



ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE

Andreia Otília da Silva Araújo

**Desenvolvimento de um Método para
Determinação da Suculência/Farinosidade
de uma Maçã**

Junho de 2018

ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Andreia Otília da Silva Araújo

**Desenvolvimento de um Método para
Determinação da Suculência/Farinosidade
de uma Maçã**

Dissertação submetida à Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo de Biotecnologia, realizado sob orientação científica de Andrea Martins da Empresa Decorgel Produtos Alimentares S.A. e institucional do Professor Doutor Ricardo Ferraz e da Professora Doutora Cristina Prudêncio, da área de Ciências Químicas e das Biomoléculas.

Junho de 2018

Dedicatória

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Aos meus pais, José e Rosa, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus.

Aos meus avós, Ezequiel e Alice, que muito me apoiaram para que chegasse ao ponto mais elevado profissionalmente, e que muito se orgulhavam disso.

Afirmo-vos que esta conquista não é apenas minha, mas sim nossa. Tudo que alcancei só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre me dedicaram. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, as vitórias foram conquistadas e as alegrias divididas entre todos. Agradeço-vos pela paciência e compreensão com minha ausência, mesmo estando presente, durante esta longa jornada.

A vós, um *muitíssimo obrigado!*

Agradecimentos

Um agradecimento especial ao **Professor Doutor Ricardo Ferraz** pela disponibilidade, orientação, apoio e motivação que me concedeu e que permitiram a concretização do presente trabalho.

Ao **Engenheiro António Nunes**, não só pela motivação, e por proporcionar este desafio, como também pelo interesse e veemência demonstrados ao longo de todo o desenvolvimento do projeto.

À **Professora Ana Paula Nascimento** por toda ajuda concedida na análise estatística.

À **Professora Doutora Cristina Prudêncio**, pela disponibilidade e apoio, que concedeu a longo da realização do projeto.

À **Andrea Martins**, não só pelo apoio e amizade, como também no interesse em ajudar sempre que necessário, que incentivou o entusiasmo várias vezes pelo trabalho a desenvolver.

E por fim, e como não poderia deixar de ser, à equipa **Decorgel**, pelo desafio colocado e por facultar o necessário sempre que solicitado.

A todos vós, o meu **Muito Obrigada!**

Resumo

Muitas indústrias usam maçãs para a formação de novos produtos para o consumidor final ou essas mesmas maçãs são vendidas na sua forma natural. E nesse fabrico ou venda de maçãs frescas, as empresas necessitam de alguns atributos específicos que devem ser medidos. Um desses atributos é a textura, que é um aspeto da consistência do tecido vegetativo determinado pela maneira como as células são unidas pela lamela média. A sensação sensorial de frescura e suculência é o que o cliente procura, e para a medição destes parâmetros existem vários tipos de instrumentos, dentro dos quais se pode encontrar os instrumentos destrutivos (como penetrómetro ou compressão) e não-destrutivos (como vibração ou medidas acústicas). No entanto, estes instrumentos não são suficientes para avaliar a farinosidade de uma maçã. Nesse contexto, muitos estudos são realizados, para se entender o que se sucede na parede celular de forma metabólica. Em estudos anteriores, já foram encontradas várias enzimas em diferentes níveis durante a maturação da maçã, como é o caso da pectina metilesterase (PME), responsável pela degradação da pectina.

Uma vez que não existe nenhum método específico e barato para a verificação da farinosidade de uma maçã, procurou-se testar vários métodos: medição do brix e da dureza, medição de pH e medição de absorvância. Estes métodos testados foram adaptações feitas, dependendo das nossas necessidades, aos diversos métodos encontrados na literatura.

A medição do brix e dureza, revelaram-se irrelevantes para o estudo, pois quer maçãs de qualidade conforme (suculentas), intermédias e não conformes (farinhentas) apresentavam valores semelhantes, pelo que o brix e dureza não estão diretamente relacionados com a farinosidade da maçã. A medição de pH com fitas de pH também teve pouca utilidade para o estudo, pois todos os grupos de maçã tinham um pH tão próximo que não era detetado pela fita de pH, em comparação com a medição no potenciómetro, em que se denotam diferenças na casa das décimas. O método que se apresentou mais eficaz, e que demonstrava diferenças claramente significativas entre os grupos foi a medição da absorvância do extrato de maçã, nas suas variáveis.

Palavras-Chave: maçã, qualidade, textura, farinosidade, frescura, suculência, medidas de textura, modificações da parede celular.

Abstract

Many industries just sell fresh apples and other industries produce new products. To make apple derivatives or to sell fresh apples, the companies need some specific attributes that must be measured first. One of these attributes is the texture, that is an aspect of the consistency of the vegetative tissue determined by the way the cells are joined by the middle lamella. Sensory sensation of crispiness and juiciness is what the customer wants. The methodology to measure those properties are destructive methods (such as penetrometer or compression) and non-destructive methods (like vibration or acoustic measures) to evaluate the texture of an apple. However, there is not enough methods to compare mealy and non-mealy apple. In this context, many studies are made to understand what happens in cell wall in metabolic ways. Many enzymes were found in different levels during the apple maturation, such as pectin methylesterase (PME) that is responsible for the pectin degradation.

Since there is no specific and inexpensive method for checking the mealiness of an apple, several methods have been tested: measurement of brix and hardness, pH measurement and absorbance measurement. The tested methods were adapted from the literature, according with some needs.

The measurement of brix and hardness proved to be irrelevant to the study, since both conformal (succulent), intermediate and non-compliant apples (mealy) had similar values, so brix and hardness were not directly related to the apple. Measurement of pH with pH strip also proved to be useless for the study because all the apple groups had a pH so close that it was not detected by the pH strip compared to the potentiometer measurement, where differences are noted in house of the tenths. The most effective method, which showed clearly significant differences between the groups, was the measurement of the absorbance of the apple extract, in its variables.

Key-words: apple, quality, texture, mealiness, freshness, juiciness, texture measurements, cell wall modifications.

Índice

Resumo	VI
Abstract	VII
Índice de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas	X
Índice de Tabelas	XI
Índice de Figuras	XII
Introdução	1
Capítulo I (Revisão Bibliográfica)	3
1.1. Perfil sensorial	4
1.2. Textura	5
1.3. Modificações na parede celular	6
1.4. Instrumentos de medição de alguns atributos da textura	8
1.5. Alterações metabólicas durante o amadurecimento.....	10
1.6. Azul de bromotimol.....	16
Capítulo II (Materiais e Métodos)	17
Capítulo III (Resultados)	22
3.1. Determinação dos valores de Brix	23
3.2. Determinação dos valores de dureza	25
3.3. Determinação dos valores de Absorvância	28
3.3.1. Experiência com o corante azul de bromotimol.....	28
3.3.2. Experiências sem o corante azul de bromotimol.....	30
3.4. Homogeneização com água	34
3.5. Determinação dos valores de pH.....	35
3.5.1. Fita de pH.....	36
3.5.2. Potenciômetro.....	37
3.6. Análise Estatística.....	39

Capítulo IV (Discussão)	42
4.1. Determinação do brix.....	43
4.2. Determinação dos valores de dureza.....	43
4.3. Determinação dos valores de Absorvância.....	44
4.3.1. Experiência com o corante azul de bromotimol	44
4.3.2. Experiências sem o corante azul de bromotimol.....	44
4.4. Homogeneização com água	46
4.5. Determinação dos valores de pH.....	47
4.5.1. Fita de pH.....	47
4.5.2. Potenciômetro.....	47
4.6. Análise estatística	48
Conclusão	50
Referências Bibliográficas	52

Índice de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas

AF	L-arabinofuranosidade
Bx	Brix
HGA	Ácido homoglactourónico
MdPME2	Gene da PME 2
MRI	Ressonância Magnética
PG	Poligalacturonase
PME	Pectina metilesterase
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
SENB	Single-edge-notched-bending (dobragem com ponta simples)
SWNIR	Infravermelhos de vibração de alta frequência
WPS	Water Soluble Pectine
XET	Endotransglicosilase xiloglucana

Índice de Tabelas

Tabela I: Descritores sensoriais de textura usados para maçãs. Adaptado de Billy et al., 2008 (Billy et al. 2008).....	5
Tabela II: Valores de brix ($^{\circ}\text{Bx}$) de extrato de maçãs de qualidade conforme, intermédia e não conforme.	23
Tabela III: Tabela representativa da média de brix ($^{\circ}\text{Bx}$) dos valores da tabela II, nos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).	24
Tabela IV: Valores de dureza das maçãs de qualidade conforme, intermédia e não conforme. A medida de grandeza da força é o kg.....	25
Tabela V: Tabela representativa da média de dureza (kg) dos valores da tabela IV, nos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).	26
Tabela VI: Valores de absorvância medidos na experiência medida com azul de bromotimol.	28
Tabela VII: Tabela representativa da média de absorvância dos valores da tabela VI, nos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).	29
Tabela VIII: Valores de absorvância medidos na experiência medida sem azul de bromotimol.	30
Tabela IX: Tabela representativa da média de absorvância (nm) dos valores da tabela VIII, nos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).	31
Tabela X: Valores de pH medidos no potenciômetro, após se obter o sumo de maçã dos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).	37
Tabela XI: Média dos valores de pH para cada um dos grupos (Qualidade Conforme, Intermédia, e Não Conforme).	38

Índice de Figuras

Figura 1: Coeficientes de regressão de atributos avaliados pelos consumidores (a), painel (b) e características medidas por análises físico-químicas (c) sobre frescor avaliado por mulheres (cinza claro) e homens (cinza escuro). Adaptado de Péneau et al, 2006 (Péneau et al. 2006).....	7
Figura 2: Diferentes abordagens de medição instrumental para propriedades da textura da maçã: (a) teste de penetração; (b) teste SENB; (c) combinação de teste de punção e método de emissão acústica (AE); (d) método ultrassônico; (e) ressonância magnética (MRI); (f) espectroscopia vis-SWNIR visível e de ondas curtas (Vis-SWNIR); (g) sistema de dispersão hiperespectral online. O grupo a vermelho representa métodos destrutivos; o grupo a roxo são métodos não destrutivos; o grupo verde apresenta os métodos acústicos; e o grupo azul representa métodos óticos (Adaptado de Chen 2013).	8
Figura 3: Reação esquemática da pectina metilesterase. Adaptado de Salas-Tovar et al., 2017 (Salas-Tovar et al. 2017).	14
Figura 4: Intervalo de pH onde existe mudança de cor do azul de bromotimol. Zona de viragem entre 6,0 e 7,6.	16
Figura 5: Figura representativa dos parâmetros de absorvância ao qual os grupos podem ser distinguidos.....	30
Figura 6: Figura representativa dos parâmetros de absorvância ao qual os grupos podem ser distinguidos.....	32
Figura 7: Extrato de maçãs de qualidade conforme. a) homogeneização com água destilada; b) homogeneização com NaCl.	34
Figura 8: Extrato de maçã obtido após homogeneização com água destilada. À esquerda encontra-se o extrato de maçã de qualidade conforme, no meio qualidade intermédia, e à direita o extrato de maçã de qualidade não conforme.	35

Figura 9: Imagens exemplificativas da com a fita de pH nos 3 grupos. **a)** Comparação entre maçãs de qualidade conforme e intermédia; **b)** Comparação entre maçãs de qualidade intermédia e não conforme; **c)** Maçãs de qualidade não conforme; **d)** Maçã de qualidade intermédia. 36

Figura 10: Figura representativa dos parâmetros de pH ao qual os grupos podem ser distinguidos..... 39

Figura 11: Árvore de decisão dos testes estatísticos não paramétricos a usar na experiência. 49

Figura 12: Investimento inicial do método espectrofotométrico sem solução de azul de bromotimol. Teste não paramétrico 49

Figura 12: Investimento inicial do método espectrofotométrico sem solução de azul de bromotimol. 50

Introdução

A principal preocupação das empresas, hoje em dia, é adquirir produtos com a mais alta qualidade.

Quando falamos de fruta, e no caso particular da maçã, a frescura, a dureza e a suculência/farinosidade são os pontos mais fortes e os alvos da indústria alimentar (Abbott et al. 1984). No entanto é necessário haver métodos e materiais de medição destas características. A nível da medição da dureza já existem vários métodos, sendo que os métodos destrutivos, como a penetrometria e compressão, são os mais amplamente utilizados por serem fáceis, rápidos e mais económicos (Abbott 1994; Nicolai et al. 2007).

No caso da suculência/farinosidade, não existe nenhum método eficaz de determinação desta característica numa maçã (Abbott et al. 1984; Abbott 1994; Nicolai et al. 2007; Longhi et al. 2012; Salas-Tovar et al. 2017). A dureza não é inversamente proporcional à farinosidade, e para algumas indústrias, esta última característica é fatal no processamento da maçã. A forma mais convencional de medir a farinosidade de uma maçã é sensorialmente, contudo esta avaliação é altamente subjetiva e pode induzir a erros (Corollaro et al. 2014; Péneau et al. 2006).

Sabe-se que há uma relação entre a farinosidade e a enzima pectina metilesterase (PME), em que quando mais elevada for a quantidade/atividade desta enzima, maior é a farinosidade (Limberg et al. 2000; Denès et al. 2000). O papel da PME é frequentemente relacionado com a degradação da pectina que ocorre durante o amadurecimento da fruta (Gupta et al. 2015; Limberg et al. 2000; Bordenave & Goldberg 1993). As maçãs farinhentas apresentam uma abundância significativamente maior de estruturas altamente metilesterificadas, o que sugere que a PME desmetila a pectina de maneira processual, levando a blocos desmetiliados (Limberg et al. 2000; Gupta et al. 2015). O amadurecimento das frutas também é atribuído à dissolução dos componentes da parede celular, particularmente os poliuronídeos, que são solubilizados por despolimerização, pela ação de poligalacturonase (PG) (Moriya et al. 2016; Johnston et al. 2017). A atividade da pectinametilesterase, que catalisa a desesterificação dos poliuronídeos, está presente durante

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã
o desenvolvimento e o amolecimento dos frutos e, muitas vezes, não mostra correlação com o amadurecimento (Moriya et al. 2016).

Face à problemática existente em algumas empresas, nomeadamente na Decorgel¹, foi pretendido desenvolver um método de verificação da qualidade da maçã, evidenciando a textura desta, nomeadamente a farinosidade. Existem muitos métodos de determinação da dureza, mas esta não é sinónimo da textura, pois a maçã pode estar dura (mediante os métodos de determinação da dureza), mas ainda assim estar farinhenta. Para evitar que a maçã farinhenta entre no produto final, a Decorgel usa, para além do penetrómetro (método de medição de dureza), a avaliação sensorial. Só assim se consegue averiguar a qualidade intrínseca da maçã.

É fundamental verificar a textura da maçã, pois se esta estiver farinhenta desfaz-se rapidamente no produto final, e transforma-se em polpa. A maior parte dos produtos com maçã da Decorgel possuem pedaços, pelo que não é, de todo, conveniente a destruição desses mesmos pedaços.

Após uma vasta pesquisa bibliográfica, foi concluído que se teria de desenvolver um método rápido, simples e económico quase de raiz, e adaptando alguns métodos da literatura.

¹ Empresa do ramo alimentar de fabrico de doces, compotas, geleias, recheios, entre outros produtos de pastelaria. Baseia-se essencialmente na fruta para o fabrico dos seus produtos, estando num relacionamento direto com a agricultura e o respeito pelo meio ambiente. Possui um grande investimento na investigação e desenvolvimento de novos produtos, tendo neste âmbito um lema próprio ativo todos os dias nos seus colaboradores: “a capacidade de nos superarmos a nós próprios”.

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Atualmente, a principal preocupação das empresas consiste em possuir todos os produtos com a mais alta qualidade e, por isso, todas as matérias-primas devem passar por vários processos restritos que levam à sua aceitação. Um boletim de análise que venha juntamente com a matéria prima, proveniente do fornecedor, é uma prova de que o produto que as empresas compram é microbiologicamente estável e está entre os parâmetros anteriormente estipulados e, portanto, é bom para seu processo.

A palavra "qualidade" vem do latim *qualitas* que significa atributo, propriedade ou natureza básica de um objeto. No entanto, hoje em dia pode ser definido como o "grau de excelência ou superioridade". Tendo em conta essa definição, podemos dizer que um produto é de melhor qualidade quando é superior em um ou vários atributos que são objetivamente ou subjetivamente valorizados (Kader et al. 1985).

1.1. Perfil sensorial

Alguns dos muitos termos usados para descrever a textura sensorial de várias frutas ou vegetais são duros, firmes, macios, crocantes, moles, duros, ásperos, fibrosos, pegajosos, secos e suculentos, entre outros. No entanto, não são aceites métodos complementares para a medição instrumental de cada atributo textural sensorial. De facto, há algum desacordo entre os usos sensoriais, hortícolas e de engenharia de certos termos texturais, particularmente a firmeza (Abbott 1994), que será debatida mais adiante.

O perfil sensorial está gradualmente a ser substituído por novas técnicas que envolvem, direta ou indiretamente, os consumidores (Qannari 2017; Péneau et al. 2006). Os requisitos para essas novas técnicas passam pela simplicidade do método e economia de tempo e custo efetivo. Mais importante ainda, a principal motivação para a criação de tais procedimentos é lançar luz sobre novas facetas dos produtos e obter melhores informações sobre a escolha do consumidor e o comportamento do consumidor (Qannari 2017).

Os atributos mais evitáveis que afetam a percepção de qualidade dos consumidores a um nível mais abstrato ou até mesmo cerebral são a frescura, segurança, valor nutricional e propriedades promotoras da saúde, resíduos de produtos químicos perigosos, sistema de produção, autenticidade, conveniência e aspetos éticos. Estas propriedades podem ser particularmente importantes, mas muitas vezes são difíceis de medir ou mesmo definir (Nicolai et al. 2007).

1.2. Textura

A qualidade de qualquer fruta ou legume é indispensável para produzir um produto final com alta excelência. Os atributos de qualidade externa são muito importantes e relacionam-se com a aparência do produto, sendo que incluem propriedades como cor, forma, tamanho e ausência de defeitos na superfície (Nicolai et al. 2007). Porém, tudo isto não é suficiente. Um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da qualidade do fruto é a textura (Camps et al. 2005). Tecnicamente, a textura é um aspeto da consistência do tecido vegetativo determinado pela forma como as células são unidas pela lamela média. Quando uma carga é aplicada aos tecidos de frutas com uma lamela média forte, as paredes celulares quebram preferencialmente, libertando sumo, dando uma sensação de dureza e suculência (**Tabela I**) (Sone 1972; Thompson 2003; Barreiro et al. 1998). Rapidamente se pode sentir a diferença entre uma maçã succulenta e farinhenta.

Tabela I: Descritores sensoriais de textura usados para maçãs. Adaptado de Billy *et al.*, 2008 (Billy et al. 2008).

Textura	Definição
Crocância	Força necessária para a primeira dentada e respetivo ruído resultante
Suculência	Quantidade de líquido libertado na mastigação antes de engolir
Farinosidade	Textura seca e friável

Na visão de um consumidor e/ou de um produtor, a textura é constituído por um grupo de características físicas que resultam dos elementos estruturais dos alimentos e são sentidos pela sensação de toque na mão ou na boca, estão relacionados à deformação, desintegração e fluxo de alimentos sob a força, e são medidos por funções de força, distância e tempo (Abbott 2004). O estudo de Péneau *et al.* mostrou que a frescura juntamente com o sabor e o aroma, é o atributo decisivo para a seleção da maçã, e a percepção do consumidor era descrita pelo gosto, crocância e suculência. Em suma, a qualidade sensorial e, particularmente, as características da textura contribuem essencialmente para a percepção da frescura da maçã (Péneau et al. 2006).

A maçã é das frutas mais consumidas, e é empregada em muitos produtos alimentares, especialmente em sobremesas. Hoje em dia, a maçã fresca é amplamente usada para produzir recheios, bolos, doces ou simplesmente é comida na sua forma fresca normal ou desidratada. Nesses processos, a maçã deve ter uma textura adequada, e o facto de ser farinhenta reduz o valor acrescentado do produto final (Moriya et al. 2016).

A farinosidade é causada por uma perda de adesão celular, o que resulta numa textura em pó com muito pouco sumo (Moriya et al. 2016), caracterizada por deterioração na textura. Este é dos problemas texturais mais importantes que resultam de um processo de amadurecimento indesejável durante o armazenamento (Segonne et al. 2014). Esta modificação na textura, frequentemente associada a um amolecimento excessivo, torna a fruta menos atraente para os consumidores e aumenta os custos para os comerciantes, devido a uma perda de qualidade e uma maior suscetibilidade a agentes patogénicos (Cantu et al. 2007; Seymour et al. 2002).

1.3. Modificações na parede celular

O fator comum na textura é que todos são relativamente macios quando consumidos, em grande parte devido à presença de células do parênquima. As células do parênquima não são sinalizadas e as suas paredes primárias são separadas por uma região morfológicamente distinta, conhecida como lamela média, que é rica em substâncias pecticais. O tamanho e disposição das células do parênquima dentro do tecido influenciam a resistência mecânica

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã

dos produtos. A maçã madura contém inúmeros tipos de tecido, como a epiderme, a hipoderme, o córtex, os feixes vasculares e uma região do núcleo central que contém a medula e os tecidos associados ao “gerador” de sementes. Destes tecidos, o tecido do córtex parenquimoso é consumido de forma voluntária, com os tecidos na região do núcleo evitados em grande parte. Do ponto de vista químico, a parede celular primária das células do parênquima é composta por uma matriz de celulose, hemicelulose e pectina. As mudanças que ocorrem na parede celular durante o amadurecimento e armazenamento são fundamentais para a textura do produto final (Abbott et al. 1984; Abbott 2004). Por isso, as avaliações destrutivas da textura são predominantemente realizadas no tecido parenquimal excisado do córtex, ou no tecido cortical intacto com as camadas epidérmicas e hipotérmicas removidas (Abbott et al. 1984; Dheilly et al. 2016).

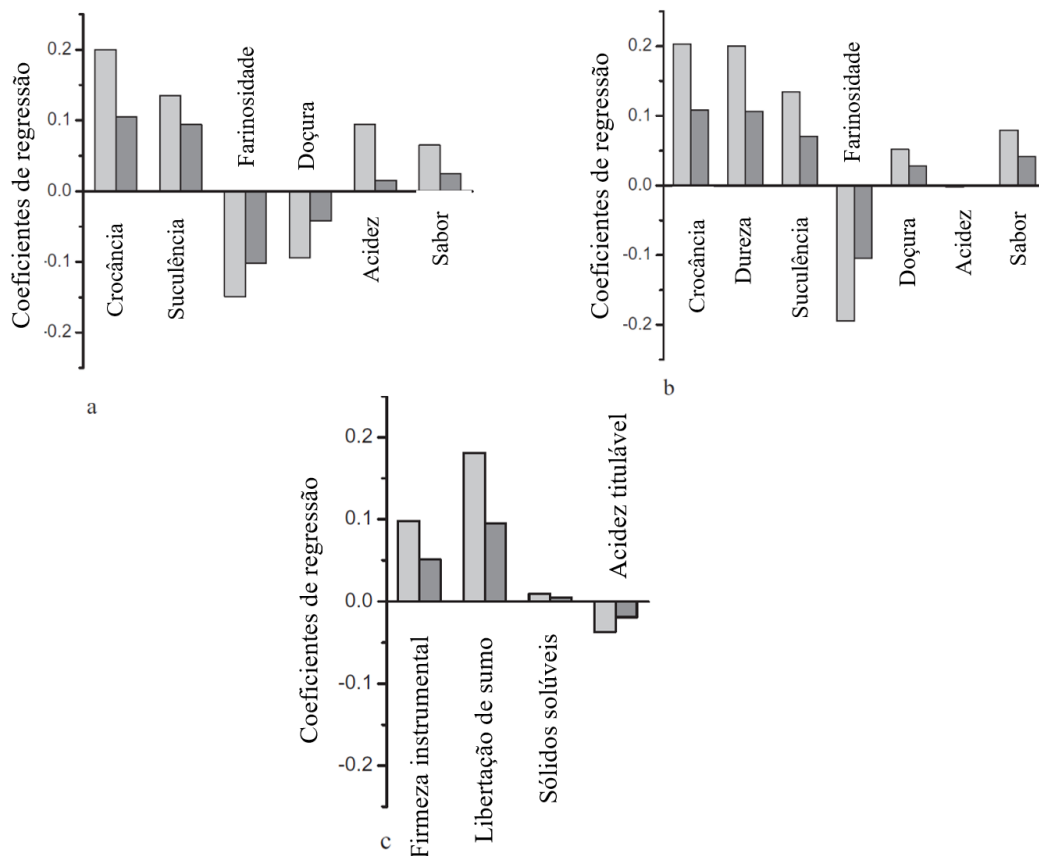


Figura 1: Coeficientes de regressão de atributos avaliados pelos consumidores (a), painel (b) e características medidas por análises físico-químicas (c) sobre fresco avaliado por mulheres (cinza claro) e homens (cinza escuro). Adaptado de Péneau *et al*, 2006 (Péneau et al. 2006).

1.4. Instrumentos de medição de alguns atributos da textura

Como referido anteriormente, as tecnologias de armazenamento, como a atmosfera controlada, também demonstram prejudicar o desenvolvimento do sabor nas frutas (Mattheis & Fellman 1999). Esses novos métodos de triagem ou armazenamento podem, portanto, ter um impacto no sabor, enquanto a qualidade da textura permanece num bom nível ou, até mesmo, melhorada (Péneau et al. 2006).

Muitos estudos apontam para a dureza, que é medida com vários instrumentos, como o penetrómetro, o mais amplamente usado. No entanto, a sensação de farinosidade/suculência é muito diferente da dureza. Uma maçã pode ser firme, e

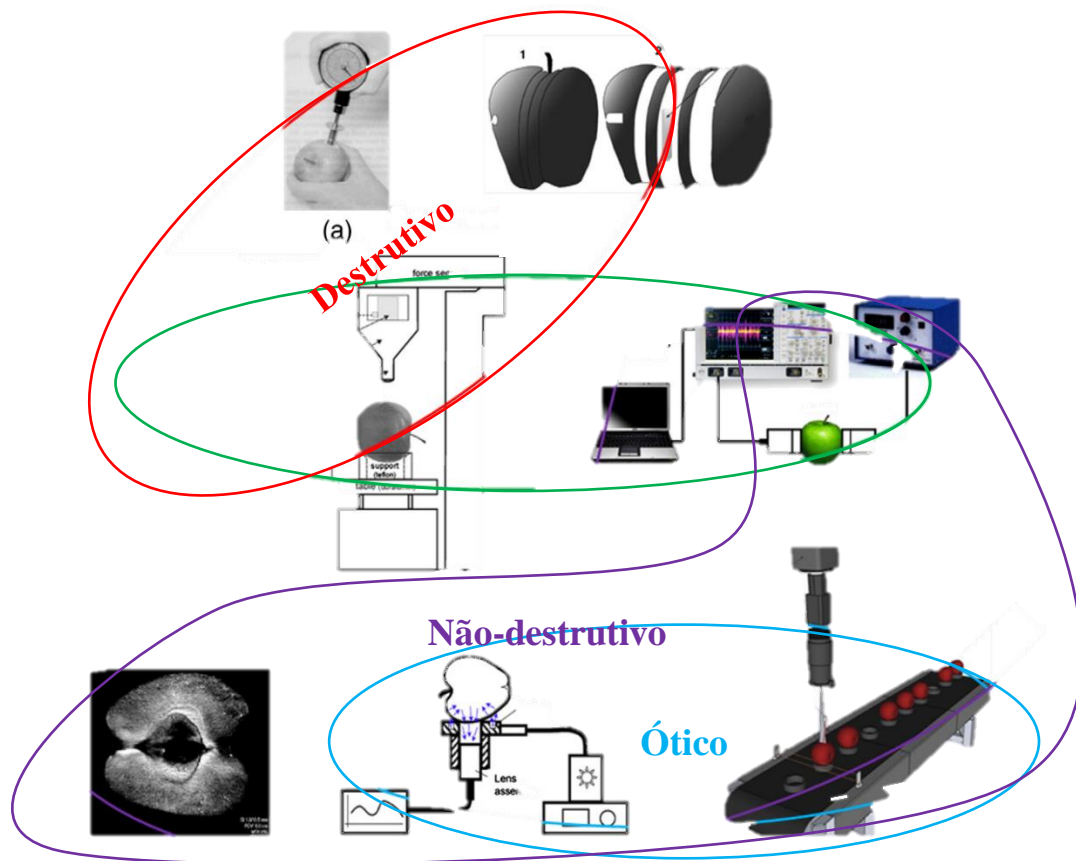


Figura 2: Diferentes abordagens de medição instrumental para propriedades da textura da maçã: (a) teste de penetração; (b) teste SENB; (c) combinação de teste de punção e método de emissão acústica (AE); (d) método ultrassônico; (e) ressonância magnética (MRI); (f) espectroscopia vis-SWNIR visível e de ondas curtas (Vis-SWNIR); (g) sistema de dispersão hiperespectral online. O grupo a vermelho representa métodos destrutivos; o grupo a roxo são métodos não destrutivos; o grupo verde apresenta os métodos acústicos; e o grupo azul representa métodos óticos (Adaptado de Chen 2013).

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã simultaneamente farinhenta. Assim, o teste com o penetrómetro não é suficiente para definir se a maçã possui boa qualidade.

O maior desafio é medir a farinosidade (Nicolai et al. 2007; Chen 2013). As técnicas instrumentais podem substituir painéis descritivos quantitativos até um certo ponto, no entanto, estes não fornecem uma alternativa aos painéis dos consumidores.

Existem instrumentos destrutivos e não destrutivos para medir a dureza da maçã (Nicolai et al. 2007). Técnicas óticas, tais como espectroscopia visível/ infravermelho próximo, espectroscopia resolvida no tempo e espaço, imagem multiespectral e hiperespectral; técnicas mecânicas como análise de impacto, análise de vibração, ultrassom; radiografia e tomografia de raio-X; imagem de ressonância magnética; espectrometria de massa; quimiometria e análise acústica são os métodos não destrutivos utilizados para medir a qualidade de frutos (Nicolai et al. 2007; Ozuna et al. 2014; Abbott 1994; Camps et al. 2005). No entanto, os métodos não destrutivos são dispendiosos e o custo não compensa para as empresas, na maior parte dos casos. Assim sendo, os métodos destrutivos são os mais utilizados para determinar a qualidade da fruta. Estes possuem grandes vantagens a nível económico, uma vez que são mais baratos, são mais simples e não precisam de mão-de-obra especializada.

A penetrometria e a compressão são os métodos destrutivos mais empregados. A penetrometria é usada como referência para caracterizar frutas frescas. Esta medição é feita em fruta descascada no lado equatorial, sendo realizadas duas medições por fruto, tendo como finalidade a quantificação da compactação de um fruto (Billy et al. 2008).

Assim como a penetrometria, a compressão também é dos métodos mais implementados nas empresas, e essa medição é feita num contacto superficial pequeno. Esta medição não é suficientemente precisa para frutas processadas, nem representativas, nem repetitivas (Bourles et al. 2009).

A Figura 2 é elucidativa de uma ampla gama de métodos instrumentais acústicos, destrutivos e não destrutivos, bem como medidas de textura usadas para alimentos sólidos e semissólidos, como maçãs (Chen 2013).

Nas empresas, as maçãs que são incluídas no produto final são expostas a temperaturas elevadas, acima da temperatura de pasteurização (cerca de 72°C). Para que a maçã não se destrua durante este processo, esta tem de possuir uma textura adequada.

O problema incide em como medir quantitativamente a farinosidade de uma maçã. Hoje em dia, esta medida consiste em provar a maçã e avaliar se esta é boa ou não, no entanto, este teste é sensorial e, portanto, subjetivo. Atualmente, as sensações táteis e orais, provenientes de vibrações produzidas pelo esmagamento de alimentos, são as principais sensações usadas para discriminar a textura dos alimentos (Poinot et al. 2011). Uma pessoa sem experiência pode aprovar esta matéria-prima que, em situações normais, deveria ser reprovada. Deste modo, uma má avaliação traduzirá em menor rentabilidade para a empresa. Estes aspetos demonstram que é muito importante estudar quais as mudanças que ocorrem e que tornaram a maçã de má qualidade e quais as enzimas que estão envolvidas no seu metabolismo que provoca degradação da textura.

1.5. Alterações metabólicas durante o amadurecimento

Durante a maturação e amadurecimento da fruta, as maçãs sofrem alterações metabólicas importantes, consistindo na conversão de amido em açúcares simples, redução do conteúdo de ácidos orgânicos, alterações da cor da pele, produção de voláteis aromatizados e amaciamento da “carne” (Segonne et al. 2014).

A forma mais comum de medição dos açúcares é utilizando um refratómetro, que mede a quantidade de açúcares em graus brix (°Bx). O brix é uma escala numérica de índice de refração (o quanto a luz desvia em relação ao desvio provocado pela água destilada) de uma solução, comumente utilizada para determinar, de forma indireta, a quantidade de compostos solúveis numa solução de sacarose. A quantidade de compostos solúveis corresponde ao total de todos os compostos dissolvidos em água, começando com açúcar, sal, proteínas, ácidos, entre outros, e os valores de leitura medido é a soma de todos eles. Um grau Brix (1°Bx) é igual a 1g de açúcar por 100 g de solução, ou 1% de açúcar (Hull & Wiley InterScience (Online service) 2010).

Muitas enzimas, como a poligalacturonase (PG), a pectina metilesterase (PME), a β -galactosidase e α -L-arabinofuranosidase (AF), que afetam a estrutura da parede celular, estão associadas ao amolecimento da “carne” de maçã (Moriya et al. 2016; Johnston et al. 2017).

Alterações na composição da pectina têm sido implicadas na diminuição da adesão entre células (Ilker & Szczesniak 1990; Billy et al. 2008). Durante o amolecimento das frutas, as pectinas normalmente sofrem solubilização e despolimerização, que contribuem para o enfraquecimento e desintegração da parede. Na maçã, geralmente há um aumento na pectina solúvel em água (Water Soluble Pectine - WSP) e uma diminuição nos resíduos de galactose e arabinose, com pouca despolimerização, ocorrendo em qualquer fração de pectina durante o amadurecimento (Yoshioka et al. 1992; Fischer 1994b; Fischer 1994a; Billy et al. 2008).

A parede celular primária de muitas plantas alimentares é composta principalmente de polissacarídeos, entre os quais, celulose, pectinas e hemiceluloses. Inegavelmente, mudanças na estrutura e organização de polímeros primários de parede celular influenciam as propriedades mecânicas do fruto (Durand et al. 2012; Vanstreels et al. 2005; Waldron et al. 2003).

Na parede celular da planta primária, as pectinas são caracterizadas por uma grande quantidade de cadeias laterais de açúcares neutros, entre as quais os mais abundantes são arabinano e galactano (Schols & Voragen 1994; Durand et al. 2012). O polissacarídeo péctico é composto principalmente por uma espinha dorsal de unidades de (1 \rightarrow 4) α -D ácido galacturónico ligado a que podem ser esterificados e acetilados. Esta cadeia linear pode ser intercalada com resíduos de α -(1 \rightarrow 2) L-ramnospiranosilo ligados, aos quais estão ligadas cadeias laterais de açúcares neutros, composta principalmente por arabinose e galactose (Durand et al. 2012; Wang & Lü 2014).

Foi demonstrado ainda que as pectinas podem desempenhar um papel determinante na estruturação das paredes celulares da planta através da formação de gel de pectato de cálcio *in vivo* controlado pela ação, dentro da parede, das enzimas pectina metilesterase (PME) e os seus inibidores (Durand et al. 2012; Vincken et al. 2003).

A pectina metilesterase (PME) e a-L-arabinofuranosidase estão envolvidas na farinosidade e a sua atividade mostra-se maior durante o estágio inicial de amadurecimento em frutos macios de maçã. Ambas as enzimas agem sobre as pectinas que tornam a matriz da parede celular mais acessível a outras enzimas degradantes, como as poligalacturonases (PG) (Toivonen & Brummell 2008; Nobile et al. 2011; Segonne et al. 2014). O papel das PMEs é frequentemente relacionado com a degradação da pectina que ocorre durante o amadurecimento da fruta (PELLOUX et al. 2007; Segonne et al. 2014). Isso está de acordo com a observação de que as células do parênquima de frutos farinhentos tendem-se a separar facilmente entre si devido à alteração da lâmina média, rica em pectina (Segonne et al. 2014).

Em adição, o amadurecimento de frutas também é atribuído à dissolução dos componentes da parede celular, particularmente os poliuronídeos (Yoshioka et al. 1992; Fischer & Bennett 1991). A solubilização de poliuronídeos no amadurecimento de frutos está relacionado com a despolimerização do poliuronídeo pela ação de poligalacturonase (PG). Existem algumas hipóteses para o mecanismo de solubilização da poligalacturonase como sendo a modificação de componentes de açúcares neutros não celulósicos da parede (Yoshioka et al. 1992; Knee 1973; Gross & Sams 1984; McCollum et al. 1989), síntese de tipos modificados de polímeros (McCollum et al. 1989), e envolvimento da mobilidade do cálcio (Yoshioka et al. 1992; Poovaiah et al. 2011). O estudo de Yoshioka *et al.* Indica que os poliuronídeos com alto grau de metoxilação podem formar apenas algumas pontes de cálcio e os complexos são lábeis. Então as moléculas são desesterificadas, os grupos resultantes carregados negativamente repelem-se e causam inchaço dos complexos. Os poliuronídeos com um baixo grau de metoxilação formam numerosas pontes de cálcio e complexos poliuronídeos estáveis, que dificilmente são afetados quando desesterificados (Yoshioka et al. 1992).

A atividade da pectinametilesterase, que catalisa a desesterificação dos poliuronídeos, está presente durante o desenvolvimento e o amolecimento dos frutos e, muitas vezes, não mostra correlação com o amadurecimento (Ahmed & Labavitch 1980; McCollum et al. 1989; Yoshioka et al. 1992). No entanto, o mecanismo de controle na desesterificação de poliuronídeos não está bem compreendido. Alguns cientistas sugerem que existe uma distribuição intermolecular irregular de grupos metoxilados em poliuronídeos de maçã. Em acréscimo, o metabolismo dos açúcares neutros também pode

estar envolvido na solubilização do poliuronídeo durante o amadurecimento. Os estudos de Yoshioka *et al.* sugerem a desesterificação de poliuronídeos com alto grau de metoxilação como possível mecanismo de solubilização do poliuronídeo durante o amadurecimento, em vez da despolimerização de poliuronídeos. Os poliuronídeos com alto grau de metoxilação, possivelmente, serão poliuronídeos ricos em açúcares neutros de cadeia lateral (Yoshioka *et al.* 1992).

As glicosidases, tais como a β -galactosidase, poderiam facilitar a solubilidade da pectina e a remoção dos resíduos de galactose e arabinose das cadeias laterais de arabinogalactana de pectina durante o amadurecimento de uma maçã (Yoshioka *et al.* 1995). A atividade da β -galactosidase aumenta significativamente em vários cultivos de maçãs durante o armazenamento, embora as diferenças nas taxas de amolecimento não tenham sido explicadas pelas diferenças na atividade desta enzima (Johnston *et al.* 2017). O papel da β -galactosidase tornou-se ainda mais complicado quando se encontraram quatro isoenzimas no amadurecimento de maçãs, dos quais apenas um aumentou a atividade durante o amadurecimento da maçã. Outro glicosídeo, α -L-arabinofuranosidase, que pode facilitar a liberação de resíduos de arabinose durante o amolecimento, aumentou a atividade durante o amadurecimento da maçã (Yoshioka *et al.* 1995; Johnston *et al.* 2017).

As concentrações de glicose não-celulósica e celulósica na parede celular permanecem relativamente constantes durante o amadurecimento das maçãs, sugerindo que ocorre pouca degradação de celulose e hemicelulose (Bartley 1976). Em análises anteriores, foi encontrada pouca degradação de hemicelulose e celulose em maçãs durante 6 meses de armazenamento (Siddiqui & Bangerth 1996). Isto reflete-se também em estudos onde o peso molecular do xiloglucano (polímero hemicelulósico predominante nos frutos) permaneceu constante, e as atividades das enzimas modificadoras do xiloglucano como a endotransglicosilase xiloglucana (XET) e a celulase diminuíram durante o amadurecimento (Abeles & Biles 1991; Percy *et al.* 1997). É, então, possível que a despolimerização mínima da hemicelulose durante o amadurecimento da maçã possa impor a característica de amolecimento parcial desta fruta (Johnston *et al.* 2017).

As maçãs farinhentas apresentam uma abundância significativamente maior de estruturas altamente metilesterificadas, enquanto que as maçãs suculentas apresentam maior abundância de estruturas altamente metilesterificadas que são acetiladas (Segonne et al. 2014). Estes resultados são consistentes com a expressão de MdPME2 que é maior nos genótipos não-farinheiros, resultando em blocos desmetilesterificados de grupos carboxilo livres (**figura 3**) (Segonne et al. 2014). As o-acetilações de pectinas podem reduzir a

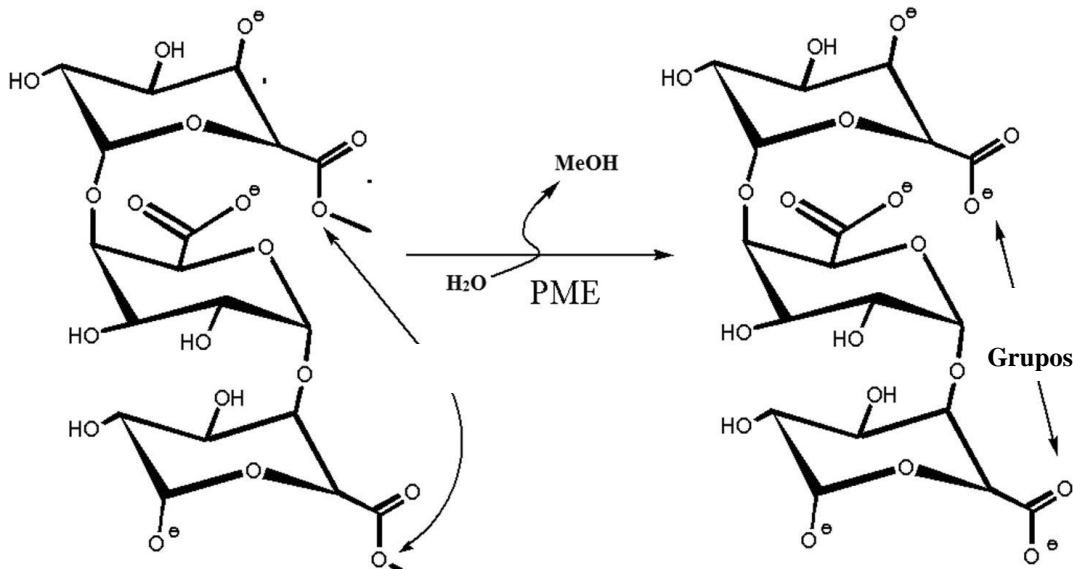


Figura 3: Reação esquemática da pectina metilesterase. Adaptado de Salas-Tovar et al., 2017 (Salas-Tovar et al. 2017).

acessibilidade da pectina às enzimas PME (Oosterveld et al. 2000). Portanto, as PMEs podem não atuar sobre esses blocos acetilados. Esses resultados sugerem que as PMEs desmetilizam a pectina de maneira processual, levando a blocos desmetilizados.

As pectinametilsterases no apoplasma catalisam a desmetilesterificação de ácidos homogalacturônicos (HGAs), expondo resíduos carboxílicos que podem fazer ligações cruzadas com o cálcio. Estas alterações afetam as propriedades reológicas, a porosidade e o estado iônico da parede celular. Segue-se que o rígido controle da atividade da PME, espacial e temporalmente, ocupa uma posição central no controle do crescimento e desenvolvimento da parede celular. As PMEs convertem os grupos metoxil na cadeia do ácido poligalacturônico em grupos carboxilo negativamente carregados, libertando tanto prótons como metanol. Acredita-se geralmente que a maioria das PMEs vegetais remove ésteres metílicos em bloco, criando longos trechos contíguos de pectinas desesterificadas (Limberg et al. 2000; Gupta et al. 2015). A atividade da PME é regulada pela expressão diferencial, as

múltiplas isoformas de PME demonstram ser expressas em certos tecidos ao mesmo tempo. A partir do padrão de ação das poucas isoformas da PME estudadas até o momento, parece que a atividade intrínseca de diferentes isoformas é a mesma, mas certas especificidades de substrato e mecanismos de reação requerem diferentes condições ambientais (Denès et al. 2000; Bordenave & Goldberg 1993; Gupta et al. 2015; Limberg et al. 2000). A distribuição das unidades carboxílicas ao longo do esqueleto da pectina e, em menor grau, do grau de metilação, é importante no controle da atividade da PME. Os grupos carboxilo livres na vizinhança da ligação éster aumentam a afinidade da enzima pelo seu substrato (Gupta et al. 2015).

O papel de uma acetilesterase de pectina é cortar a ligação éster entre um carbono glicosídico e um grupo acetilo. Esta enzima pode desacetilar pectinas de uma maçã farinhenta, o que explica a abundância de estruturas de metilos, mas não de estruturas acetiladas. A sua baixa atividade em maçãs não farinhentas resulta na manutenção das pectinas acetiladas, que não podem ser desmetilesterificadas pelas PMEs. O gene MdPME pode desempenhar um papel interessante na regulação da atividade da PME, visando a desmetilesterificação localizada das pectinas. Todos esses estudos de Segonne *et al.* evidenciam que a quantificação de PME e MdPME2 pode indicar o estado do endurecimento do fruto: este metabolismo da pectina aumenta a porosidade da parede celular, diminui a adesão celular e afeta a textura da fruta (Segonne et al. 2014; Dheilily et al. 2016).

Para além das enzimas supracitadas, existem enzimas responsáveis pela cor das maçãs. O escurecimento de maçãs cortadas é devido a processos de escurecimento enzimático nos quais as principais enzimas envolvidas são polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) (Augusto et al. 2016; Jang & Moon 2011; Qi et al. 2011). O escurecimento ocorre quase instantaneamente quando a estrutura da célula é destruída, promovendo o contato entre a enzima e o substrato. A PPO catalisa a hidroxilação de monofenóis e a oxidação de o-difenóis em o-quinonas, seguida de uma formação não enzimática de melanina responsável pela cor preta, castanha ou vermelha característica do escurecimento enzimático (Augusto et al. 2016; Oms-Oliu et al. 2010; Tomás-Barberán & Espín 2001).

1.6. Azul de bromotimol

O azul de bromotimol é um corante utilizado como indicador na determinação de pH. Este é um ácido fraco e pode estar em forma ácida ou básica, dependendo do pH da solução. Este reagente é amarelo em soluções ácidas (abaixo de 6,0), azul em soluções básicas (acima de 7,6) e quando o valor do pH está dentro da faixa de viragem (solução neutra) o azul de bromotimol apresenta uma cor intermédia esverdeada (Sabnis 2007).

O indicador ácido-base azul de bromotimol é conhecido como uma sonda altamente sensível às alterações na estrutura e propriedades físicas das proteínas, vesículas fosfolipídicas e biomembranas. A resposta do azul de bromotimol às mudanças das condições ambientais envolve o deslocamento de seu equilíbrio protolítico (Gorbenko 1998).

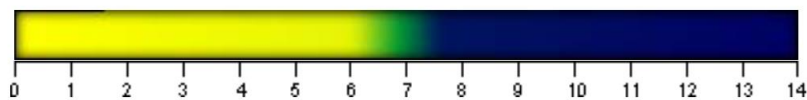


Figura 4: Intervalo de pH onde existe mudança de cor do azul de bromotimol. Zona de viragem entre 6,0 e 7,6.

No caso de enzimas em que a sua ação liberta protões, como é o caso da PME, o pH da solução tenderá a ficar mais ácido, e, portanto, o azul de bromotimol ficará com uma tonalidade amarela.

Capítulo II

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais e Reagentes:

- Homogeneizador Jata Electro 500w 1,7L
- Refratômetro de mão Hanna Instruments RB 32
- Penetrômetro Effegi FT-327
- Potenciômetro Hanna Instruments HI 2210-02
- Espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys™ Visible Spectrophotometer 20
- Maçãs Golden
- Cloreto de sódio (NaCl), Sigma-Aldrich
- Azul de Bromotimol, Sigma-Aldrich
- Fosfato de potássio, Sigma-Aldrich
- Água destilada

2.2. Método de obtenção de extrato de maçã

O extrato de maçã foi iniciado com o descasque das maçãs Golden, vindas da Decorgel. Apenas, o pericarpo foi usado para o presente estudo. Em seguida, as maçãs foram homogeneizadas no homogeneizador Jata Electro 500w 1,7L, com uma solução de NaCl 8,8% (p/v).

Cada extrato foi obtido com a utilização do pericarpo de cinco maçãs, sendo que para tal, usou-se 100 mL de solução de NaCl 8,8% (p/v).

Após a homogeneização, o preparado foi filtrado com um coador com uma granulometria de 1 mm.

2.3. Medição do brix

A medição do brix foi realizada colocando um pouco de extrato no refratômetro de mão RB 32 da Hanna Instruments.

2.4. Medição da dureza da maçã

A dureza foi medida com o penetrômetro (Effegi, FT-327). Mediu-se de um lado da maçã e do lado oposto na mesma direção e fez-se a média de dureza para cada maçã.

2.5 Medição do pH

O pH do extrato foi medido diretamente, usando um potenciômetro HI 2210-02 da Hanna Instruments.

2.6 Medição da absorvância com o corante azul de bromotimol

Foi preparada uma solução de 0,01% (p/v) de azul de bromotimol em 0,0003M de solução de fosfato de potássio. De seguida, foi ajustado o pH a 7,5.

Após a obtenção do extrato de maçã foi colocado na cuvete 2 mL de extrato de maçã, 0,83 mL de água destilada e 0,15 mL de solução azul de bromotimol.

A absorvância foi medida a 620 nm no espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys™ Visible Spectrophotometer 20.

2.7 Medição da absorvância sem o corante azul de bromotimol

Neste momento os 0,15 mL de solução de azul de bromotimol foram substituídos por água destilada.

Após a obtenção do extrato de maçã foi colocado na cuvete 2 mL de extrato de maçã e 0,98 mL de água destilada.

De igual modo, a absorvância foi medida a 620 nm Thermo Scientific Genesys™ Visible Spectrophotometer 20.

2.8. Método de obtenção de extrato de maçã sem NaCl

O extrato de maçã foi iniciado com o descasque das maçãs Golden, vindas da Decorgel. Em seguida, o pericarpo das maçãs foi homogeneizado no homogeneizador Jata Electro 500w 1,7L, com água destilada.

Cada extrato foi obtido com a utilização do pericarpo de cinco maçãs, sendo que para tal, usou-se 100 mL de água destilada.

Após a homogeneização, o preparado foi filtrado com um coador.

2.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software estatístico GraphPad Prism 6. As maçãs foram distinguidas em dois grupos: qualidade conforme, qualidade intermédia e qualidade não conforme. Os testes usados na análise estatística foram os não paramétricos, na medida em que se tratava de um bem alimentar, e portanto, a quantidade de amostra era reduzida. Desta forma poder-se-ia reduzir o erro tipo I e II associado à análise estatística. Para averiguar se os grupos eram estatisticamente diferente dois a dois foi usado o teste não

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã
paramétrico Mann-Whitney, e para a apurar se os três grupos eram diferentes entre si usou-
se o teste não paramétrico Krukal-Wallis.

Capítulo III

Resultados

3. Resultados

3.1. Determinação dos valores de Brix

Preparou-se e obteve-se o extrato de maçã de qualidade intermédia, conforme e não conforme. Foi medido o brix através do refratômetro de mão, os resultados estão apresentados na tabela II (**tabela II**).

Tabela II: Valores de brix ($^{\circ}\text{Bx}$) de extrato de maçãs de qualidade conforme, intermédia e não conforme.

Maçã Qualidade Conforme	Maçã Qualidade Intermédia	Maçã Qualidade Não Conforme
14,4	14,2	15,0
14,6	14,6	15,0
14,4	15,0	14,6
14,4	14,2	14,8
14,2	14,2	14,4
15,0	15,0	15,4
14,4	15,0	15,4
14,2	14,0	15,2
14,6	15,2	14,2
14,2	15,2	15,2
14,8	15,2	14,2
14,6	14,0	14,6
14,0	14,0	14,6
13,9	15,0	14,2
13,9	15,0	14,2
11,7	15,0	15,0
13,2	15,0	15,0
14,4	14,2	15,0
14,6	14,6	15,0
14,4	15,0	14,6

Maçã Qualidade Conforme	Maçã Qualidade Intermédia	Maçã Qualidade Não Conforme
14,4	14,2	14,8
14,2	14,2	14,4
15,0	15,0	15,4

De acordo com a tabela II, pode-se aferir que os valores de brix nos três grupos é em tudo muito semelhante, sendo que existem valores comuns a todos os grupos. Posteriormente fez a média para os 3 grupos (tabela III).

Tabela III: Tabela representativa da média de brix (°Bx) dos valores da tabela II, nos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).

	Média
Maçã Qualidade Conforme	14,4
Maçã Qualidade Intermédia	15
Maçã Qualidade Não Conforme	14,8

Os valores médios dos três grupos não são muito diferentes, e não existe nenhuma linearidade entre esses mesmos valores (Gráfico I).

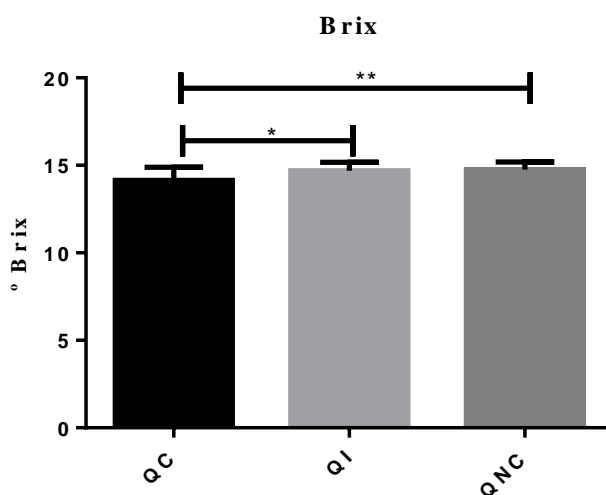


Gráfico I: Gráfico representativo do brix de extrato de maçã de qualidade conforme (QC), intermédia (QI) e não conforme (QNC).

Calculou-se o valor de p para o teste de Mann-Whitney entre os diferentes grupos, para verificar se os grupos eram estatisticamente diferente dois a dois. O resultado foi o seguinte:

- **QC/QI:** $P = 0,0160$ (*)
- **QI/QNC:** $P = 0,6560$
- **QC/QNC:** $P = 0,0037$ (**)

Os grupos QC e QI são estatisticamente diferentes, com um $P < 0,05$, assim como QC e QNC, que possuem um $P < 0,01$. Contrariamente, os grupos QI e QNC são estatisticamente semelhantes.

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico), que permite a apurar se os três grupos eram diferentes entre si, obteve-se um valor de $P < 0,01$ (**). Logo os grupos eram significativamente diferentes.

3.2. Determinação dos valores de dureza

Os valores de dureza foram obtidos na Decorgel, através do penetrómetro, fazendo o teste diretamente nas maçãs. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela IV.

Tabela IV: Valores de dureza das maçãs de qualidade conforme, intermédia e não conforme. A medida de grandeza da força é o kg.

Maçã Qualidade Conforme	Maçã Qualidade Intermédia	Maçã Qualidade Não Conforme
6,2	6,0	7,0
7,2	6,2	6,8
6,8	6,4	6,8
6,6	6,2	6,8
8,2	6,4	7,0
8,4	7,0	6,8
8,0	8,0	6,8

Maçã Qualidade Conforme	Maçã Qualidade Intermédia	Maçã Qualidade Não Conforme
8,2	8,0	6,8
7,8	8,2	6,8
7,6	7,0	6,8
7,6	7,0	6,8
7,6	7,0	8,2
7,0	7,0	8,2
7,2	7,0	8,2
7,2	7,0	8,2
7,2	7,2	8,2
7,2	7,2	8,2
6,2	6,0	7,0
7,2	6,2	6,8
6,8	6,4	6,8
6,6	6,2	6,8
8,2	6,4	7,0
8,4	7,0	6,8

Tal como verificado aquando da medição do brix, a dureza das maçãs é muito semelhante nos três grupos (**tabela IV**). A tabela V representa a média obtida para cada grupo. Pode-se verificar que é difícil observar a distinção entre eles. No gráfico II é possível analisar as médias destes resultados e o limite de dureza ao qual a maçã é aceite.

Tabela V: Tabela representativa da média de dureza (kg) dos valores da tabela IV, nos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).

	Média
Maçã Qualidade Conforme	7,2
Maçã Qualidade Intermédia	7,0
Maçã Qualidade Não Conforme	6,8

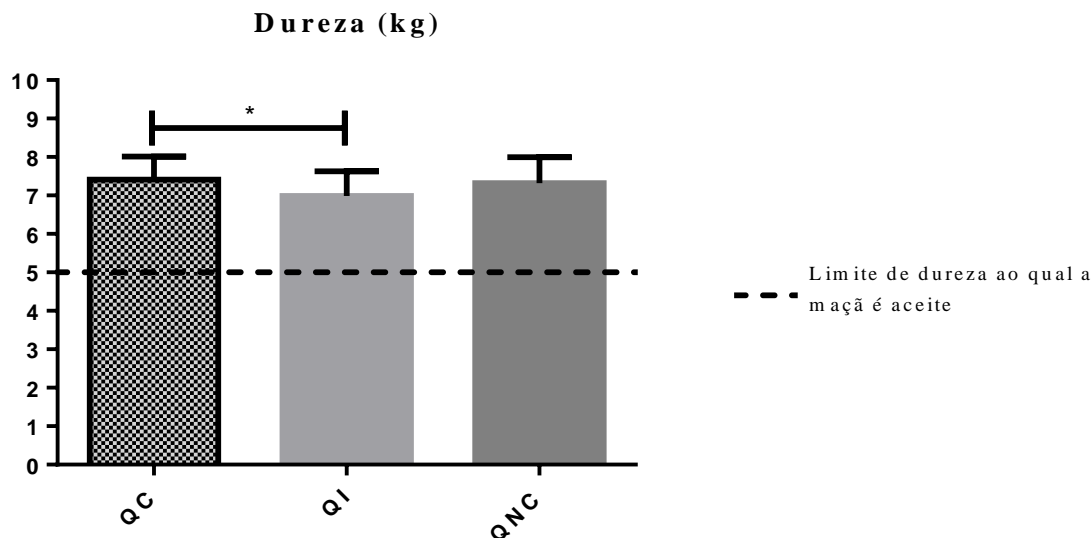


Gráfico II: Gráfico alusivo à dureza (kg) de maçãs de qualidade conforme (QC), intermédia (QI) e não conforme (QNC).

O valor p para o teste de Mann-Whitney entre os diferentes grupos é o seguinte:

- **QC/QI:** $P = 0,0297$ (*)
- **QI/QNC:** $P = 0,3877$
- **QC/QNC:** $P = 0,5678$

Os grupos QC e QI são estatisticamente diferentes, com um $P < 0,05$. Os grupos QI e QNC e QC e QNC são estatisticamente semelhantes.

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico) os grupos não são significativamente diferentes, como valor $P > 0,05$.

Pelo gráfico II, pode-se verificar que todos os grupos estudados se encontravam em conformidade de dureza, ou seja, a dureza estava superior a 5 kg. No entanto o grupo de maçã de qualidade não conforme foi reprovado pelo Departamento de Qualidade, após a avaliação sensorial.

3.3. Determinação dos valores de Absorvância

Adaptou-se o método usado por Hegerman *et al.* (Hagerman & Austin 1986), substituindo-se a centrifugação por uma filtração com um coador, de forma a que o método ficasse muito mais económico.

3.3.1. Experiência com o corante azul de bromotimol

Os valores de absorvância foram obtidos no espectrofotómetro, com a junção de extrato de maçã, água destilada e azul de bromotimol. Pela tabela VI pode-se verificar que os valores eram muito similares em cada um dos grupos, à exceção de um valor considerado *outlier* pela sua discrepância, em comparação com os restantes.

Tabela VI: Valores de absorvância medidos na experiência medida com azul de bromotimol.

Maçã Qualidade Conforme	Maçã Qualidade Intermédia	Maçã Qualidade Não Conforme
0,756	0,854	1,250
0,724	1,059	1,270
0,773	1,063	1,248
0,590	1,155	1,349
0,803	1,49520*	1,147
0,583	0,982	1,304
0,769	1,038	1,371
0,758	1,081	1,231
0,680	1,089	1,149
0,614	1,144	1,277
0,633	1,056	1,304
0,783	1,151	1,341

*Este valor foi considerado *outlier*, visto ter sido muito discrepante dos restantes.

A tabela VII representa a média de absorvância obtida para cada grupo, baseando-se nos valores da tabela VI. Pode-se verificar que, efetivamente, existe diferença entre os três grupos. No gráfico III é possível analisar as médias destes resultados as verificar que essas diferenças são estatisticamente significativas.

Tabela VII: Tabela representativa da média de absorvância dos valores da tabela VI, nos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).

	Média
Maçã Qualidade Conforme	0,740
Maçã Qualidade Intermédia	1,063
Maçã Qualidade Não Conforme	1,273

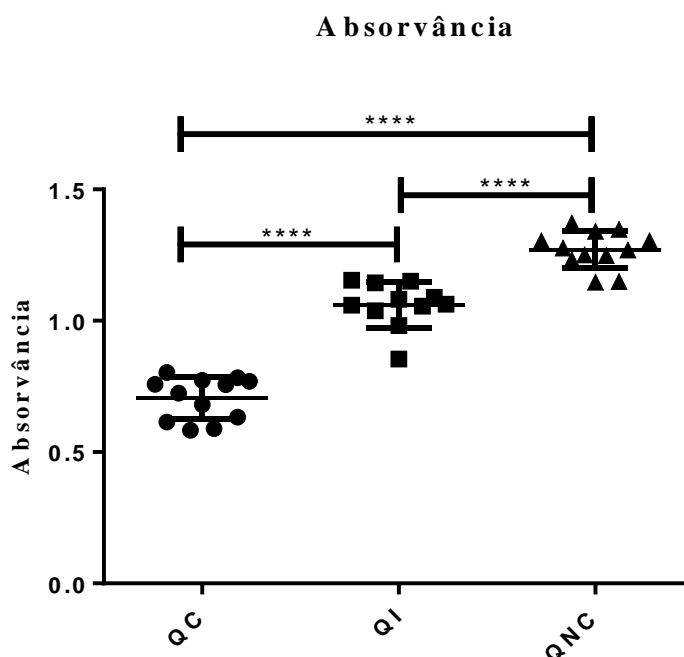


Gráfico III: Absorvância medida na experiência com azul de bromotimol. Entre todos os grupos o valor $p < 0,0001$ (****), pelo teste de Mann-Whitney, e Kruskal-Wallis.

O valor p para o teste de Mann-Whitney entre os diferentes grupos é o seguinte:

- **QC/QI:** $P < 0,0001$ (****)
- **QI/QNC:** $P < 0,0001$ (****)
- **QC/QNC:** $P < 0,0001$ (****)

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico) e o teste de Mann-Whitney (t test não paramétrico), os grupos são significativamente diferentes, como valor $P < 0,0001$ (****).

Mediante os resultados obtidos, pode-se determinar os parâmetros entre os quais se pode distinguir entre os três grupos. Estes resultados foram obtidos analisando os valores mínimos e máximos de cada grupo.

$\leq 0,850$ nm	0,900 – 1,150 nm	$> 1,150$ nm
Qualidade Conforme	Qualidade Intermédia	Qualidade Não Conforme

Figura 5: Figura representativa dos parâmetros de absorvância ao qual os grupos podem ser distinguidos.

3.3.2. Experiências sem o corante azul de bromotimol

Os valores de absorvância foram obtidos no espectrofotómetro, de igual forma que na experiência anterior, a única diferença consistia na substituição do azul de bromotimol pela água destilada. Tal como na tabela VI, a tabela VIII mostra a homogeneidade nos valores em cada um dos grupos.

Tabela VIII: Valores de absorvância medidos na experiência medida sem azul de bromotimol.

Maçã Qualidade Conforme	Maçã Qualidade Intermédia	Maçã Qualidade Não Conforme
0,781	0,996	1,194
0,621	0,936	1,256
0,630	1,090	1,126

Maçã Qualidade Conforme	Maçã Qualidade Intermédia	Maçã Qualidade Não Conforme
0,645	0,998	1,102
0,664	1,085	1,297
0,613	0,989	1,248
0,681	1,025	1,319
0,623	0,996	1,112
0,649	0,936	1,109
0,824	1,090	1,177
0,832	0,950	1,353
0,821	0,995	1,346

A tabela IX apresenta a média de absorvância obtida para cada grupo, baseando-se nos valores da tabela VIII. Pode-se verificar que, tal como na experiência com azul de bromotimol, existe diferença entre os três grupos. No gráfico IV é possível analisar as médias destes resultados as verificar essas diferenças que são estatisticamente significativas.

Tabela IX: Tabela representativa da média de absorvância (nm) dos valores da tabela VIII, nos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).

	Média
Maçã Qualidade Conforme	0,657
Maçã Qualidade Intermédia	0,996
Maçã Qualidade Não Conforme	1,221

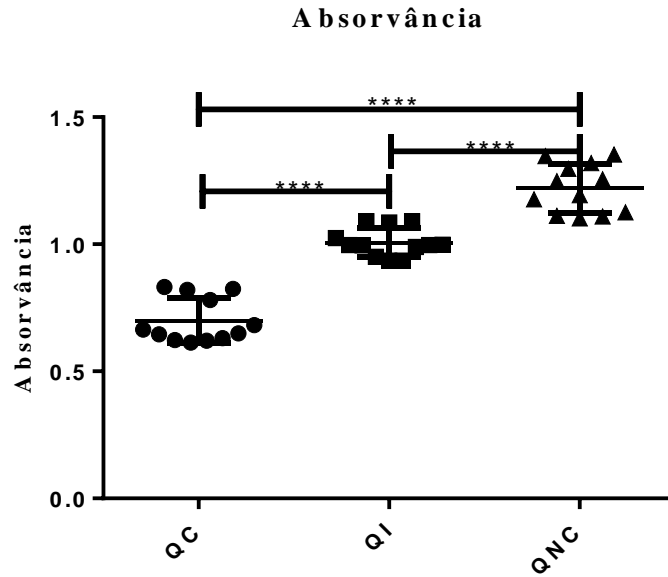


Gráfico IV: Absorvância medida na experiência com água. Entre todos os grupos o valor $p < 0,0001$ (****), pelo teste de Mann-Whitney, e Kruskal-Wallis.

O valor p para entre os diferentes grupos é o seguinte:

- **QC/QI:** $P < 0,0001$ (****)
- **QI/QNC:** $P < 0,0001$ (****)
- **QC/QNC:** $P < 0,0001$ (****)

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico) e o teste de Mann-Whitney (t test não paramétrico), os grupos são significativamente diferentes, como valor $P < 0,0001$ (****).

< 0,850 nm	0,900 – 1,100 nm	> 1,100 nm
Qualidade Conforme	Qualidade Intermédia	Qualidade Não Conforme

Figura 6: Figura representativa dos parâmetros de absorvância ao qual os grupos podem ser distinguidos.

3.3.3. Comparação entre as duas experiências

Comparando os grupos, verifica-se que nenhum é estatisticamente diferente, à exceção da qualidade não conforme.

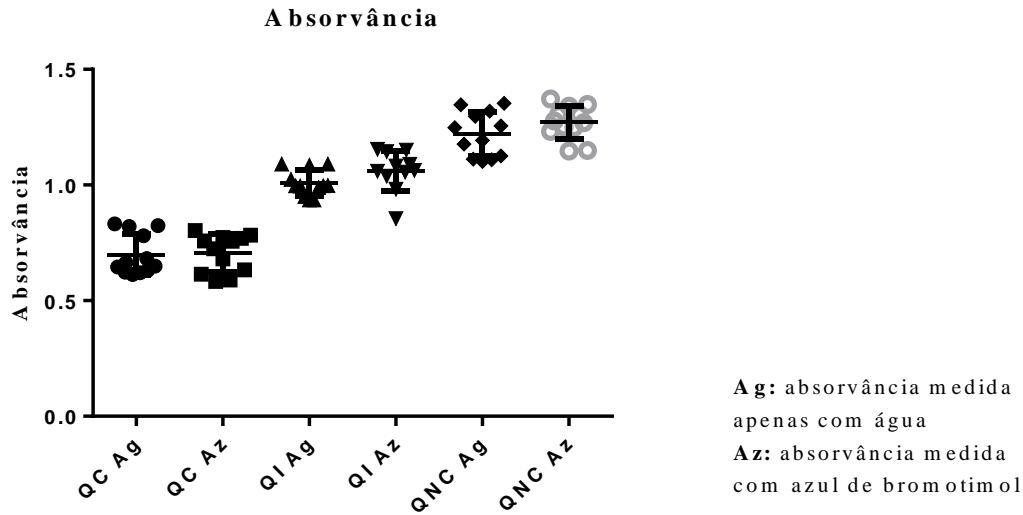


Gráfico V: Absorvância medida na experiência com água e com azul de bromotimol. Os grupos QC, QI e QNC não são estatisticamente diferentes, comparando as duas experiências.

O valor p para entre os diferentes grupos é o seguinte:

- QC Ag/QC Az: $P = 0,9171$
- QI Ag/QI Az: $P = 0,08776$
- QNC Ag/QNC Az: $P = 0,2165$

Mediante o teste de Mann-Whitney, nenhum dos grupos é estatisticamente diferente.

3.4. Homogeneização com água

Uma vez verificado que medir a absorvância sem azul de bromotimol era possível, tentou-se diminuir a quantidade de mais reagentes. O reagente que faltava seria o NaCl. Deste modo, substituiu-se o a solução de NaCl 8,8% (p/v) por água destilada. No entanto, após a homogeneização a maçã oxidava muito rapidamente. A cor do extrato passava de cor amarela característica para a cor castanha (**figura 7**).



Figura 7: Extrato de maçãs de qualidade conforme. **a)** homogeneização com água destilada; **b)** homogeneização com NaCl.

Ao medir a absorvância, os valores de qualidade conforme davam muito elevados (a qualidade conforme deu valores que rondavam os 1,645), pelo que se abandonou o método.



Figura 8: Extrato de maçã obtido após homogeneização com água destilada. À esquerda encontra-se o extrato de maçã de qualidade conforme, no meio qualidade intermédia, e à direita o extrato de maçã de qualidade não conforme.

3.5. Determinação dos valores de pH

Após as maçãs serem homogeneizadas com a solução de NaCl e o sumo ser extraído, foi medido o pH das respetivas homogeneizações.

Inicialmente testou-se dois métodos:

- Fita de pH
- Potenciómetro

3.5.1. Fita de pH

As medições com a fita de pH deram inconclusivos, pois a cor situava-se entre o laranja em todos os grupos.

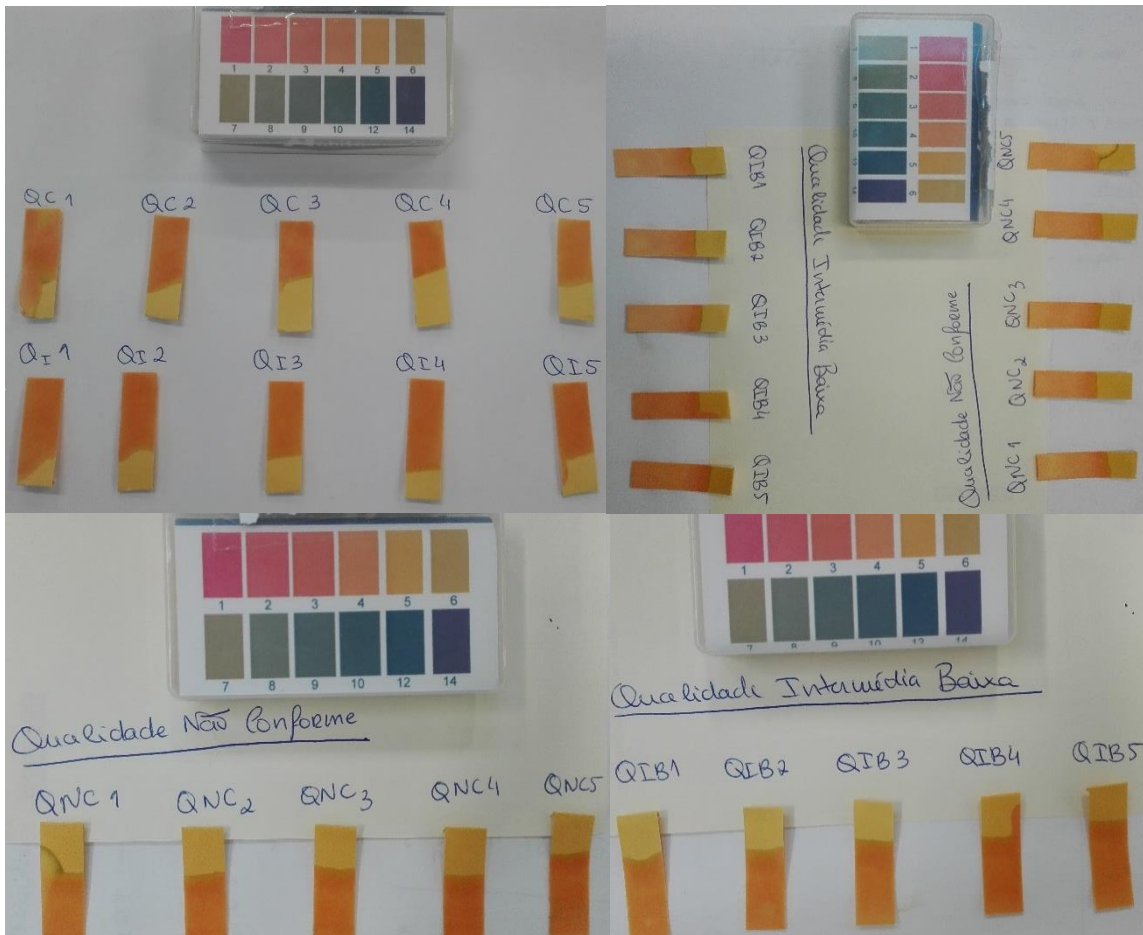


Figura 9: Imagens exemplificativas da com a fita de pH nos 3 grupos. **a)** Comparação entre maçãs de qualidade conforme e intermédia; **b)** Comparação entre maçãs de qualidade intermédia e não conforme; **c)** Maçãs de qualidade não conforme; **d)** Maçã de qualidade intermédia.

Como se pode verificar na figura 9, as cores são em tudo semelhante nos 3 grupos, pelo que este método foi rapidamente excluído.

3.5.2. Potenciómetro

Os valores de pH foram obtidos no potenciómetro através do extrato de maçã. Pode-se verificar que o valor antes da vírgula é praticamente sempre o mesmo (número 3), o que dificulta a distinção entre os três grupos (maçã conforme, intermédia e não conforme).

Tabela X: Valores de pH medidos no potenciómetro, após se obter o sumo de maçã dos 3 grupos (Qualidade Conforme, Intermédia e Não Conforme).

Maçã Qualidade Conforme	Maçã Qualidade Intermédia	Maçã Qualidade Não Conforme
3,308	3,382	3,736
3,268	3,534	3,698
3,258	3,356	3,724
3,372	3,564	4,028
3,418	3,276	4,038
3,328	3,580	3,760
3,346	3,560	3,900
3,310	3,560	3,760
3,430	3,610	3,680
3,316	3,600	3,810
3,300	3,650	3,870
3,430	3,450	4,060

Como se pode constatar pela tabela X os valores apenas diferem nas casas decimais, o que confirma o facto de não ser viável a utilização da fita de pH. A tabela XI, onde se apresenta a média para cada grupo, percebe-se que, a diferença de valor entre os grupos é reduzida.

Tabela XI: Média dos valores de pH para cada um dos grupos (Qualidade Conforme, Intermédia, e Não Conforme).

	Média
Maçã Qualidade Conforme	3,32
Maçã Qualidade Intermédia	3,56
Maçã Qualidade Não Conforme	3,79

Mesmo os valores sendo muito próximos, estatisticamente existe diferença entre eles (**gráfico VI**). No entanto, os desvios padrão entre os grupos é elevado, nomeadamente nos grupos de maçã de qualidade intermédia e não conforme, o que faz com que certos valores se cruzem com os de outros grupos, e tornem este teste bastante falível.

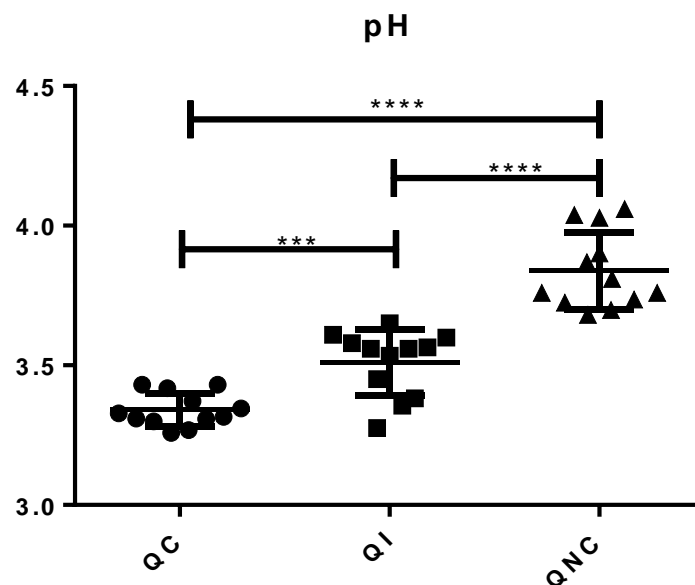


Gráfico VI: Valores de pH medidos no potenciômetro para os grupos de qualidade conforme (QC), intermédia (QI) e não conforme (QNC).

O valor p para entre os diferentes grupos é o seguinte:

- **QC/QI:** $P = 0,0008$ (***)
- **QI/QNC:** $P < 0,0001$ (****)
- **QC/QNC:** $P < 0,0001$ (****)

De acordo com o teste de Mann-Whitney (t test não paramétrico) todos os grupos são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$). Os grupos QC e QI são os que possuem uma menor diferença estatística ($P < 0,005$), pelo que ainda é mais difícil distinguir na prática estes dois grupos.

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico) os grupos são significativamente diferentes, como valor $P < 0,0001$ (****).

Mediante os resultados obtidos, pode-se determinar os parâmetros entre os quais se pode distinguir entre os três grupos. Estes resultados foram obtidos analisando os valores mínimos e máximos de cada grupo.

< 3,43	3,43 – 3,65	> 3,65
Qualidade Conforme	Qualidade Intermédia	Qualidade Não Conforme

Figura 10: Figura representativa dos parâmetros de pH ao qual os grupos podem ser distinguidos.

Este método aparenta ser menos viável que a absorvância na medida em que existem valores de qualidade intermédia que se juntam com a qualidade conforme. Mesmo e podendo distinguir estatisticamente estes grupos e se poder estabelecer parâmetros, a medição poderá induzir a erro, pois os valores são muito próximos e a medição dependerá intrinsecamente da calibração do aparelho.

3.6. Análise Estatística

O número n da amostragem foi calculada para o teste One Way ANOVA, usando o software estatístico DEVELVE, e as equações estatísticas abaixo citadas (Whitley & Ball 2002; Kirk 2013; Cohen 1988).

De forma a encontrar a dimensão da amostra, delimitou-se o erro tipo I em 5% e o erro tipo II em 20%. Assim sendo, $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,2$. Os valores de área para α e β foram identificados na tabela de distribuição normal standard (**Anexo I**).

$$\alpha_{total} = \frac{\alpha}{\left(\frac{grupos \times grupos - 1}{2}\right)} \Leftrightarrow \alpha_{total} = \frac{0,05}{\left(\frac{3 \times 3 - 1}{2}\right)} \Leftrightarrow \alpha_{total} = 0,0125$$

Para determinação dos quadrados médios (*MSe*) foram utilizadas as fórmulas:

$$Sse = \sum_{i=j}^r \sum_{j=1}^c (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 \quad \text{e} \quad MSe = \frac{Sse}{DFe} = 0,007936$$

E por fim, tendo todos os valores, recorreu-se a uma das fórmulas da ANOVA para calcular a dimensão amostral:

$$n = \left(\frac{(z_{\alpha_{total}/2} + z_{\beta}) \sqrt{MSe}}{\Delta} \right)^2 \Leftrightarrow n = \left(\frac{(2,485 + 0,845) \sqrt{0,007936}}{0,5262} \right)^2 \Leftrightarrow n = 9$$

Legenda:

\bar{X} = Média total de todos os dados

c = Quantidade de colunas (conjuntos de dados)

r = Quantidade de linhas (pontos de dados de um conjunto de dados)

X_{ij} = Ponto de dados da linha *i* do conjunto de dados de coluna *j*

DF = Graus de liberdade

Sse = Soma dos quadrados da ANOVA

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã

n = Dimensão da amostra

MSe = Quadrados médios da ANOVA

Δ = Diferença máxima média no grupo

z_{β} = Valor de área na curva normal que fica à direita de um determinado valor de z , para β .

$z_{\alpha_{total}/2}$ = Valor de área na curva normal que fica à direita de um determinado valor de z para $\alpha_{total}/2$.

Para o teste de Kruskal-Wallis é necessário possuir mais 15% de amostra, logo:

$$9 + (9 \times 15\%) = 10$$

Resumindo, o número mínimo de amostras para cada um dos grupos seria 10. Uma vez que o ideal em estatística é aumentar 20% ao mínimo, foi estipulado acrescentar mais duas amostras, perfazendo um total de 12 amostras por grupo.

Capítulo IV

Discussão

4. Discussão

4.1. Determinação do brix

De acordo com os resultados obtidos, não é possível concluir que medindo o brix se consegue distinguir os grupos, tal como na experiência de Charles *et al.* (Charles et al. 2017). Existem valores que se repetem nos três grupos (**tabela II**). Mediante as médias obtidas para os três grupos (**tabela III**) os valores são muito semelhantes. Uma explicação viável reside no facto dos três grupos possuírem uma quantidade de açúcares muito próxima. Estes resultados vão de encontro com a literatura, que afirma que, durante o amadurecimento, a quantidade de açúcares permanece quase inalterada (Johnston et al. 2017).

Após a análise estatística, podemos verificar que, embora exista alguma diferença entre os grupos QC e QI ($P < 0,05$), e os grupos QC e QNC ($P < 0,01$), não existe diferença entre os grupos QI e QNC, pelo que não poderíamos distinguir se a maçã poderia ser aprovada ou não. Desta forma, este método nunca poderia ser impregnado, pois existiriam muitas falhas ao longo do processo que induziriam a erro.

4.2. Determinação dos valores de dureza

Tal como na medição do brix, os valores de dureza também são muito semelhantes entre os grupos QC, QI e QNC (**tabela IV**). Isto comprova que a textura e dureza não são a mesma coisa, uma maçã pode ser dura, mas ainda assim ser farinhenta. Como podemos ver pelo gráfico II, todos os grupos de maçãs estudados tinham passado no teste da dureza, pois esta era superior a 5 kg (limite mínimo de aceitação de dureza estipulado pela Decorgel). No entanto, quando foi realizado o controlo de qualidade com a avaliação da farinosidade (avaliação sensorial em fábrica), verificou-se que esta não estava conforme para entrar no produto final, sendo rejeitada. Esta seleção na fábrica será testada mais à frente, e ver-se-á que está correta, mediante um outro método analítico.

Deste teste de dureza, podemos confirmar que se consegue distinguir os grupos pela dureza, não sendo um teste viável.

4.3. Determinação dos valores de Absorvância

4.3.1. Experiência com o corante azul de bromotimol

Ao medir a absorvância dos extratos de maçã dos três grupos a 620 nm, consegue-se aferir que existem realmente diferença entre eles, sendo esta altamente significativa entre os três grupos e dois a dois ($P < 0,0001$) (**gráfico III**). Após a verificação das médias e dos valores máximos e mínimos de absorvância de cada grupo, foi possível estipular limites ao qual se pode considerar as maçãs com alta qualidade, qualidade média, e baixa qualidade. Estipulou-se então que até aos 0,850, inclusive, pode-se considerar maçãs conformes, entre 0,900-1,150 seriam maçãs de qualidade intermédia, e acima de 1,150 as maçãs seriam consideradas não conformes.

Este será um método viável para a determinação da qualidade da maçã a nível de textura.

4.3.2. Experiências sem o corante azul de bromotimol

Uma vez que se pretendia tornar o método o mais económico possível, experimentou-se usar o mesmo método anterior, mas sem a solução de azul de bromotimol com fosfato de potássio. Sem estes dois reagentes, para além de tempo a preparar as soluções também se economizava bastante a logo prazo.

Em substituição da solução de azul de bromotimol usou-se mais 0,15 mL de água destilada na cuvete. Desta forma, a diluição do extrato de maçã seria igual que anteriormente.

Os resultados obtidos foram muito positivos, conseguindo-se distinguir inequivocamente os três grupos, com a mesma significância que no método anterior ($P < 0,0001$) entre os três grupos independentes e dois a dois.

Deste modo, pode-se aferir que será viável retirar o azul de bromotimol e manter a fidelidade do método.

4.3.3. Comparação entre as duas experiências

Uma grande vantagem dos dois métodos é ambos determinarem o valor de absorvância na gama do visível (620 nm), pelo que o espectrofotómetro poderá ser o mais rudimentar possível e não necessita de gastos largamente dispendiosos na compra deste equipamento.

De forma a averiguar se existiam diferenças significativas entre os mesmos grupos, mas em que a absorvância foi determinada por métodos diferentes, foi realizada a comparação entre as duas experiências anteriores.

Mesmo não havendo diferenças estatísticas, consegue-se aferir pelo gráfico V que o método com azul de bromotimol tem tendência a dar valores de absorvância maiores. O facto do método com azul de bromotimol dar uma absorvância um pouco mais elevada seria expectável, na medida em que, a solução de azul de bromotimol contém cor, e, portanto, capta mais radiação que a água destilada, que tem uma absorvância próxima do zero.

Uma vez que o branco no espectrofotómetro é realizado com água destilada, quando colocamos apenas o extrato de maçã diluído em água destilada, estamos a medir apenas a absorvância do extrato, pelo que este método, para além de ser mais económico, também é mais exato.

Pensa-se que o que faz distinguir os grupos será a granulometria da suspensão do extrato de maçã. No grupo de qualidade conforme (QC), uma vez que a maçã é mais concisa, ao fazer-se a homogeneização, os pedaços de suspensão serão maiores. Aquando da filtração do homogeneizado com o coador, a maior parte das partículas de maçã ficaraão retidas, por ter um tamanho superior a 1 mm. Em contrapartida, a homogeneização de maçãs de qualidade não conforme originará partículas mais pequenas, capazes de passarem a filtração

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã feita pelo coador. Uma vez que haverá uma maior quantidade de suspensões no extrato, a absorvância medida no espectrofotómetro dará um valor mais elevado.

Isto é visível após a homogeneização, em que se verifica que o homogeneizado de maçãs de qualidade não conforme possui uma estrutura mais homogénea. E também após a filtração, em que se verifica que o extrato de maçãs de qualidade conforme é mais transparente e menos amarelado que o de maçãs de qualidade não conforme.

Estas características são transpassadas de forma gradual entre maçãs de QC, QI e QNC, em que se denota que a estrutura do homogeneizado fica mais lisa ao longo das maçãs de QC, QI e QNC, assim como o extrato aparenta uma cor mais amarela nessa mesma sequência.

Assim sendo, pode-se concluir que ambos os métodos podem ser usados, contudo, para o efeito pretendido numa empresa, em que é preferível o mais rápido e económico, o segundo método é mais vantajoso.

4.4. Homogeneização com água

Como se pode verificar pela figura 7, após a homogeneização apenas com água destilada, o extrato de maçã fica rapidamente oxidado, evidenciando uma cor acastanhada. Já quando se promove a homogeneização com uma solução de NaCl o extrato fica com uma cor amarelada, mais típica da maçã. Uma vez que a cor é mais escura na homogeneização com água, é normal que absorvância também dê maior. Neste caso, a absorvância aumentava significativamente (sensivelmente mais 0,800).

A maior parte dos equipamentos de espectrofotometria perde a relação linear quando a absorvância é superior a 2 (1% de transmissão), e portanto, as soluções devem ser diluídas (Voet et al. 2014). Assim sendo, quanto mais a absorvância se aproxima de 2, menos eficiente será o método. Uma vez que o NaCl é relativamente barato, o facto de diluir a solução não iria trazer vantagens para o método, pois, para além da questão económica, também se tem de ter em conta a rapidez de execução do método. Enquanto se teria de todas

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã
as vezes diluir os extratos, poder-se-ia fazer uma grande quantidade de solução de NaCl e ir gastando à medida da necessidade, obtendo-se resultados mais rapidamente que fazendo uma diluição.

4.5. Determinação dos valores de pH

4.5.1. Fita de pH

Após a formação do extrato de maçã, foi medido o pH com a fita de pH. No entanto, não se verificam diferenças entre os grupos, pois a tonalidade encontra-se sempre no laranja, dando a entender que o pH de todos os grupos se situa entre o 3 e o 4. Assim sendo, este método não é viável, pois não permite a distinção entre os grupos.

4.5.2. Potenciómetro

Quando se mede o pH no potenciómetro já se denotam algumas diferenças entre os valores de cada grupo (**tabela X**), e efetivamente, as médias dos grupos já diferem. Percebe-se que as maçãs de qualidade conforme têm um pH mais ácido, seguidas das maçãs intermédias e não conforme.

Pelo gráfico VI, é possível apurar que existem diferenças estatísticas entre os três grupos e entre si dois a dois. E também se pode constatar que a diferença entre as maçãs de qualidade conforme e intermédia, mesmo tendo diferença estatística, não é tão grande quando comparando estes dois grupos com as maçãs de qualidade não conforme. Ainda assim, conseguimos distinguir os grupos e estabelecer limites de pH para cada grupo (**figura 10**).

No entanto, e mesmo havendo diferenças, por vezes será difícil de distinguir maçãs de qualidade conforme com maçãs de qualidade intermédia, pois, os valores cruzam-se (**tabela X**). Também será necessário ter em conta o tipo de potenciómetro, e o erro de medição associado a este. O facto das diferenças entre os grupos estar apenas na casa das

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã
décimas, e a diferença entre o mínimo valor de pH e o máximo rondar os 0,7, torna o método mais falível que o método de absorvância, em que a diferença entre os valores é nítida e mais precisa.

Em suma, este método poderá ser aplicado, no entanto terá várias limitações, que seriam eliminadas usando o método de absorvância.

Uma curiosidade ao longo destas experiências com a medição de pH é o facto de em vez do pH diminuir com a alteração da textura da maçã (pois, segundo a literatura, a pectina metilesterase acidifica, pois existe a formação de protões (Gupta et al. 2015)), está a aumentar. Isto pode indicar que existem outras enzimas a atuar que podem contrabalançar o efeito produzido pela pectina metilesterase e até revertê-lo, com a alteração da textura da maçã.

4.6. Análise estatística

A amostragem era maçã, e tratando-se de um bem alimentar, dever-se-ia diminuir o seu desperdício. Assim sendo, pretendia-se uma amostragem o menor possível. Foram, portanto, escolhidos os testes não paramétricos, pois estes (Warmuth 1980; Berenson et al. 2015; Cohen 1988)

- não necessitam de requisitos tão fortes, como a normalidade, como para serem usados, ao contrário dos testes paramétricos;
- são indicados para amostras pequenas;
- não necessitam de amostras com distribuição normal

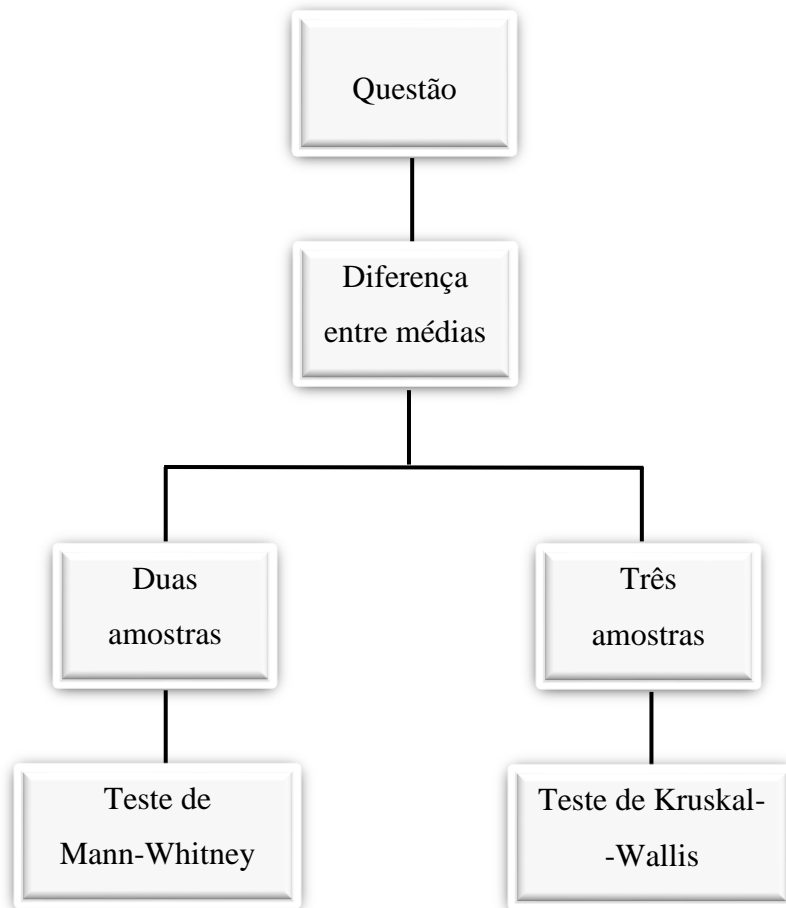


Figura 11: Árvore de decisão dos testes estatísticos não paramétricos a usar na experiência.

Para analisar dois grupos independentes, usou-se o teste de Mann-Whitney, que é a alternativa não paramétrica do teste t (**figura 11**). A hipótese nula para este teste consiste nas médias da população serem as mesmas para os dois grupos.

A alternativa não paramétrica do teste ANOVA é o teste de Kruskal-Wallis, e, portanto, este teste foi usado para analisar os três grupos (QC, QI e QNC) em conjunto (**figura 11**). A sua hipótese nula é igual à s teste de Mann-Whitney.

Conclusão

Os métodos de medição do brix e dureza afirmaram não serem viáveis para a determinação da textura da maçã, pois o brix manteve-se semelhante nos três grupos, a rondar os 14°Bx, tal como afirmado em Charles *et al.* (Charles et al. 2017). Relativamente à dureza, esta demonstrou também ser semelhante entre os grupos, denotando-se apenas uma ligeira diminuição de textura nas maçãs de qualidade não conforme. Contudo, e visto que na Decorgel o limite mínimo de aceitação da dureza é de 5 kg, todos os grupos estudados cumpriam com esse requisito, pelo que a medição da dureza não é viável para a determinação da farinosidade da maçã, isto porque dureza e textura não são exatamente palavras de sentido semelhante.

Relativamente ao método com de determinação do pH, apesar de haver diferenças estatísticas e ser possível a distinção dos grupos, essa distinção é muito ténue (na ordem das décimas), e poderia induzir a erro em algumas situações, dependendo do potenciómetro que se usar.

Existem dois métodos altamente viáveis na distinção de maçãs de qualidade conforme, intermédia e não conforme: método espectrofotométrico com e sem azul de bromotimol. Estes dois métodos têm a vantagem de usar um espectrofotómetro na onda do visível, que é o mais barato da sua gama.

Uma vez que o pretendido seria usar o método mais rápido e económico possível, o método sem azul de bromotimol parece ser o mais viável.

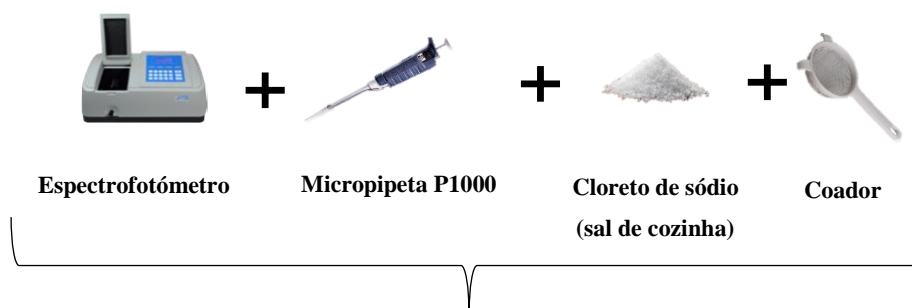


Figura 13: Investimento inicial do método espectrofotométrico sem solução de azul de bromotimol.

Assim, e uma vez que a Decorgel não possui espectrofotómetro nem micropipeta P1000, foi estipulado um valor inicial dos equipamentos em falta (**figura 12**). Como já existe homogeneizador e água destilada no laboratório, estes não constituem um entrave para a realização do método.

O investimento inicial seria de aproximadamente 3 251€, sendo que o valor de execução do método seria quase nulo após este investimento, o que o torna muito apazível. Para manutenção será necessário ter água destilada (sempre em stock na Decorgel) e cloreto de sódio. Uma vez que o valor monetário do cloreto de sódio é muito reduzido não impõe impedimento no método. O valor das maçãs não foi contabilizado pois estas já são gastas em proporções muito semelhantes na avaliação sensorial, já existente na Decorgel.

Quanto à duração do método, o mais demorado reside no descasque das maçãs e sua homogeneização. No total, o método demora cerca de 5 minutos a ser concluído.

O facto de após a aquisição de todo o material o método possuir um valor monetário quase desprezável e de ser de rápida execução torna o processo ideal a ser implementado na escolha da maçã. Será uma excelente alternativa à avaliação sensorial, pois é analítico e objetivo, e não depende da subjetividade de cada operador.

Referências Bibliográficas

- Abbott J.A., 1994. Firmness Measurement of Freshly Harvested “ Delicious ” Apples by Sensory Methods , Sonic Transmission , Magness-Taylor , and Compression. , 119(3), pp.510–515.
- Abbott J.A., 2004. Textural Quality Assessment For Fresh Fruits And Vegetables. , pp.265–266.
- Abbott J.A., Watada A.E., Massie D.R., 1984. Sensory and Instrument Measurement of Apple Texture. , 109(March), pp.221–228.
- Abeles F.B., Biles, C.L., 1991. Cellulase activity in developing apple fruits. *Scientia Horticulturae*, 47(1–2), pp.77–87.
- Ahmed A.E., Labavitch J.M., 1980. Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit: II. Changes In Carbohydrate-Degrading Enzymes In Ripening ;Bartlett’ Pears. *Plant physiology*, 65(5), pp.1014–6.
- Augusto A., Simões T., Pedrosa R., Silva S., 2016. Evaluation of seaweed extracts functionality as post-harvest treatment for minimally processed Fuji apples. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, pp.589–595.
- Barreiro P., Ortiz C., Andari Z., Uiz-Altisent M., Schotte Sandani Z., Wakeling I., Beyt P., 1998. Comparison between sensory and instrumental measurements for mealiness assessment in apples. a collaborative test.
- Bartley I.M., 1976. Changes in the glucans of ripening apples. *Phytochemistry*, 15(5), pp.625–626.
- Berenson M.L., Levine, D.M., Szabat, K.A., 2015. *Basic business statistics : concepts and applications* 13th ed., Pearson/Prentice Hall.
- Billy L., Mehinagic E., Royer G., Renard C., Arvisenet G., Prost C., Jourjon F., 2008. Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 47(3), pp.315–324.
- Bordenave M., Goldberg, R., 1993. Purification and characterization of pectin methylesterases from mung bean hypocotyl cell walls. *Phytochemistry*, 33(5), pp.999–1003.
- Bourles E., Mehinagic E., Courthaudon J. L., Jourjon F., 2009. Impact of Vacuum Cooking Process on the Texture Degradation of Selected Apple Cultivars. , 74(9), pp.512–518.
- Camps C., Guillermin P., Mauget J., Bertrand D., 2005. Measurement of Textural Properties of Apples and their Prediction by near Infrared Reflectance Spectroscopy. , (September), pp.12–16.
- Cantu D., Vicente A., Greve L., Dewey F., Bennett A., Labavitch J., Powell A., 2007. The intersection between cell wall disassembly , ripening , and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*.
- Charles M., Endrizzi I., Aprea E., Zambanini J., Betta E., Gasperi F., 2017. Dynamic and static sensory methods to study the role of aroma on taste and texture: A multisensory approach to apple perception. *Food Quality and Preference*, 62, pp.17–30.
- Chen, L., 2013. Texture measurement approaches in fresh and processed foods — A review
Texturemeasurement approaches in fresh and processed foods — A review. *FRIN*, 51(2).

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã

Cohen J., 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, L. Erlbaum Associates.

Corollaro M.L., Aprea E., Endrizzi I., Betta E., Demattè M. L., Charles M., Bergamaschi M., Costa F., Biasioli F., Corelli Grappadelli L., Gasperi F., 2014. A combined sensory-instrumental tool for apple quality evaluation. *Postharvest Biology and Technology*, 96, pp.135–144.

Denès J., Baron A., Renard C., Péan C., Drilleau J. F., 2000. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research*, 327(4), pp.385–393.

Dheilly E., Gall S., Guillou M., Renou J., Bonnin E., Orsel M., Lahaye, M., 2016. Cell wall dynamics during apple development and storage involves hemicellulose modifications and related expressed genes. *BMC Plant Biology*.

Durand S., Gaillard C., Garnier C., Doublier J. L., 2012. Properties of cellulose / pectins composites : Implication for structural and mechanical properties of cell wall. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), pp.1081–1091.

Fischer M., 1994a. Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 1: Analysis of the alcohol-insoluble residue. *Carbohydrate Polymers*, 25(3), pp.161–166.

Fischer M., 1994b. Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 2: Analysis of the pectic fractions. *Carbohydrate Polymers*, 25(3), pp.167–175.

Fischer R.L., Bennett A.B., 1991. Role of Cell Wall Hydrolases in Fruit Ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), pp.675–703.

Gorbenko G.P., 1998. Bromothymol blue as a probe for structural changes of model membranes induced by hemoglobin.

Gross K.C., Sams, C.E., 1984. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry*, 23(11), pp.2457–2461.

Gupta R., Kohli P., Kalia, M., 2015. Pectin Methylesterases: A Review. *J Bioprocess Biotech*, 5(5).

Hagerman A.E., Austin P.J., 1986. Continuous Spectrophotometric Assay for Plant Pectin Methyl Esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(3), pp.440–444.

Hull P., Wiley InterScience (Online service), 2010. *Glucose syrups : technology and applications*, Wiley-Blackwell Pub.

Ilker R., Szczesniak A.S., 1990. Structural And Chemical Bases For Texture Of Plant Foodstuffs. *Journal of Texture Studies*, 21(1), pp.1–36.

Jang J.-H., Moon K.-D., 2011. Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 124(2), pp.444–449.

Johnston J., Hewett E., Hertog M., 2017. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit : A review., 671(September).

Kader A.A., 1985. Postharvest Technology of Horticultural Crops. , c, pp.390–391.

Kirk R., 2013. *Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences* 4th ed., 2455 Teller Road,

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã

Thousand Oaks California 91320 United States: SAGE Publications, Inc.

Knee M., 1973. Polysaccharide changes in cell walls of ripening apples. *Phytochemistry*, 12(7), pp.1543–1549.

Limberg G., Körner R., Buchholt H. C., Christensen T. M., Roepstorff P., Mikkelsen J. D., 2000. Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydrate research*, 327(3), pp.293–307.

Longhi S., Moretto M., Viola R., Velasco R., Costa, F., 2012. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh .), 63(3), pp.1107–1121.

Mattheis J.P., Fellman, J.K., 1999. Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3), pp.227–232.

McCollum, T.G., Huber, D.J., Cantliffe, D.J., 1989. Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiologia Plantarum*, 76(3), pp.303–308.

Moriya S., Kuniyama M., Okada K., Iwanami H., Iwata H., Minamikawa M., Katayose Y., Matsumoto T., Mori S., Sasaki H., Matsumoto T., Nishitani C., Terakami S., Yamamoto T., Abe K., 2016. Identification of QTLs for Flesh Mealiness in Apple (*Malus x domestica* Borkh .).

Nicolai B.M., Defraeye T., Ketelaere B., Herremans E., Hertog M., Saey W., Toricelli A., Verboven P., 2007. Nondestructive Measurement Of Fruit And Vegetable Quality. *Postharvest Biology and Technology*, 46(Juran 1951), pp.99–118.

Nobile P.M., Watted F., Quecini V., Girardi C. L., Lormeau M., Laurens F., 2011. Identification of a novel α -L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), pp.4309–4321.

Oms-Oliu G., Rojas-Graü M. A., González L. A., Varela P., Soliva-Fortuny R., Hernando M. I., Munuera I. P., Fiszman S., Martín-Belloso O., 2010. Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3), pp.139–148.

Oosterveld A., Beldman G., Schols H. A., Voragen A. G., 2000. Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. *Carbohydrate research*, 328(2), pp.185–97.

Ozuna C., Álvarez-arenas T., Riera E., Cárcel J. A., Garcia-perez J. V., 2014. Ultrasonics Sonochemistry Influence of material structure on air-borne ultrasonic application in drying. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 21(3), pp.1235–1243.

Pelloux J., Rusterucci C., Mellerowicz, E., 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12(6), pp.267–277.

Péneau S., Brockhoff P. B., Hoehn, E., Escher F., Nuessli J., Plads R. P., 2006. Relating Consumer Evaluation Of Apple Freshness To Sensory And Physico-Chemical Measurements. , 22(2007), pp.313–335.

Percy A.E., Melton L.D., Jameson, P.E., 1997. Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening. *Plant Science*, 125(1), pp.31–39.

Poinot P., Arvisenet G., Texier F., Lethuaut L., Mehinagic E., Vigneau E., Prost C., 2011. Use of sense masking to study sensory modalities singly: Interest for the understanding of apple in-mouth perception. *Food Quality and Preference*, 22(6), pp.573–580.

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã

- Poovalah B.W., Glenn G.M., Reddy A.S.N., 2011. Calcium and Fruit Softening: Physiology and Biochemistry. In *Horticultural Reviews*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 107–152.
- Qannari E.M., 2017. Sensometrics approaches in sensory and consumer research. *Current Opinion in Food Science*, 15, pp.8–13.
- Qi H., Hu W., Jiang A., Tian M., Li Y., 2011. Extending shelf-life of Fresh-cut “Fuji” apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1), pp.62–66.
- Sabnis R., 2007. *Handbook of Acid-Base Indicators* 1st ed. CRC Pres, ed., Boca Raton: CRC Press.
- Salas-Tovar J.A., Flores-Gallegos A. C., Contreras-Esquivel J. C., Escobedo-García S., Morlett-Chávez J. A., Rodríguez-Herrera R., 2017. Analytical Methods for Pectin Methylesterase Activity Determination: a Review. *Food Analytical Methods*, pp.1–13.
- Schols H.A., Voragen A.G.J., 1994. Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research*, 256(1), pp.83–95.
- Segonne S.M. Bruneau M., Celton J., Gall S., Francin-allami M., Juchaux M., Laurens F., Orsel M., Renou J., 2014. Multiscale investigation of mealiness in apple : an atypical role for a pectin methylesterase during fruit maturation. , pp.1–18.
- Seymour G.B., Manning K., Eriksson E. M., Popovich A. H., King G. J., 2002. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. , 53(377), pp.2065–2071.
- Siddiqui S., Bangerth, F., 1996. The effect of calcium infiltration on structural changes in cell walls of stored apples. *Journal of Horticultural Science*, 71(5), pp.703–708.
- Sone T., 1972. *Consistency of Foodstuffs*, Dordrecht : Springer Netherlands.
- Thompson A.K., 2003. *Fruit and vegetables : harvesting, handling and storage* 2nd ed. T. A., ed., Blackwell Pub.
- Toivonen P.M.A., Brummell, D.A., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), pp.1–14.
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), pp.853–876.
- Vanstreels E., Alamar. A. C., Verlinden B., Enninghorst A., Loodts J. K. A., Tijsskens E., Ramon H., Nicolai B., 2005. *Postharvest biology and technology.*, Elsevier, 37(2), pp. 163-173.
- Vincken J., Schols H. A. Oomen R., McCann M. C., Ulvskov P., 2003. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiology*, 132(4).
- Voet D., Voet J.G., Pratt, C.W., 2014. *Fundamentos de bioquímica : a vida em nível molecular*, Artmed.
- Waldron K.W., Parker M.L., Smith, A.C., 2003. and Food Quality. , 2(Oliver 1997), pp.101–119.
- Wang X., Lü X., 2014. Characterization of pectic polysaccharides extracted from apple pomace by hot-compressed water. *Carbohydrate Polymers*, 102, pp.174–184.

Desenvolvimento de um Método para Determinação da Suculência/Farinosidade de uma Maçã

- Warmuth E., 1980. Bhattacharya, G. K., R. A. Johnson: Statistical concepts and methods. j. wiley & sons, new york-santa barbara-london-sydney-toronto 1977. xv, 639 s., £ 11.25; \$ 19. *Biometrical Journal*, 22(4), pp.371–371.
- Whitley E., Ball, J., 2002. Statistics review 4: sample size calculations. *Critical care (London, England)*, 6, pp.335–41.
- Yoshioka H., Aoba K., Kashimura, Y., 1992. Molecular Weight and Degree of Methoxylation in Cell Wall Polyuronide during Softening in Pear and Apple Fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117(4), pp.600–606.
- Yoshioka H., Kashimura Y., Kaneko, K., 1995. β -D-Galactosidase and α -L-Arabinofuranosidase Activities during the Softening of Apples. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 63(4), pp.871–878.

Anexos

Anexo I

TABELAS ESTATÍSTICA



Tabela - Proporções da Curva Normal (uma cauda)

Esta tabela indica a área na curva normal que fica à direita de um determinado valor de z. Por exemplo, esta área para $z \geq 1.32$ é 0.0934.

z	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	z
0.0	0.5000	0.4960	0.4920	0.4880	0.4840	0.4801	0.4761	0.4721	0.4681	0.4641	0.0
0.1	0.4602	0.4562	0.4522	0.4483	0.4443	0.4404	0.4364	0.4325	0.4286	0.4247	0.1
0.2	0.4207	0.4168	0.4129	0.4090	0.4052	0.4013	0.3974	0.3936	0.3897	0.3859	0.2
0.3	0.3821	0.3783	0.3745	0.3707	0.3669	0.3632	0.3594	0.3557	0.3520	0.3483	0.3
0.4	0.3446	0.3409	0.3372	0.3336	0.3300	0.3264	0.3228	0.3192	0.3156	0.3121	0.4
0.5	0.3085	0.3050	0.3015	0.2981	0.2946	0.2912	0.2877	0.2843	0.2810	0.2776	0.5
0.6	0.2743	0.2709	0.2676	0.2643	0.2611	0.2578	0.2546	0.2514	0.2483	0.2451	0.6
0.7	0.2420	0.2389	0.2358	0.2327	0.2297	0.2266	0.2236	0.2207	0.2177	0.2148	0.7
0.8	0.2119	0.2090	0.2061	0.2033	0.2005	0.1977	0.1949	0.1922	0.1894	0.1867	0.8
0.9	0.1841	0.1814	0.1788	0.1762	0.1736	0.1711	0.1685	0.1660	0.1635	0.1611	0.9
1.0	0.1587	0.1562	0.1539	0.1515	0.1492	0.1469	0.1446	0.1423	0.1401	0.1379	1.0
1.1	0.1357	0.1335	0.1314	0.1292	0.1271	0.1251	0.1230	0.1210	0.1190	0.1170	1.1
1.2	0.1151	0.1131	0.1112	0.1093	0.1075	0.1056	0.1038	0.1020	0.1003	0.0985	1.2
1.3	0.0968	0.0951	0.0934	0.0918	0.0901	0.0885	0.0869	0.0853	0.0838	0.0823	1.3
1.4	0.0808	0.0793	0.0778	0.0764	0.0749	0.0735	0.0721	0.0708	0.0694	0.0681	1.4
1.5	0.0668	0.0655	0.0643	0.0630	0.0618	0.0606	0.0594	0.0582	0.0571	0.0559	1.5
1.6	0.0548	0.0537	0.0526	0.0516	0.0505	0.0495	0.0485	0.0475	0.0465	0.0455	1.6
1.7	0.0446	0.0436	0.0427	0.0418	0.0409	0.0401	0.0392	0.0384	0.0375	0.0367	1.7
1.8	0.0359	0.0351	0.0344	0.0336	0.0329	0.0322	0.0314	0.0307	0.0301	0.0294	1.8
1.9	0.0287	0.0281	0.0274	0.0268	0.0262	0.0256	0.0250	0.0244	0.0239	0.0233	1.9
2.0	0.0228	0.0222	0.0217	0.0212	0.0207	0.0202	0.0197	0.0192	0.0188	0.0183	2.0
2.1	0.0179	0.0174	0.0170	0.0166	0.0162	0.0158	0.0154	0.0150	0.0146	0.0143	2.1
2.2	0.0139	0.0136	0.0132	0.0129	0.0125	0.0122	0.0119	0.0116	0.0113	0.0110	2.2
2.3	0.0107	0.0104	0.0102	0.0099	0.0096	0.0094	0.0091	0.0089	0.0087	0.0084	2.3
2.4	0.0082	0.0080	0.0078	0.0075	0.0073	0.0071	0.0069	0.0068	0.0066	0.0064	2.4
2.5	0.0062	0.0060	0.0059	0.0057	0.0055	0.0054	0.0052	0.0051	0.0049	0.0048	2.5
2.6	0.0047	0.0045	0.0044	0.0043	0.0041	0.0040	0.0039	0.0038	0.0037	0.0036	2.6
2.7	0.0035	0.0034	0.0033	0.0032	0.0031	0.0030	0.0029	0.0028	0.0027	0.0026	2.7
2.8	0.0026	0.0025	0.0024	0.0023	0.0023	0.0022	0.0021	0.0021	0.0020	0.0019	2.8
2.9	0.0019	0.0018	0.0018	0.0017	0.0016	0.0016	0.0015	0.0015	0.0014	0.0014	2.9
3.0	0.0013	0.0013	0.0013	0.0012	0.0012	0.0011	0.0011	0.0011	0.0010	0.0010	3.0
3.1	0.0010	0.0009	0.0009	0.0009	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0007	0.0007	3.1
3.2	0.0007	0.0007	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0005	0.0005	0.0005	3.2
3.3	0.0005	0.0005	0.0005	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0003	3.3
3.4	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	3.4
3.5	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	3.5
3.6	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	3.6
3.7	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	3.7
3.8	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	3.8