

José Fernando Rinaldi de Alvarenga

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SUCO DE
LARANJA PROCESSADO POR ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Araraquara

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SUCO DE LARANJA PROCESSADO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

JOSÉ FERNANDO RINALDI DE ALVARENGA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magali Monteiro da Silva

Araraquara

2014

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais,
José Olimpio e Marivalda
Por toda energia, amor e paciência
Para finalizar mais esta etapa da minha vida.

Dedico aos meus irmãos,
Clara e José Vitor,
Pelo carinho e companheirismo
A felicidade está ao lado de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Magali Monteiro pela orientação e ensinamentos transmitidos desde meu ingresso nesta Universidade, por todo aprendizado, confiança e por despertar a paixão pela pesquisa.

A Embrapa – Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, na pessoa do Dr. Amauri Rosenthal, pelo uso do equipamento de alta pressão hidrostática.

Agradeço ao Antonio Bisconsin Júnior, pela amizade e apoio na execução deste trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

Aos funcionários e professores do Departamento de Alimentos e Nutrição e, em especial a Lica, cujo apoio e experiência foram imprescindíveis à qualidade deste trabalho e pela amizade.

A Raíssa Bittar Mastello, por estar presente ao longo de todos os anos de laboratório, me apoiando, ensinando e sendo uma grande amiga.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Luiza, Eliane, Estela, Fernanda, Mariana Nucci e Paz por todos os bons momentos e risadas que demos juntos.

Aos meus colegas de turma, Danete, Pamps, Sininho, Pestiscão, Turtle e Tixo por todas as emoções vividas nesses 6 anos.

A Naiara Fachinetti e Aline Cafareli Bergo (Pitty) pela amizade, companheirismo e amor por todos os anos de faculdade. A amizade e a força de vocês fizeram com que a cada ano eu não desistisse da graduação.

À minha família que sempre me apoiou, com amor e carinho. Sem vocês ao meu lado este título nunca seria conquistado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	6
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Suco de laranja	9
1.2 Tecnologia de alta pressão	10
1.2.1 Homogeneização a alta pressão (HAP)	11
1.2.2 Alta pressão hidrostática (APH)	11
1.2.3 Processamento do suco de laranja a alta pressão.....	12
1.3 Compostos bioativos e atividade antioxidante.....	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 MATERIAL	16
3.2 MÉTODOS	16
3.2.1 Otimização do processamento do suco de laranja por APH	16
3.2.1.1 Planejamento experimental	16
3.2.2 Determinação do teor de ácido ascórbico	17
3.2.4 Determinação dos compostos fenólicos totais	19
3.2.5 Determinação da atividade antioxidante.....	20
3.2.5.1 Preparo das amostras	20
3.2.5.2 Determinação da atividade antioxidante usando a reação de descoloração do radical ABTS ^{•+}	20
3.2.5.3 Determinação da atividade antioxidante usando a reação com o radical DPPH [•]	22
3.2.5.4 Determinação da atividade antioxidante usando a reação de redução do ferro (FRAP)	23
4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	25
5. RESULTADOS	25

5.1 Otimização do processamento do suco de laranja por APH	25
5.2 Efeito do processamento por APH no teor de ácido ascórbico	25
5.3 Efeito do processamento por APH nos compostos fenólicos totais.....	30
5.4 Efeito do processamento por APH na atividade antioxidante.....	31
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS.....	35

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja. O suco NFC (*Not From Concentrate*) vem sendo valorizado pelo consumidor frente ao FCOJ (*Frozen Concentrated Orange Juice*) por apresentar sabor e aroma característicos de laranja, próximos ao do suco espremido na hora do consumo. Já o FCOJ é exposto à temperatura elevada por um período de tempo maior que o NFC, o que altera drasticamente o aroma e sabor. O emprego da tecnologia de alta pressão hidrostática (APH) é considerado promissor para processar alimentos termossensíveis, sem afetar as características nutricionais e sensoriais, e garantindo a qualidade microbiológica. A influência do processamento por alta pressão hidrostática sobre o teor de ácido ascórbico, de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante do suco de laranja Pêra-Rio foi avaliada nas condições de pressão (100-600 MPa), temperatura (30-60 °C) e tempo (30-360 s) empregando a metodologia de superfície de resposta. O processamento por APH reduziu o conteúdo de ácido ascórbico e a atividade antioxidante do suco de laranja Pêra Rio. O tempo, a temperatura e a pressão influenciaram a resposta das variáveis. O tempo de processamento do suco por APH apresentou a maior influência na redução do ácido ascórbico e da atividade antioxidante. As condições de tratamento de 100 a 250 MPa, 30 a 40 °C e 30 a 125 s foram capazes de produzir suco de laranja com mais de 70% do conteúdo inicial de ácido ascórbico e de 80% da atividade antioxidante.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da extração de compostos fenólicos do suco de laranja.	18
Figura 2. Curva de calibração com ácido gálico (72-200 mg.mL ⁻¹)	20
Figura 3. Estabilização do radical ABTS ^{•+} com compostos antioxidantes (Rufino et al, 2007a).	21
Figura 4. Curva de calibração de Trolox (100-500 µmol.L ⁻¹).	21
Figura 5 Estabilização do radical livre DPPH [•] (RUFINO et al., 2007b).	22
Figura 6. Curva de calibração de trolox (100-500 µmol.L ⁻¹).	23
Figura 7. Redução do complexo férrico tripiridiltiazina (RUFINO et al., 2006).	23
Figura 8. Curva de calibração de Trolox (200-400 µmol.L ⁻¹).	24
Figura 9. Superfícies de resposta para o teor de ácido ascórbico (mg/100ml) do suco de laranja em função da pressão e tempo (a), sob temperatura de 45 °C (ponto central); da temperatura e tempo (b), sob pressão de 350 MPa (ponto central); e da temperatura e pressão (c), com tempo de 195 s (ponto central).	30
Figura 10. Superfícies de resposta da atividade antioxidante utilizando a reação com o radical ABTS (µmol de Trolox.L ⁻¹) do suco de laranja em função da pressão e tempo (a), sob temperatura de 45 °C (ponto central); da temperatura e tempo (b), sob pressão de 350 MPa (ponto central); e da temperatura e pressão (c), com tempo de 195 s (ponto central).	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis codificados das variáveis para os ensaios de otimização do processamento do suco de laranja por APH.....17

Tabela 2. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas nos ensaios de otimização do processamento do suco de laranja por APH.....26

Tabela 3. Teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante usando as reações com ABTS, DPPH e FRAP do suco de laranja Pêra Rio não processado e do suco de laranja processado por APH, conforme o DCCR.27

Tabela 4. Valor F da análise de variância dos modelos ajustados de segunda ordem do teor de ácido ascórbico, do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante usando as reações com ABTS, DPPH e FRAP, do suco de laranja processado por APH.28

1. INTRODUÇÃO

1.1 Suco de Laranja

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), sendo responsável por mais da metade da produção do suco de laranja consumido no mundo. A cadeia citrícola é uma das mais importantes no setor do agronegócio brasileiro, gerando empregos e divisas para o país e produzindo diversos produtos e subprodutos. Na safra de 2013/2014 o país apresentou uma área cultivada de 789 mil ha, com uma produção de 16,30 milhões de ton do fruto (CitrusBR, 2014).

O cultivo de laranja está presente em todos os estados brasileiros, no entanto, os pomares de laranja se concentram no chamado cinturão citrícola, que se localiza no estado de São Paulo e no Triângulo Mineiro, onde são produzidos mais de 80% das laranjas do país (CONAB, 2013). As variedades mais cultivadas no estado de São Paulo são Pêra Rio, Valência, Natal e Hamlim (AMARO & BAPTISTELLA, 2011).

De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos em fábricas brasileiras (CitrusBR, 2014). A produção brasileira de suco de laranja na safra 2012/2013 foi de 980 mil ton de FCOJ (*Frozen Concentrate Orange Juice*), cujo a água é retirada do suco, e de 1,15 milhões de ton de NFC (*Not From Concentrate*), suco pasteurizado sem a retirada de água (205 mil ton equivalentes a FCOJ). O total de suco de laranja exportado no mesmo período foi 1,19 milhões de ton, sendo 920 mil ton de FCOJ e 1,15 milhões de ton de NFC (205 mil ton equivalentes a FCOJ) (USDA, 2014).

Estudos apontam uma preferência do consumidor por suco de laranja natural, com conceito de saudável e sabor mais próximo ao do suco espremido na hora do

consumo (JANZANTTI *et al.*, 2011; FIESP & IBOPE, 2010; CAMPOS *et al.*, 2006; VILELA & BICALHO, 2006).

Dessa forma, o NFC vem sendo muito valorizado pelo consumidor frente ao FCOJ, que fica exposto à temperatura elevada por um período maior de tempo que o NCF, o que altera drasticamente o aroma e sabor. Contudo, o FCOJ apresenta a vantagem de ter maior estabilidade microbiológica e custo de transporte menor, devido ao processo de concentração (QUEIROZ & MENEZES, 2010; TRIBESS & TADINI, 2003). A logística de exportação do NFC é complicada e cara, uma vez que o volume para transporte é seis vezes maior que o do FCOJ. Ainda assim, suas características sensoriais fazem dele um produto diferenciado, de grande aceitação pelo consumidor e alto valor agregado (MENDES, 2009; CitrusBR, 2014).

1.2 Tecnologia de alta pressão

O tratamento à alta pressão é uma das tecnologias mais inovadoras para processar produtos termossensíveis. O uso de pressões de 100 a 1000 MPa provoca destruição microbiana e retarda significativamente as taxas de reações enzimáticas minimizando a formação de sabores indesejáveis e o escurecimento não-enzimático. Desta forma, ocorre pouca perda de nutrientes e vitaminas e as alterações no sabor são praticamente imperceptíveis (BASAK & RAMASWAMY, 1996).

Existem dois tipos de processamento à alta pressão, alta pressão hidrostática e homogeneização à alta pressão, cujo modo de funcionamento e efeitos sobre os componentes dos alimentos e dos agentes de deterioração e patógenos são diferentes (FARKAS & HOOVER, 2000).

1.2.1 Homogeneização a alta pressão (HAP)

A HAP é um processo de homogeneização de líquidos que são forçados a passar à alta velocidade e pressão através de uma válvula de homogeneização, que produz uma velocidade extremamente elevada ao passar pelo orifício, produzindo atrito entre as células de microrganismos, levando à quebra da parede celular devido a sua rigidez. Após a passagem pelo orifício ocorre queda brusca na pressão, provocando expansão do líquido, e consequente colapso nos vacúolos dos microrganismos. Os fenômenos de cavitação, atrito, cisalhamento e turbulência são os responsáveis pela eficácia do tratamento (CAMPOS, 2004; LACROIX, FLISS & MAKH, 2005).

1.2.2 Alta pressão hidrostática (APH)

O processo de APH consiste em submeter o alimento à alta pressão, normalmente de 100 a 900 MPa, dentro de um tanque pressurizado, contendo um meio líquido, geralmente água potável (YUSTE *et al.*, 2001). O processo é isostático, ou seja, a pressão é transmitida de maneira uniforme e instantaneamente, e adiabático, o que significa que não importa a forma ou tamanho dos alimentos, diferentemente dos processos térmicos. Além disso, ocorre pouca variação de temperatura com o aumento da pressão. A temperatura aumenta cerca de 3 °C para cada acréscimo de 100 MPa no processo, dependendo da composição do alimento (SMELT, 1998; WILSON *et al.*, 2008).

Em termos gerais, a APH aplicada à temperatura ambiente, destrói células vegetativas e inativa enzimas (SIMPSON & GILMOUR, 1997), com pouca alteração sensorial do alimento (SAN MARTIN *et al.* 2002). A eficácia do tratamento depende

principalmente da pressão aplicada e do tempo de retenção. A resistência dos microrganismos é variável, dependendo do tipo de organismo e da matriz do alimento (FARKAS & HOOVER, 2000).

1.2.3 Processamento do suco de laranja a alta pressão

O processamento de sucos de fruta usando a tecnologia de alta pressão vem sendo muito indicado quando as características sensoriais são muito afetadas, como é o caso do suco submetido ao tratamento térmico. A tecnologia de alta pressão é capaz de manter as características nutricionais e sensoriais do suco mais próximas às daquelas do produto natural (CAMPOS & CRISTIANINI, 2004). Tradicionalmente, o processamento do suco NFC vem sendo feito por pasteurização, que emprega calor para destruir microrganismos e inativar enzimas como a pectinametilesterase, aumentando a vida de prateleira do produto. Entretanto, o processo térmico é capaz de impactar negativamente a qualidade do suco, levando à perda de sabor natural e à degradação do ácido ascórbico e alteração da cor (TIMMERMANS *et al.*, 2011).

No tratamento do suco de laranja por alta pressão vêm sendo empregadas pressões que variam de 300 a 700 MPa por períodos de 30 segundos até alguns minutos para a destruição de bactérias, embora esporos de bactérias consigam resistir até 1000 MPa em temperatura ambiente. Seu desenvolvimento, no entanto, pode ser minimizado com uso de baixas temperaturas e baixo pH. Além disso, o processamento do suco de laranja à alta pressão também é eficaz em relação à inativação enzimática, já que diferentemente da pasteurização, a alta pressão consegue inativar a pectinametilesterase (TIMMERMANS *et al.*, 2011).

Na literatura são encontrados vários estudos sobre a influência do processamento por APH no teor de ácido ascórbico e na atividade antioxidante do suco de laranja, entretanto o efeito em uma faixa ampla de condições de processamento de pressão, temperatura e tempo ainda não foi determinado. Bull *et al.* (2004) observaram no suco de laranja da variedade Valência processado a 600 MPa, 20 °C e 60 s que o teor de ácido ascórbico não foi afetado significativamente. Entretanto, Sanchez-Moreno *et al.* (2003) obtiveram uma redução de 11% no teor de ácido ascórbico em suco de laranja processado a 100MPa, 60 °C por 30 s. Ancos *et al.* (2002) estudaram o efeito da APH no teor de carotenoides e na atividade antioxidante de suco de laranja da variedade Valência. O maior teor de vitamina A e carotenoides foi obtido no suco processado nas condições de 350 MPa, 30 °C por 300 s, embora tenha sido observada uma redução de 22% na atividade antioxidante comparada ao suco não processado. Sanchez-Moreno *et al.* (2005) observaram que o processamento de suco de laranja a 400MPa, 40 °C e 60 s não reduziu significativamente o conteúdo de ácido ascórbico e aumentou o teor de carotenoides (54%) e flavanonas (34%), mas sem diferença significativa na atividade antioxidante em relação ao suco não processado.

1.3 Compostos bioativos e atividade antioxidante

Muito consumido em todo mundo e também pelos brasileiros, o suco de laranja é rico em vitaminas e nutrientes, com destaque para a quantidade de vitamina C, B, fibra, potássio, ferro, além de fonte de carotenoides e flavonoides que contribuem expressivamente para a atividade antioxidante. Atualmente, estudos vêm comprovando que o suco de laranja melhora o HDL em indivíduos com

hipercolerostemia e reduz a oxidação lipídica em fumantes (SUGAI *et al.*, 2002; SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2005).

Os estudos com antioxidantes estão cada vez mais em evidência devido aos efeitos prejudiciais que os radicais livres, substâncias contendo elétrons desemparelhados, principalmente em átomos de oxigênio e nitrogênio, podem causar no organismo (Liu, 2003). A oxidação sofrida por esses átomos faz parte do metabolismo devido, entre outros fatores, à sua função aeróbica como a produção de energia, além da fagocitose e da síntese de substâncias. A presença de radicais livres em excesso pode causar estresse oxidativo, que gera danos ao organismo, provocando peroxidação lipídica de membranas, destruição de proteínas, carboidratos e DNA. Por isso, os radicais livres vêm sendo relacionados ao surgimento de doenças cardiovasculares, catarata, câncer, etc, e podem piorar quadros clínicos já existentes. Existem vários tipos de espécies oxidativas, dentre eles: hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), alcoxila ($\text{RO}^\bullet$), oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS *et al.*, 2006).

O organismo humano tem várias maneiras de combater o estresse oxidativo, quer seja empregando substâncias produzidas pelo próprio corpo ou provenientes da dieta. A oxidação pode ser reduzida ou inibida pelo consumo de nutrientes como: vitaminas C, E e A, clorofilina, carotenóides, como o β -caroteno, e outros antioxidantes, como compostos fenólicos, que são capazes de estabilizar os radicais livres, evitando lesões em estruturas biológicas (LIU, 2003; BARREIROS *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos são substâncias que contém um anel aromático com

um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais e os principais representantes são os ácidos fenólicos, polifenóis como os flavonóides, responsáveis pelo sabor amargo e adstringente de alguns alimentos. Em geral, os compostos fenólicos, em especial os flavonóides, possuem estrutura capaz de sequestrar radicais livres, sendo mais efetivos que a vitamina E e C, pois apresentam maior reatividade, estabilidade do radical flavonil formado e grande solubilidade e interação com as membranas (MALACRIDA & MOTTA, 2005; BARREIROS *et al.*, 2006).

O suco de laranja é uma fonte importante de compostos antioxidantes na dieta, principalmente devido à presença de ácido ascórbico e de flavonoides. Embora os compostos antioxidantes do suco de laranja venham sendo bastante estudados, sobretudo devido à sua relação com a proteção do DNA contra danos oxidativos, ainda não existem dados sobre o impacto de diferentes intervalos de processamento por alta pressão na atividade antioxidante do suco (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2005; STELLA *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

O objetivo desse projeto foi avaliar a influência das condições de processamento do suco de laranja por alta pressão hidrostática no teor de ácido ascórbico, nos compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante utilizando diferentes técnicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Neste trabalho foi utilizado o suco de laranja da variedade Pêra Rio pressurizado e o suco não processado (recém extraído e filtrado), usado como controle. O suco de laranja foi fornecido por uma indústria citrícola da região de Araraquara, SP.

O equipamento de alta pressão hidrostática utilizado para o processamento do suco de laranja é do modelo Stansted Food Lab 9000 (Stansted Fluid Power, Reino Unido), do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Embrapa, RJ. Para o processamento os sucos foram embalados em sacos de polietileno flexíveis e processados em câmara de 500 mL. O fluido utilizado para transmitir a pressão foi etanol 70%.

3.2 Métodos

3.2.1 Otimização do processamento do suco de laranja por APH

3.2.1.1 Planejamento experimental

Com o objetivo de otimizar o processamento do suco de laranja por APH, foi empregada a metodologia de superfície de resposta. Previamente, foram realizados testes preliminares para definir os intervalos de trabalho do equipamento, considerando sua capacidade de processamento, frente às características inerentes do suco de laranja. Para tanto foi escolhido o delineamento experimental composto central rotacional (DCCR), com planejamento fatorial completo 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 17 ensaios.

Os valores das variáveis foram representados como -1 e +1; o ponto central como 0 (zero) e os pontos axiais como $-\alpha$ e $+\alpha$ (Tabela 1). Para o cálculo dos pontos axiais foi utilizada a equação $\alpha = (2^n)^{1/4}$, onde n=número de variáveis, tendo-se $+\alpha=1,68$ e $-\alpha=-1,68$. Na Tabela 1 estão apresentados os níveis codificados das condições utilizadas para cada ensaio, segundo o planejamento fatorial completo 2^3 .

Tabela 1. Níveis codificados das variáveis para os ensaios de otimização do processamento do suco de laranja por APH.

Nº ensaio	Pressão	Temperatura	Tempo
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

3.2.2 Determinação do teor de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico foi determinado utilizando a reação de Tillmans (AOAC, 1990).

3.2.3 Extração dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos foi baseada na metodologia descrita por Asami et al, 2003, que foi adaptada para as condições laboratoriais (Figura 1). O suco dos 17 ensaios (5,00mL) foi extraído com metanol 80% (10,00mL, v/v), sob agitação por 1 minuto, seguido de ultrassom por 15 minutos e centrifugação a 9000rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado e recolhido em balão volumétrico de 25,00mL, enquanto o precipitado foi submetido novamente ao processo de extração e depois recolhido no mesmo balão volumétrico contendo o extrato da primeira extração. Após o processo de extração o volume do balão foi completado com metanol 80% (v/v). Foi necessário a utilização da centrifugação para extrair os compostos presentes nas vesículas e centrifugação para remover a parte sólida não desejada (Figura 1).

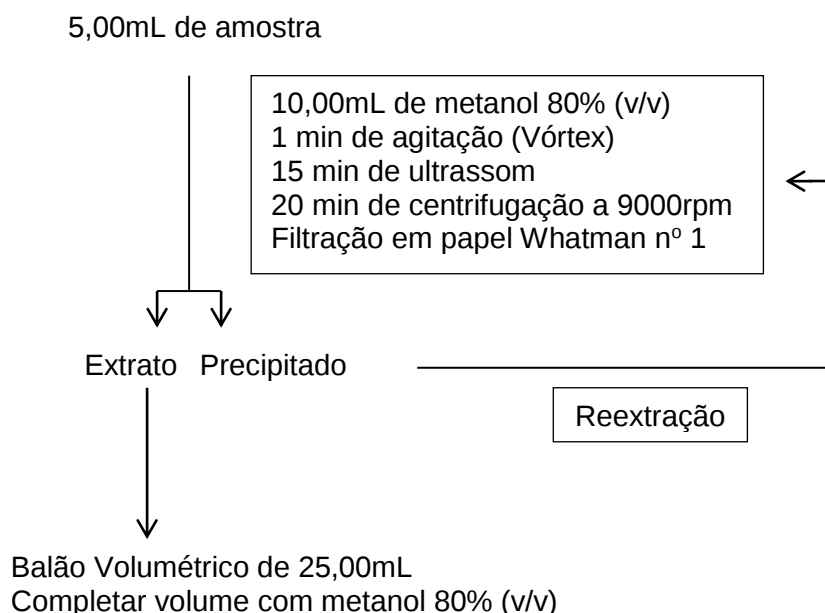
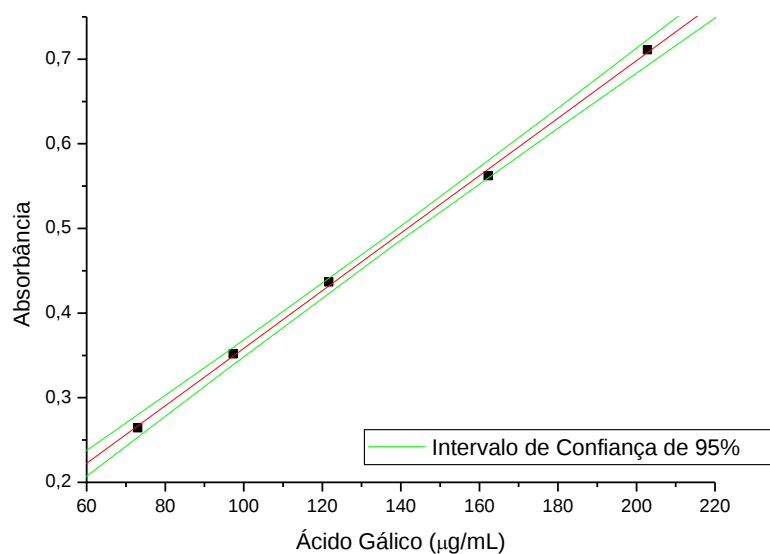


Figura 1. Fluxograma da extração de compostos fenólicos do suco de laranja.

3.2.4 Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi feita empregando a reação de Folin-Ciocalteu baseada naquela descrita por Singleton *et al.* (1999) e adaptada por Asami *et al.* (2003).

Em um balão de 5ml, foram adicionados 0,200 ml de extrato, 1,00 ml de água e 60 µl do reagente de Folin-Ciocalteu. A solução obtida foi deixada em repouso por 10 minutos e a seguir foram adicionados 2,00 ml de solução de Na₂CO₃ 7% (m/v). O volume do balão foi completado com água, e este levado a banho-maria a 40°C por 30 minutos. Em seguida, foi feita a leitura de absorbância a 740nm, contra um branco (água destilada) que passou pelo mesmo procedimento. Para a determinação da concentração de compostos fenólicos presentes no suco de laranja foram preparadas curvas de calibração com ácido gálico. Os compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico, em mg.L⁻¹.



$$y = 0,01846 + 0,0034x; r = 0,9996$$

Figura 2. Curva de calibração com ácido gálico (72-200 mg.mL⁻¹)

3.2.5 Determinação da atividade antioxidante

3.2.5.1 Preparo das amostras

O extrato usado na determinação do teor de compostos fenólicos totais também foi utilizado para a determinação da atividade antioxidante. Foram preparadas três diluições, em triplicata, para que a partir dos resultados fosse construído um gráfico da queda da absorbância versus diluição para a determinação da atividade antioxidante.

3.2.5.2 Determinação da atividade antioxidante usando a reação de descoloração do radical ABTS^{•+}

A determinação da atividade antioxidante usando a reação de descoloração do radical cátion ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) baseia-se na capacidade de um antioxidante de capturar o cátion radicalar ABTS^{•+}, que passa da cor verde-escura para verde-clara (Figura 2). Os resultados são expressos em TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006; RUFINO *et al.*, 2007a).

O radical é obtido através da reação de 5,0mL de uma solução estoque de ABTS (7mM) com 88µL da solução de persulfato de potássio (140mM), é mantido no escuro à temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, 1,0mL da solução do radical ABTS^{•+} é diluído em álcool etílico até se obter uma absorbância de $0,7 \pm 0,1$, lida a 752nm (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006; RUFINO *et al.*, 2007a). Em cubeta de vidro foram adicionados 30µL do extrato (amostra) e 3,0mL da solução contendo radical ABTS^{•+}. Após 6 minutos foi realizada a leitura da

absorbância contra um branco (álcool etílico absoluto) a 752nm. Para a determinação da atividade antioxidante foram empregadas curvas de calibração usando Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) (PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006; RUFINO *et al.*, 2007a).

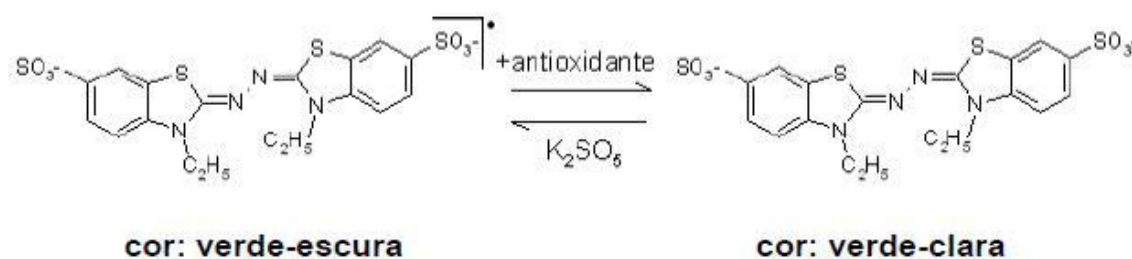
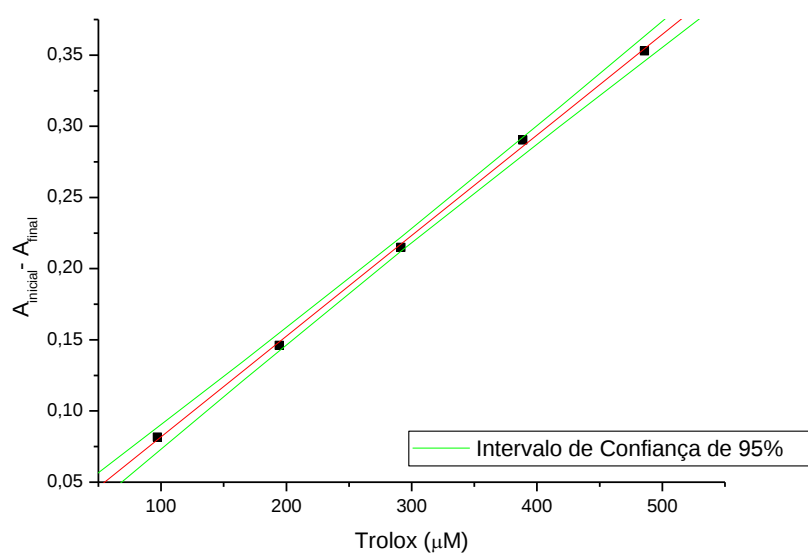


Figura 3. Estabilização do radical ABTS^{•+} com compostos antioxidantes (Rufino *et al.*, 2007a).



$$y = 0,111 + 7,07028 \cdot 10^{-4}x; r = 0,99961$$

Figura 4. Curva de calibração de Trolox (100-500 μmol.L⁻¹).

3.2.5.3 Determinação da atividade antioxidante usando a reação com o radical DPPH[•]

O radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) também é estabilizado por reação com antioxidantes. Quando capturado produz um decréscimo na absorbância a 515nm, passando da cor violeta-escura para a cor violeta-clara (Figura 3).

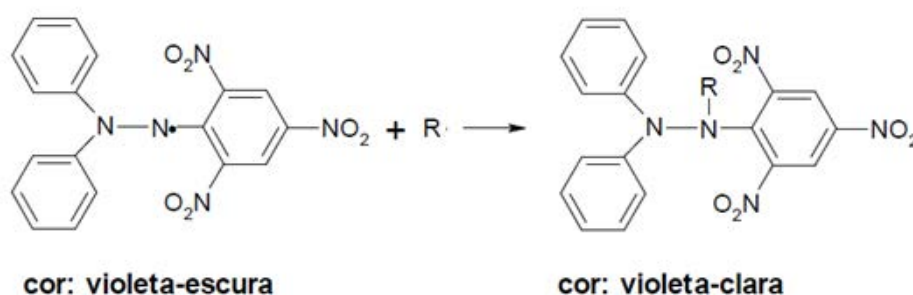
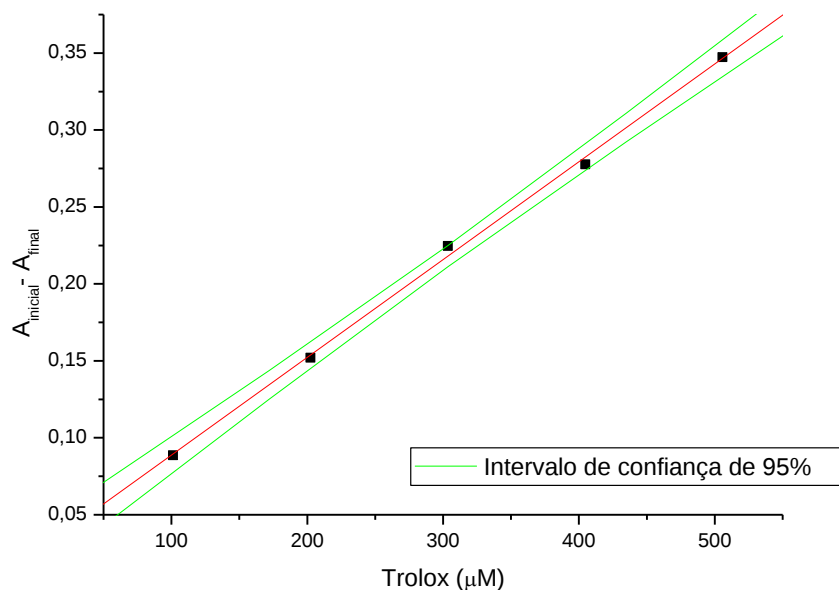


Figura 5 Estabilização do radical livre DPPH[•] (RUFINO *et al.*, 2007b).

O radical é obtido solubilizando o DPPH[•] em álcool metílico para obter uma solução 0,06mM. Em cubeta de vidro foram adicionados 3,0mL da solução de DPPH[•] e 30μL de extrato (amostra) em ambiente escuro. A leitura de absorbância era feita a 515nm quando ocorria a estabilização da absorbância, utilizando álcool metílico como branco. O tempo de reação é estabelecido quando ocorre a estabilização do radical, que é utilizado em todas as amostras (PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006; RUFINO *et al.*, 2007b). A determinação da atividade antioxidante também é expressa por curva de calibração usando Trolox.



$$y = 0,02517 + 6,3561 \times 10^{-4}x; r = 0,99916$$

Figura 6. Curva de calibração de trolox (100-500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

3.2.5.4 Determinação da atividade antioxidante usando a reação de redução do ferro (FRAP)

A Reação do *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) é baseada na redução do complexo férrico de tripiridiltiazina à complexo ferroso de tripiridiltiazina ($\lambda_{\text{máx}} = 595\text{nm}$) por reação com compostos antioxidantes em meio ácido (Figura 4).

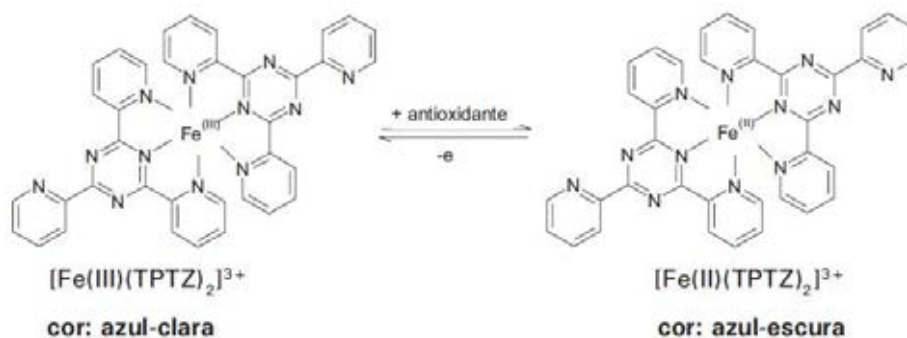
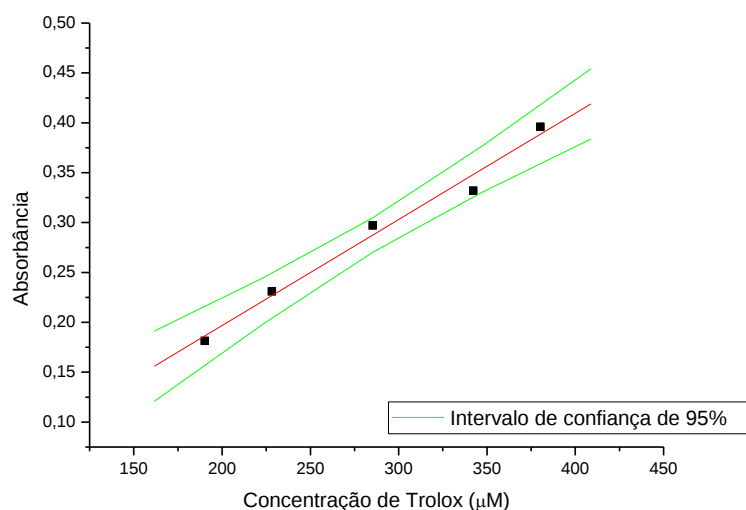


Figura 7. Redução do complexo férrico tripiridiltiazina (RUFINO *et al.*, 2006).

O reagente FRAP foi preparado com 5,00mL de solução de tripiridiltiazina (TPTZ) 10mM e 5,00mL de solução aquosa de cloreto férrico 20mM em balão volumétrico de 50,00mL, que é completado com solução tampão acetato 0,3M. O reagente deve ser preparado no dia da análise.

O ensaio foi realizado em balão volumétrico de 5,00mL, utilizando 4,00mL de solução do reagente FRAP, 150μL de extrato (amostra) e completando o volume com água destilada. A solução dos balões foi homogeneizada e aquecida em banho-maria a 37°C por 30 minutos. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro a 595nm, utilizando o reagente FRAP como branco. A curva de calibração foi preparada usando soluções de Trolox em cinco diferentes concentrações (PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006, RUFINO *et al.*, 2006).



$$y = -0,01592 + 0,00106x; r = 0,99205$$

Figura 8. Curva de calibração de Trolox (200-400 μmol.L⁻¹).

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados serão submetidos à análise de variância (ANOVA) e metodologia de superfície de resposta, que permitiram escolher a melhor condição de pressurização do suco de laranja.

5. RESULTADOS

5.1 Otimização do processamento do suco de laranja por APH

Os resultados dos testes preliminares apontaram que a faixa de pressão mais adequada do equipamento para a pressurização do suco de laranja era de 100 a 600 MPa, a temperatura de 30 a 60°C e o tempo de 0,5 a 6 min. Considerou-se que não era necessário o uso de maiores pressões devido ao efeito sinérgico da temperatura na redução da atividade da enzima pectinametilesterase (PME) (HAGERMAN & AUSTIN, 1986). Em relação à temperatura, foi necessário considerar o limite máximo de aquecimento no equipamento de 60°C, pois o mesmo possuía o vaso de pressão encamisado conectado a um banho de água termostático, que alcançava temperatura máxima de 60 °C. O tempo de 0,5 a 6 min foi definido com base no estudo de Polydera (2004). Assim sendo, foi possível estabelecer os valores reais das variáveis a serem utilizadas no DCCR para os níveis codificados, que estão apresentados na Tabela 2.

5.2 Efeito do processamento por APH no teor de ácido ascórbico

Os resultados do teor de ácido ascórbico dos 17 ensaios, de acordo com o DCCR, para as variáveis pressão, temperatura e tempo do processamento do suco de laranja por APH e do suco não processado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas nos ensaios de otimização do processamento do suco de laranja por APH.

Níveis Codificados	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-1,68	100	30	0,5
-1	201	36	1,6
0	350	45	3,3
+1	499	54	4,9
+1,68	600	60	6,0

O suco de laranja não processado apresentou 859,5 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, enquanto no suco processado por APH houve variação de 435,9 a 710,2 mg.L⁻¹ no teor de ácido ascórbico. O maior valor de ácido ascórbico foi obtido nas condições de processamento de 201 MPa, 36 °C por 97 s e o menor valor nas condições 350 MPa, 45 °C por 360 s (Tabela 3). A degradação do ácido ascórbico no processamento por APH foi maior do que aquela encontrada em outros estudos (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2003, SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2005; PLAZA *et al.*, 2006). Plaza et al (2006) observaram uma degradação de 5% do ácido ascórbico em suco de laranja da variedade Valencia processado a 400 MPa, 40 °C por 60 s, enquanto Sanchez-Moreno (2005) observaram degradação de 8% no ácido ascórbico do suco de laranja da variedade Navel processada sobre as mesmas condições.

A análise de variância mostrou que o modelo ajustado de segunda ordem está adequado aos resultados do ácido ascórbico, como indicado pelo valor F do modelo de 8,80 (p<0,01), e apresentou coeficiente de determinação satisfatório ($R^2 = 0,92$) (Tabela 4). Termos com o valor de F significativo ($p \leq 0,1$) foram incluídos no modelo.

Tabela 3. Teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante usando as reações com ABTS, DPPH e FRAP do suco de laranja Pêra Rio não processado e do suco de laranja processado por APH, conforme o DCCR.

Ensaio	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Ácido Ascórbico (mg.L ⁻¹)	Compostos Fenólicos Totais (mg ác. gálico.L ⁻¹)	Atividade antioxidante (μmol de Trolox.L ⁻¹)		
						ABTS	DPPH	FRAP
Controle	-	-	-	859,5 ± 11,4	416,7 ± 16,7	3176,7 ± 103,8	2211,7 ± 59,8	4392,1 ± 36,7
1	201	36	97	710,2 ± 4,3	426,4 ± 28,5	2708,6,± 128,3	2169,4 ± 33,8	5641,5 ± 74,8
2	499	36	97	640,1 ± 4,3	447,7 ± 21,1	2737,6 ± 100,3	2182,0 ± 27,2	3613,6 ± 334,2
3	201	54	97	618,7 ± 4,3	421,7 ± 20,4	2563,8 ± 55,7	2021,4 ± 44,3	3208,8 ± 04,3
4	499	54	97	582,2 ± 4,3	434,7 ± 2,3	2550,4 ± 136,3	1991,7 ± 60,8	3459,7 ± 8,6
5	201	36	293	539,5 ± 11,4	427,7 ± 14,1	2621,5 ± 86,4	2048,6 ± 41,7	3181,0 ± 13,9
6	499	36	293	512,1 ± 18,8	419,6 ± 5,5	2353,7 ± 133,2	2039,5 ± 11,0	3700,5 ± 3,4
7	201	54	293	445,0 ± 4,3	402,1 ± 5,1	2266,8 ± 146,4	2015,5 ± 92,8	3178,2 ± 12,9
8	499	54	293	457,2 ± 11,4	401,7 ± 6,8	2062,0 ± 114,2	1823,1 ± 14,5	3502,6 ± 48,0
9	100	45	195	557,8 ± 4,3	386,0 ± 12,2	2416,1 ± 35,8	1876,9 ± 40,4	3820,0 ± 22,9
10	600	45	195	521,2 ± 4,3	404,8 ± 7,8	2304,8 ± 11,2	1864,3 ± 33,9	3288,3 ± 18,7
11	350	30	195	536,4 ± 11,4	406,8 ± 10,2	2351,1 ± 77,6	1761,1 ± 26,7	4007,0 ± 5,6
12	350	60	195	499,9 ± 4,3	418,3 ± 2,7	2120,4 ± 64,9	1811,1 ± 34,9	5623,7 ± 159,0
13	350	45	30	621,8 ± 4,3	425,5 ± 9,2	2935,9 ± 146,6	1759,0 ± 42,8	3525,2 ± 55,8
14	350	45	360	435,8 ± 4,3	404,8 ± 17,5	2112,2 ± 57,6	1751,1 ± 11,8	3251,3 ± 95,8
15	350	45	195	509,0 ± 8,6	421,6± 4,3	2402,8 ± 59,9	1745,3 ± 15,3	3401,2 ± 11,6
16	350	45	195	496,8 ± 7,5	428,8 ± 7,8	2469,6 ± 114,8	1766,0 ± 23,4	3704,6 ± 69,2
17	350	45	195	518,1 ± 4,3	424,6 ± 10,4	2484,0 ± 94,8	1747,8 ± 13,2	3278,5 ± 2,7

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=3.

Tabela 4. Valor F da análise de variância dos modelos ajustados de segunda ordem do teor de ácido ascórbico, do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante usando as reações com ABTS, DPPH e FRAP, do suco de laranja processado por APH.

Fonte de variação ¹	Ácido ascórbico	Compostos fenólicos totais	Atividade antioxidante		
			ABTS	DPPH	FRAP
Regressão do modelo	8,80 ^b	1,87 ^{ns}	7,20 ^b	1,08 ^{ns}	3,00 ^{ns}
Termos					
<i>P</i>	21,50 ^c	18,38 ^c	16,19 ^d	33,12 ^c	ns
<i>T</i>	83,25 ^c	54,18 ^c	72,98 ^b	147,19 ^b	ns
<i>t</i>	529,04 ^b	14,17 ^c	272,24 ^c	116,60 ^b	12,11 ^c
<i>P</i> ²	33,80 ^c	ns	0,25 ^{ns}	763,88 ^b	ns
<i>T</i> ²	12,10 ^b	18,08 ^c	15,30 ^d	359,49 ^b	53,39 ^c
<i>t</i> ²	21,24 ^c	23,43 ^{ns}	15,79 ^b	235,81 ^b	ns
<i>PT</i>	5,84 ^{ns}	ns	0,03 ^{ns}	49,86 ^c	11,28 ^{ns}
<i>Pt</i>	9,12 ^d	17,30 ^c	15,87 ^d	36,39 ^c	17,85 ^c
<i>Tt</i>	ns	ns	6,58 ^{ns}	ns	14,79 ^{ns}
Falta de ajuste	12,23 ^{ns}	15,95 ^{ns}	8,57 ^{ns}	268,74 ^{ns}	8,68 ^{ns}
R²	0,9164	0,51223	0,9052	0,4462	0,5773

¹ *P* = pressão, *T* = temperatura, *t* = tempo.

^{ns} Não significativo ($p > 0,10$).

^a $p \leq 0,001$. ^b $p \leq 0,01$. ^c $p \leq 0,05$. ^d $p \leq 0,10$.

Os termos lineares e quadráticos da pressão (P , P^2), temperatura (T , T^2) e tempo (t , t^2) e o efeito combinado dos termos pressão e tempo (Pt) foram significativos. Os parâmetros estatísticos confirmam a consistência do modelo, indicando que o modelo é confiável para prever o teor de ácido ascórbico presente no suco de laranja da variedade Pêra Rio processado por APH (Tabela 4).

Utilizando os coeficientes de regressão para os modelos ajustados (Tabela 4) foi obtida a equação do modelo:

$$AA = 1297,481 - 0,829P - 15,442T - 1,584t + (8,371 \times 10^{-4})P^2 + 0,139T^2 + (1,525 \times 10^{-3})t^2 + (7,829 \times 10^{-4})Pt$$

AA = teor de ácido ascórbico (mg.L^{-1}), P = pressão (MPa), T = temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e t = tempo (s).

Para visualizar a relação entre o teor de ácido ascórbico e as variáveis independentes, foram gerados gráficos de superfícies de resposta mantendo uma variável independente fixa no ponto central e variando as outras duas variáveis independentes (Figura 5). As superfícies de resposta mostraram que no processamento do suco de laranja por APH, o tempo e a temperatura apresentaram uma relação inversa com o teor de ácido ascórbico (Figura 5). Comportamento semelhante foi obtido por Sánchez-Moreno *et al.*, 2003. A maior degradação de ácido ascórbico (11%) foi observada no suco pressurizado sob maior tempo e temperatura (100 MPa a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 300 s), quando comparado com um suco processado a 400 MPa a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 60 s, em que houve redução de ácido ascórbico de 7%. As Figura 5a e 5b mostram que o suco de laranja pressurizado entre 100 a 300 MPa teve o ácido ascórbico reduzido, embora sob pressão de 500 a 600 MPa tenha ocorrido um leve aumento no ácido ascórbico. A

variável independente tempo foi a que mais afetou a redução de ácido ascórbico no suco de laranja processado por APH (Figura 5a e 5b). De com a equação do modelo, para se obter um suco de laranja processado por APH com o teor de ácido ascórbico superior a 600 mg.L^{-1} , representando 70% do conteúdo inicial, as condições de processamento devem estar entre 100-250 MPa, 30 a 40 °C e 30 a 125 s (Figura 5).

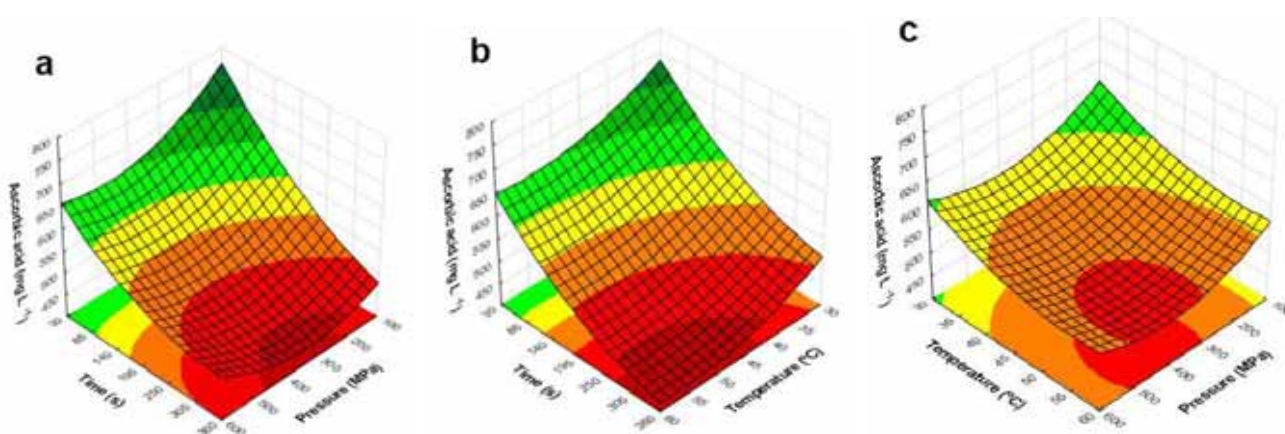


Figura 9. Superfícies de resposta para o teor de ácido ascórbico (mg/100ml) do suco de laranja em função da pressão e tempo (a), sob temperatura de 45 °C (ponto central); da temperatura e tempo (b), sob pressão de 350 MPa (ponto central); e da temperatura e pressão (c), com tempo de 195 s (ponto central).

5.3 Efeito do processamento por APH nos compostos fenólicos totais

O resultado do teor de compostos fenólicos totais do suco de laranja não processado e daquele processado por APH de acordo com os 17 ensaios do DCCR estão na Tabela 3.

O teor de compostos fenólicos totais do suco não processado foi $416,7 \text{ mg}$ de ácido gálico. L^{-1} e do suco de laranja processado por APH, de acordo com os 17 ensaios, variou de $386,0$ a $447,7 \text{ mg}$ de ácido gálico. L^{-1} . A condição de processamento usando 499 MPa , 36 °C e 97 s resultou na maior concentração de compostos fenólicos e a condição usando 100 MPa , 45 °C e 195 s na de menor concentração (Tabela 3).

Cao *et al.* (2010) analisaram o teor de compostos fenólicos totais em polpas de morango processadas por APH a 400 MPa. Independente do tempo, foi observado decréscimo no conteúdo de compostos fenólicos totais, enquanto sob pressões de 500 e 600 MPa houve aumento no teor de compostos fenólicos totais. O resultado do decréscimo do conteúdo de compostos fenólicos totais pode ser associado à alta atividade residual de enzimas polifenol oxidase e peroxidases, responsáveis por catalisar a oxidação de compostos fenólicos, enquanto que em pressões mais altas ocorre inativação das enzimas (CAO *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2010). Ademais, em pressões mais altas pode ocorrer maior extração de compostos antioxidantes pelo rompimento de células e estruturas (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2003; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2005; PATRAS *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2010).

A análise de variância mostrou que o modelo ajustado de segunda ordem não está adequado para predizer o teor de compostos fenólicos totais do suco de laranja, como é possível verificar pelo valor F do modelo que foi de 1,87 ($p > 0,01$) e o valor do coeficiente de determinação (R^2) do modelo, de 0,51 (Tabela 4). Levando em conta esses critérios, não foi possível considerar o modelo válido para prever as variáveis dependentes para o teor de compostos fenólicos totais e, por isso, não foram gerados gráficos de superfície de resposta.

5.4 Efeito do processamento por APH na atividade antioxidante

A atividade antioxidante usando a reação com o radical DPPH e ABTS e a reação de redução do ferro (FRAP) para o suco de laranja Pêra Rio processado por APH, segundo o DCCR, variou de 1745,3 a 2182,0 $\mu\text{mol de Trolox.L}^{-1}$, empregando a reação com o radical DPPH, de 3178,2 a 5641,5 $\mu\text{mol de Trolox.L}^{-1}$, para a reação de redução do ferro (FRAP), e de 2062,0 a 2935,9 $\mu\text{mol de Trolox.L}^{-1}$, para a reação com

o radical ABTS. O suco não processado apresentou 2211,7 μmol de Trolox. L^{-1} , usando a reação com DPPH, 4392,1 e 3176,7 μmol de Trolox. L^{-1} , usando a reação com FRAP e ABTS, respectivamente (Tabela 3).

As condições de processamento por APH empregando 499 MPa, 36 °C e 97 s resultaram na maior atividade antioxidante quando a reação com DPPH foi usada, enquanto que 201 MPa, 36 °C e 97 s, e 350 MPa, 45 °C e 30 s, forneceram suco com atividade antioxidante mais elevada, quando a reação de redução do ferro (FRAP) e a reação com ABTS foram empregadas.

Ainda, o processamento a 350 MPa, 45 °C e 195 s gerou o suco com a menor atividade antioxidante usando a reação com DPPH, enquanto as condições de 201 MPa, 54 °C e 293 s, e 499 MPa, 54 °C e 293 s, geraram a menor atividade antioxidante usando as reações FRAP e ABTS, respectivamente.

A análise de variância mostrou que os modelos ajustados de segunda ordem não estão adequados à atividade antioxidante total empregando a reação com DPPH e FRAP, como é possível verificar pelo valor F dos modelos, de 1,08 ($p>0,01$) para atividade antioxidante com DPPH, e de 3,00 ($p>0,01$) para atividade antioxidante com FRAP. Ainda, os coeficientes de determinação (R^2) dos modelos foram fracos, apresentando valor de 0,45 para a atividade antioxidante usando a reação com DPPH, e de 0,58 para atividade antioxidante total usando a reação com FRAP. Levando em conta esses critérios, não foi possível considerar os modelos válidos para prever as variáveis dependentes para as reações de atividade antioxidante total usando a reação com DPPH e FRAP, não tendo sido então gerados os gráficos de superfície de resposta (Tabela 4).

Paralelamente, a análise de variância mostrou que o modelo ajustado de segunda ordem está adequado aos resultados da atividade antioxidante usando a

reação com ABTS, como indicado pelo valor F do modelo, de 7,20 ($p < 0,01$). O R^2 foi 0,91 e a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$), indicando que o modelo é adequado para prever a atividade antioxidante usando a reação com o radical ABTS (Tabela 4). Termos com valor de F que apresentaram $p \leq 0,10$ foram incluídos no modelo. A pressão (P), temperatura (T) e tempo (t) afetaram linearmente a atividade antioxidante, e os termos quadráticos da temperatura (T^2) e do tempo (t^2) foram significativos. Somente o efeito combinado da pressão e tempo (Pt) foi incluído no modelo como termo de interação. Usando os coeficientes de regressão dos termos significativos foi possível obter a equação:

$$\text{AAT} = 2127,168 + 0,498P + 43,555T - 2,662t - 0,608T^2 + (5,518 \times 10^{-3})t^2 - (4,180 \times 10^{-3})Pt$$

AAT = atividade antioxidante por ABTS (μmol de Trolox. L^{-1}), P = pressão (MPa), T = temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e t = tempo (s).

Utilizando a equação do modelo foram gerados os gráficos de superfície de resposta para ilustrar os efeitos das variáveis independentes na atividade antioxidante usando a reação com ABTS (Figura 6). Observa-se na Figura 6a que a partir de 105 s o aumento da pressão eleva a atividade antioxidante, utilizando a reação com o radical ABTS, embora com tempo maior do que 195 s o aumento da pressão reduza a atividade antioxidante. A Figura 6c mostra que o aumento da pressão provoca leve redução da atividade antioxidante. O tempo foi a variável que mais afetou a redução da atividade antioxidante no processamento do suco de laranja por APH (Figura 6a e 6b). Suco de laranja com atividade antioxidante utilizando a reação com o radical ABTS maior que 2550 μmol de Trolox. L^{-1} , representando cerca de 80% da atividade

antioxidante inicial, foi obtido nas condições de 100 a 320 MPa, 30 a 42 °C e 30 a 180 s.

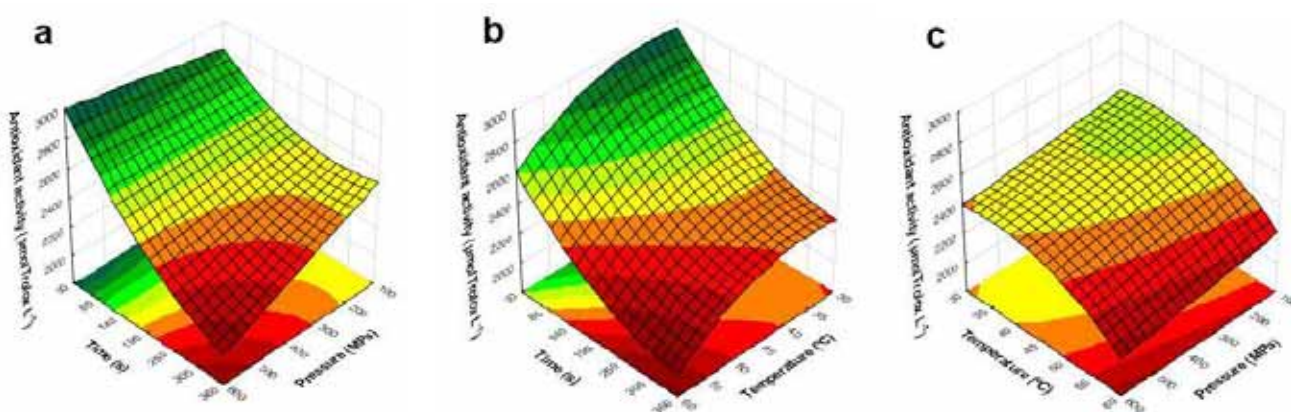


Figura 10. Superfícies de resposta da atividade antioxidante utilizando a reação com o radical ABTS (μmol de Trolox. L^{-1}) do suco de laranja em função da pressão e tempo (a), sob temperatura de 45 °C (ponto central); da temperatura e tempo (b), sob pressão de 350 MPa (ponto central); e da temperatura e pressão (c), com tempo de 195 s (ponto central).

A atividade antioxidante está relacionada com a presença de compostos bioativos em alimentos. O conteúdo de ácido ascórbico e a atividade antioxidante do suco de laranja Pêra Rio processado por APH apresentaram correlação positiva e forte ($R = 0,8248$). O ácido ascórbico (Figura 5) e a atividade antioxidante (Figura 6) mostraram comportamento similar no processamento por APH nas variáveis pressão, temperatura e tempo, indicando que a o decréscimo da atividade antioxidante pode ser atribuído à degradação do ácido ascórbico. Estes resultados estão de acordo com aqueles reportados por Sanchez-Moreno *et al.*, (2003), Stella *et al.*, (2011) e Miller & Rice-Evans (1997) que observaram que o ácido ascórbico é o principal componente antioxidante do suco de laranja.

6. CONCLUSÃO

O processamento por APH reduziu o conteúdo de ácido ascórbico e a atividade antioxidante do suco de laranja Pêra Rio. O tempo, a temperatura e a pressão influenciaram a resposta das variáveis. O tempo de processamento do suco por APH apresentou a maior influência na redução do ácido ascórbico e da atividade antioxidante. As condições de tratamento de 100 a 250 MPa, 30 a 40 °C e 30 a 125 s foram capazes de produzir suco de laranja com mais de 70% do conteúdo inicial de ácido ascórbico e de 80% da atividade antioxidante.

7. REFERÊNCIAS

- AMARO, AA.; BAPTISTELLA, C.S.L. Viveiros de citros – uma visão econômica. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em 21 fev. 2011.
- ANCOS B., SGROPPO S., PLAZA L. & CANO M.P. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 790–796, 2002.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15th ed. Washington, D.C., 1990.
- ASAMI, D. K.; HONG, Y-J; BARRETT, D. M.; MITCHELL, A. E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1237 - 1241, 2003.
- BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, vol 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S. Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. **Food Research International**, v. 29, p. 601-607, 1996.

BOFF J.M.; TRUONG T.T.; MIN D.B.; SHELLHAMMER T.H. Effect of thermal processing and carbon dioxide-assisted high-pressure processing on pectinmethylesterase and chemical changes in orange juice. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1179-1184, 2003.

BULL M.K.; ZERDIN, K.; HOWE, E.; GOICOECHEA, D.; PARAMANANDHAN, P.; STOCKMAN, R.; SELLAHEWA, J.; SZABO, E.A.; JOHNSON, R.L.; STEWART, C.M. The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 135–149, 2004.

CAMPOS, E.M.; LOPES, F.F.; ROSSI, R.M; NEVES, M.F. Comportamento do consumidor organizacional de laranja e suco de laranja. **Revista de Gestão USP**, v. 13, p. 75-86, 2006.

CAMPOS, F.P. “Estudo do processamento de suco de laranja através da tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão”. 2004. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CAO, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, F.; WANG, Y.; YI, J.; LIAO, X. Effects of hight hydrostatic pressure on enzyme, phenolic compunds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. **Journal of Science of Food and Agriculture**. 91, p. 877-885, 2011.

CITRUSBR. Associação Nacional dos Exportadores de Sucos de Cítricos. Disponível em <<http://www.citrusbr.com.br/>> Acesso em 28 de setembro de 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira – Laranja Safra 2011/2012. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em 14 de jun. 2012.

FARKAS D.; HOOVER, D.G. High pressure processing. **Journal of Food Science**, Supplement – Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies, v. 65, p. 47–64, 2000.

FIESP, Federação das Indústrias do Estado de São Paulo; IBOPE, Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística. Pesquisa Nacional Fiesp/IBOPE sobre o Perfil do Consumo de Alimentos no Brasil. In: **Brasil Food Trends 2020**. FIESP, São Paulo, 2010.

GOODNER J.K.; BRADDOCK R.J.; PARISH M.E. Inactivation of pectinesterase in orange and grapefruit juices by high pressure, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1997-2000, 1998.

HAGERMAN, A.E.; AUSTIN, P.J. Continuous Spectrophotometric Assay for Plant Pectin Methyl Esterase, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 440-444, 1986.

JANZANTTI, N. S.; MACHADO, T.V.; MONTEIRO, M. Sensory acceptance of juice from FCOJ processing steps. **Journal of Sensory Studies**, v. 26, p. 322-330, 2011.

LACROIX N.; FLISS I.; MAKHLOUF J. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International**, v. 38, p. 569-576, 2005.

LIU, R.H. Health benefits of fruits: implications for disease prevention and health promotion. **Amerian Journal of Clinical Nutrition**. 2003;78 (suppl): 517S–20S, 2003.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**; Campinas, 25(4), p. 659-664, 2005.

MENDES, M. XXI Semana de Citricultura. “Mercado de Sucos”. Cordeirópolis, 5 de junho de 2009.

MILLER NJ AND RICE-EVANS CA. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry** 60: 331-337 (1997)

NEVES, M.F. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ed. Marketstrat. 137 pgs. 2010.

NIENABER, U., & SHELLHAMMER, T. H. High-pressure processing of orange juice: combination treatments and a shelf life study. **Journal of Food Science**, v. 66(2), p. 332–336, 2001.

PATRAS, A.; BRUTON, N.P.; PIEVE, S.D.; BUTLER, F. Impact of hight pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 10, p. 308-313, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO,F. Effect of solvente and certain food constituents on diferente antioxidante capacity assays. **Food Research International**, nº 39, p. 791-800, 2006.

PLAZA, L.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; DE ANCOS, B.; MARTÍN-BELLOSO, O.; CANO, M.P. Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity

of orange juice processed by high-pressure or pulsed electric fields with regard to low pasteurization. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 487-493, 2006.

POLYDERA, A.C.; GALANOU, E.; STOFOROS, N.G.; TAOUKIS, P.S. Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 291-298, 2004.

RODRIGUES MI & IEMMA AF (2009) **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, Ed Cárita, Campinas, Brazil.

QUEIROZ, C.; MOREIRA, C.F.F.; LAVINAS, F.C.; LOPES, M.L.M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V.L. effect of high hydrostatic pressure on phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidante activity in cashew apple juice. **High Pressure Research**. v. 30, n.4, p. 507-5013, 2010.

QUEIROZ, E.C.; MENEZES, H.C. Suco de laranja. In: VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas** Vol. 2: Bebida não alcoólicas Ed Edgard Blücher, São Paulo, p. 243-267, 2010.

RUFINO, M.S.M. et al. Comunicado Técnico on line. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). ISSN 1679-6535, Fortaleza, CE, dezembro, 2006.

RUFINO, M.S.M. et al. Comunicado Técnico on line. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. ISSN 1679-6535, Fortaleza, CE, julho, 2007a.

RUFINO, M.S.M. et al. Comunicado Técnico on line. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. ISSN 1679-6535, Fortaleza, CE, julho, 2007b.

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

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; DE ANCOS, B.; CANO, M.P. Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 647-653, 2003.

SANCHEZ-MORENO, C. et al. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 53, No. 11, p. 4403-4409, 2005

SIMPSON R.K.; GILMOUR, A. The effect of high hydrostatic pressure on the activity of intracellular enzymes of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 48-53, 1997.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, p. 152-178, 1999

SMELT, J.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing, **Trends in Food Science & Technology**, 1. 9, p. 152-158, 1998.

STELLA SP, FERRAREZI AC, SANTOS KO, MONTEIRO M. Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar. **Journal Food Science**, 76: C392-C397 (2011).

SUGAI, A. Y. et al. Análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 233-238, 2002.

TIMMERMAN, R.A.H et al. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v 12, p. 235–243, 2011.

TRIBESS, T.B.; TADINI, C.C. Suco de laranja natural minimamente processado: uma alternativa para ampliar o mercado de suco de laranja no Brasil. In: IV Congresso internacional de economia e gestão de redes agroalimentares, FEA/USP, Ribeirão Preto. 2003.

USDA. United States Department of Agriculture. **Brazil citrus semi-annual**, 2013. Disponível em: <<http://gain.fas.usda.gov>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, F.M.; SPAANSEN, C.H.; PILNIK, W. Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 969-971, 1980.

VERVOORT L, VAN DER PLANCKEN I, GRAUWET T, TIMMERMAN RAH, MASTWIJK HC, MATSER AM, HENDRICKX ME & VAN-LOEY A. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice Part II: Impact on

specific chemical and biochemical quality parameters. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 12, 466-477, 2011.

VILELA, P.R; BICALHO, E. Mudanças no perfil do consumo da laranja no Brasil. Disponível em: <<http://www.faemg.org.br>>. Acesso em 19 de fev. 2011. FAEMG, Assessoria Técnica, 2006.

WILSON, D.R.; DABROWSKI, L.; STRINGER, S.; MOEZELAAR, R.; BROCKLEHURST, T.F. High pressure in combination with elevated temperature as a method for the sterilisation of food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, p. 289-299, 2008.

YUSTE J.; CAPELLAS, M.; PLA, R.; FUNG, D.Y.C.; MOR-MUR, M. High pressure processing for food safety and preservation: a review. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2001.

Araraquara, 5 de janeiro de 2015.

José Fernando Rinaldi de Alvarenga

De acordo,

Prof^a Dra Magali Monteiro