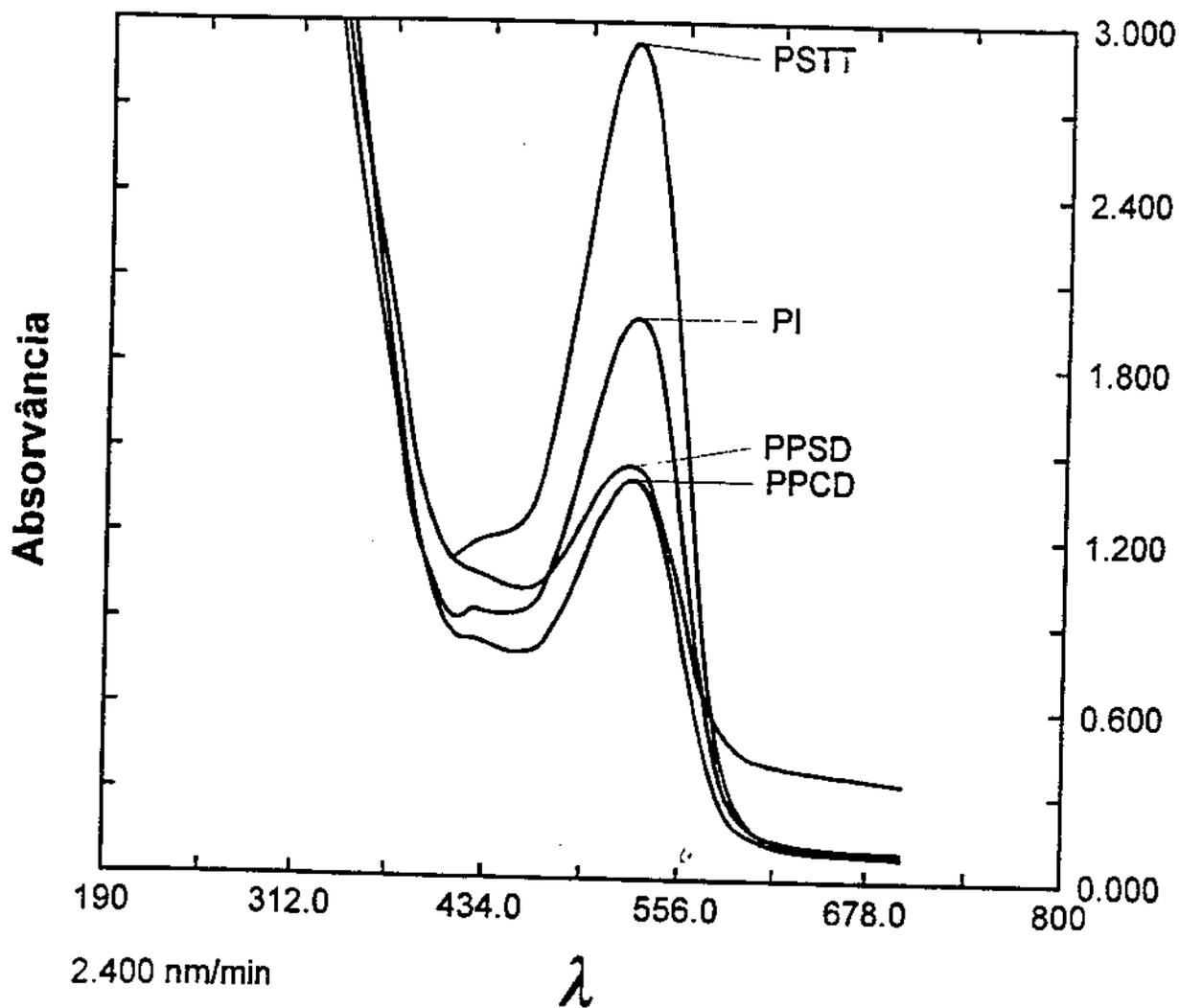


FIGURA 5. Espectro dos extratos antocianínicos das polpas de acerola no tempo zero de processamento: polpa sem tratamento térmico(PSTT), polpa pasteurizada inativada termicamente (PI), polpa pasteurizada sem desaeração (PPSD) e polpa pasteurizada com desaeração (PPCD)

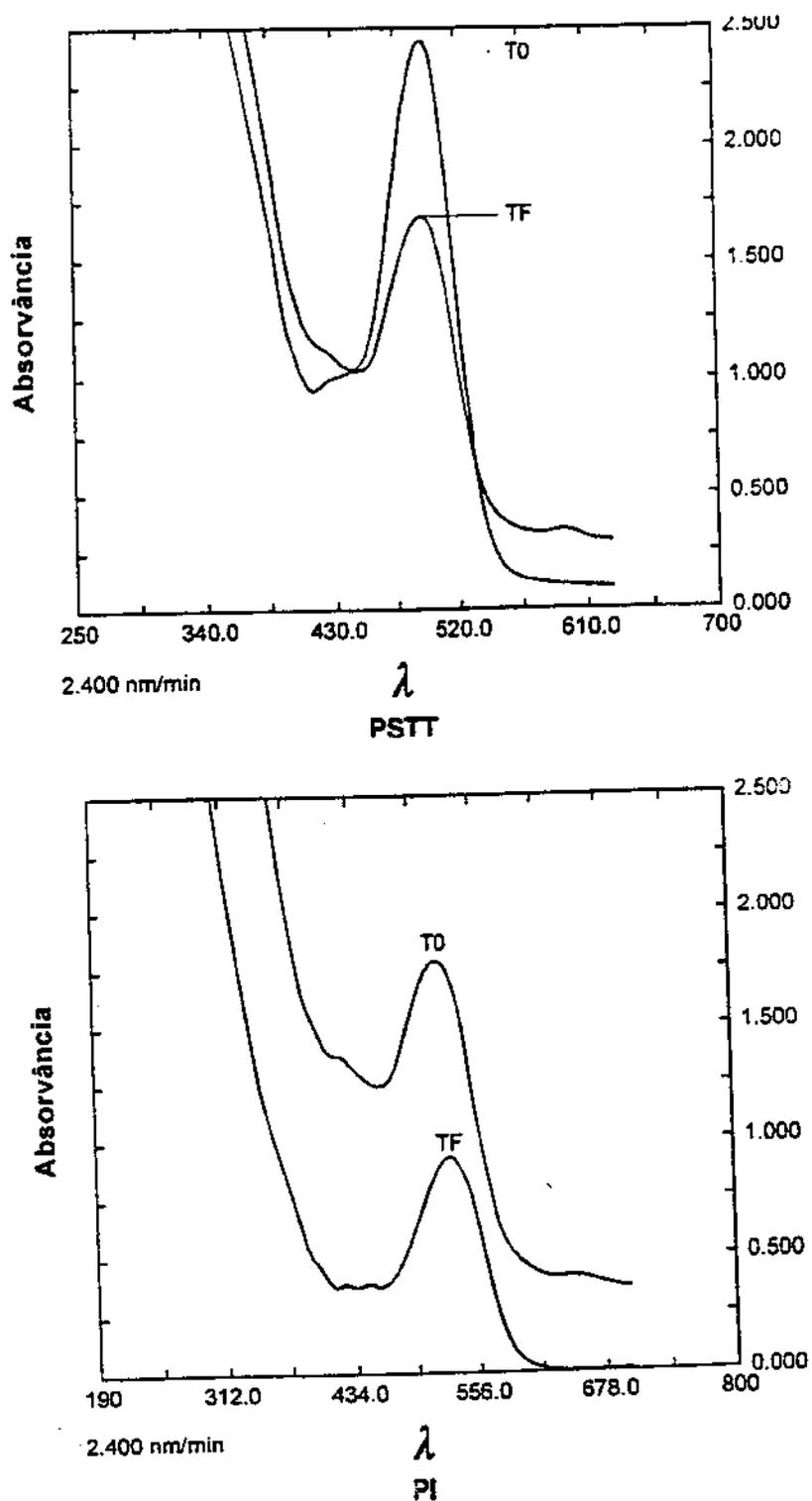


FIGURA 6. Espectros dos extratos antocianínicos da polpa de acerola dos tratamentos PSTT e PI, nos tempos zero (T₀) e final do armazenamento (T_F) (seis meses).

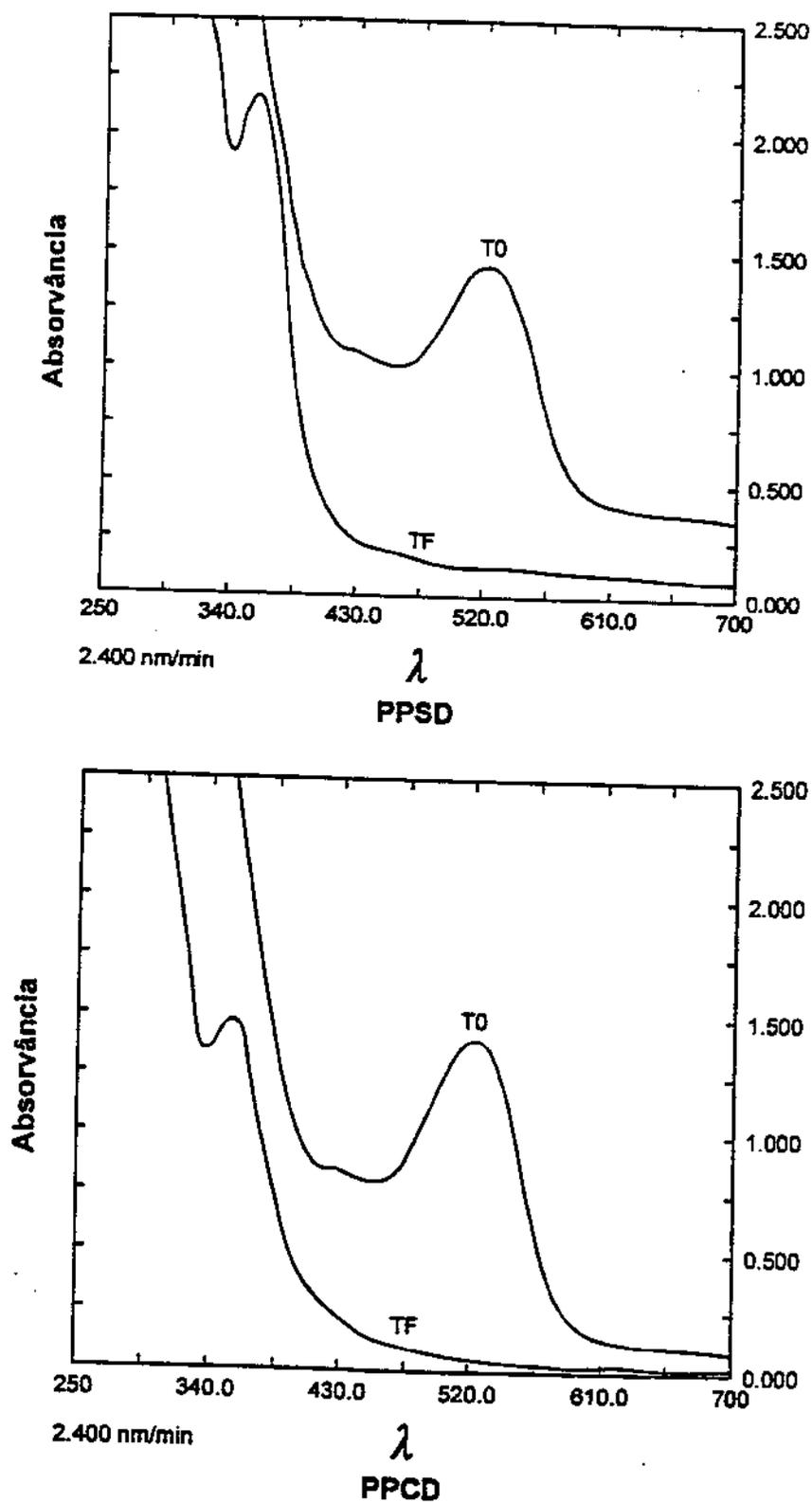


FIGURA 7. Espectros dos extratos antocianínicos da polpa de acerola dos tratamentos PPSD e PPCD, nos tempos zero (T_0) e final do armazenamento (T_F) (seis meses).

TABELA 7. Efeito dos tratamentos sobre a absorvância, os teores de antocianinas totais diferença de cor (ΔE), e "hue" das polpas de acerola ao final do armazenamento (seis meses).

Polpa	Perda de absorvância (%)	Perda de "hue" (%)	ΔE_{F-0} (%)	Perda de AcyT (%)
PSTT	31,16	39,10 \pm 1,37	3,25 \pm 0,48	21,74
PI	57,78	39,86 \pm 1,77	2,99 \pm 0,05	22,96
PPSD	Total	24,71 \pm 0,09	7,12 \pm 0,87	100,0
PPCD	Total	13,32 \pm 1,20	7,89 \pm 0,13	100,0

PSTT – polpa sem tratamento térmico

PI – polpa com inativação térmica

PPSD – polpa pasteurizada sem desaeração

PPCD – polpa pasteurizada com desaeração

"hue" - tonalidade da cor da polpa

ΔE - diferença da cor no final do armazenamento, calculado em relação à diferença da cor final da polpa PSTT

Acy T- teores de antocianinas totais

A diminuição espectral da absorvância nos extratos antociânicos no tempo zero de processamento das polpas (Figura 5) mostra que a temperatura dos diferentes processamentos provocou alta destruição dos pigmentos. Comparando-se a degradação dos pigmentos por intermédio da absorvância das diferentes polpas, no tempo zero, em relação à polpa PSTT, como controle, a degradação foi de 32,88%, 50,85% e 52,88%, para as polpas PI, PPSD, e PPCD, respectivamente. Estes resultados estão semelhantes àqueles reportados no cap.IV (Tabela 5) na determinação do conteúdo das antocianinas totais, onde os valores obtidos pelos diferentes tratamentos térmicos, quando comparados à polpa PSTT, mostraram uma degradação destes pigmentos de: 32,93%, 59,93% e 59,85%, para as polpas PI, PPSD e PPCD, respectivamente. Os dados estatísticos indicaram que a diferença entre os tratamentos PPSD e PPCD não foi significativa ($p \leq 0,05$), na degradação das antocianinas (Anexo 5, Cap.IV).

É necessário verificar o efeito do processamento no tempo zero, mas sejam também investigadas as mudanças que ocorrem com o produto num determinado tempo de

armazenamento, principalmente nas condições que o mercado exige, isto é, emprego de tecnologias que garantam a preservação do sabor, cheiro e aparência dos alimentos sem alterar suas características originais, produtos com maior vida de prateleira e assegurado valor nutricional, minimização de perdas do produto e outros.

Os espectros de absorção apresentados nas figuras 6 e 7, associada aos dados apresentados na Tabela 7, mostraram quais efeitos ocorreram com as polpas de acerola no decorrer de seis meses de armazenamento. Os resultados de perda da absorvância representam a perda cromática devida à degradação da cor e a destruição das antocianinas ao final de seis meses de armazenamento e em relação aos tratamentos dado às polpas.

A perda da cromaticidade além de ser observada pela absorvância também pode ser verificada pelos índices de perdas na tonalidade ("hue"), na diferença de cor e nas antocianinas totais. A tonalidade é avaliada pela relação das coordenadas de cromaticidade de cor a/b , onde a , representa a cor vermelha, e b a cor amarela, logo, os resultados desses índices (Tabela 7) mostraram que ao final do armazenamento houve maior perda da tonalidade nas polpas PSTT e PI (39,1% e 39,86%, respectivamente), em função da diminuição dos valores das coordenadas de cromaticidade, principalmente, da cor vermelha comparativamente às polpas pasteurizadas (sem e com desaeração), que apresentaram perda de 24,71% e 13,32%. Os resultados, na mesma tabela indicam que as polpas pasteurizadas (PPSD e PPCD) apresentaram maior diferença de cor que as polpas PSTT e PI. Portanto, o efeito térmico da pasteurização associada às condições de armazenamento, foi mais drástico para a cor das polpas do que a inativação térmica enzimática. Este resultado, no entanto, não pode ser conclusivo porque a polpa inativada não foi armazenada nas mesmas condições de temperatura das pasteurizadas.

Os resultados da Tabela 7 mostraram evidências de que o tratamento da inativação térmica da polpa não teve boa retenção das antocianinas totais, promoveu grande perda na tonalidade da cor, e apresentou maior diferença da cor quando comparada a polpa sem tratamento térmico armazenada nas mesmas condições, á -18°C . Resultados semelhantes foram encontrados por SIEGEL, MARKAKIS & BEDFORD (1971), ao estudarem a estabilização de antocianinas por branqueamento em cerejas congeladas. Nesse estudo, os investigadores verificaram que os frutos branqueados pelo vapor não preveniram a retenção da

cor, analisada pela descoloração das antocianinas, e o tempo de branqueamento de 60 segundos promoveu maior perda da cor do que a 0, 30 e 45 segundos. Diante desta questão, torna-se imprescindível que sejam avaliadas todas condições de processamento para minimizar a degradação desses pigmentos que servem como importante atributo na escolha do produto pelo consumidor.

Com respeito à temperatura de armazenamento, o congelamento (-18°C), embora não tenha evitado a diminuição nos teores das antocianinas (Tabela 7), foi melhor do que o armazenamento a temperatura ambiente das polpas de acerola. Ao final de seis meses, as antocianinas totais das polpas pasteurizadas, armazenadas à temperatura ambiente tiveram leitura de absorvância e teor zero das antocianinas. O efeito da pasteurização foi melhor para preservar o ton das polpas, principalmente da polpa desacerada, embora tenha ocorrido maior diferença de cor quando comparado aos resultados da polpa que sofreu inativação térmica.

Na avaliação da diferença de cor, estão envolvidos os parâmetro de luminosidade (L), cor vermelha (a) e cor amarela (b). Comparando-se os quatro tratamentos experimentais dados à polpa de acerola, é possível que a porcentagem dos resultados da diferença de cor tenham sido maiores nas polpas pasteurizadas ao final do período de seis meses de armazenamento, porque, principalmente a luminosidade das polpas é afetada quando o produto apresenta coloração escura. Isto pode ser atribuído à degradação dos pigmentos, devido a temperatura do tratamento e a temperatura de armazenamento do produto. Durante o experimento, a temperatura ambiente variou entre 15 a 35°C , com uma média de 23°C na maior parte do armazenamento das polpas pasteurizadas, fato que contribuiu para a degradação da cor do produto. Outro fator que pode ter influenciado na mudança de coloração das polpas, é a presença do alto conteúdo de ácido ascórbico que de acordo com algumas investigações (STARR & FRANCIS, 1968; SHRIKANDE & FRANCIS, 1974; SILVA, 1996; CONCEIÇÃO, 1997) ele interage com as antocianinas promovendo sua degradação.

No tempo inicial de processamento, as polpas tratadas termicamente mostraram uma mudança do vermelho para o laranja. As polpas pasteurizadas ao final do armazenamento apresentaram-se amarelas, com leve ton levemente marrom (ilustração no capítulo IV, Fig.2).

É importante determinar o teor de antocianinas de produtos tratados termicamente, e armazenados, porque essas amostras sempre contêm produtos de degradação das antocianinas.

Tais compostos absorvem energia na mesma região que as antocianinas e certamente a leitura é feita concomitantemente. Se o propósito de análise de um produto que contém produtos de degradação for a aparência visual, então a cor deve ser medida, e não o pigmento. Em outras palavras, a cinética de degradação do pigmento pode ser uma ferramenta para avaliar as mudanças na qualidade do produto (FRANCIS, 1982).

Para aumentar o tempo de retenção dos pigmentos de produtos vegetais, ou de frutos submetidos a tratamentos térmicos, alguns autores recomendam o processamento de alta temperatura por curto tempo (sistema HTST) (JACKMAN et al., 1987; ADAMS & ONGLEY, 1973 e SKALSKI & SISTRUNK, 1973), uma vez que o mecanismo de degradação de diferentes antocianinas tem sido demonstrado, em sistemas modelo e natural, seguir uma reação cinética de primeira ordem (GUEDES, 1993; STRINGHETA, 1991; BOBBIO et al., 1990).

Estudos com suco de acerola tratado termicamente (88°C/45 segundos) e armazenado a temperatura de 28°C por 78 horas apresentou um valor da constante de velocidade de reação igual a 0,0063 unidades, enquanto a antocianina purificada, submetida ao mesmo tratamento térmico, armazenada a 25°C por 48 horas, apresentou uma constante de velocidade de reação de 0,0107, o que significa que a velocidade de degradação do pigmento purificado foi muito superior ao pigmento presente no suco (CONCEIÇÃO, 1997).

Os resultados aqui encontrados mostraram uma taxa de degradação de antocianinas muito alta, principalmente na polpa submetida ao tratamento térmico. Foi verificado que a maior taxa de degradação das antocianinas totais ocorreu nos três primeiros meses, com uma diminuição de $10,79 \pm 0,32\%$; $13,53 \pm 0,10\%$; $68,81 \pm 0,02\%$ e $72,63 \pm 0,18$ nas polpas PSTT, PI, PPSD e PPCD, respectivamente, apresentando diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes polpas, exceto as pasteurizadas, que não foram diferentes entre si, nesse período. Esses resultados vêm confirmar os dados obtidos por SIMARD et al. (1982); ROCHA (1988) e CONCEIÇÃO (1997), os quais revelaram que a velocidade de degradação das antocianinas em sistemas modelos e naturais foram significativamente influenciada pela temperatura do processamento e armazenamento. Associando-se a esses estudos, foi observado que a presença de furfural e hidroximetilfurfural, que são compostos típicos da degradação de açúcares, aumentam a taxa de perda dos pigmentos antocianínicos (SILVA, 1996).

A polpa PSTT manteve um aroma agradável, característico, até o final do experimento, notando-se, todavia, uma perda deste nas polpas tratadas termicamente (polpa inativada e pasteurizadas). Um estudo com polpa de acerola realizado por SANTOS (1997), mostrou que, devido ao processamento térmico, novos compostos voláteis que constituem o aroma são formados, alterando o aroma do produto final. Segundo a mesma autora, o processo de pasteurização promoveu a perda de 32 compostos voláteis, enquanto o processamento por atomização promoveu a perda de 21 compostos, o que mostra que os tratamentos térmicos são prejudiciais à qualidade do produto final em termos de aroma e sabor. Comparando-se a intensidade do aroma nos dois processos, a pasteurização, neste produto, teve um efeito mais prejudicial que a atomização.

De acordo com relatos de TING & ROUSEFF (1986) quando sucos cítricos são armazenados à temperaturas relativamente altas (27°C), é observado um rápido acúmulo de furfural. Este composto é um indicador de *off-flavor* produzido no produto, como resultado do abuso de temperatura no suco cítrico. O furfural é também considerado um produto de degradação do ácido ascórbico.

Neste experimento, foi possível visualizar que as polpas tratadas termicamente tornaram-se mais homogêneas e mais consistentes, ao contrário da polpa sem tratamento térmico, que apresentava uma separação de polpa propriamente dita e soro. Parece que a homogeneidade e a consistência da polpa de acerola, adquirida pelo tratamento térmico, facilita a interação entre os diversos compostos que constituem a polpa e o resultado dessa interação diminuiria a estabilidade das antocianinas presentes no sistema naturalmente. O efeito térmico na polpa de acerola cujo pH é ácido, aproximadamente de 3,5, pode proporcionar a hidrólise dos açúcares presentes na estrutura das antocianinas; assim, tais compostos são levados à forma de antocianidina, estrutura bastante instável e facilmente degradável. De acordo com MARKAKIS (1982) o ácido ascórbico na presença de antocianinas favorecem a reação de condensação ocorrendo a degradação de ambos. Este fato levaria à perda da qualidade do produto final ao longo do armazenamento.

As antocianinas interagem com o ácido ascórbico, metais, açúcares, oxigênio, luz, temperatura e enzimas, produzindo polímeros e produtos de degradação que diminuem sua estabilidade (FRANCIS, 1992; BOBBIO & BOBBIO, 1992). De acordo com estudos neste

experimento, discutidos no capítulo anterior (Tabela 2, cap. IV), a polpa de acerola, mesmo com tratamento térmico de pasteurização, e armazenado a temperatura ambiente, ainda manteve uma alta concentração de ácido ascórbico (720,56 mg/100g a 753,53mg/100g) ao final de seis meses de armazenamento e os produtos de degradação de ambos os compostos formam pigmentos escuros que influenciam a mudança de cor do produto ao final de um armazenamento prolongado.

De acordo com JURD (1972), existe uma reação de condensação entre o ácido ascórbico e a antocianina. E, quanto maior a concentração de ácido ascórbico no sistema (modelo ou natural), maior a taxa de perda de pigmento antociânico (SHRIKHANDE & FRANCIS, 1974; CONCEIÇÃO, 1997). Além disso, o ácido dehidroascórbico presente na polpa também contribui para a descoloração das antocianinas, embora em taxa bem menor que o ácido ascórbico (MARKAKIS, 1982). A estabilidade das antocianinas pode ser influenciada por outros componentes do fruto, tais como ácido ascórbico e compostos fenólicos (POEILANGSTON & WROLSTAD, 1981, MARKAKIS, 1974).

No estudo com xarope de morango, foi demonstrado que a relação antocianina-ácido ascórbico é um importante fator a ser considerado na estabilidade de antocianina e cor nesse produto. Alta relação antocianina-ácido ascórbico favoreceu a estabilidade da antocianina e cor. Quando essa relação foi baixa, os pigmentos e cor apresentaram baixa estabilidade (SKREDE, et al., 1992). Neste experimento, (cap. IV, Tabelas 13 a 16) verificou-se uma alta correlação dos teores de ácido ascórbico com os teores das antocianinas nos diferentes tratamentos das polpas: PSTT (0,962), PI (0,941), PPSD (0,979) e PPCD (0,949), indicando influência direta de um composto sobre o outro.

Com base nos dados experimentais concluiu-se, então, que a cor das polpas pasteurizadas ao final do período de armazenamento de seis meses, não é devida às antocianinas, mas a outros pigmentos ou interações de compostos que favorecem a cor amarela, que são mais resistentes ao tratamento térmico, à presença do ácido ascórbico e ao tempo de armazenamento. Apesar de que o processo de pasteurização usado no experimento tenha sido um sistema HTST para preservar os pigmentos, a condição de armazenamento das polpas à temperatura ambiente embora protegidas da luz, favoreceu a degradação das antocianinas. Além disso, o tempo de armazenagem de 6 meses foi considerado muito longo

para conservar os pigmentos submetidos a um tratamento térmico que, de acordo com dados anteriormente discutidos, demonstraram afetar drasticamente as antocianinas pelo processamento.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. B. & ONGLEY, M. H. The degradation of anthocyanins in canned strawberries. Part II. The effect of various additives on the retention of pelargonidin-3-glucoside. **Journal Food Technology**, v. 8, n. 3, p. 305-307, 1973.
- BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. A. **Química de Processamento de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2ª edição, 1992. 145p.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; STRINGUETA, P. C. & CASTRO, J. O. Effect of different copigments on the stability of anthocyanins. In: "Proceedings of the XVth International Conference of Groupe Polyphenols". 1990.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, pp. 317-333, 1998.
- CHAN, H. T. & YAMAMOTO, H. Y. Kinetics of anthocyanin decomposition in acerola juice. **ASEAN Food Journal**, v.9, n. 4, p. 132-135, 1994.
- CONCEIÇÃO, M. P. J. Cinética da degradação térmica de antocianinas em suco de acerola (*Malpighia glabra* L.). Viçosa, MG, 1997. 59p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. 1997.
- CZAPSKI, J. Wpływ wybranych czynników na stabilność betacyjanów w soku buraka aewiklowego. **Roczniki AR w Poznaniu, Zeszyt**, v.169, 1988. (English abstract).
- DONOVAN, J. L.; MEYER, A. S.; WATERHOUSE, A. L. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1247-1252, 1998.

- FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterização físico-química do suco e pó de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). Campinas:UNICAMP, 1998, 184p. Tese (Doutor). Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1998.
- FLORA, L. F. Influence of heat, cultivar and maturity on the anthocyanin 3,5-diglucosides of Muscadine grapes. **Journal Food Science**, v. 43, p.1819, 1978.
- FRANCIS, F. J. Analysis of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. London: Academic Press, 1982. p.181-206.
- FRANCIS, F. J. A new group of food colorants. **Trends in Science & Technology**, v.3, p. 2730, 1992.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of Total Anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 1. p. 72-77, 1968.
- GAO, Y. & CAHOON, G. A. High performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the red seedless table grape reliance. **American Journal Enol. Vitic.**, v. 46, n. 3, p. 339-345, 1995.
- GIUSTI, M. M. & WROLSTAD, R.E. Radish anthocyanin extract as a natural red colorant for Maraschino cherries. **Journal of Food Science**, v.61, n.4, p.688-694, 1996.
- GOIFFON, J.; BRUN, M.; BOURRIER, M. J. High – performance liquid chromatography of red fruits anthocyanins. **Journal Chromathography**, v. 537, n.1, p. 1010-121, 1991.
- GRAJEK, W; WALKOWIAK-TOMCZAK, D. & CZAPSKI, J. Changes in pigment content in red beet juice denitrified by *Para-coccus Denitrifican*. **Fruit Processing**, v.10, p. 400-404, 1997.
- GEISSMAN, T. A.; JORGENSEN, E.C. & HARBONE, J. B. The effect of aluminium chloride on absorption spectra of athocyanins. **Chemical Industry**, dec, p.1389-1291, 1953.

- GUEDES, M. C. Influência do anel B na estabilidade das antocianinas e antocianidinas. .
Campinas: UNICAMP, 1993. 126 p. Tese (Doutor) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1993.
- GUEDES, M.C. & PEREIRA, D. L. Comparative estabilization of anthocyanins from napier grass (*Pennisetum purpureum*) with tannic acid, ascorbic acid and citric acid. **Proceedings of the XVI th International Conference of the Group Polyphenols.** 1998
- GUEDES, M. C. & RODRIGUES, A. C. D. M. Obtenção, identificação e análise de um corante natural vermelho obtido do botão floral de bananeira (*Musa sp*). **XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.** Alimento, População e Desenvolvimento. SBCTA – Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, Anais -Trabalho completo n.525, julho, 1998.
- HACKET, A. M. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. **Program Clinical Biology Research**, v.213, p. 177-194, 1986.
- HARBONE, J. B. **Comparative Biochemistry of the Flavonoids.** London: Academic Press. 1967. pp.1-36.
- HEBRERO, E.; GARCIA-RODRIGUEZ, C.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography- diode array spectroscopy in a hibrid grape variety (*Vitis vinifera x Vitis berlandieri* 41B). **American Journal Enol. Vitic**, v. 40, n.4, p. 283-291, 1989.
- HERNANDEZ, L. G.; WESCHE-EBELING, P. & ARGALIZ-JAMET, A. Changes to anthocyanin pigments in plums preserved by combined factors and processed into marmalade. **IFT Annual Meeting 1995**, p.66, 1995 (English abstract).
- HRAZDINA, G. Column chromatographic isolation of anthocyanidin 3,5-diglucosides from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.18, n.1, p. 243-45, 1970.
- JACKMAN, R.L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A.; SPEERS, R. A. Anthocyanins as food colorants – A Rewiew. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, n.1, p. 201-247, 1987.

- JURD, L. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. In: **The Chemistry of Plant Pigments**. Chichester, C. O. (ed) pp. 123-142, Academic Press, New York. 1972.
- KATSABOXAKIS, K.; PAPANICOLAOU, D. & MELANITOU, M. Stability of pigmented orange anthocyanins in model and real food systems. **Italian Journal Food Science**, v. 10, n. 1, p. 17-25, 1998.
- MANSILLA, M. L. Identificação e estudo de estabilização das antocianinas de capim napier (*Pennisetum purpureum*) por β - ciclodextrina. Campinas:UNICAMP. Dissertação (Mestrado). 1998. 84p. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1998.
- MARKAKIS, P.. Anthocyanins and their stability in food. **CRC Critical Review Food Technology**, v.4, n.2, p.437-456, 1974.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in food. In: **Anthocyanins as Food Colors**. (Pericles Markakis, ed.) London: Academic Press, 1982. p.163-161.
- MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 35, n.2, pp. 341-71, 1995
- MAZZA, G. & BROUILLARD, R. Color stability and structural transformations of cianidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 2, pp.422-26, 1987.
- PALE, E.; MOUHOSSINE, N.; VANHAELEN, M. & VANHAELEN-FASTRÉ, R. Anthocyanins from Bambara Groundnut (*Vigna subterranea*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.45, p. 3359-3361, 1997.
- PETERSON, J. & DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.
- POEI-LANGSTON, M. S., WROLSTAD, R. E. Color degradation in na ascorbic acid-anthocyanin-flabvonol model system. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 1218-22, 1981.

- POURRAT, H.; BASTIDE, P.; DORIER, P.; POURRAT, M. & TRONCHE, P. Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides d'anthocyanes. **Chimie Thérapeutique**, v.2, p. 33-38, 1967.
- ROCHA, I. C. Suco de acerola: Efeito da temperatura de pasteurização e armazenamento. Recife, PE: Centro de Ciências da Saúde, 1988. 105p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, 1988.
- SAIJA, A. Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins on triiodothyronine transport in the rat. **Pharmacology Research**, v. 22, n.3, p. 59-60, 1994.
- SANTINI JR., R. & HUYKE, A. S. Identification of the polibasic acids presents in guavas and acerola by paper chromatography. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 40, p. 86-90, 1956.
- SANTOS, H. S. Efeito térmico na retenção de voláteis da polpa de acerola microencapsulada. Campinas: UNICAMP. 1997. 138p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos- UNICAMP, 1997.
- SATUÉ-GRACIA, M. T. HEINONEN, M. & FRANKEL, E. N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin – liposome systems. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3362-3367, 1997.
- SIEGEL, A.; MARKAKIS, P. & BEDFORD, L. Stabilization of anthocyanins in frozen tart cherries by blanching. **Journal of Food Science**, v. 36, n. 6, p. 962-963, 1971.
- SILVA, S. R. Extração e estabilidade de pigmentos antociânicos de frutos de maria-pretinha (*Solanum americanum*, Mill.). Viçosa: UFV. 1996. 76p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SILVA, M. F. V.; GUEDES, M. C. & MENEZES, H. C. Caracterização dos pigmentos antociânicos de diferentes cultivares de acerola (*Malpighia glabra*) por CLAE. In: SEVENTH LATIN AMERICAN CONGRESS ON CHROMATOGRAPHY. COLACRO VII. Águas de São Pedro:S.Paulo, Brasil, 1998.

- SIMARD, R. E.; BOURZEIX, M. & HEREDIA, N. Factors influencing color degradation in blueberry juice. **Lebensm. - Wiss. U. Technology**, v. 15, p. 177-180, 1982.
- SKALSKY, C. & SISTRUNK, W. A. Factors influencing color degradation in concord grape juice. **Journal of Food Science**, v. 38, n. 6, p. 1060-62, 1973.
- SHRIKHANDE, A. J. & FRANCIS, F. J. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. **Journal Food Science**, v. 39, n. 6, p. 904-906, 1974.
- SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E.; LEA, P. & ENERSEN, G. Color stability of strawberry and blackcurrant syrups. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 172-177, 1992.
- STARR, M. S. & FRANCIS, F. J. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. **Food Technology**, v. 22, n. 10, p. 91-93, 1968.
- STRINGHETA, P. C. Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). Campinas: UNICAMP. 1991. 138p. Tese (Doutor). Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1991.
- TING, S. V. & ROUSEFF, R. L. Citrus fruits and their products. Analysis. Technology. New York: Marcel Dekker, Inc., p.175-182, 1986.
- TSUDA, T.; OSAWA, T.; NAKAYAMA, T.; KAWASAKISHI, S.; OSHIMA, K. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.42, n. 1, p.248-251, 1994a.
- TSUDA, T.; WATANABE, M.; OSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S. W.; KAWAKISHI, S. & OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D- glucoside and cyanidin. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.42, n. 11, p.2407-2410, 1994b.
- WANG, H.; NAIR, G. M.; STRASBURG, G. M.; BOOREN, A. M. & GRAY, J. I. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 840-844, 1999.

CONCLUSÕES

1. Na determinação do ácido ascórbico em polpa de acerola, pelo método titulométrico com 2,6-diclorofenol indofenol (DCFI), as modificações propostas ao método como: extração do ácido ascórbico da amostra com água, no intervalo de 15 minutos de extração; indicador, DCFI, diluído na concentração de 1:1 daquela indicada pelo método oficial da AOAC, e redução da quantidade de ácido oxálico para titular (50 mL) forneceram resultados comparáveis aos obtidos por CLAE.
2. As antocianinas encontradas na polpa de acerola foram pelargonidina, malvidina e cianidina, sendo esta última encontrada em maior concentração.
3. Os teores de antocianinas totais foram significativamente afetados pelo processamento. A cianidina e a pelargonidina sofreram grande influência com o tratamento térmico.
4. Nas análises dos produtos pasteurizados durante o armazenamento, concluiu-se que o maior tempo de armazenamento desses produtos a temperatura ambiente (média 23°C) não deverá exceder 5 meses, para garantir a qualidade nutricional e sensorial das polpas de acerola.
5. A inativação térmica (branqueamento) mais congelamento da polpa de acerola resultou em maiores perdas de antocianinas, ácido ascórbico e cor ao final de seis meses de armazenamento, quando comparada com o processo de pasteurização.
6. O tratamento térmico de pasteurização resultou num produto mais homogêneo fisicamente e com menor produção de gases que o produto não tratado termicamente e congelado.
7. A cor das polpas de acerola pasteurizadas armazenadas a temperatura ambiente, após 5 meses de armazenamento, não é devida às antocianinas, mas a pigmentos amarelos já presentes, ou resultado de interações entre compostos ou de modificações de compostos opticamente inativos que se transformam em ativos. Ao longo do armazenamento de 5 meses ocorre descoloração das antocianinas que concorre para a mudança de coloração.
8. No pH da polpa de acerola ($\approx 3,3$), o tratamento térmico de inativação é suficiente para provocar hidrólise das ligações glicosídicas das antocianinas, resultando em perda de cor dos pigmentos e aumento do °Brix. A pasteurização (HSTT) é menos drástica

- neste sentido, não provocando esta hidrólise, mas promove sensível degradação da cor no momento do processamento..
9. Os sólidos totais apresentaram maior correlação positiva com os teores de ácido ascórbico das polpas armazenadas à temperatura ambiente (0,92) do que com as polpas congeladas ($\cong 0,60$).
 10. Os tratamentos térmicos (pasteurização e inativação) influenciaram diretamente na acidez total. As antocianinas e o ácido ascórbico apresentaram alta correlação (0,94) com acidez total.
 11. Os modelos de regressão propostos, após ajustes, para estimar a concentração de antocianinas e do ácido ascórbico na polpa de acerola, obtidos a partir de valores experimentais apresentaram altos coeficientes de determinação de 88,8% a 99,9%, indicando a validade dos modelos.
 12. De acordo com a caracterização da polpa de acerola e dos principais efeitos do processamento, as análises estatísticas concluiu-se que o tipo de embalagem não influenciou os parâmetros de cor, os valores de pH, de °Brix, e da acidez. O tempo de armazenamento influenciou nos valores de pH, de °Brix, na acidez expressa em ácido málico, nos valores de sólidos totais, e nos teores de ácido ascórbico e de antocianinas.
 13. O tipo de tratamento influenciou nos valores de pH, de °Brix, da acidez, dos sólidos totais, do ácido ascórbico e das antocianinas totais. Os teores de ácido ascórbico e de antocianinas nas polpas congeladas (PSTT e PI) apresentaram maiores valores na polpa acondicionada em lata. O tratamento de desaeração das polpas pasteurizadas e o tipo de embalagem não influenciaram os parâmetros monitorados durante o armazenamento, porém este tratamento influenciou significativamente os valores de antocianinas nas polpas, apresentando menores valores ao final do armazenamento quando comparado à polpa sem desaeração.
 14. As polpas acondicionadas em embalagens de vidro apresentaram maiores valores de pH e de ácido ascórbico, e as polpas acondicionadas em lata apresentaram maiores valores de antocianinas. Os valores da luminosidade e do ácido ascórbico se diferenciam significativamente no caso da embalagem e do tratamento empregado.

15. O tempo de armazenamento, o tipo de tratamento e o efeito da interação tempo *versus* tratamento influenciam significativamente nas coordenadas de cromaticidade vermelha (a) e amarela (b).

16. À medida que aumenta o tempo de armazenamento, diminuem os teores das antocianinas e do ácido ascórbico na polpa de acerola. Estes dois compostos apresentaram alta correlação (0,941 a 0,979) em todos os tratamentos dados à polpa.

17. As condições de processamento realizadas no experimento, garantiram a qualidade microbiológica das polpas de acerola.

SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS:

1. Desenvolver estudos mais detalhados dos ácidos orgânicos presentes na acerola para verificar a possível influência na degradação do ácido ascórbico e antocianinas.
2. Será interessante estudar sobre o comportamento de compostos opticamente inativos sob efeito de diferentes tratamentos térmicos. Também investigar sobre compostos que modificam a textura da polpa com o efeito térmico para avaliar a interação com ácido ascórbico e antocianinas.

ANEXOS

ANEXOS DO CAPÍTULO II

ANEXO 1. Análise de variância dos valores médios do ácido L-ascórbico na polpa A de acerola.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p
Método	3	3469	1156	6,44*	0,002
Resíduo	32	5741	179		
Total	35	9211			

C.V%=1.61; DMS= 17,11 ; *nível de significância de 0,2% de probabilidade

ANEXO 2. Intervalo de confiança de 95% para médias individuais baseados no desvio padrão para os métodos utilizados na polpa A de acerola

Método	N	Média	DP*	Intervalo de confiança de 95%/médias baseadas no desvio padrão
1	9	756.36	18.95	(-----*-----)
2	9	774.81	14.60	(-----*-----)
3	9	750.27	8.78	(-----*-----)
4	9	751.61	8.26	(-----*-----)
Desvio Padrão = 13.39				744 756 768 780

*desvio padrão

1- método Contreras-Guzman; 2- método Iodato; 3- método Timans; 4- método CLAE

ANEXO 3. Análise de variância dos valores médios do ácido L-ascórbico da polpa B de acerola

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p
Método	3	2937	979	6,38*	0,002
Resíduo	32	4907	153		
Total	35	7844			

*nível de significância de 0,02 de probabilidade

ANEXO 4 . Intervalo de confiança de 95% para médias individuais baseados no desvio padrão para os métodos químicos de determinação de ácido ascórbico na polpa B de acerola.

Método	N	Média	D.P*	Intervalo de confiança de 95%/médias baseado no desvio padrão
1	9	861.75	16.75	-----+-----+-----+-----+----- (-----*-----)
2	9	880.03	15.97	(-----*-----) (-----*-----)
3	9	857.06	6.23	(-----*-----)
4	9	859.78	6.23	(-----*-----)
Desvio Padrão = 12.38				-----+-----+-----+-----+----- 852 864 876 888

*desvio padrão

1-método Contreras; 2-método Iodato; 3-método Timans; 4-método HPLC

ANEXO 5. Resultado comparativo da análise estatística pelo Teste F, entre duas médias, de acordo com os métodos para determinação do ácido ascórbico em polpa de acerola

Polpa de acerola	Contreras X Iodato	Contreras X Tilmans ¹	Contreras X HPLC	Tilmans ² X HPLC	Iodato X HPLC	Tilmans ¹ X Iodato
Polpa A	0,2156	0,6350	0,5350	0,7130	0,0254*	0,0234*
Polpa B	0,2019	0,7635	0,7881	0,9326	0,1332	0,1404

* diferença significativa (p≤0,05)

ANEXO 6. Cálculo para determinação do teor de ácido ascórbico

Para calcular o teor de ácido ascórbico na amostra, utiliza-se a seguinte relação:

$$\text{Teor de Ácido Ascórbico (mg/100g)} = \frac{VA \times Cp}{VP} \times \frac{100}{Cam}, \text{ onde:}$$

VA – volume de DCFI gasto na amostra (mL)

VP – volume de DCFI gasto no padrão de ácido ascórbico (mL)

Cp – concentração do padrão de ácido ascórbico (mg)

Cam – concentração da amostra (g)

Como exemplo,

Quantidade da amostra = 10 g

Quantidade de padrão AA = 30mg

Concentração da amostra (Cam): 10 g de amostra diluído para 100ml, do qual foi usado uma alíquota de 2ml (10:100:2, então calcula-se $10 \times 2/100 = 0,20$)

Concentração do Padrão AA (Cp): 30 mg de padrão diluído para 100ml, do qual foi tirado uma alíquota de 2ml (30:100:2), calculando-se $30 \times 2/100 = 0,60$

Volume de DCFI gasto na amostra = 4,00 ml

Volume de DCFI gasto no padrão de AA = 0,70ml

$$\text{Teor de ácido ascórbico} = \frac{4,0 \times 0,60}{0,70} \times \frac{100}{0,20} = 1714,29 \text{ mg de ácido ascórbico/100g}$$

ANEXO 1.(Cap. III) Resultados médios do teste de repetibilidade e reprodutibilidade do método titulométrico com DCFI, para determinação dos teores de AA em polpa de acerola não pasteurizada (NP) e pasteurizada (P)

		TEORES DE ÁCIDO ASCÓRBICO (AA)														
		Mês 1					Mês 2					Mês 3				
Média	Polpa	Ensaio (dia)					Ensaio (dia)					Ensaio (dia)				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
h ₁	NP	1531,98 (0,98)	1529,48 (0,64)	1523,78 (2,72))	1517,98 (1,02)	1517,81 (1,70)	1469,80 (1,15)	1466,72 (1,93)	1457,92 (3,40)	1461,07 (2,08)	1457,87 (1,89)	1451,46 (1,13)	1447,91 (1,12)	1443,12 (1,83)	1439,71 (0,98)	1439,00 (0,95)
	P	1354,45 (1,30)	1353,16 (1,58)	1349,64 (0,88)	1349,22 (1,81)	1351,79 (1,57)	1288,56 (1,55)	1280,88 (1,04)	1278,08 (2,66)	1277,65 (1,65)	1275,19 (0,65)	1281,26 (0,78)	1275,63 (1,49)	1268,75 (1,13)	1273,06 (1,41)	1270,15 (0,61)
h ₂	NP	1530,28 (1,26)	1526,68 (2,76)	1522,44 (2,10)	1520,51 (0,96)	1520,08 (0,74)	1465,79 (1,58)	1461,88 (1,19)	1459,74 (0,95)	1457,48 (1,47)	1454,45 (0,95)	1452,10 (3,41)	1445,07 (0,46)	1442,98 (1,04)	1436,71 (2,37)	1434,88 (2,22)
	P	1351,77 (1,15)	1350,79 (1,05)	1348,18 (1,60)	1348,77 (1,84)	1346,08 (1,60)	1287,38 (2,98)	1282,76 (1,84)	1279,35 (0,63)	1272,23 (2,90)	1268,84 (0,71)	1278,42 (1,68)	1277,16 (1,19)	1271,90 (1,09)	1271,27 (2,46)	1272,75 (1,73)
h ₃	NP	1528,73 (1,48)	1523,64 (2,09)	1519,09 (1,73)	1518,25 (1,15)	1520,43 (0,80)	1467,13 (1,45)14	1466,67 (0,84)	1460,66 (2,83)	1461,87 (1,93)	1455,28 (2,34)	1452,24 (1,65)	1448,01 (1,36)	1441,47 (0,98)	1436,51 (0,62)	1435,43 (0,62)
	P	1350,26 (2,11)	1348,26 (1,45)	1347,40 (1,27)	1345,41 (0,75)	1347,23 (1,85)	1289,40 (1,48)	1285,84 (2,77)	1281,04 (1,41)	1281,23 (2,81)	1276,39 (2,76)	1279,16 (1,66)	1275,82 (2,13)	1270,05 (0,81)	1270,15 (2,06)	1269,98 (3,57)
Média total	NP	1530,33 (1,83)	1526,67 (3,14)	1521,77 (2,97)	1518,91 (1,54)	1519,44 (1,64)	1526,67 (3,14)	1465,09 (2,67)	1459,44 (2,88)	1460,14 (2,83)	1455,87 (2,33)	1451,93 (2,31)	1447,00 (1,72)	1442,52 (1,54)	1437,64 (2,11)	1436,44 (2,33)
	P	1352,16 (2,34)	1350,74 (2,43)	1348,41 (1,58)	1347,80 (2,31)	1348,37 (2,98)	1350,74 (2,43)	1283,16 (2,87)	1279,44 (2,15)	1276,90 (4,35)	1273,47 (3,72)	1279,61 (1,87)	1276,20 (1,79)	1270,23 (1,65)	1271,49 (2,35)	1270,96 (2,64)
CV (%) (médio)	NP	0,11	0,21	0,19	0,10	0,11	0,21	0,18	0,20	0,19	0,16	0,16	0,12	0,11	0,15	0,16
	P	0,17	0,18	0,12	0,17	0,22	0,18	0,22	0,17	0,34	0,29	0,15	0,14	0,13	0,18	0,21

Resultados dos teores de AA representam a média de 3 determinações analíticas com suas respectivas estimativas de desvios padrões, em 3 diferentes horários (h₁, h₂, h₃)/dia/mês, realizadas por dois analistas.

ANEXOS DO CAPÍTULO IV

ANEXO 1. Comparação das médias dos teores de ácido ascórbico e estimativas de desvios padrões, através do valor p , entre as polpas de acerola submetidas a diferentes tratamentos no tempo zero de processamento.

Tratamento	Polpa doméstica ¹	PSTT	PI	PPSD	PPCD
Média	1078,07 (5,67)	1167,52 (8,35)	1146,64 (9,51)	1112,13 (2,93)	1030,67 (2,84)
Polpa doméstica¹		0,000176*	0,000177*	0,02719*	0,000322*
PSTT			0,055234n.s	0,000202*	0,000176*
PI				0,002473*	0,000176*
PPSD					0,000176*

¹- processada em laboratório; PSTT- polpa sem tratamento térmico; PI- polpa com inativação térmica; PPSD- polpa pasteurizada sem desaeração; PPCD- polpa pasteurizada com desaeração
n.s diferença não significativa

* diferença significativa entre tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

PSTT- polpa sem tratamento térmico; PI- polpa inativada; PPSD- polpa pasteurizada sem desaeração; PPD- polpa pasteurizada desaerada

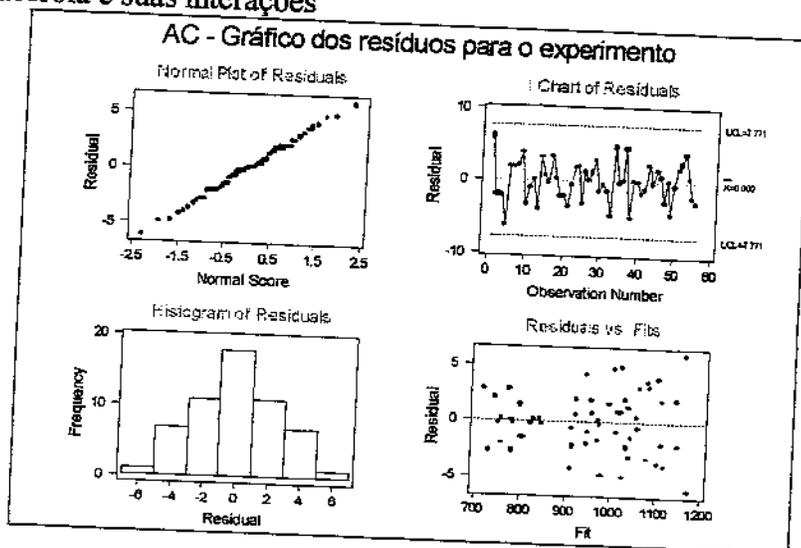
ANEXO 2. ANOVA dos resultados médios do ácido ascórbico nos diferentes tratamentos da polpa de acerola, com a análise do comportamento linear

Fonte de variação	GL.	SQ	SQ ajustado	QM	F	p
Tempo	6	499099	499099	83183	49,46	0,000
Regressão	3	357789	357789	119263	70,92	0,000
Linear	2	357375	272403	136201	80,99	0,000
Interação	1	414	414	414	0,25	0,622
Resíduo	46	77357	77357	1682		
Total	55	934244				

ANEXO 3. ANOVA para determinação da influência do tempo, tipo de embalagem e de tratamento dado à polpa de acerola e suas interações

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
tempo	6	499099	83183	3771.42	0.000
embalage	1	1252	1252	56.77	0.000
tratam	3	391025	130342	5909.54	0.000
tempo*embalage	6	319	53	2.41	0.069
tempo*tratam	18	41465	2304	104.44	0.000
embalage*tratam	3	687	229	10.38	0.000
Erro	18	397	22		
Total	55	934244			

ANEXO 3.1(Cap.IV). Análise de resíduos na determinação do ácido ascórbico e a influência do tempo, tipo de embalagem e de tratamento dado à polpa de acerola e suas interações



ANEXO 4. Comparação entre as médias dos teores de antocianinas, através do valor p , entre as polpas de acerola submetidas a diferentes tratamentos, no tempo zero de processamento

Tratamento	Polpa doméstica	PSTT	PI	PPSD	PPCD
Média para Acy^2	21,167 (0,10)	25,483 (0,01)	17,087(0,001)	10,210 (0,04)	10,230 (0,01)
Polpa Doméstica		0,000176*	0,000176*	0,000176*	0,000176*
PSTT			0,000176*	0,000176*	0,000176*
PI				0,000176*	0,000176*
PPSD					0,991971 n.s

1- polpa processada em laboratório; n.s- diferença não significativa
 * diferença significativa entre tratamentos ($p < 0,05$); PSTT- polpa sem tratamento térmico; PI- polpa inativada; PPSD- polpa pasteurizada sem desaeração; PPCD- polpa pasteurizada com desaeração
 Acy^2 - antocianinas

ANEXO 5. Análise de variância para Antocianinas (Acy 1) de polpas de acerola não pasteurizadas e polpas inativadas congeladas

Fonte de variação	GL	SQ	SQ ajust	MS ajust	F	P
Tempo	6	392,674	392,674	65,4456	35,61	0,000
Regressão	3	110,344	110,344	36,7814	20,01	0,000
Linear	2	110,342	84,592	42,2960	23,02	0,000
Interação	1	0,002	0,002	0,0019	0,00	0,975
Erro residual	18	33,079	33,079	1,8377		
Total	27	536,096				

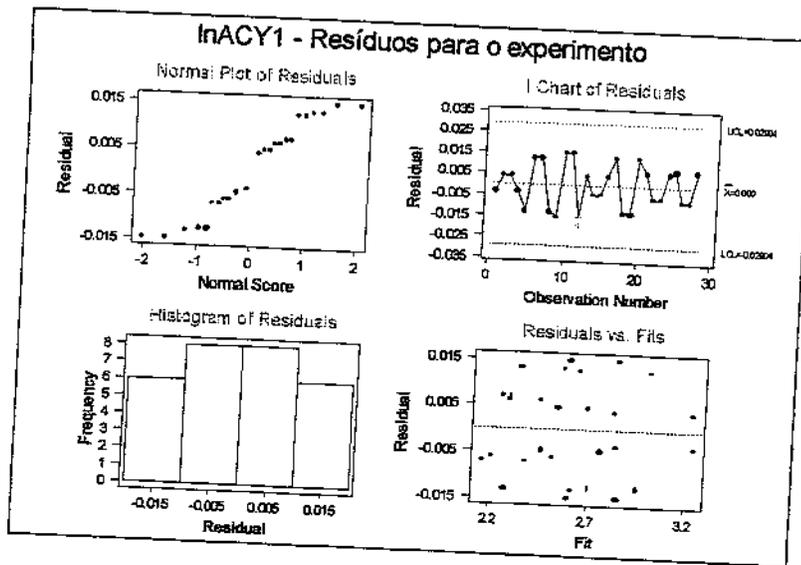
Acy 1- teores de antocianinas para polpas sem tratamento térmico (PSTTV e PSTTL) acondicionadas em vidro e lata, respectivamente e polpas com inativação térmica (PIV e PIL) acondicionadas em vidro e em lata, respectivamente durante o armazenamento de 180 dias.

ANEXO 6. ANOVA das análises de Antocianinas (Acy 1) de polpas de acerola sem tratamento térmico e polpas inativadas congeladas, analisadas até 180 dias de armazenamento, incluindo as interações dos principais efeitos envolvidos no processamento

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
tempo1	6	1.76505	0.29417	659.65	0.000
embalag1	1	0.01786	0.01786	40.06	0.001
tratal	1	0.47490	0.47490	1064.89	0.000
tempo1*embalag1	6	0.00795	0.00132	2.97	0.106
tempo1*tratal	6	0.03907	0.00651	14.60	0.002
embalag1*tratal	1	0.00037	0.00037	0.83	0.398
Erro	6	0.00268	0.00045		
Total	27	2.30787			

(valor $p < 0,05$); Acy 1- teores de antocianinas para polpas sem tratamento térmico (PSTTV e PSTTL) acondicionadas em vidro e lata, respectivamente e polpas com inativação térmica (PIV e PIL) acondicionadas em vidro e em lata, respectivamente durante o armazenamento de 180 dias.

ANEXO 6.1 (Cap. IV). Análise dos resíduos dos resultados das Antocianinas (Acy 1) de polpas de acerola não pasteurizadas e polpas inativadas congeladas, analisadas até 180 dias de armazenamento, incluindo as interações dos principais efeitos envolvidos no processamento

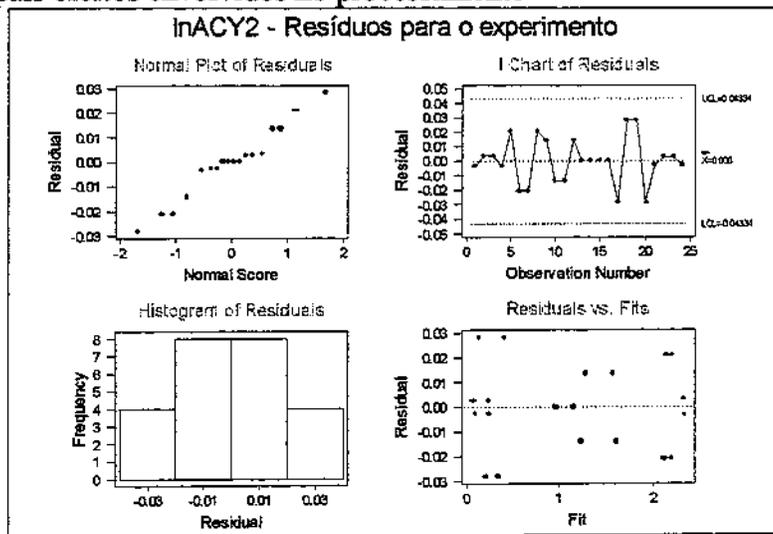


ANEXO 7. Análise de variância das análises de Antocianinas (Acy 2) de polpas de acerola pasteurizadas (sem e com desaeração) armazenadas à temperatura ambiente, analisadas até 150 dias de armazenamento, incluindo as interações dos principais efeitos envolvidos no processamento.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
tempo2	5	16.71429	3.34286	2907.13	0.000
embalag2	1	0.00699	0.00699	6.08	0.057
trata2	1	0.13164	0.13164	114.48	0.000
tempo2*embalag2	5	0.00390	0.00078	0.68	0.660
tempo2*trata2	5	0.08242	0.01648	14.34	0.005
embalag2*trata2	1	0.00028	0.00028	0.24	0.642
Erro	5	0.00575	0.00115		
Total	23	16.94526			

(valor $p \leq 0,05$); Acy 1- teores de antocianinas para polpas sem tratamento térmico (PPSD e PPCD) acondicionadas em vidro e em lata, respectivamente durante o armazenamento de 150 dias.

ANEXO 7.1. (Cap. IV). Análise dos resíduos dos resultados das Antocianinas (Acy 2) de polpas de acerola pasteurizadas (PPSD e PPCD) armazenadas à temperatura ambiente, analisadas até 150 dias de armazenamento, incluindo as interações dos principais efeitos envolvidos no processamento



ANEXO 8. Análise de variância para acidez total equivalente à ácido cítrico de polpa de acerola

Fonte de variação	G.L.	S.Q	S.Q.ajust	M.S.ajust	F	P
Tempo	6	0,012736	0,012736	0,002123	23,73	0,000
Regressão	3	0,005548	0,005548	0,001849	20,68	0,000
Linear	2	0,005548	0,004664	0,002332	26,07	0,000
Interação¹	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	0,950
Erro Residual	46	0,004114	0,004114	0,000089		
Total	55	0,022398				

1- embalagem x tratamento; G.L.- graus de liberdade; S.Q.- soma dos quadrados; S.Q.ajust.- soma dos quadrados ajustado; p(0,005)

ANEXO 9. Análise de variância detalhada para acidez total equivalente à ácido cítrico de polpa de acerola

Fonte de variação	G.L.	S.Q	S.Q.ajust	M.S.ajust	F	P
Tempo	6	0,0127735	0,0127357	0,0021226	36,36	0,000
		7		6		
Embalagem	1	0,0001446	0,0001446	0,0001446	2,48	0,122
Tratamento	3	0,0068911	0,0068911	0,0022970	39,35	0,000
Erro	45	0,0026268	0,0026268	0,0000548		
Total	55	0,0223982				

ANEXO 10. Estudo dos coeficientes de regressão para análise de significância de acidez total equivalente ao ácido cítrico para polpa de acerola

Variável	Estimativa dos parâmetros	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	0,760679	0,003356	226,65	0,000
Tempo	-0,0071429	0,0006823	-10,47	0,000
Embalagem	0,003214	0,002729	11,18	0,244
Tratamento	-0,008786	0,001220	-7,20	0,000
s = 0,01021	R-sq = 75,8%	R-sq = 74,4%		

ANEXO 11. Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para °Brix em polpa de acerola

Fonte de variação	G.L.	S.Q	S.Q.ajust	M.S.ajust	F	P
Tempo	6	0,216036	0,216036	0,036006	3,76	0,004
Regressão	3	0,109985	0,109985	0,036662	3,83	0,016
Linear	2	0,103476	0,048474	0,024237	2,53	0,091
Interação	1	0,006509	0,006509	0,006509	0,68	0,414
Erro residual	46	0,440377	0,440377	0,009573		
Total	55	0,766398				

ANEXO 12. Avaliação dos coeficientes de regressão para análise de significância de °Brix em polpa de acerola

Variável	Estimativa dos parâmetros	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	7,64986	0,03674	208,21	0,000
Tempo	0,007679	0,007469	1,03	0,309
Embalagem	-0,01750	0,02987	-0,59	0,561
Tratamento	-0,03764	0,01336	-2,82	0,007
s = 0,1118	R-sq = 15,2%	R-sq = 10,3%		

ANEXO 13. Análise de variância para Sólidos Totais em polpa de acerola

Fonte de variação	G.L.	S.Q	S.Q.ajust	M.S.ajust	F	P
Tempo	6	4,44287	4,44287	0,740478	19,17	0,000
Regressão	3	2,06201	2,06201	0,0687338	17,79	0,000
Linear	2	2,06000	1,20313	0,601565	15,57	0,000
Interação ¹	1	0,00201	0,00201	0,002009	0,05	0,821
Erro Residual	46	1,77687	1,77687	0,038628		
Total	55	8,28176				

ANEXO 14. Análise dos coeficientes de regressão para determinação de Sólidos Totais em polpa de acerola

Variável	Estimativa dos parâmetros	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	8,53054	0,08042	106,08	0,000
Tempo	-0,11781	0,01635	-7,21	0,000
Embalagem	-0,09107	0,06539	-1,39	0,170
Tratamento	-0,166664	0,002924	-5,70	0,000
s = 0,2447	R-sq = 62,4%	R-sq ajust = 60,2%		

ANEXO 15. ANOVA dos principais efeitos, tempo de armazenamento de 180 dias, tipo de embalagem e tratamento das polpas de acerola, na determinação do pH

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
tempo	6	0.2107751	0.0351292	3106.17	0.000
embalage	1	0.0001446	0.0001446	12.79	0.002
tratam	3	0.0004482	0.0001494	13.21	0.000
tempo*embalage	6	0.0001679	0.0000280	2.47	0.064
tempo*tratam	18	0.0047393	0.0002633	23.28	0.000
embalage*tratam	3	0.0001339	0.0000446	3.95	0.025
Erro	18	0.0002036	0.0000113		
Total	55	0.2166127			

ANEXO 16. Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração das antocianinas, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Estimativa dos parâmetros	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	-44,47	68,49	-0,65	0,537
PH	7,503	8,082	0,93	0,384
°Brix	-13,606	4,553	-2,99	0,020
AcCit	93,92	34,10	2,75	0,028
AcMal	23,13	35,32	0,66	0,533
S	2,837	1,487	1,91	0,098
AA	0,026540	0,009734	2,73	0,029

S= 0,6900

R-sq = 99,0%

R-sq(adj) = 98,1%

ANEXO 17. Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração do ácido ascórbico, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PSTT, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Estimativa dos parâmetros	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	742	1886	0,39	0,706
pH	-254,6	210,7	-1,21	0,266
°Brix	213,3	167,3	1,27	0,243
AcCit	-763	1299	-0,59	0,575
AcMal	-198,9	981,0	-0,20	0,845
S	-5,68	49,52	-0,11	0,912
AA	19,406	7,117	2,73	0,029

S= 18,66

R-sq = 97,2%

R-sq(adj) = 94,7%

ANEXOS DO CAPÍTULO V

ANEXO 1. ANOVA sobre a influência dos principais efeitos do processamento (tratamento, embalagem e armazenamento sobre cor vermelha (a) na polpa de acerola

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
tempo	6	131.883	21.980	60.25	0.000
embalage	1	0.727	0.727	1.99	0.175
tratam	3	432.946	144.315	395.57	0.000
tempo*embalage	6	5.311	0.885	2.43	0.068
tempo*tratam	18	105.182	5.843	16.02	0.000
embalage*tratam	3	3.257	1.086	2.98	0.059
Erro	18	6.567	0.365		
Total	55	685.873			

ANEXO 2. ANOVA sobre a influência dos principais efeitos do processamento (tratamento, embalagem e armazenamento sobre cor amarela (b) na polpa de acerola

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
tempo	6	35.406	5.901	7.22	0.000
embalage	1	0.094	0.094	0.11	0.739
tratam	3	420.088	140.029	171.25	0.000
tempo*embalage	6	11.329	1.888	2.31	0.079
tempo*tratam	18	87.972	4.887	5.98	0.000
embalage*tratam	3	6.465	2.155	2.64	0.081
Erro	18	14.718	0.818		
Total	55	576.072			

Anexos

ANEXO 3. ANOVA sobre a influência dos principais efeitos do processamento (tratamento, embalagem e armazenamento sobre a luminosidade(L) na polpa de acerola

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
tempo	6	36.335	6.056	14.24	0.000
embalage	1	0.607	0.607	1.43	0.248
tratam	3	330.838	110.279	259.27	0.000
tempo*embalage	6	0.593	0.099	0.23	0.960
tempo*tratam	18	49.340	2.741	6.44	0.000
embalage*tratam	3	4.091	1.364	3.21	0.048
Erro	18	7.656	0.425		
Total	55	429.458			

ANEXO 4. Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração de antocianinas na polpa PI, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PI, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coeficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	-35,5	161,1	-0,22	0,837
PH	14,48	13,82	1,05	0,354
°Brix	-3,26	16,14	-0,20	0,850
AcCit	-6,35	46,75	-0,14	0,898
AcMal	18,41	35,03	0,53	0,627
S	0,246	1,837	0,13	0,900
AA	0,013331	0,01439	0,92	0,407
L	-0,2076	0,5636	-0,37	0,731
A	1,3661	0,8356	1,63	0,177
B	0,0419	0,2598	0,16	0,880

s= 0,7785

R-sq = 97,7%

R-sq(adj) =92,4%

ANEXO 5. Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração de ácido ascórbico na polpa PI, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PI, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coeficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	4006	4702	0,85	0,442
PH	-204,9	481,2	-0,43	0,692
°Brix	-349,7	480,7	-0,73	0,507
AcCit	1261	1336	0,94	0,399
AcMal	-739	1081	-0,68	0,532
S	-45,12	53,47	-0,84	0,446
AA	13,23	14,31	0,92	0,407
L	-1,46	18,06	-0,08	0,940
A	11,34	33,55	0,34	0,752
B	7,035	7,427	0,95	0,397

s= 24,86

R-sq = 96,5%

R-sq(adj) = 88,8%

ANEXO 6. Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração das antocianinas na polpa PPSD, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PPSD, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coeficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	151,84	66,13	2,30	0,149
PH	-44,42	13,78	-3,22	0,084
°Brix	1,790	1,411	1,27	0,332
AcCit	-47,18	17,58	-2,68	0,115
AcMal	5,277	8,366	0,63	0,593
S	-4,7792	0,5117	-9,34	0,011
AA	0,041516	0,003655	11,36	0,008
L	0,21110	0,1386	1,52	0,267
A	0,1026	0,1059	0,97	0,435
B	0,2135	0,1387	1,54	0,264

s= 0,1255

R-sq = 100,0%

R-sq(adj) = 99,9%

ANEXO 7. Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração de ácido ascórbico na polpa PPSD, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PPSD, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coeficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	-3853	1289	-2,99	0,096
PH	1104,9	248,6	4,45	0,047
°Brix	-37,82	36,58	-1,03	0,410
AcCit	1177,2	346,0	3,40	0,077
AcMal	-128,0	199,4	-0,64	0,587
S	114,870	8,759	13,11	0,006
AA	23,719	2,088	11,36	0,008
L	-4,521	3,670	-1,23	0,343
A	-2,638	2,437	-1,08	0,392
B	-5,491	2,991	-1,84	0,208

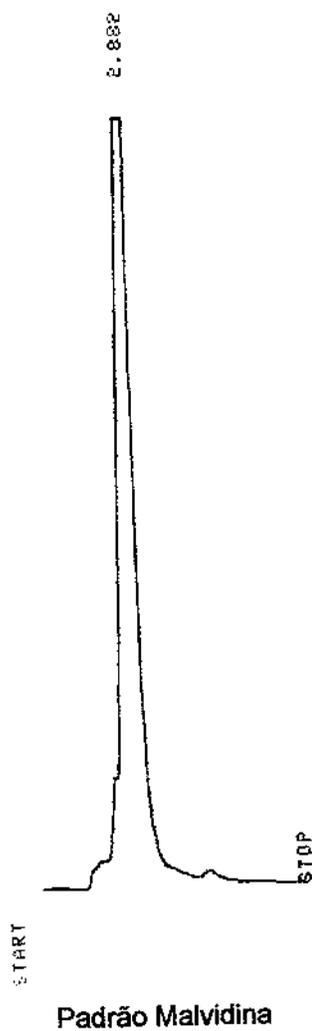
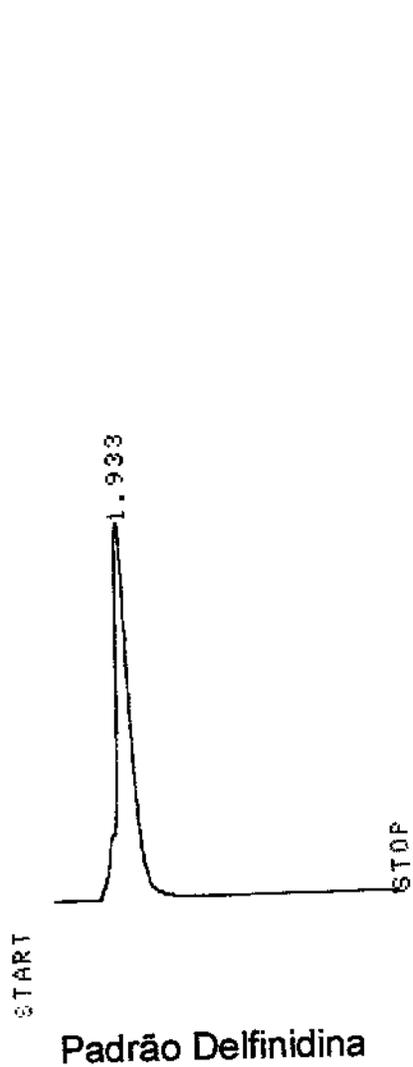
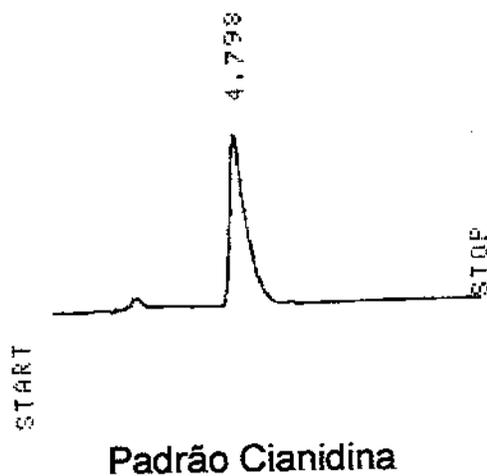
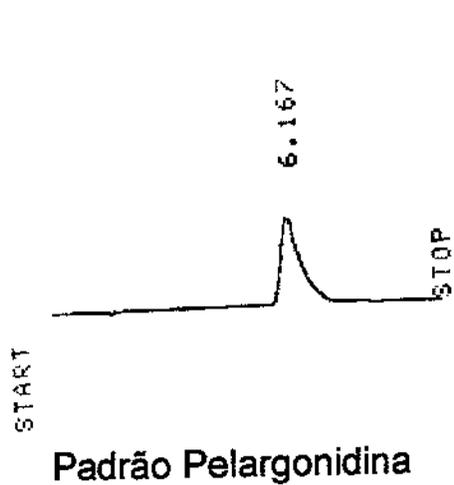
s= 3,001 R-sq = 100,0% R-sq(adj) =99,9%

ANEXO 8. Coeficientes do modelo de regressão para determinar a concentração de antocianinas na polpa PPCD, incluindo as diferentes análises químicas envolvidas no experimento (fixos o tratamento PPCD, a embalagem e todos os tempos incluídos)

Variável	Coeficientes	Desvio padrão	"t-ratio"	P
Constante	-219,3	163,5	-1,34	0,312
PH	5,97	41,13	0,15	0,898
°Brix	0,860	3,854	0,22	0,844
AcCit	155,60	64,18	2,42	0,136
AcMal	39,55	40,88	0,97	0,435
S	-1,7309	5,634	-0,28	0,806
AA	0,00080	0,02909	0,03	0,981
L	1,7309	0,6455	2,68	0,115
a	-1,475	1,810	-0,81	0,501
b	-0,2898	0,3849	-0,75	0,530

s= 0,6987 R-sq = 99,4% R-sq(adj) =96,5%

ANEXOS DO CAPÍTULO VI



ANEXO 1. Padrões de antocianidinas