



UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THAYANE RABELO BRAGA FARIAS

EFEITO DO PLASMA FRIO NA QUALIDADE DE MAÇÃ E ARAÇÁ-BOI

FORTALEZA

2022

THAYANE RABELO BRAGA FARIAS

EFEITO DO PLASMA FRIO NA QUALIDADE DE MAÇÃ E ARAÇÁ-BOI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F238e Farias, Thayane Rabelo Braga.
Efeito do plasma frio na qualidade de maçã e araçá-boi / Thayane Rabelo Braga Farias. – 2022.
119 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes.

1. Qualidade nutricional. 2. Descarga de barreira dielétrica. 3. Plasma de descarga luminescente. I.
Título.

CDD 660

THAYANE RABELO BRAGA FARIAS

EFEITO DO PLASMA FRIO NA QUALIDADE DE MAÇÃ E ARAÇÁ-BOI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia química. Área de concentração: Processos químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 25/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
EMBRAPA - Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Elenilson de Godoy Alves Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Profa. Dra. Marciane Magnani
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A Deus.

Aos meus pais e ao meu esposo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes, pela excelente orientação, pelos esclarecimentos e a sua disponibilidade em sempre me ajudar, pela parceria e confiança no meu trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora Edy Sousa de Brito, Elenilson de Godoy Alves Filho, Pedro Henrique Campelo Felix e Marciane Magnani pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de doutorado e do laboratório, pela companhia, reflexões e sugestões recebidas.

Aos professores do departamento de Engenharia Química, pelos conhecimentos e excelentes conselhos para a vida profissional.

Ao meu esposo (Alison Nascimento Farias) por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial, pelo companheirismo e conforto com palavras de fé.

Aos amigos e familiares (principalmente meus pais) pelo o apoio e torcida de sempre.

A DEUS, a quem busco confiança e fé em todos os dias da minha vida. Sou imensamente grata a Ele por até aqui ter me ajudado.

*“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele,
e ele tudo fará”.*

Salmos 37.5

RESUMO

O plasma frio é uma alternativa aos métodos tradicionais de conservação térmica e se apresenta como uma técnica promissora para preservar e reter parâmetros de qualidade. Sendo assim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito de dois tipos de plasma frio (descarga de barreira dielétrica e descarga luminescente) sobre os aspectos qualitativos de maçã (cubo e suco) e araçá-boi (polpa). Foi avaliada a aplicação do plasma de descarga de barreira dielétrica (DBD) com diferentes frequências: 50, 200, 400, 600, e 900 Hz por 15 min para a maçã; e 10, 15 e 20 min para o araçá-boi, com aplicação do plasma de descarga luminescente com fluxo de gás entre 10 e 30 mL/min de 10 a 30 min. Os efeitos da aplicação do plasma na maçã foram avaliados na atividade enzimática (polifenoloxidase-PPO e peroxidase-POD), compostos fenólicos, capacidade antioxidante, colorimetria, concentração de açúcares e ácidos orgânicos. Para as polpas de araçá-boi, as análises avaliadas foram: vitamina C, peróxido de hidrogênio e perfil de compostos voláteis. A aplicação dos dois tipos de plasma foi capaz de inativar parcialmente as enzimas (PPO e POD) responsáveis pelo escurecimento, contribuiu para um aumento dos fenólicos e da atividade antioxidante. O plasma DBD induziu um maior aumento do conteúdo fenólico do que o plasma de descarga luminescente. A frequência de excitação de 50 Hz proporcionou um suco de maçã com o maior conteúdo fenólico total e capacidade antioxidante. As alterações nos parâmetros de cor não comprometeram a qualidade do produto. A aplicação de plasma de descarga luminescente induziu a redução do teor de sacarose e o aumento da glicose, frutose e ácido málico, diferente do plasma de barreira dielétrica, que induziu a redução de açúcar e o aumento do teor de ácido málico. A tecnologia de plasma frio hidrolisou a sacarose em glicose e frutose por clivagem na ligação éter. O plasma DBD induziu ainda mais o consumo de glicose e frutose, provavelmente através do mecanismo fenilpropanoide. Com isso, a tecnologia de plasma frio poderia ser utilizada para modular as características sensoriais dos produtos de maçã, alterando tanto a doçura como a relação açúcar-ácido. Para o araçá-boi, a partir das condições de processo estudadas, foi observado que o plasma aumentou o teor de vitamina C, reduziu o teor de peróxido de hidrogênio e influenciou na modificação dos compostos voláteis. Portanto, o plasma frio pode ser utilizado como uma técnica para preservação e retenção dos parâmetros de qualidade de frutas estudadas, a partir de condições de processo avaliadas para alcançar os objetivos específicos.

Palavras-chave: Qualidade nutricional; Descarga de barreira dielétrica; Plasma de descarga luminescente.

ABSTRACT

Cold plasma is an alternative to traditional methods of thermal conservation and presents itself as a promising technique to preserve and retain quality parameters. Thus, the objective of this study is to evaluate the effect of two types of cold plasma (dielectric barrier discharge and glow discharge) on the qualitative aspects of apple (cube and juice) and guava (pulp). The application of dielectric barrier discharge (DBD) plasma at different frequencies: 50, 200, 400, 600, and 900 Hz for 15 min was evaluated for apple and 10, 15, and 20 min for guava, with the application of glow discharge plasma with gas flow rate between 10 and 30 mL/min for 10 to 30 min. The effects of plasma application on apple were evaluated on enzyme activity (polyphenoloxidase-PPO and peroxidase-POD), phenolic compounds, antioxidant capacity, colorimetry, concentration of sugars and organic acids. For the araçá-boi pulp the analyses evaluated were: vitamin C, hydrogen peroxide and volatile compounds profile. The application of the two types of plasma was able to partially inactivate the enzymes (PPO and POD) responsible for browning, contributed to an increase in phenolics and antioxidant activity. The DBD plasma induced a greater increase in phenolic content than the glow discharge plasma. The 50 Hz excitation frequency provided apple juice with the highest total phenolic content and antioxidant capacity. The changes in color parameters did not compromise the quality of the product. The application of glow discharge plasma induced a decrease in sucrose content and an increase in glucose, fructose and malic acid, unlike the dielectric barrier plasma which induced a decrease in sugar and an increase in malic acid content. The cold plasma technology hydrolyzed sucrose into glucose and fructose by cleavage at the ether bond. DBD plasma further induced the consumption of glucose and fructose, most likely through the phenylpropanoid mechanism. With this the cold plasma technology could be used to modulate the sensory characteristics of apple products by altering both sweetness and sugar-acid ratio. For guava, from process conditions studied it was observed that plasma increased the vitamin C content, reduced the hydrogen peroxide content and influenced the modification of volatile compounds. Therefore, cold plasma can be used as a technique for preservation and retention of quality parameters of studied fruits, from process conditions evaluated to achieve the specific objectives.

Key-words: Nutritional quality; Dielectric barrier discharge; Glow discharge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Fruto (araçá-boi)	30
Figura 2	- Esquema do plasma de descarga de barreira dielétrica (a) e plasma de descarga luminescente (b).....	31
Figura 3	- Efeito do processamento de plasma DBD em diferentes frequências de excitação na capacidade antioxidante de cubos de maçã (a) e suco de maçã (b).....	54
Figura 4	- Espectro de RMN de ¹ H do suco de maçã não processado (amostra controle) com os compostos identificados.....	64
Figura 5	- Decomposição da sacarose em glicose e frutose.....	67
Figura 6	- Caminho de produção do malato citosólico.....	69
Figura 7	- Escores de PC1 × PC2 das amostras de suco de maçã controle (não processado) ilustradas na cor preta, suco de maçã submetido ao plasma de descarga luminescente em verde, suco de maçã submetido a barreira dielétrica de descarga de plasma em azul (a) gráfico de pesos com os compostos relevantes para discriminação de amostras (b).....	70
Figura 8	- Escores de PC1 × PC2 das amostras de suco de maçã controle (não processado) ilustradas na cor preta, cubos de maçã submetidos a barreira dielétrica de descarga de plasma em cores (a) gráfico de pesos com os compostos relevantes para discriminação de amostras (b).....	72
Figura 9	- Escores de PC1 × PC2 das amostras de suco de maçã controle (não processado) ilustradas na cor preta, suco de maçã submetido a plasma de descarga de brilho em verde, suco de maçã submetido a plasma de descarga de barreira dielétrica em azul, e cubos de maçã submetido a plasma de descarga de barreira dielétrica em vermelho (a); gráfico de pesos com os compostos relevantes para discriminação das amostras (b).....	73

Figura 10	- Atividade enzimática PPO e POD no suco de maçã submetido a barreira dielétrica de descarga de plasma operando a diferentes frequências de excitação (a, b), e a descarga de plasma luminescente em diferentes condições de funcionamento (c, b)	92
Figura 11	- Teor fenólico total em suco de maçã sujeito a barreira dielétrica de descarga de plasma operando a diferentes frequências de excitação (a), e ao plasma de descarga luminescente em diferentes condições de funcionamento (b).....	95
Figura 12	- Capacidade antioxidante do suco de maçã sujeito a barreira dielétrica de descarga de plasma operando a diferentes frequências de excitação (a), e ao plasma de descarga luminescente em diferentes condições de funcionamento (b), medida pelo método DPPH.....	96
Figura 13	- Concentração de Vitamina C das amostras da polpa do araçá-boi submetidas ao tratamento com plasma frio DBD em diferentes frequências (50, 200, 400, 600 e 800 Hz) e tempos (10, 20 e 30 min) e amostra controle (sem tratamento)	105
Figura 14	- Concentração de vitamina C das amostras da polpa do araçá-boi submetidas ao tratamento com plasma de descarga luminescente em diferentes fluxos de gás (10, 20 e 30/mL) e tempos (10, 20 e 30 min) e amostra controle (sem tratamento)	106
Figura 15	- <i>Heat map</i> a partir do efeito do plasma frio (DBD e descarga luminescente) sobre os compostos presentes na polpa de araçá-boi.....	109
Figura 16	- <i>Heat map</i> a partir do efeito do plasma frio (DBD e descarga luminescente) sobre os compostos voláteis presentes na polpa de araçá-boi.....	110

Figura 17	-Concentração de peróxido de hidrogênio das amostras da polpa do arará-boi submetidas ao tratamento com plasma frio DBD em diferentes frequências (50, 200, 400, 600 e 800 Hz) e tempos (10, 20 e 30 min) e amostra controle (sem tratamento)	111
Figura 18	-Concentração de peróxido de hidrogênio das amostras da polpa do arará-boi submetidas ao tratamento com plasma de descarga luminescente em diferentes fluxos de gás (10, 20 e 30/mL) e tempos (10, 20 e 30 min) e amostra controle (sem tratamento)	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade PPO e POD para os cubos de maçã e suco de maçã não tratados e tratados com plasma	50
Tabela 2 – Conteúdo fenólico total dos cubos de maçã e suco de maçã não tratados e tratados com plasma	53
Tabela 3 – Parâmetros de cor do CIELab para os cubos de maçã e suco de maçã não tratados e tratados com plasma.....	55
Tabela 4 – Concentração de frutose, glucose, sacarose e ácido málico dos produtos de maçã não tratados e tratados com plasma.....	66
Tabela 5 – Concentração total de açúcar da frutose, poder adoçante e relação açúcar-ácido.....	75
Tabela 6 – Concentração de vitamina C e peróxido de hidrogênio da polpa do araçá-boi sem tratamento e com tratamento de plasma frio (DBD e descarga luminescente)	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UHT	<i>Ultra high temperature</i>
O ₂	Oxigênio
N ₂	Nitrogênio
UV	Ultravioleta
pH	Potencial hidrogeniônico
DBD	Descarga de barreira dielétrica
PPO	Polifenoloxidase
POD	Peroxidase
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil´
ORAC	capacidade de absorção de radical de oxigênio
FRAP	<i>Ferric reducing antioxidant power</i>
NADP	Núcleo de análises e desenvolvimentos de processos
Hz	Hertz
Kv	Quilovolt
nm	Nanômetros
NMR	Ressonância magnética nuclear
PCA	Análise de componentes principais
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

LISTA DE SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Métodos de conservação térmicos e não térmicos	20
2.2 Plasma Frio	21
2.3 Efeito do plasma nos aspectos de qualidade de alimentos	23
2.3.1 <i>Enzimas</i>	23
2.3.2 <i>Cor</i>	24
2.3.3 <i>Antioxidantes</i>	25
2.3.4 <i>Compostos fenólicos</i>	26
2.3.5 <i>Vitamina C</i>	27
2.3.6 <i>Açúcares</i>	28
2.3.7 <i>Sabor e aroma</i>	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Materiais	30
3.2 Processamento com o plasma frio	31
3.2.1 <i>Plasma de descarga de barreira dielétrica</i>	31
3.2.2 <i>Plasma de descarga luminescente</i>	32
3.3 Análises bioquímicas, químicas e físicas	32
3.3.1 <i>Atividade enzimática (polifenoloxidase)</i>	32
3.3.2 <i>Atividade enzimática (peroxidase)</i>	33
3.3.3 <i>Compostos fenólicos</i>	33
3.3.4 <i>Capacidade antioxidante</i>	33
3.3.5 <i>Colorimetria</i>	34
3.3.6 <i>Peróxido de hidrogênio</i>	34
3.3.7 <i>Vitamina C</i>	35
3.3.8 <i>Perfil de compostos orgânicos voláteis por cromatografia gasosa</i>	35
3.3.9 <i>Determinação de açúcares e ácidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	36
3.3.11 <i>Poder adoçante</i>	37
3.3.12 <i>Análise estatística</i>	37
3.3.12.1 <i>Análise estatística multivariada dos dados adquiridos por RMN de ¹H</i>	37
3.3.12.2 <i>Análise de variância</i>	38
3.3.12.3 <i>Mapa de calor (heat map)</i>	38
REFERÊNCIAS	39
4 EFFECT OF DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE PLASMA EXCITATION	

FREQUENCY ON THE ENZYMATIC ACTIVITY, ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC CONTENT OF APPLE CUBES AND APPLE JUICE.....	49
5 NMR EVALUATION OF APPLE CUBES AND APPLE JUICE COMPOSITION SUBJECTED TO TWO COLD PLASMA TECHNOLOGIES.....	61
6 COMPARATIVE STUDY OF TWO COLD PLASMA TECHNOLOGIES ON THE ENZYMATIC ACTIVITY, ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC CONTENT OF APPLE JUICE.....	90
7 EFEITO DO PLASMA FRIO NO PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E QUALIDADE DA POLPA DO ARAÇÁ-BOI	102
APÊNDICE A- PERFIL DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS.....	117
APÊNDICE A- PERFIL DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS.....	119
8 CONCLUSÃO.....	119

1 INTRODUÇÃO

As frutas são fontes de componentes essenciais à manutenção da vida, desempenhando um importante papel na dieta do ser humano, com evidências de benefícios associados ao seu consumo devido às suas propriedades (ABADIAS *et al.*, 2008; BERGER *et al.*, 2010). Por isso, o seu consumo é recomendado por organizações como Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO).

O Brasil está entre os três maiores produtores de frutas, e a maioria das suas produções é destinada ao mercado interno¹. Dentre elas, a maçã (*Malus domestica*) ganha destaque, pois está entre as dez frutas mais produzidas no país e mais consumidas no mundo (ANDRADE, 2020; BUENO *et al.*, 2021).

Assim, do volume total produzido da safra de maçã, cerca de 20% a 25% são destinados à produção de sucos. Desde então, a industrialização vem ganhando espaço para a produção de diversos produtos à base de maçã, o que está relacionado a uma tendência em busca de uma alimentação mais saudável (KIST *et al.*, 2019). As maçãs são fontes de fibra, compostos bioativos como vitaminas e compostos fenólicos de diferentes classes que apresentam propriedades antioxidantes e que são capazes de proteger o corpo humano dos radicais livres e de algumas doenças (HYSON, 2011).

Nesse contexto, os consumidores estão em busca de sucos de frutas com aparência mais natural, sabor fresco e menos conservantes. Sendo assim, a manutenção da qualidade do produto é um desafio para a indústria, sabendo que a cor e o sabor são indicadores importantes para o suco de maçã processado (YI *et al.*, 2017), como também a relação açúcar-ácido, que está associada, principalmente, ao sabor do suco (LÓPEZ *et al.*, 2007).

O Brasil também se destaca por possuir diversas variedades de frutas exóticas, dentre elas o araçá-boi (*eugenia stipitata*), que é um fruto da região amazônica que apresenta importantes compostos nutricionais e funcionais, já que é rico em vitaminas, fibras, antioxidantes (carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos) e compostos voláteis (ARAÚJO *et al.*, 2019; NERI-NUMA *et al.*, 2013).

Em relação às características físicas e sensoriais, o fruto é arredondado, cor amarelo-claro e com polpa carnuda e suculenta, de aromas agradáveis, porém, com caráter ácido o que

¹ Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 19 julho. 2021.

limita o consumo *in natura* (ARAÚJO *et al.*, 2019; NERI-NUMA *et al.*, 2013), sendo, então, considerado uma alternativa para a formulação de sucos, geleias, doces e sorvetes (NEVES *et al.*, 2015).

Para a conservação desses produtos alimentícios, redução de deterioração e fornecimento contínuo ao longo do ano, tecnologias de preservação são estudadas, uma das mais utilizadas (principalmente para sucos) para inativar micro-organismos e enzimas é o tratamento térmico (por meio de processos de pasteurização ou esterilização) (MISRA *et al.*, 2014a). Porém, o uso do calor pode alterar alguns parâmetros de qualidade, como sabor, aroma, cor e valor nutricional desses produtos, uma vez que possuem componentes termossensíveis, como vitaminas e pigmentos (WANG *et al.*, 2012; MISRA *et al.*, 2014a).

Nos últimos anos, algumas técnicas não térmicas têm sido estudadas para substituir os métodos convencionais de conservação que utilizam o calor. Dentre elas, tem-se o plasma frio, que consiste em submeter a matriz alimentar a um gás ionizado composto por partículas (íons, elétrons, fótons e radicais livres) produzidas a partir de uma descarga elétrica, que é responsável por iniciar inúmeras reações químicas de significativa importância (RAMAZZINA *et al.*, 2015). É um tratamento realizado a baixas temperaturas, que evita os efeitos negativos do calor, além de contribuir para a preservação das características sensoriais dos produtos (HERCEG *et al.*, 2016), processo de descontaminação de alimentos e segurança microbiológica (MISRA *et al.*, 2014a).

Quando comparados aos métodos térmicos convencionais, o processamento com o plasma frio apresenta algumas vantagens, como: baixas temperaturas, processo operacional com baixo custo, aplicação para uma grande variedade de produtos (ZIUZINA *et al.*, 2013), aumento da vida útil (SUROWSKY *et al.*, 2015), inativação de enzimas e minimização da perda do valor nutritivo (MISRA *et al.*, 2014b).

O plasma frio pode ser produzido sob condições de pressão atmosférica ou vácuo, com alguns tipos de configurações de equipamentos no que diz respeito à forma de geração de energia. No processamento de plasma de descarga luminescente, um fluxo de gás é produzido e distribuído em uma câmara que pode lidar com um grande número de amostras e com condições de baixas pressões. Para o plasma com descarga de barreira dielétrica à pressão atmosférica, diversas espécies reativas são geradas, que podem causar alterações na matriz alimentar (ALVES FILHO *et al.*, 2016; NIEMIRA, 2012).

Nesse sentido, os efeitos do processamento com o plasma frio podem ser influenciados pelo tipo de equipamento, tempo de tratamento, gás de alimentação, fluxo de gás e tensões aplicadas (MIR *et al.*, 2016). Portanto, estudos estão sendo avaliados para verificar se

o impacto é positivo ou negativo na qualidade dos produtos agrícolas (KOVAČEVIĆ *et al.*, 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito de dois tipos de plasma frio (descarga de barreira dielétrica e descarga luminescente) sobre os aspectos qualitativos (atividade enzimática, capacidade antioxidante, compostos fenólicos, cor) da maçã e identificar seus principais compostos (açúcares e ácidos). Da mesma forma, avaliar os efeitos dos dois tipos de plasma frio para a polpa do araçá-boi na concentração de vitamina C, peróxido de hidrogênio e caracterizar o perfil de compostos orgânicos voláteis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Métodos de conservação térmicos e não térmicos

O tratamento térmico (UHT – *Ultra high temperature* e pasteurização) é um dos métodos de conservação mais empregados em alimentos com a finalidade de inativar enzimas endógenas e micro-organismos patogênicos e deteriorantes que podem afetar a segurança e a qualidade do produto (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; CASSANI *et al.*, 2016; SUCUPIRA *et al.*, 2017). Como também atuar no aumento da vida útil, principalmente nos períodos de entressafra de frutas nas indústrias de processamento de polpas e sucos comerciais (MISRA *et al.*, 2016).

Contudo, a aplicação de calor pode alterar as características sensoriais (redução de frescor, alteração na cor e no sabor) e causar perdas nutricionais desses produtos (DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2014). Portanto, para atender as necessidades dos consumidores que estão em busca de alimentos mais saudáveis e mais próximos ao natural, assim como apresentar características de bem-estar, prazer e praticidade, novas tecnologias vêm ganhando espaço a fim de preservar os atributos sensoriais e garantir a segurança alimentar (DJEKIC *et al.*, 2018; JERMANN *et al.*, 2015).

As tecnologias não térmicas surgem para substituir o processamento térmico com o objetivo, também, de reter os compostos (antioxidantes, vitaminas, pigmentos e compostos voláteis), que podem sofrer danos pelo calor, reduzindo, com isso, a degradação e mantendo a qualidade nutricional (PUTNIK *et al.*, 2019). Além disso, essas novas tecnologias podem alterar a qualidade sensorial (sabor, aroma, textura e cor) e nutricional de forma positiva devido a reações químicas que ocorrem, levando em consideração a matriz alimentar e as condições de processo (ALVES FILHO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2016; HERCEG *et al.*, 2016).

Os processos não térmicos em destaque são: alta pressão hidrostática, campo elétrico, ozônio, luz ultravioleta, ultrassom e plasma frio (FARKAS, 2016). Tais processos vêm sendo aplicados em diversas matrizes alimentares (frutas, hortaliças, cereais e seus derivados) e as pesquisas investigam o efeito sobre as propriedades reológicas, sensoriais, nutricionais e microbiológicas (DJEKIC *et al.*, 2018; MEHTA *et al.*, 2019). Portanto, essas tecnologias emergentes têm o desafio de manter a qualidade dos produtos, já que o processamento térmico tradicional causa impactos negativos (DJEKIC *et al.*, 2018).

2.2 Plasma Frio

A tecnologia não térmica do plasma frio vem sendo estudada no processamento de alimentos, já que temperaturas baixas (aproximadamente 30 °C) não danificam os nutrientes. O plasma frio é produzido em baixos níveis de pressão e potência, sem um equilíbrio termodinâmico da energia liberada entre as partículas constituintes (NIEMIRA, 2012).

Além disso, o plasma é definido como o quarto estado da matéria que exibe comportamento diferente dos outros estados (sólido, líquido e gasoso) e é considerado como um gás neutro, ionizado ou parcialmente ionizado. Sendo assim, campos elétricos e magnéticos influenciam o gás, que passa a ser um condutor elétrico e causa uma descarga elétrica (EKEZIE *et al.*, 2017; NIEMIRA, 2012).

Em vista disso, o gás dá origem a diversas partículas e moléculas: radicais de hidrogênio e hidroxila, radicais livres, elétrons livres, íons positivos e negativos, fótons de UV, moléculas excitadas (exemplos: O₂ e N₂) e não excitadas (exemplo: ozônio) (NIEMIRA; GUTSOL, 2011). Essas partículas carregadas sofrem colisões, assim interagem com os micro-organismos e com o substrato alimentar (PANKAJ *et al.*, 2013) levando a diversas reações químicas, dentre elas: isomerização, cisão, hidrogenação, hidrólise, dimerização, oxidação, desamidação, nitração, sulfoxidação, desidrogenação e/ou hidroxilação de aminoácidos (TAKAI *et al.*, 2014).

No âmbito alimentício, o plasma frio é considerado uma tecnologia emergente para conservação e descontaminação, bem como em aplicações para inativar enzimas, modificar embalagens de alimentos, remover toxinas e tratar águas residuais (GANESAN *et al.*, 2021; PANKAJ *et al.*, 2018).

O plasma frio, em particular, apresenta vantagens, como: eficiência na inativação microbiana; redução nas perdas de processamento; aumento da vida de prateleira de produtos *in natura* e processados; maior segurança química do alimento; retenção e melhoria na qualidade (propriedades físico-químicas, nutricionais, sensoriais e compostos bioativos) em alguns produtos alimentícios; bem como beneficia a questão de sustentabilidade ambiental, por ser uma tecnologia que não deixa resíduos (GANESAN *et al.*, 2021; KEENER; MISRA, 2016).

Porém, essas melhorias e modificações dependem de alguns fatores que influenciam as reações na matriz alimentar, como: a forma de energia para a geração do plasma, o tipo de equipamento e o processamento que envolve o tipo e o fluxo do gás, pressão, tensão, frequência e tempo (OLIVEIRA *et al.*, 2018; PANKAJ *et al.*, 2018; PÉREZ-ANDRÉS *et al.*, 2018; ZIUZINA *et al.*, 2013).

A eficácia do plasma vai ser determinada por outros fatores além das variáveis do processo, que são os parâmetros intrínsecos da natureza da matriz do alimento (tipo, umidade, pH) e a sua forma (sólido ou líquido), já que a interação com as espécies reativas ocorre de formas diferentes e também a concentração dessas espécies formadas (EKEZIE *et al.*, 2017; MURANYI, WUNDERLICH; HEISE, 2008).

O gerador de plasma opera à pressão atmosférica (sem necessidade de câmara para manter a pressão) ou à baixa pressão. O gás usado para ser ionizado pode ser: ar sintético, Nitrogênio, Hélio, Argônio ou misturas de gases (NIEMIRA, 2012). Além disso, a descarga de plasma é formada por alguns meios (tipos de energia que ionizam o gás): descarga de barreira dielétrica (DBD), jatos de plasma, descargas de corona, descargas por micro-ondas, descarga de brilho uniforme (luminescente) e descarga de radiofrequência (EKEZIE *et al.*, 2017; NIEMIRA, 2012).

A forma de geração do plasma DBD ocorre entre dois eletrodos que possuem diferença de potencial, os quais estão separados por uma ou mais barreiras dielétricas (MISRA *et al.*, 2015; PANKAJ *et al.*, 2013). Essas barreiras (podem ser materiais isolantes, como o plástico) são fundamentais para limitar a corrente da descarga, evitando a transição do arco para o ambiente, favorecendo, assim, a formação de um grande número de microdescargas para um tratamento homogêneo (TENDERO *et al.*, 2006).

Esse tipo de geração de plasma possibilita diferentes geometrias de eletrodos e uma variedade de gases pode ser utilizada quando se compara com outras configurações. Para tanto, alguns parâmetros importantes devem ser levados em consideração durante o processo, como: o gás utilizado, a operação elétrica da descarga e a distância entre os eletrodos (EHLBECK *et al.*, 2011; MISRA *et al.*, 2015).

Para o plasma de descarga luminescente a partir de radiofrequência à baixa pressão, uma corrente de gás é produzida entre dois eletrodos e entregue em uma câmara de vácuo onde se encontram as amostras. É um tipo de equipamento que permite o controle das taxas de fluxo de gás, a composição do gás usado e o tempo de contato (NIEMIRA, 2012).

O fluxo de gás é fundamental, pois ele determina a velocidade que as espécies reativas são levadas para o local de destino, sabendo que algumas dessas apresentam vida curta. Portanto, o controle do fluxo, o tempo e a frequência podem melhorar a eficiência do processo (NISHIME *et al.*, 2017). O que também pode influenciar é o tipo de equipamento, já que podem haver variações para o comportamento e concentração das espécies reativas formadas. Por exemplo: no plasma de descarga luminescente as taxas de colisões entre os elétrons e outras

moléculas presentes são menores do que do plasma à pressão atmosférica (MISRA *et al.*, 2011; NIEMIRA, 2012).

Sendo assim, a pesquisa com o plasma frio na área de qualidade de alimentos vem sendo estudada nos últimos anos pelo grupo de pesquisa do laboratório NADP (Núcleo de análises e desenvolvimentos de processos) da Engenharia Química na UFC, com responsabilidade do professor Fabiano André Narciso Fernandes juntamente com outros parceiros. No qual diversos estudos já foram divulgados no meio científico em relação aos resultados inovadores desta tecnologia e esta tese também contribui de forma relevante.

2.3 Efeito do plasma nos aspectos de qualidade de alimentos

Os impactos nos componentes e nas propriedades dos alimentos que afetam a qualidade estão sendo estudados para verificar se o plasma frio é uma alternativa promissora para substituir os tratamentos térmicos.

2.3.1 Enzimas

A inativação de enzimas em produtos alimentícios pela aplicação do plasma frio tem sido estudada, já que a redução da atividade enzimática pode evitar o escurecimento e problemas no processamento e armazenamento desses produtos. As principais enzimas endógenas responsáveis pelo escurecimento são: PPO (polifenoloxidase) e POD (peroxidase) (THIRUMDAS *et al.*, 2015).

Com a aplicação do plasma com presença de campos elétricos e geração de espécies reativas, ocorre uma interação com os aminoácidos, que impede as enzimas de atuarem em seus substratos e/ou nas coenzimas de ligação, causando uma catálise devido às alterações de conformação em torno do centro ativo (RODACKA *et al.*, 2016; THIRUMDAS; ANNAPURE, 2020).

A exposição das proteínas a esses radicais leva a diversas mudanças químicas e físicas: clivagem e desdobramentos de algumas ligações, oxidação de grupos de cadeia lateral, mudanças na conformação e hidrofobicidade (HEADLAM *et al.*, 2006), induz modificações nas cadeias laterais e leva à perda da estrutura secundária das enzimas (perda da folha β e α – hélice, devido ela possuir um forte momento dipolo) (LI *et al.*, 2014; SEGAT *et al.*, 2016; SUROWSKY *et al.*, 2013).

Além disso, alguns fatores desempenham um papel importante na inativação enzimática: o tipo de enzima/proteína, tipo de plasma, gás, frequência, potência e outros parâmetros de processamento. Como mostraram Surowsky *et al.* (2013), no estudo com o uso de argônio combinado com diferentes concentrações de oxigênio no plasma, que constataram melhores efeitos de inativação enzimática do que com apenas o oxigênio puro em diferentes alimentos.

O tempo de processamento também foi significativo para Khani *et al.* (2017), que observaram que o plasma causou inativação da peroxidase do tomate em mais de 90%; já para Illera *et al.* (2019), em análise de sucos de maçã, houve uma redução significativa da atividade da enzima PPO com o aumento do tempo de processo.

Outro alimento estudado também para avaliar o efeito do plasma com diferentes tensões, tempos e frequências foi a água de coco verde. Constatou-se que a frequência foi o parâmetro mais importante para reduzir a peroxidase, exceto em frequências mais altas (PORTO *et al.*, 2020). Comportamento similar ocorreu com o suco de camu-camu, no qual diferentes frequências foram testadas e, na maioria, observou-se um aumento na inativação das enzimas PPO e POD, com exceção para a maior frequência (960 Hz) que favoreceu a concentração de enzima por liberação intracelular desta (DE CASTRO *et al.*, 2020).

Embora a inativação enzimática por plasma frio esteja sendo estudada e comprovada, é fundamental entender o mecanismo de interação que ocorre para que se possa otimizar os parâmetros de processamento (ATTRI *et al.*, 2015).

2.3.2 Cor

A cor é um importante atributo dentre as preferências do consumidor, sendo assim considerada como um parâmetro de controle de qualidade pela indústria. Dessa forma, qualquer alteração indesejável durante o processamento pode comprometer a aceitabilidade por parte dos consumidores (BARBA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2012). A formação da cor e a sua aparência notável nos produtos alimentícios se deve à presença de pigmentos que podem ser naturais ou sintéticos e por meio de reações químicas de origem enzimática ou não (PANKAJ *et al.*, 2008).

Diversos estudos relataram os efeitos da aplicação do plasma frio na cor de vegetais. Exemplo disso é o trabalho de Kovačević *et al.* (2016) com suco de romã, no qual observaram que o fluxo de gás do plasma frio influenciou na mudança de cor do suco (cor mais clara) e o aumento desse fluxo aumentou o teor de pigmento (antocianina), o que explica a mudança de

cor.

Um outro fator que também pode influenciar é o tempo de processamento, como afirma Pankaj *et al.*(2017), que trabalharam com suco de maçã e mostraram que o maior tempo de exposição teve efeito mais significativo na mudança de cor. Wang *et al.*(2020), também trabalhando com aplicação de plasma em suco de maçã, observaram cor mais clara e mais amarela, e explicam que essa mudança está relacionada com as reações de oxidação e isomerização de pigmentos.

Fernandes *et al.* (2019) observaram, em suco de acerola submetido ao tratamento com o plasma, uma cor mais clara, resultado do aumento de carotenoides, no entanto, parâmetros de matiz, luminosidade e croma não apresentaram mudanças significativas. Conforme o que ocorreu no suco de tomate, após a aplicação do plasma houve uma mudança na cor, mas não foi significativa, comportamento que pode ser explicado pela degradação de pigmentos carotenoides (ALI *et al.*, 2021).

De forma geral, o plasma frio é eficaz na manutenção da cor de sucos e frutas. As mudanças que ocorrem se devem à degradação de pigmentos, reações químicas e enzimáticas, bem como outros fatores relacionados à matriz alimentar, se é líquido ou sólido, condições de armazenamento e parâmetros de processamento do plasma (gás, potência, frequência e tempo) (MISRA *et al.*, 2016; PANKAJ *et al.*, 2018).

2.3.3 Antioxidantes

Os antioxidantes atuam na qualidade dos alimentos, já que são compostos que combatem os radicais livres (responsáveis por infecções e doenças) e previnem os vegetais de oxidações. Alguns dos compostos antioxidantes são: vitamina C, vitamina E, compostos fenólicos e carotenoides (PANKAJ; WAN; KEENER, 2018).

Para avaliar o potencial antioxidante, métodos são realizados, como: atividade de eliminação de radicais: Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), poder antioxidante de redução de ferro (FRAP) e capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC) (ALI *et al.*, 2020; PANKAJ *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2012).

Pesquisas para determinar a capacidade antioxidante nos alimentos tratados com o plasma estão sendo realizadas para verificar a vantagem dessa tecnologia. Assim, estudos mostraram uma relação direta da concentração de antioxidantes e compostos fenólicos, como

foi verificado no suco de laranja e suco de acerola submetidos ao tratamento com o plasma (ALMEIDA *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2019). Conforme a quantidade de fenólicos no suco era reduzida, o potencial antioxidante também era. Essa diminuição da atividade antioxidante pode ser devido à redução dos fenólicos por reação com espécies reativas de oxigênio e perda da vitamina C (SRUTHI *et al.*, 2021).

O contrário também pode ser relatado por Rodríguez *et al.* (2017) no suco de caju, com um aumento de fenólicos e de antioxidantes quando exposições por períodos menores ao plasma foram utilizadas. Dessa forma, alguns fatores (tipo de alimento, fonte de geração do plasma, modo e tempo de exposição) têm que ser levados em consideração para que o tratamento com o plasma seja eficaz em manter ou aumentar os antioxidantes (MISRA, 2016; PANKAJ; WAN; KEENER, 2018).

2.3.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são componentes encontrados em vegetais que atuam de forma benéfica, sendo considerados compostos bioativos, com potencial antioxidante e associados à saúde devido ao seu efeito positivo no combate a doenças (PARR; BOLWELL, 2000). Dessa forma, estudos mostraram que a ingestão de alimentos com esses componentes ajuda na redução de câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (BAZZANO *et al.*, 2008). Eles atuam, também, na proteção dos alimentos contra os radicais livres e manutenção da qualidade, além de possuírem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (SRUTHI *et al.*, 2021).

Os fenólicos são definidos como metabólitos secundários e consistem em um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, com estrutura variando de simples a polímeros de alta massa molecular (GOMES-MAQUEO, 2018). Dentre os diversos tipos de compostos fenólicos existentes, pesquisas com a maçã apresentaram diferenças significativas conforme a variedade da fruta e dos diferentes compostos presentes, como: flavonóis (quercetina), antocianinas, ácidos fenólicos e flavan-3-ols (catequinas e procianidinas) (CEYMANN *et al.*, 2012; MINNOCCI *et al.*, 2010).

Tecnologias inovadoras, como o plasma frio, estão sendo estudadas para verificar o efeito da sua aplicação no teor de compostos fenólicos. Gomes-Maqueo *et al.* (2020) apontam que essa tecnologia pode aumentar o conteúdo dos fenólicos, promovendo a liberação dos compostos ligados durante o processamento e induzir a síntese deles pela ativação da via fenilpropanoide durante o armazenamento, como mostrado no estudo de Illera *et al.* (2019) com

suco de maçã (aumento de 69 e 64% dos compostos fenólicos após 4 e 5 min de tratamento, respectivamente).

Outros estudos também apresentam resultados benéficos a partir de um aumento na concentração dos compostos fenólicos. De acordo com Rodríguez *et al.* (2017), em suco de caju, constataram que os fenólicos aumentaram com a utilização da menor taxa de fluxo de gás do plasma. Do mesmo modo, no suco de mirtilo, Hou *et al.* (2019) observaram aumento desses compostos com maiores tempos de tratamento e concentrações de oxigênio. Sobretudo, o aumento dos fenólicos podem ser devido às rupturas e despolimerização na parede celular do vegetal com a ação do plasma, liberando-os para fora da célula vegetal (LANDBO; MEYER, 2001).

No entanto, estudos apontaram a redução dos fenólicos. Em suco de acerola e suco de cereja, o conteúdo desses compostos foram diminuídos conforme aumentava o tempo de processamento com o plasma (GAROFULIC *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2019). Do mesmo modo, a exposição do plasma, de forma direta e indireta, em apenas algumas condições de processo, levaram à redução dos fenólicos em suco de laranja prebiótico (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Dado o exposto, a degradação dos compostos fenólicos pode ser devido à reação com as espécies reativas de oxigênio e espécies iônicas geradas no plasma que levam à oxidação (GAROFULIC *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2019). Além disso, os fenólicos são sensíveis ao ataque de ozônio formado em algumas condições pelo plasma e que podem degradar o anel aromático (PEREZ *et al.*, 2002).

2.3.5 Vitamina C

O ácido ascórbico (conhecido como vitamina C) é considerado como ingrediente funcional em alimentos, já que apresenta atividade antioxidante, função protetora contra doenças coronárias, ajudando, assim, no combate aos radicais livres e algumas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de ser um dos parâmetros fundamentais para definir a qualidade nutricional na indústria de sucos (WAGHMARE, 2021).

Apresenta características como: solubilidade em água, é termolábil e instável em algumas condições de processamento (SILVEIRA *et al.*, 2019). Portanto, investigações se concentram em verificar as modificações na concentração de vitamina C induzidas pelo plasma frio. Alguns estudos relataram que não houve a redução do conteúdo do ácido ascórbico após o

tratamento com o plasma frio, como afirmam Ramazzina *et al.* (2015), trabalhando com kiwi; Shi *et al.* (2011), analisando suco de laranja; Fernandes *et al.* (2019), estudando suco de acerola; e Paixão *et al.* (2019), com suco de seriguela.

Além disso, melhorias podem ainda ser observadas, como o ocorrido com o teor de ácido ascórbico de suco de caju tratado com plasma frio (descarga luminescente) em uma condição específica (fluxo de N₂ de 10 mL/min durante 5 e 10 min), no qual a sua concentração foi superior à amostra-controle (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). Do mesmo modo, frutos de mirtilo apresentaram maiores concentrações de ácido ascórbico quando submetidos ao plasma frio (descarga de barreira dielétrica) (DONG; YANG, 2019).

O aumento da vitamina C pode estar relacionado à ativação da enzima desidroascorbato redutase. O ácido ascórbico sofre oxidação e forma a molécula de ácido desidroascórbico e esta é naturalmente convertida de volta em ácido ascórbico devido à ação da enzima desidroascorbato redutase por meio do ciclo ascorbato-glutationa (NOCTOR; FOYER, 1998).

Uma das espécies reativas formadas pelo plasma frio é o óxido nítrico (LIU *et al.*, 2017). Sabendo que esta molécula pode regular o ciclo ascorbato-glutationa e aumentar a atividade da enzima (desidroascorbato redutase) (SUN *et al.*, 2015), pode ocorrer, conseqüentemente, um aumento na concentração de vitamina C, como explicado por Rodríguez *et al.* (2017), em condições testadas com baixas taxas de fluxo de plasma, já que a ocorrência desse ciclo é maior do que a decomposição do ácido ascórbico.

Contudo, em algumas condições de processamento, o conteúdo de ácido ascórbico foi reduzido à medida que houve o aumento do tempo de aplicação no plasma frio, como mostrado no estudo de Xu *et al.* (2017) com suco de laranja e Hou *et al.* (2019) com suco de mirtilo. Do mesmo modo, foi observada uma pequena redução da vitamina C em suco de tomate, mas não sendo consideradas diferenças significativas em relação ao controle.

A redução no conteúdo de ácido ascórbico está relacionada ao efeito oxidativo das espécies formadas pelo plasma e sua radiação (WANG *et al.*, 2012), bem como outros fatores que podem influenciar: o tempo de processamento, o tipo de gás e o tipo de amostra (PANKAJ *et al.*, 2018). Portanto, pesquisas são necessárias para avaliar o impacto do plasma frio nos componentes bioativos, como a vitamina C.

2.3.6 Açúcares

Os açúcares são substâncias fundamentais que influenciam na qualidade dos produtos alimentícios (PANKAJ, 2018). Nesse sentido, trabalhos avaliaram a aplicação do plasma frio e seu efeito nos açúcares.

Rodríguez *et al.* (2017) mostraram que houve uma redução no teor de sacarose no suco de caju quando aplicado o plasma de descarga luminescente a 10 mL/min de vazão de plasma de ar por 15 min, como também redução na frutose e glicose. Neste caso, independentemente do gás, taxa de fluxo de plasma e tempo de tratamento.

A degradação da frutose e da glicose pode ocorrer seguindo um caminho semelhante ao da ozonologia, em que o ozônio forma radicais de oxigênio que reagem com compostos de ácidos formadores de frutose e glicose. Além disso, os radicais gerados pelo plasma podem reagir com a frutose e a glicose, aumentando a redução desses dois açúcares (WANG; HOLLINGSWORTH; KASPER, 1999).

Em outro estudo com suco de laranja prebiótico, também foi observado redução de glicose e frutose ao aplicar o plasma frio e um aumento de sacarose ao longo do tempo de tratamento, o que explica a degradação dos oligossacarídeos devido ao alto grau de polimerização, resultando na liberação do açúcar simples (ALMEIDA *et al.*, 2015). No entanto, Alves Filho *et al.* (2016), estudando o uso de processamentos não térmicos (plasma e ozônio) em suco de laranja, verificaram que o tratamento com plasma frio aumentou a concentração de frutose e sacarose em relação à amostra-controle e ao processamento com ozônio.

Dessa maneira, o plasma pode gerar impacto na qualidade sensorial e nutricional dos sucos de frutas, como foi mostrado por Farias *et al.* (2021), que, utilizando o plasma de descarga luminescente, observaram o aumento do poder adoçante em sucos de maçã.

2.3.7 Sabor e aroma

O sabor está relacionado à percepção de constituintes voláteis ativos, que são formados durante a mastigação, sendo, assim, a base da interpretação dos receptores da língua. Durante o processamento de alimentos, diversas reações químicas são formadas, as quais envolvem uma gama de metabólitos, e estes levam ao desenvolvimento de compostos voláteis. Portanto, a estabilidade e proteção dos sabores são de grande importância para a indústria de alimentos no desenvolvimento de produtos (SHIRANI *et al.*, 2020).

Uma característica importante para o sabor e aroma dos sucos de frutas e influência da percepção do doce é a proporção açúcar-ácido (COLARIC *et al.*, 2005; PETKOVSEK *et al.*, 2007), uma vez que os ácidos são usados para regular essa percepção de doçura dos açúcares,

reduzindo o sabor doce. As relações açúcar-ácido mais baixas resultam em uma percepção mais baixa da doçura. Ainda assim, proporções de açúcar-ácido muito baixas (<20 para maçãs) aumentam a acidez do produto e o sabor azedo (PETKOVSEK *et al.*, 2007).

Dependendo da composição dos alimentos e das condições de aplicação do plasma frio, pode haver mudanças consideráveis no sabor. Em vista disso, é fundamental identificar as espécies químicas que podem influenciar na percepção do sabor e evitar, assim, impactos negativos do tratamento (SHIRANI *et al.*, 2020).

Nesse sentido, Campelo *et al.* (2020) constataram que o plasma frio interagiu com moléculas de odor da polpa do camu-camu, causando mudanças perceptíveis no aroma e induzindo várias reações químicas (hidrogenação, abertura e fechamento de anel, hidrólise e rearranjo de moléculas). Desse modo, o uso do plasma frio pode possibilitar a modificação de sabor e aroma, bem como a melhoria da qualidade sensorial de alimentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Maçãs frescas (*Malus domestica*) da variedade gala foram adquiridas em supermercados (Fortaleza, CE), higienizadas e cortadas em cubos (0,8 × 0,8 × 0,8 cm). As maçãs foram selecionadas por tamanho e variedade. Para a preparação do suco, no liquidificador a fruta foi diluída com água (razão 1:1 v/v), em seguida, as amostras (fruta e suco) foram tratadas com o plasma frio e, posteriormente, mantidas a -18 °C até serem analisadas.

Os frutos do araçá-boi (*Eugenia stipitata*) apresentados na Figura 1 foram adquiridos no mercado local de Manaus (AM) e a obtenção da polpa de araçá-boi foi realizada no Laboratório NADP, na Universidade Federal do Ceará (UFC). Para a preparação do suco, no liquidificador, a polpa foi diluída com água (razão 1:1 v/v), em seguida, o suco foi submetido ao processamento com o plasma frio.

Foram três experimentos e para cada análise realizada, triplicatas eram obtidas. Além das amostras para o processamento, para cada experimento a amostra controle era separada.

Figura 1 – Fruto (araçá-boi)



Fonte: Viveiro Ciprest – Plantas Nativas e Exóticas².

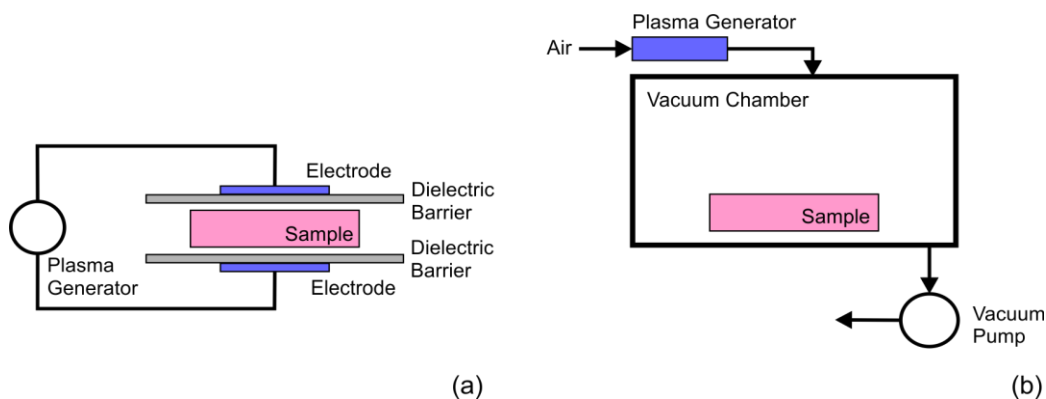
3.2 Processamento com o plasma frio

3.2.1 Plasma de descarga de barreira dielétrica

Os tratamentos de plasma de descarga de barreira dielétrica (Figura 2a) foram realizados usando um sistema gerador de plasma de bancada (*Inergiae modelo Pulse*). O plasma foi gerado em um espaço (1,5 cm) entre dois eletrodos de alumínio de 8 cm, usando duas placas de acrílico de 5 mm como barreiras dielétricas. Os experimentos com suco de maçã foram realizados aplicando cinco frequências diferentes: 50, 200, 400, 600 e 900 Hz. O plasma foi usado por 15 min nessas frequências (FARIAS *et al.*, 2020) e 10, 15 e 20 min para o araca-boi. O plasma foi gerado aplicando uma tensão de 20 kV entre os eletrodos. Placas de Petri acrílicas contendo 20 mL de suco de maçã (ou suco de araca-boi) ou 20 g de cubos de maçã foram colocadas no espaço entre os eletrodos e submetidas ao tratamento com plasma. As amostras de referência foram armazenadas sem serem tratadas pela tecnologia de plasma. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 2 – Esquema do plasma de barreira dielétrica (a) e plasma de descarga luminescente (b)

² Disponível em: <https://ciprest.blogspot.com/2016/11/araca-boi-ou-fruta-iogurte-eugenia.html>. Acesso em: 10 fev. 2022.



Fonte: elaborada pela autora.

3.2.2 Plasma de descarga luminescente

Os tratamentos com plasma de descarga luminescente (Figura 2 b) foram realizados usando um sistema de plasma de bancada PE-50 (*Plasma Etch*, EUA). O plasma foi gerado em ar sintético (grau FID 4.0, pureza 99,95%, *White Martins*, Brasil). Uma fonte de frequência de rádio de 50 kHz foi usada para excitar os íons e criar plasma aplicando 80 kV através dos eletrodos. O ar que passava pelo eletrodo era alimentado em uma câmara de processamento (19 x 22 x 9 cm) que continha as amostras. Uma bomba de vácuo (*Krytox 5CFM-2- Stage*, EUA) foi usada para manter a câmara de processamento em 0,3 bar.

Os experimentos foram realizados em três diferentes taxas de fluxo de plasma de ar (10, 20 e 30 mL/min) e em três tempos de processamento (10, 20 e 30 min). A faixa operacional para taxa de fluxo de plasma e tempo de processamento foi baseada em estudos anteriores de nosso grupo que mostraram que essas faixas são mais significativas para induzir mudanças em sucos de frutas (ALVES FILHO *et al.*, 2018; 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2017).

Para cada experimento, três tubos de polipropileno, com 40 mL de suco de maçã ou suco de araçá-boi, foram colocados na câmara de tratamento e submetidos ao tratamento com plasma de descarga luminescente. Uma amostra de referência foi armazenada sem ser tratada pela tecnologia de plasma. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3 Análises bioquímicas, químicas e físicas

3.3.1 Atividade enzimática (polifenoloxidase)

Para a realização dessa análise, foram pesados 2 g da fruta ou 2 g de suco da mesma, adicionou-se 10 mL de tampão fosfato pH 7.0 com PVP (polivinilpirrolidona) para ser homogeneizado em Ultra-Turrax (*Synth IKA T25*) e depois centrifugado em centrífuga

refrigerada (10.000 rpm/4 °C/20 min SIGMA), em seguida, ficou mantido em geladeira 4 °C por 30 min. Para cada leitura, adicionou-se 0,3 mL de amostra e 1,85 mL de tampão fosfato (0,10M) pH 6,0 com catecol e agitou-se, rapidamente, para transferir para cubeta. A absorbância de 395 nm foi lida em espectrofotômetro (*Evolution 201*) a cada min por 10 min, conforme Wissemann e Lee (1980), adaptada por Fernandes (2012). Os resultados foram expressos em unidade de atividade enzimática (UAE/min/g de fruta).

3.3.2 Atividade enzimática (peroxidase)

Nessa análise, foram pesados 2 g da fruta ou 2 g de suco da mesma, adicionou-se 10 mL de tampão fosfato (0,05M) pH 7.0 com PVP (polivinilpirrolidona) para ser homogeneizado em Ultra-Turrax (*Synth IKA T25*) e depois centrifugado em centrífuga refrigerada (10.000 rpm/4 °C/20 min SIGMA). Em seguida, ficou mantido em geladeira 4°C por 30 min. Para cada leitura, adicionou-se 0,6 mL de amostra, 1 mL de tampão fosfato pH 5,0 com guaiacol e 0,1 mL de H2O2 0,3%, agitou-se, rapidamente, e foi transferido para a cubeta. A absorbância de 470 nm foi lida em espectrofotômetro (*Evolution 201*) a cada min por 10 min, conforme Matsuno e Uritani (1972), adaptada por Fernandes (2012). Os resultados foram expressos em UAE/min/g de fruta.

3.3.3 Compostos fenólicos

Foram pesados 3 g da fruta ou suco para a realização dessa análise, em seguida, adicionou-se 10 mL de etanol 96% e foi homogeneizado em Ultra-Turrax (*Synth IKA T25* por 2 min), filtrou-se a amostra para transferir para o tubo de ensaio. Para cada leitura, adicionou-se 0,1 mL de extrato, 0,2 mL de solução Folin e 0,2 mL de água. Esperou-se por 3 min para reação e adicionou-se 1 mL de carbonato de sódio, foi agitado rapidamente e transferido para cubeta. A absorbância de 765 nm foi lida em espectrofotômetro (*Evolution 201*). A quantidade de fenólicos totais foi expressa em miligramas de ácido gálico/L a partir de uma curva de calibração com solução de ácido gálico (armazenado sob refrigeração, conforme a metodologia de Folin e Ciocalteu (1927), com adaptações de Fernandes (2012).

3.3.4 Capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH foi realizada de acordo com o método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), com modificações. Uma amostra de 5 mL de suco de maçã foi adicionada à 10 mL de metanol e homogeneizada em Ultra-Turrax (IKA modelo T25 Digital) a 13000 rpm por 2 min. O extrato foi centrifugado (modelo Sigma 2-16 KL) a 5000 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio e mantido em banho de gelo. A solução de trabalho foi preparada com 0,024 g de DPPH diluído em 100 mL de metanol. O decréscimo na absorbância foi medido a 515 nm contra um branco (metanol) a cada 1 minuto durante 10 min. Os resultados foram calculados com base na curva de calibração padrão ($R^2 = 0,982$) preparada com 6 concentrações diferentes de trolox (0,1 - 0,6 mg/g em metanol) e foram apresentados como mg de equivalente de trolox por g ou mL da amostra.

3.3.5 Colorimetria

A análise colorimétrica das amostras da maçã em cubos e do suco foi determinada com o equipamento colorímetro (*konica minolta*). Foram realizadas duas leituras de cada amostra antes e após a aplicação do plasma. O L^* indica a luminosidade, o “eixo a” representa uma escala do verde (- a) ao vermelho (+ a) e o “eixo b” uma escala do azul (- b) ao amarelo (+ b). Foram determinadas os parâmetros de ΔL , Δa e Δb . Os valores de delta (ΔE) foram determinados para indicar se houve alteração de cor, a partir da diferença entre as amostras tratadas com o plasma e a amostra não tratada, levando em consideração os parâmetros L, a e b. Todas as análises foram realizadas cinco vezes (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

3.3.6 Peróxido de hidrogênio

Nesse experimento, pesou-se 1g da fruta ou suco, adicionou-se 6 mL de água destilada para homogeneizar em Ultra-Turrax (*Synth IKA T25*). Em seguida, foi centrifugado (5 min) e transferido para tubo de ensaio, agitou-se. Para a leitura, foi adicionado 0,5 mL da amostra e 1 mL de iodeto de potássio (1,0 M), e lida em espectrofotômetro (*Evolution 201*) em 390 nm, seguindo metodologia de Ovenston e Rees (1950), com modificações de Fernandes (2012). Os valores foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ a partir de uma curva de calibração com 5 pontos (mínimo 100 $\mu\text{mol/L}$ e máximo 500 $\mu\text{mol/L}$), elaborada com solução de peróxido de hidrogênio (100 $\mu\text{mol/L}$) e solução de iodeto de potássio.

3.3.7 Vitamina C

Para esse experimento foi pesado 1 g da fruta ou 1 mL do suco, adicionou-se 10 mL de oxalato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) (concentração $0,0056 \text{ mol/dm}^3$) e foi homogeneizado em Ultra-Turrax (*Synth IKA T25*). Em seguida, filtrou-se, retirou-se 1 mL do filtrado e adicionou-se 9 mL de oxalato de sódio. A amostra foi agitada para leitura em espectrofotômetro (*Evolution 201*) em 266 nm, para o branco, a solução usada foi oxalato de sódio. Os valores foram expressos em mg ácido ascórbico/ mL a partir de uma curva de calibração de 5 pontos preparada com solução padrão de ácido ascórbico (FERNANDES *et al.*, 2015). Essa análise foi baseada na metodologia proposta por Selimović e Salkić (2011), adaptada por Fernandes (2012).

3.3.8 Perfil de compostos orgânicos voláteis por cromatografia gasosa

O procedimento foi realizado de acordo com metodologia do grupo de pesquisa de Godoy Alves Filho *et al.* (2017). Uma alíquota de 5,0 mL de polpa de araçá-boi foi adicionada a um frasco de 20 mL e equilibrado a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min, com agitação constante a 500 rpm. Utilizou-se um sistema automatizado de coleta por *Headspace* (HS). A temperatura foi mantida em $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ao longo da extração dos compostos voláteis com agitação.

Após a extração, 5 mL foram injetados no cromatógrafo gasoso, com injetor mantido a $230 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 min para condicionamento da fibra. Amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (GC-EM), Termo Scientific, modelo ISQ e Trace CG Ultra MS, modelo ISQ conectado a um detector de íon trap operando no modo EI a 70 eV e $200 \text{ }^\circ\text{C}$ com uma faixa de varredura de massa de 40 a 400 m/z a uma taxa de amostragem de $3,0 \text{ } \mu\text{s}$. O gás de arraste foi o hélio a $1,0 \text{ mL/min}$. O injetor e a interface com temperaturas de $250 \text{ }^\circ\text{C}$ no modo Splitless.

A rampa de temperatura era: $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min, aumentado para $200 \text{ }^\circ\text{C}$ a $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura era mantida a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min e depois aumentada para $260 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura final ($260 \text{ }^\circ\text{C}$) foi mantida durante 5 min. As separações cromatográficas foram realizadas usando coluna 5% fenil-metil filme de $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm ID} \times 0,25 \text{ } \mu\text{m}$. Os espectros de massa foram comparados com a biblioteca de espectros de massa NIST e com aqueles disponíveis na literatura (FRANCO; SHIBAMOTO, 2000; PINO; QUIJANO, 2008).

3.3.9 Determinação de açúcares e ácidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Amostras de suco de maçã e amostras de cubos de maçã liquefeitas no Ultraturrax foram centrifugadas por 3 min a 6.000 rpm antes dos experimentos de RMN de ^1H . Uma alíquota de 165 μL das amostras de maçã foi misturada com 400 μL de D_2O (99,9%) e 35 μL de uma solução contendo 14 mM de EDTA e 1% de sódio-3-trimetilsilil propionato (TMSP- d_4), atingindo um volume total de 600 μL . A solução final foi inserida em um tubo de RMN de 5 mm.

Os experimentos de RMN de ^1H foram realizados em um espectrômetro Agilent 600 MHz equipado com um One Probe™ de detecção inversa de 5 mm (^1H - ^{19}F / ^{15}N - ^{31}P) com um gradiente Z ativamente protegido. As aquisições de RMN de ^1H foram realizadas sob parâmetros quantitativos: 5 min de espera antes de iniciar a aquisição para estabilizar a temperatura da amostra com a sonda fixada em 298 K; pulso calibrado para 90° (8,20 μs de duração); tempo de aquisição de 5,0 s e tempo entre as aquisições de 22,0 s alcançados pela sequência de pulsos de inversão e recuperação considerando $7T_1$ (99,9% de precisão da relaxação dos núcleos de ^1H), e valor de ganho de receptor fixo em 40 para todas as aquisições para receber os sinais na mesma amplitude.

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos com 16 varreduras usando a sequência de pulso PRESAT para supressão de água não deuterada a 4,76 ppm, uma janela espectral de 16,0 ppm com número de ponto de 32k. O TMSP- d_4 foi usado como um padrão interno (simpleto em 0,0 ppm). Os espectros foram processados aplicando multiplicação exponencial do FID por um fator de 0,3 Hz e transformação de Fourier de 16k pontos. A correção de fase foi realizada manualmente e a correção da linha de base foi aplicada em toda a faixa espectral.

A identificação dos constituintes nas amostras de maçã antes e após o processamento foi realizada por meio de experimentos de RMN 2D, como ^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C gHSQC e ^1H - ^{13}C gHMBC. Os resultados foram comparados com os dados existentes em bancos de dados de acesso aberto³ (BELTON *et al.*, 1997; 1998).

3.3.10 Análise quantitativa de açúcares e ácidos orgânicos por RMNq de ^1H

Os compostos destacados pela análise estatística multivariada com sinais não sobrepostos foram quantificados. Sacarose, α -glicose, β -glicose, frutose, ácido málico, ácido

³ Disponível em: www.hmdb.ca. Acesso em: 10 fev. 2022.

acético, alanina e ácido lático foram quantificados pelo método de referência externa (ALVES FILHO *et al.*, 2016; 2018). Uma solução padrão de sacarose (5,0 mg / L) foi previamente utilizada para calibrar o equipamento. A sonda foi atualizada com todos os parâmetros necessários para determinar as concentrações em amostras desconhecidas. A incerteza combinada dos resultados foi estimada com base nos erros analíticos e nos desvios-padrão das três repetições de amostragem.

Os resultados quantitativos foram avaliados por análise de fator único de variância (ANOVA) sob um nível de significância de 0,05 para certificar as variações estatisticamente significativas entre as concentrações do composto. A comparação de médias utilizando o teste de Tukey e Levene para testar a homogeneidade da variância.

3.3.11 Poder adoçante

O poder adoçante das amostras foi determinado com base no poder adoçante da sacarose (100), frutose (170) e glicose (74) (HOBBS, 2009; TIEFENBACHER, 2017). O poder adoçante da frutose varia entre 100 e 170, dependendo do pH do meio, temperatura, concentração e efeitos sinérgicos. Neste trabalho, o valor de 170 foi aplicado devido ao efeito sinérgico entre a sacarose e a frutose, e a presença dos ácidos málico e cítrico (CURTIS *et al.*, 1984; MCBRIDE, 1986). O poder adoçante das amostras foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$S_{sample} = C_g S_g + C_f S_f + C_s S_s$$

(1) Onde C é a concentração do composto i (g/L), S é o poder adoçante do composto i (adimensional) e os subscritos g, f e s referem-se, respectivamente, à glicose, frutose e sacarose.

3.3.12 Análise estatística

3.3.12.1 Análise estatística multivariada dos dados adquiridos por RMN de ¹H

Uma análise multivariada não supervisionada por Análise de Componentes Principais (PCA) foi desenvolvida para investigar a influência de diferentes processos não térmicos na composição da amostra de maçã. Para construção da matriz numérica, cada espectro de RMN de ¹H foi convertido para *American Standard Code for Information Interchange* (ASCII), importado pelo programa Origin™ 9.4. A área afetada pela supressão de água não deuterada,

de acordo com o perfil de saturação do solvente não deuterado (entre δ 4,66 a 5,00), foi excluída do conjunto de dados. A matriz numérica resultante apresentou dimensionalidade de 280.665 pontos, composta por 63 amostras de suco \times 4.455 variáveis em cada espectro entre δ 0,8 e 5,5. Essa matriz foi posteriormente importada pelo programa PLS Toolbox™ (versão 8.6.2, *Eigenvector Research Incorporated*, Manson, WA EUA) para análise estatística multivariada.

Anteriormente à avaliação PCA, algoritmos para correção de linha de base, alinhamento de variáveis usando COW (*Correlation Optimized Warping*) e normalização pela área total foram aplicados nos espectros de RMN de ^1H (variáveis) e foram aplicados antes da decomposição da matriz (ALVES FILHO *et al.*, 2016; 2018). O pré-tratamento de centralização dos dados em torno da média proporcionou melhores diferenças entre as amostras de maçã, não permitindo que ruídos e pequenos sinais não identificados afetassem negativamente a distribuição da amostra. O algoritmo *Singular Value Decomposition* (SVD) foi aplicado para decomposição da matriz original em escores e pesos sob um nível de confiança de 95%.

3.3.12.2 Análise de variância

Os dados obtidos de cada condição operacional foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de Tukey ao nível de 95% de confiança, utilizando o programa estatístico STATISTICA (*Statsoft*) versão 10. As análises bioquímicas, químicas e físicas foram realizadas em triplicata, sendo calculadas a média e o desvio padrão de cada uma delas.

3.3.12.3 Mapa de calor (*heat map*)

Para verificar os efeitos do plasma frio no perfil dos compostos orgânicos voláteis do araçá-boi, um mapa de calor (*heat map*) foi desenvolvido para apresentar por meio de intensidade de cores a concentração dos compostos em cada tratamento realizado. Esse mapa é um agrupamento representado por cores, no qual a maior intensidade de cor indica maior concentração do composto.

REFERÊNCIAS

- ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSON, C.; VINAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 121–129, 2008.
- ALI, M.; CHENG, J. H.; SUN, D. W. Effects of dielectric barrier discharge cold plasma treatments on degradation of anilazine fungicide and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 69-75, 2021.
- ALMEIDA, F. D. L.; CAVALCANTE, R. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 32, p. 127-135, dez. 2015.
- ALVES FILHO, E. G.; ALMEIDA, F. D. L.; CAVALCANTE, R. S.; DE BRITO, E. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M. ¹H NMR spectroscopy and chemometrics evaluation of non-thermal processing of orange juice. **Food Chemistry**, v. 204, p. 102-107, 2016.
- ALVES FILHO, E. G.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S.; CULLEN, P. J.; FARIAS, J. M.; RODRIGUES, S. An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 53, p. 63-69, 2017.
- ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; BRITO, E. S.; WURLITZER, N. J.; FERNANDES, F. A. N.; RABELO, M. C.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using ¹H qNMR and GC–MS coupled to chemometrics. **Food Chemistry**, v. 265, p. 23–31, 2018.
- ALVES FILHO, E. G.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; CAVALCANTE, R. S.; ALMEIDA, F. D. L.; RODRIGUES, S. An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 53, p. 63-69, 2019.
- ANDRADE, P. F. S. Departamento de Economia Rural. **Prognóstico 2020**. Governo do estado do paraná, v. 41, p. 3313-4136, 2020.
- ARAÚJO, F. F.; NERI-NUMA, I. A.; FARIAS, D. P.; CUNHA, G. R. M. C.; PASTORE, G. M. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57–72, 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12694**: Especifica  es de cores de acordo com o sistema de notac  o Munsell. Rio de Janeiro, 1992.
- ATTRI, P. J.; SARINONT, T.; KIM, M.; AMANO, T.; KOGA, K.; CHO, A. E.; HA CHOI, E.; SHIRATANI, M. Influence of ionic liquid and ionic salt on protein against the reactive

species generated using dielectric barrier discharge plasma. **Sci. Rep.** v. 5, p. 17781, 2015.

AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 6, p. 584–602, 2007.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 3, p. 307–322, 2012.

BAZZANO, L. A.; LI, T. Y.; JOSHIPURA, K. J.; HU, F. B. Intake of fruit, vegetables, and fruit juices and risk of diabetes in women. **Diabetes Care**, v. 31, p. 1311–1317, 2008.

BELTON, P. S.; DELGADILLO, I.; GIL, A.; ROMA, P.; CASUSCELLI, F.; COLQUHOUN, I.; DENNIS, M.; SPRAUL, M. High-field proton NMR studies of apple juices. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 35, p. 52–60, 1997.

BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Application of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**, v. 61, p. 207–213, 1998.

BERGER, C. N.; SODHA, S. V. *et al.* Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 2385–2397, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BUENO, M. P.; SILVA, A. C.; NUNES, A. L. P. F.; SARDINHA, A. C.; LIMA, P. T. S.; SILVA, J. F. Análise da comercialização da cadeia produtiva da maçã brasileira: produção, importação e exportação no período 2015 a 2019/analysis of the commercialization of the brazilian apple production chain. **Brazilian Journal Of Development**, v. 7, n. 4, p. 34061–34078, 2021.

CAMPELO, P. H.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M.A.; BRITO, E. S.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Modulation of aroma and flavor using dielectric barrier discharge plasma technology in a juice rich in terpenes and sesquiterpenes. **LWT**, v. 130, p. 109644, ago. 2020.

CASSANI, L. *et al.* Enhancing quality attributes of fiber-enriched strawberry juice by application of vanillin or geraniol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 90–98, 2016.

CASTRO, D. R. G.; MAR, J. M.; SILVA, L. S.; SILVA, K. A.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. A.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N.; CAMPELO, P. H. Dielectric barrier atmospheric cold plasma applied on camu-camu juice processing: effect of the excitation frequency. **Food Research International**, v. 131, p. 109044, maio 2020.

CEYMANN, M.; ARRIGONI, E.; SCHÄRER, H.; BOZZI NISING, A.; HURRELL, R. F.

Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. **J Food Compos Anal**, v. 26, p. 128–35, 2012.

COLARIC, M.; VEBERIC, R.; STAMPAR, F.; HUDINA, M. Evaluation of peach and nectarine fruit quality and correlations between sensory and chemical attributes. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 85, n. 15, p. 2611-2616, 2005.

CURTIS, D. W.; STEVENS, D. A.; LAWLESS, H. T. Perceived intensity of the taste of sugar mixtures and acid mixtures. **Chemical Senses**, v. 9, n. 2, p. 107–120, 1984.

DEMIRDÖVEN, A.; BAYSAL, T. Optimization of ohmic heating applications for pectin methylesterase inactivation in orange juice. **Journal Of Food Science And Technology**, v. 51, n. 9, p. 1817-1826, 2012.

DJEKIC, I.; SANJUÁN, N.; CLEMENTE, G.; JAMBRAK, A. R.; DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A.; BRODNJAK, U. V.; POP, E.; THOMOPOULOS, R.; TONDA, A. Review on environmental models in the food chain - Current status and future perspectives. **Journal Of Cleaner Production**, v. 176, p. 1012-1025, 2018.

DONG, X. Y.; YANG, Y. L. A Novel Approach to Enhance Blueberry Quality During Storage Using Cold Plasma at Atmospheric Air Pressure. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 8, p. 1409–1421, 2019.

EKEZIE, F.-G. C.; SUN, D.-W.; CHENG, J.-H. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: current applications and future trends. **Trends In Food Science & Technology**, v. 69, p. 46-58, 2017.

EHLBECK, J.; SCHNABEL, U.; POLAK, M.; WINTER, J.; VON WOEDTKE, T.; BRANDENBURG, R.; HAGEN, T. V. D.; WELTMANN, K. D. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 1, 2011.

FARIAS, T. R. B.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Effect of dielectric barrier discharge plasma excitation frequency on the enzymatic activity, antioxidant capacity and phenolic content of apple cubes and apple juice. **Food Research International**, 136, 109617, 2020.

FARIAS, T. R. B.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; BRITO, E. S.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. NMR evaluation of apple cubes and apple juice composition subjected to two cold plasma technologies. **LWT**, v. 150, p. 112062, out. 2021.

FARKAS, D. F. A Short History of Research and Development Efforts Leading to the Commercialization of High-Pressure Processing of Food. **High Pressure Processing of Food**, p. 19-36, Springer New York, 2016.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S.; CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V. Ultrasound-Assisted Air-Drying of Apple (*Malus domestica* L.) and Its Effects on the Vitamin of the Dried Product. **Food Bioprocess Technol.**, v. 8, n. 7, p. 1503-1511, 2015.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; CÁRCEL, J. A. Effects

of ultrasound-assisted air-drying on vitamins and carotenoids of cherry tomatoes. **Drying Technology**, v. 34, n. 8, p. 986–996, 2016.

FERNANDES, F. A. N.; SANTOS, V. O.; RODRIGUES, S. Effects of glow plasma technology on some bioactive compounds of acerola juice. **Food Research International**, v. 115, p. 16–22, 2019.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry Baltimore**, v. 73, p. 627, 1927.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: Umbu-
caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia
stipitata*), and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food
Chemistry**, v. 48, p. 1263-1265, 2000.

GANESAN, A. R.; TIWARI, U.; EZHILARASI, P. N.; RAJAURIA, G. Application of cold plasma on food matrices: A review on current and future prospects. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 1, p. 1-16, 2021.

GAROFULIĆ, I. E.; JAMBRAK, A. R.; MILOLEVIĆ, S.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; ZORIĆ, Z.; HERCEG, Z. The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*) juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 894-900, jun. 2015.

GÓMEZ-MAQUEO, A.; ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z.; WELTI-CHANES, J. Phenolic Compounds in Mesoamerican Fruits—Characterization, Health Potential and Processing with Innovative Technologies. **International Journal of Molecular Sciences** v. 21, n. 21, p. 8357, nov. 2020.

GÓMEZ-MAQUEO, A.; ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z.; CANO, M. P.; WELTI-CHANES, J. Phenolic Compounds in Food. **Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis**, 1st ed. CRC Press: Boca Raton, FL, EUA, p. 33–60, 2018.

HERCEG, Z.; KOVAČEVIĆ, D. B.; KLJUSURIĆ, J. G.; JAMBRAK, A. R.; ZORIĆ, Z.; DRAGOVIĆ-UZELAC. Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. **Food Chemistry**, v. 190, p. 665–72. 2016.

HOBBS, L. Sweeteners from Starch. **Starch**, Elsevier, p. 797-832, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-746275-2.00021-5>

HOU, Y.; WANG, R.; GAN, Z.; SHAO, T.; ZHANG, X.; HE, M., et al. Effect of cold plasma on blueberry juice quality. **Food Chemistry**, v. 290, p. 79-86, 2019.

HYSON, D. A. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. **Adv. Nutr.**, n. 2, p. 408, 2011.

ILLERA, A. E.; CHAPLE, S.; SANZ, M. T.; NG, S.; LU, P.; JONES, J.; CAREY, E.; BOURKE, P. Effect of cold plasma on polyphenol oxidase inactivation in cloudy apple juice and on the quality parameters of the juice during storage. **Food Chemistry: X**, v. 3, p. 100049, set. 2019.

JERMANN, C.; KOUTCHMA, T.; MARGAS, E.; LEADLEY, C.; ROS-POLSKI, V. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 31, p. 14-27, 2015.

KEENER, K. M.; MISRA, N. N. Future of Cold Plasma in Food Processing. **Cold Plasma in Food and Agriculture**, p. 343-360, 2016.

KHANI, M. R.; SHOKRI, B.; KHAJEH, K. Studying the performance of dielectric barrier discharge and gliding arc plasma reactors in tomato peroxidase inactivation. **Journal Of Food Engineering**, v. 197, p. 107-112, mar. 2017.

KIST, B. B. *et al.* **Anuário Brasileiro da Maçã**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2019.

KOVAČEVIĆ, D. B.; PUTNIK, P.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; PEDISIĆ, S.; JAMBRAK, A. R.; HERCEG, Z. Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. **Food Chemistry**, v. 190, p. 317-323, 2016.

LANDBO, A. K.; MEYER, A. S. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3169–3177, 2001.

LI, Y.; KOJTARI, A.; FRIEDMAN, G.; BROOKS, A.D.; FRIDMAN, A.; JI, H.-F. Decomposition of L-valine under nonthermal dielectric barrier discharge plasma. **J. Phys. Chem.** v. 118, p. 1612-1620, 2014.

LIU, Z.; XU, D.; LIU, D.; CUI, Q.; CAI, H.; LI, Q.; CHEN, H.; KONG, M. G. Production of simplex RNS and ROS by nanosecond pulse N₂/O₂ plasma jets with homogeneous shielding gas for inducing myeloma cell apoptosis. **Journal Of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 19, p. 195204, abr. 2017.

LÓPEZ, M. L.; VILLATORO, C.; FUENTES, T.; GRAELL, J.; LARA, I.; ECHEVERRÍA, G. V. Compounds, quality parameters and consumer acceptance of ‘Pink Lady®’ apples stored in different conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 55-66, 2007.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidases isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

MCBRIDE, R. L. Sweetness of binary mixtures of sucrose, fructose, and glucose. **Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance**, v. 12, n. 4, 584-591, 1986.

MEHTA, D. *et al.* Impact of ultrasonication, ultraviolet and atmospheric cold plasma processing on quality parameters of tomato-based beverage in comparison with thermal processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 52, p. 343–349, 2019.

MINNOCCI, A.; IACOPINI, P.; MARTINELLI, F.; SEBASTIANI, L. Micromorphological, biochemical, and genetic characterization of two ancient, late-bearing apple varieties. **Eur J**

Hortic Sci, v. 75, p. 1-7, 2010.

MIR, S. A.; SHAH, M. A.; MIR, M. M. Understanding the role of plasma technology in food industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 734-750, 2016.

MISRA, N.; TIWARI, B.; RAHAVARAO, K.; CULLEN, P. Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens. **School of Food Science and Environmental Health**, v. 3, p. 159-170, 2011.

MISRA, N. N.; KEENER, K. M.; BOURKE, P.; MOSNIER, J.-P.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 177–182, 2014a.

MISRA, N. N.; PATIL, S.; MOISEEV, T.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; KEENER, K. M.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. **Journal of Food Engineering**, v. 125, p. 131-138, 2014b.

MISRA, N. N.; KAUR, S.; TIWARI, B. K.; KAUR, A.; SINGH, N.; CULLEN, P. J. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 115-121, 2015.

MISRA, N. N. *et al.* Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 55, p. 39-47, 2016.

MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.; HEISE, M.. Influence of relative gas humidity on the inactivation efficiency of a low temperature gas plasma. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 104, n. 6, p. 1659-1666, 2008.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; DE CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; MAR´OSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70–76, 2013.

NEVES, L. C; TOSIN, J. M.; BENEDETTE, R. M.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**, v. 174, p. 188-196, 2015.

NIEMIRA, B. A.; GUTSOL, A. Nonthermal Plasma as a Novel Food Processing Technology. **Nonthermal Processing Technologies For Food**, p. 271-288, 2011.

NIEMIRA, B. A. Cold plasma decontamination of foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 125–142, 2012.

NISHIME, T. M. C.; BORGES, A. C.; KOGA-ITO, C. Y.; MACHIDA, M.; HEIN, L. R. O.; KOSTOV, K. G. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. **Surface and Coatings Technology**, v. 312, p. 19-24, 2017.

- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 49, p. 249-279, 1998.
- OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais: aprendendo a aprender**. 2. ed. São Paulo: SARVIER, 2008.
- OLIVEIRA, A. F. A. et al. Non-thermal combined treatments in the processing of açai (*Euterpe oleracea*) juice. **Food Chemistry**, v. 265, p. 57-63, 2018.
- OVENSTON, T. C. J.; REES, W. T. The Spectrophotometric determination of small amounts of hydrogen peroxide in aqueous solutions. **Analyst**, v. 75, p. 204-208, 1950.
- PAIXÃO, L. M. N.; FONTELES, T. V.; OLIVEIRA, V. S.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Cold Plasma Effects on Functional Compounds of Siriguela Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 1, p. 110–121, 2019.
- PANKAJ, S. K.; KEENER, K. M. Cold plasma: background, applications and current trends. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 49-52, ago. 2017.
- PANKAJ, S.; WAN, Z.; KEENER, K. Effects of Cold Plasma on Food Quality: a review. **Foods**, v. 7, n. 1, p. 4, jan. 2018.
- PANKAJ, S. K.; MISRA, N. N.; CULLEN, P. J. Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 153-157, 2013.
- PARR, A. J.; BOLWELL, G. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 985-1012, 2000.
- PÉREZ-ANDRÉS, J. M.; CHAROUX, C. M. G.; CULLEN, P. J.; TIWARI, B. K. Chemical modifications of lipids and proteins by nonthermal food processing technologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 20, 5041–5054, 2018.
- PÉREZ, M.; TORRADES, F.; DOMÈNECH, X.; PERAL, J. Treatment of bleaching Kraft mill effluents and polychlorinated phenolic compounds with ozonation. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 77, n. 8, p. 891-897, jun. 2002.
- PETKOVSEK, M. M.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). **Scientia Horticulturae**, v. 114, n. 1, p. 37-44, set. 2007
- PINO, J. A.; QUIJANO, C. E. Volatile constituents of Camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh) leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 205–207, 2008.
- PORTO, E.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; FONTELES, T. V.; NASCIMENTO, R. B. R.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S.; RODRIGUES, S. Ozone and plasma processing effect on green coconut water. **Food Research International**, v. 131, p. 109000, maio 2020.

- PUTNIK, P. *et al.* Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: A review. **Food Chemistry**, v. 279, p. 150–161, jul. 2019.
- RAMAZZINA, I.; BERARDINELLI, A.; RIZZI, F.; TAPPI, S.; RAGNI, L.; SACCHETTI, G.; ROCCULI, P. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 107, p. 55–65, 2015.
- RODACKA, A.; GERSZON, J.; PUCHALA, M.; BARTOSZ, G. Radiation-induced inactivation of enzymes—molecular mechanism based on inactivation of dehydrogenases. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 128, p. 112–117, 2016.
- RODRÍGUEZ, Ó.; GOMES, W. F.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 457-463, 2017.
- SEGAT, A.; MISRA, N.N.; CULLEN, P.J.; INNOCENTE, N. Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase. **Food Bioprod. Process.** **2016**, v. 98, p. 181-188, 2016.
- SELIMOVIĆ, A.; SALKIĆ M. Direct Spectrophotometric Determination of L-Ascorbic acid in Pharmaceutical Preparations using Sodium Oxalate as a Stabilizer. **International Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 11, n. 02, p. 106, 2011.
- SHI, X. *et al.* Effect of low-temperature plasma on microorganism inactivation and quality of freshly squeezed orange juice. **IEEE Trans. Plasma Sci.** v. 39, p. 1591-1597, 2011.
- SHIRANI, K.; SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, S. A. Investigation of decontamination effect of argon cold plasma on physicochemical and sensory properties of almond slices. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 335, p. 108892, dez. 2020.
- SILVEIRA, M. R.; COUTINHO, N. M.; ESMERINO, E. A.; MORAES, J.; FERNANDES, L. M.; PIMENTEL, T. C.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; RANADHEERA, C. S. Guava-flavored whey beverage processed by cold plasma technology: bioactive compounds, fatty acid profile and volatile compounds. **Food Chemistry**, v. 279, p. 120-127, maio 2019.
- SRUTHI, N. U.; JOSNA, K.; PANDISELVAM, R.; KOTHAKOTA, A.; GAVAHIAN, M.; KHANEGHAH, A. M. Impacts of cold plasma treatment on physicochemical, functional, bioactive, textural, and sensory attributes of food: a comprehensive review. **Food Chemistry**, v. 368, p. 130809, jan. 2022.
- STAREK, A.; PAWŁAT, J.; CHUDZIK, B.; KWIATKOWSKI, M.; TEREBUN, P.; SAGAN, A.; *et al.* Evaluation of selected microbial and physicochemical parameters of fresh tomato juice after cold atmospheric pressure plasma treatment during refrigerated storage. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- SUCUPIRA, N. R. *et al.* NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. **Food Chemistry**, v. 216, p. 217–224, 2017.

SUROWSKY, B.; FISCHER, A.; SCHLUETER, O.; KNORR, D. Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 146-152, jul. 2013.

TAKAI, E.; KITAMURA, T.; KUWABARA, J.; IKAWA, S.; YOSHIZAWA, S.; SHIRAKI, K.; KAWASAKI, H.; ARAKAWA, R.; KITANO, K. Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution. **Journal Of Physics D: Applied Physics**, v. 47, n. 28, p. 285403, 2014.

TENDERO, C. *et al.* Atmospheric pressure plasmas: A review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 1, p. 2-30, 2006.

THIRUMDAS, R.; SARANGAPANI, C.; ANNAPURE, U. S. Cold Plasma: a novel non-thermal technology for food processing. **Food Biophysics**, v. 10, n. 1, p. 1-11, nov. 2014.

THIRUMDAS, R.; ANNAPURE, U. S. Enzyme inactivation in model systems and food matrixes by cold plasma. **Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation**, p. 229–252, 2020.

TIEFENBACHER, K. F. Technology of Main Ingredients – Sweeteners and Lipids. **Wafer And Waffle**, Elsevier, p. 123-225, 2017.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

WAGHMARE, R. Cold plasma technology for fruit based beverages: a review. **Trends In Food Science & Technology**, v. 114, p. 60-69, ago. 2021.

WANG, Y.; HOLLINGSWORTH, R. I.; KASPER, D. L. Ozonolytic depolymerization of polysaccharides in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, v. 319, p. 141-147, 1999.

WANG, R. X.; NIAN, W. F.; WU, H. Y.; FENG, H. Q.; ZHANG, K.; ZHANG, J.; FANG, J. Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation. **The European Physical Journal**, v. 66, n. 10, p. 276, 2012.

WANG, Y.; WANG, Z.; ZHU, X.; YUAN, Y.; GAO, Z.; YUE, T. Application of electrical discharge plasma on the inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* in apple juice. **LWT**, v. 121, p. 108974, mar. 2020.

WISSEMANN, K. W.; LEE, C.Y. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production, **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 31, p. 206-211, 1980.

XU, L.; GARNER, A. L.; TAO, B.; KEENER, K. M. Microbial inactivation and quality changes in orange juice treated by high voltage atmospheric cold plasma. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 10, p. 1778–1791, 2017.

YI, J.; KEBEDE, B. T.; HAI DANG, D. N.; BUVÉ, C.; GRAUWET, T.; VAN LOEY, A.; HU, X.; HENDRICKX, M. Quality change during high pressure processing and thermal

processing of cloudy apple juice. **LWT**, v. 75, p. 85-92, 2017.

ZIUZINA, D.; PATIL, S.; CULLEN, P. J.; KEENER, K. M.; AND BOURKE, P.
Atmospheric Cold Plasma Inactivation of Escherichia Coli in Liquid Media inside a Sealed
Package. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 778-87, 2013.

4 EFFECT OF DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE PLASMA EXCITATION FREQUENCY ON THE ENZYMATIC ACTIVITY, ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC CONTENT OF APPLE CUBES AND APPLE JUICE

Esta seção contém o resumo, uma breve introdução, os resultados, a discussão, a conclusão e as referências do artigo que foi publicado na revista científica Food Research Internacional.

Abstract

Cold plasma is a potential alternative to traditional thermal conservation methods because of its high efficiency in the preservation and retention of quality parameters. The objective of this study was to evaluate the application of atmospheric cold plasma on some qualitative aspects of apple cubes and apple juice. The research used dielectric barrier discharge plasma and studied different excitation frequencies of plasma: 50, 200, 400, 600, and 900 Hz. The effects of plasma application were evaluated on enzymatic activity (PPO and POD), total phenolic compounds, antioxidant capacity, and colorimetry. Plasma treatment partially inactivated the polyphenol oxidase enzyme in apples cubes and juice. Inactivation of peroxidase occurred only in apple juice. Total phenolic content and antioxidant capacity presented no significant difference between the treated and control samples of apple cubes, while significant changes were observed in apple juice. The changes in color parameters were slight and did not compromise the product quality. Plasma application was able to partially inactivate the enzymes responsible for browning while maintaining the quality and sensory properties of apple cubes and juice.

1. INTRODUCTION

Apples have high amounts of phenolic compounds (2.9 to 4.9 mg/g), and its browning enzymes are highly active (KALINOWSKA *et al.*, 2014). Upon processing, apple products tend to darken very quickly, and thermal processes are usually applied to reduce color change by inactivating the browning enzymes (ANTHON AND BARRETT, 2002; MISRA *et al.*, 2014). Thermal processes, however, decrease the contents of vitamins, phenolic compounds, and other bioactive compounds related to flavor (WANG *et al.*, 2012).

Non-thermal processes, such as cold plasma, may be an alternative to inactivate browning enzymes without compromising much the quality attributes of apple products

(ALVES FILHO *et al.*, 2018; HERCEG *et al.*, 2016; MISRA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2012). Cold plasma processes consist of subjecting samples to ionized gases produced from electrical, microwave, or radio-frequency discharges. Although cold plasma may inactivate browning enzymes, plasma species (ions, electrons, free radicals, ozone, photons, and other species) may induce positive or negative chemical changes in the samples (ALVES FILHO *et al.*, 2019, 2016; RAMAZZINA *et al.*, 2015), which need to be evaluated.

Dielectric barrier discharge plasma became one of the most used plasma systems in academic research and is currently being tested in industrial applications. Although most systems apply an excitation frequency of 50 or 60 Hz, it is possible to apply higher excitation frequencies obtaining different responses and effects (CASTRO *et al.*, 2020). The available information on the effects of the excitation frequency is scarce and similar study has been conducted only for the exotic camu-camu pulp (CASTRO *et al.*, 2020). No information is available on the effects of excitation frequency on the more commercial apple juice, and no information is available regarding whether the effects are more pronounced in fruit flesh or fruit juices.

This study reports the inactivation of browning enzymes (polyphenol oxidase and peroxidase) by dielectric barrier discharge plasma applying excitation frequencies between 50 and 900 Hz. This study evaluated the effects of plasma application on enzyme inactivation, and some quality attributes that are directly influenced by enzyme inactivation: total phenolic content, antioxidant capacity, and color. Two different matrices were studied (apple cubes and apple juice) to evaluate how tissue structure affects the desired plasma effects.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Enzyme inactivation

Table 1 presents the polyphenol oxidase and peroxidase activities on apple cubes and apple juice subjected to different plasma excitation frequencies. PPO was partially inactivated in the juice at all plasma excitation frequencies, and in apple cubes at excitation frequencies between 50 and 200 Hz. POD activity in apple cubes increased, while it decreased in the juice except for the assay carried out at 600 Hz, where no statistical difference ($p < 0.05$) was noticed.

Table 1 - PPO and POD activity for the untreated and plasma-treated apple cubes and apple juice.

Treatment	PPO activity (UAE/min.g)	POD activity (UAE/min.g)
<i>Apple cubes</i>		

Untreated	0.013 ± 0.001 ^a	0.014 ± 0.005 ^a
50 Hz	0.013 ± 0.001 ^a	0.064 ± 0.013 ^b
200 Hz	0.007 ± 0.001 ^b	0.099 ± 0.020 ^c
400 Hz	0.016 ± 0.001 ^c	0.106 ± 0.029 ^{cd}
600 Hz	0.019 ± 0.001 ^d	0.095 ± 0.022 ^{bc}
900 Hz	0.017 ± 0.001 ^{cd}	0.136 ± 0.015 ^d
<hr/>		
Apple juice	(UAE/min.mL)	(UAE/min.mL)
Untreated	0.006 ± 0.001 ^a	0.063 ± 0.006 ^a
50 Hz	0.003 ± 0.001 ^a	0.030 ± 0.014 ^b
200 Hz	0.005 ± 0.001 ^a	0.036 ± 0.002 ^{bc}
400 Hz	0.004 ± 0.001 ^a	0.031 ± 0.001 ^b
600 Hz	0.006 ± 0.001 ^a	0.064 ± 0.010 ^a
900 Hz	0.004 ± 0.001 ^a	0.045 ± 0.004 ^c

Fonte: elaborada pelo autor.

The treatment carried out at 200 Hz presented the highest decrease in PPO activity in apple cubes (-46 %), while the treatment carried out at 50 Hz presented the highest decrease in apple juice (-50 %). At these frequencies, POD activity increased in apple cubes and decreased in apple juice. It was not possible to find an operating condition able to inactivate both PPO and POD in apple cubes. For apple juice, the excitation frequency of 50 Hz seems to be a satisfactory compromising point where a decrease in both PPO (-50 %) and POD (-56 %) could be achieved. Inactivation of PPO and POD at 50 Hz was also observed in tomatoes subjected to in-package plasma application (PANKAJ *et al.*, 2013).

The increase in POD activity may be explained by the formation of hydroxyl radicals (OH·) during plasma application due to the dissociation of water in the cubes and juice. A high concentration of this radical in the samples triggers the POD enzyme and increases its activity. This response mechanism was already observed in apple juice subjected to ultrasound treatment, a process known to produce hydroxyl radicals, which increased the POD activity (SILVA *et al.*, 2015).

Oxygen reactive species (ROS) formed during plasma application in atmospheric air are known to damage cell membranes of fruits and vegetables. A natural response of fruit and vegetable under these circumstances is to increase the production and activity of antioxidant enzymes such as POD, PPO, and SOD (superoxide dismutase) (ALSCHER *et al.*, 2002; MARCHESE *et al.*, 2008; MISHARA *et al.*, 2012).

Plasma acts efficiently on the surface of the samples but has low penetration power. Thus, one would expect that the inactivation of PPO and POD would be higher in apple juice

than apple cubes because the intact cell walls act as a protective barrier against plasma species. The results confirm this expectation with both enzymes activities decreasing in the juice, while POD activity increased in apple cubes.

The low penetration power of plasma species also explains the increased activity of POD in apple cubes. The formation of hydroxyl radicals in apple cubes occurred in the cube surface, triggering the POD response on the whole cube. The low penetration of plasma species, however, induced a small inactivation of these enzymes because of only the enzymes near the fruit surface were inactivated. This phenomenon was also observed with cherry tomatoes (MISRA *et al.*, 2014).

Takai *et al.* (2012) proposed an inactivation mechanism for PPO and POD induced by plasma. The authors proposed that the loss in enzymatic activity was due to chemical modifications caused by plasma species ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{HOO}\cdot$, and $\text{NO}\cdot$) in reactive amino acids side-chains (cysteine, tryptophan, tyrosine, and aromatic rings of phenylalanine). This chemical modification would be responsible for the inactivation of PPO and POD in apples, melons, and potatoes subjected to DBD plasma (BUBLER *et al.*, 2016; TAPPI *et al.*, 2016, 2014). Surowsky *et al.* (2013) proposed that the inactivation of PPO and POD could also be related to changes in the secondary structure of these molecules resulting in the reduction of the amount of α -helix structures. However, these changes are time-dependent, and its occurrence increases with increasing plasma application time.

Khani *et al.* (2017) showed a decrease in enzymatic activity by 98% in tomato POD subjected to gliding arc plasma (16 kV, 20 kHz, 7 min) showing that the food matrix and plasma equipment system and setup may lead to higher reduction in POD activity. Chutia *et al.* (2019) reported an enzymatic decay higher than 80% in coconut water PPO and POD subjected to dielectric barrier plasma (18 kV, 50 Hz, 5 min) showing that enzymes of the same class but from other matrix can be more susceptible to inactivation by plasma discharge.

2.2. Phenolic compounds

Table 2 presents the concentration of total phenolics compounds in apple cubes and apple juice after plasma treatment. Apple cube and apple juice not subjected to plasma treatment presented a total phenolic content of 538.3 ± 3.5 mg gallic acid equivalent/g and 212.6 ± 9.1 mg gallic acid equivalent/mL, respectively. Plasma application increased the phenolic content in both apple cubes and juice. The only exception was observed in apple cubes subjected to plasma application at 900 Hz.

Table 2 - Total phenolics content of the untreated and plasma-treated apple cubes and apple juice.

Treatment	Apple cubes (mg/ g)	Apple Juice (mg/mL)
Untreated	538.3 ± 3.5 ^a	212.6 ± 9.1 ^a
50 Hz	647.0 ± 10.4 ^c	345.7 ± 7.8 ^b
200 Hz	532.2 ± 5.2 ^a	282.6 ± 18.7 ^c
400 Hz	593.0 ± 33.0 ^d	230.4 ± 0.9 ^d
600 Hz	720.0 ± 13.0 ^e	319.1 ± 1.7 ^e
900 Hz	495.7 ± 20.0 ^b	239.6 ± 0.4 ^d

Fonte: elaborada pelo autor.

The trends for the phenolic content followed an inverse relationship with PPO enzyme activity for plasma application between 50 and 400 Hz. Lower PPO activities induced higher phenolic content in both cubes and juice. This result is expected because both PPO and POD use phenolic compounds as substrate against oxidants (ROBARDS *et al.*, 1999). With the decrease in enzyme activity, these enzymes consume fewer phenolics compounds. The increase in phenolic content at 600 Hz could not be correlated to enzyme activity and might have been caused by the depolymerization of polyphenols.

The increase in the phenolic content was higher in apple juice due to the lower activity of both PPO and POD in the juice in comparison to the apple cubes. The highest increase in phenolic content was observed at excitation frequencies of 50 (20 %) and 600 Hz (34 %).

The decrease in PPO and POD activities and the consequent increase in total phenolic compounds is a positive effect of plasma processing. Other processes, such as thermosonication (60 to 80 °C, 15 min), resulted in a reduction of total phenolics in apple juice (GARDNER *et al.*, 2000). Phenolic compounds are secondary metabolites of fruits and have an essential role in the development of the nutritional and sensory properties (flavor and color) of apples. Thus, it is essential to maintain or increase its content.

In related work, plasma processing also increased the phenolic content in pomegranate juice (HERCEG *et al.*, 2016). This work showed that the phenolic content increased with processing time and gas flow rate. However, in their work, the depolymerization of ellagitannins caused an increase in ellagic acid, and thus in total phenolic content. In contrast, caffeic and protocatechuic acids decreased due to reaction with plasma generated species.

High excitation frequency (900 Hz) decreased the total phenolic contents in apple cubes

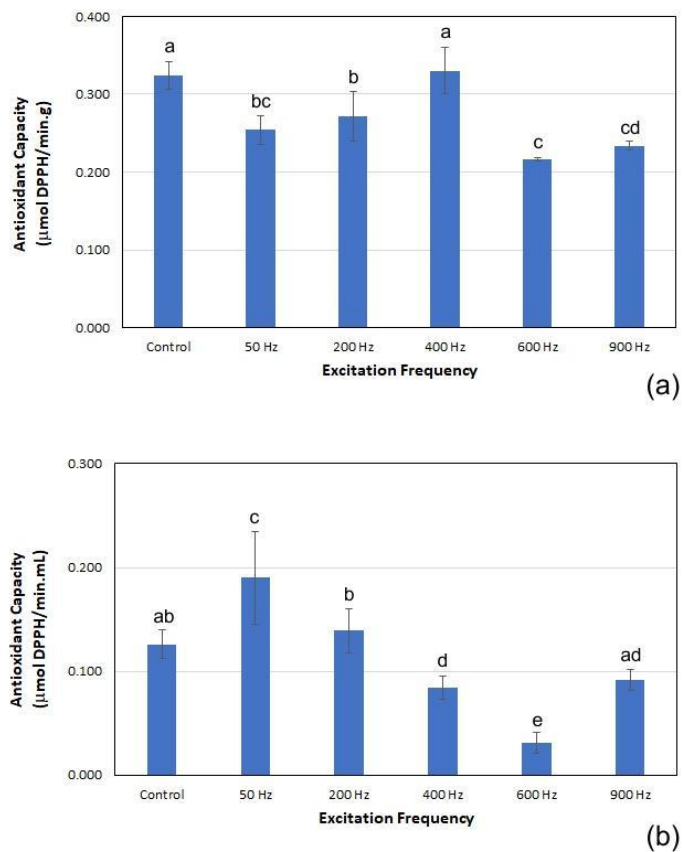
(-8 %) and increased only slightly the contents in apple juice (13 %). The increase in the excitation frequency showed a similar effect as the increase in the energy input in grape pomace subjected to plasma processing, where the total phenolic content increased up to 80 kJ/kg and then decreased with increasing energy inputs (BOUSSETTA *et al.*, 2011).

Rana *et al.* (2020) reported an slight increase in phenolic compounds in strawberries subjected to dielectric barrier discharge plasma (60 kV, 50 Hz, 10 to 30 min), due to an increase in chlorogenic acid and phloretin. However, the authors have pointed out that over-exposure to plasma could lead to oxidation of phenolics.

2.3. Antioxidant Activity

Figure 3 presents the antioxidant activity of the untreated and treated apple cubes and apple juice. The untreated apple cubes presented an antioxidant activity of 0.324 ± 0.018 $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ by the DPPH method. The untreated apple juice presented an antioxidant activity of 0.126 ± 0.014 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ by the DPPH method.

Figure 3 - Effect DBD plasma processing at different excitation frequencies on antioxidant capacity of apple cubes (a) and apple juice (b), measured by the DPPH method.



The antioxidant capacity of the treated apple cubes did not change significantly after plasma treatment at 400 Hz and decreased after plasma treatment between 600 (-33 %) and 900 Hz (-28 %). The results for antioxidant capacity are in line with the phenolics content, except for the treatment carried out at 600 Hz, which resulted in the lowest antioxidant capacity.

The antioxidant capacity of the treated apple juice increased significantly ($p < 0.05$) when applying plasma at excitation frequencies of 50 (50 %) and 200 Hz (10 %), which is in line with the increase observed in total phenolics content.

Changes in the antioxidant capacity were also not observed in kiwis and probiotic orange juice subjected to DBD plasma processing (ALMEIDA *et al.*, 2017; RAMAZZINA *et al.*, 2015). On the other hand, cashew apple juice subjected to plasma treatment presented a significant increase in antioxidant capacity. However, this result was reported for glow discharge plasma, which induces the formation of different plasma species (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017).

2.4. Color

Color is a quality and freshness indicator in foods, influencing costumers whether to buy or not the product. Table 3 presents the CIELab color parameter for the untreated and plasma-treated apple cubes and apple juice. Plasma treatment induced imperceptible changes in the color of the apple cubes since color change is only noticeable when the ΔE is higher than 3 (TIWARI *et al.*, 2008). Only the excitation frequency of 200 Hz induced a change greater than $\Delta E = 3.0$ in apple cubes.

Table 3 - CIELab color parameters for the untreated and plasma-treated apple cubes and apple juice.

Treatment	ΔL	Δa	Δb	ΔE
<i>Apple cubes</i>				
Untreated *	--	--	--	--
50 Hz	-1.62 ± 0.9 ^{ab}	1.67 ± 0.0 ^d	-0.30 ± 0.9 ^a	2.5 ± 0.7 ^{ab}
200 Hz	-2.28 ± 0.5 ^a	2.79 ± 0.1 ^e	1.01 ± 0.9 ^a	3.8 ± 0.6 ^b
400 Hz	-1.06 ± 0.2 ^{ab}	1.28 ± 0.1 ^c	-0.51 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.2 ^{abc}
600 Hz	-0.87 ± 0.2 ^{ab}	0.53 ± 0.0 ^a	2.28 ± 0.6 ^a	2.5 ± 0.6 ^{ab}
900 Hz	-0.85 ± 0.4 ^{ab}	0.35 ± 0.1 ^a	0.65 ± 1.4 ^a	1.4 ± 0.9 ^{ac}

<i>Apple juice</i>				
Untreated*	--	--	--	--
50 Hz	-5.23 ± 2.1 ^b	6.09 ± 0.1 ^d	6.51 ± 0.6 ^d	10.4 ± 0.7 ^d
200 Hz	-15.17 ± 0.1 ^a	12.30 ± 0.4 ^b	-3.29 ± 0.3 ^a	19.8 ± 0.0 ^a
400 Hz	-11.86 ± 1.9 ^a	10.73 ± 0.0 ^a	3.17 ± 0.9 ^c	16.4 ± 1.1 ^a
600 Hz	-15.79 ± 0.8 ^a	12.63 ± 0.1 ^b	-3.69 ± 0.1 ^a	20.6 ± 0.7 ^b
900 Hz	-11.81 ± 0.3 ^a	10.50 ± 0.1 ^a	0.31 ± 0.1 ^b	15.8 ± 0.1 ^a

Fonte: elaborada pelo autor.

* The control sample values are not in the table, because the Δ data is related to the sample difference with the decreasing treatment of the control sample.

However, plasma treatment induced significant changes in apple juice with all plasma-treated juices presenting an ΔE higher than 10 in relation to the untreated juice. Plasma application reduced the luminosity and increased the redness of the apple juice. The treatment at excitation frequencies of 200 and 600 Hz presented the biggest changes in color. The changes in color can be related to PPO enzyme activity since the most significant changes in color occurred in the treatments with the lowest reductions in PPO enzyme activity.

Plasma treatment decreased the luminosity of pumpkin puree, but the decrease observed after plasma application was smaller than for thermally treated pumpkin puree (SANTOS-JR *et al.*, 2018). Plasma-treated cherry tomatoes presented the same trend of our results, with a decrease in luminosity, an increase in redness, and no significant changes in yellowness (BERMÚDEZ-AGUIRRE *et al.*, 2013). Studies with strawberries, tomatoes, pomegranate juice, and kiwi did not report significant changes in the color of these products subjected to plasma processing (KOVAČEVIĆ *et al.*, 2016; RAMAZZINA *et al.*, 2015; VUKIĆ *et al.*, 2016).

Pankaj *et al.* (2017) reported that non-significant changes were observed in the color of white grape juice subjected to dielectric discharge plasma (60 kV, 50 Hz, 1 to 4 min). This result may indicate that longer exposure time causes higher color deviation, as occurred with apple juice. However, exposure reduction implies in increasing the voltage of the plasma system, which will increase the concentration of several plasma reactive species leading higher chemical changes in the product. In their work, both total phenolics and antioxidant capacity decreased with longer processing time. Herein, an increase in both total phenolics and antioxidant capacity increased. Thus, there is a trade-off between application of higher voltage and longer processing.

3. CONCLUSIONS

Dielectric barrier discharge plasma induced partial inactivation of the polyphenol oxidase in both apple cubes and apple juice, contributing to an increase in total phenolics content and antioxidant activity. Plasma application induced partial inactivation of the peroxidase enzyme only in apple juice. The inactivation efficacy was highly dependent on the food structure, being higher in the juice than in the minimally processed apple.

Plasma processing induced slight changes in the total phenolics content, antioxidant activity, and color of apple cubes while inducing more significant changes in this quality parameter in apple juice. The effect of the plasma excitation frequency was higher in apple juice. The excitation frequency of 50 Hz provided an apple juice with the highest total phenolic content, antioxidant capacity, and lowest color change.

Dielectric barrier discharge plasma systems can be built to work at excitations frequencies ranging from 50 to 30,000 Hz. This work showed that a specific excitation frequency may have a significant effect on some quality parameters, while not significantly affecting other parameters. This observation opens some opportunities to search for optimal excitation frequencies for specific goals, where a desired property change may be obtained while not significantly affecting other food properties.

REFERENCES

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSON, C.; VINAL, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **Int. J. Food Microbiol.**, n. 123, p. 121-129, 2008.

ALMEIDA, F. D. L.; GOMES, W. F.; CAVALCANTE, R. S.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Fructooligosaccharides integrity after atmospheric cold plasma and high-pressure processing of a functional orange juice. **Food Res. Int.**, n. 102, p. 282-290, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.072>

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, n. 53, p. 1331-1341, 2002.

ALVES FILHO, E. G.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; TIWARI, B. K.; BRITO, E.; S.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Evaluation of plasma, high-pressure and ultrasound processing on the stability of fructooligosaccharides. **Int. J. Food Sci. Technol.**, n. 51, p. 2034-2040, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13175>

ALVES FILHO, E. G.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, F. A. N.; DE BRITO, E. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; CAVALCANTE, R. S.; ALMEIDA, F. D. L.;

RODRIGUES, S. An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, n. 53, p. 63-69, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.10.001>

ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; DE BRITO, E. S.; WURLITZER, N. J.; FERNANDES, F. A. N.; RABELO, M. C.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using ¹H qNMR and GC-MS coupled to chemometrics. **Food Chem.**, n. 265, p. 23-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.038>

ANTHON, G. E.; BARRETT, D. M. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. **J. Agric. Food Chem.** n. 50, p. 4119-4125, 2002.

BERGER, C. N.; SODHA, S. V.; SHAW, R. K.; GRIFFIN, P. M.; PINK, D.; HAND, P.; FRANKEL, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environ. Technol.**, n. 12, p. 2385-2397, 2020.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; WEMLINGER, E.; PEDROW, P.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; GARCIA-PEREZ, M. Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of Escherichia coli in fresh produce. **Food Control**, n. 34, p. 149–157, 2013.

BOUSSETTA, N.; VOROBIEV, E.; DELOISON, V.; POCHEZ, F.; FALCIMAIGNE-CORDIN, A.; LANOISELLÉ, J. L. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. **Food Chem.**, n. 128, p. 364-370, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Sci. Technol.**, n. 30, p. 25-30, 1995.

BUBLER, S.; EHLBECK, J.; SCHLÜTER, O. K. Pre-drying treatment of plant related tissues using plasma processed air: Impact on enzyme activity and quality attributes of cut apple and potato. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, n. 40, p. 78-6, 2016.

CASTRO, D. R. G.; MAR, J. M.; SILVA, L. S.; SILVA, K. A.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. A.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N.; CAMPELO, P. H.O. Dielectric barrier atmospheric cold plasma applied on camu-camu juice processing: Effect of the excitation frequency. **Food Res. Int.**, n. 131, p. 109044, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109044>

CHUTIA, H.; KALITA, D.; MAHANTA, C. L.; OJAH, N.; CHOUDHURY, A. J. Kinetics of inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in tender coconut water by dielectric barrier discharge plasma. **LWT**, n. 101, p. 625-629, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.071>

FERNANDES, F. A. N.; SANTOS, V. O.; RODRIGUES, S. Effects of glow plasma technology on some bioactive compounds of acerola juice. **Food Res. Int.**, n. 115, p. 16-22, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.042>

GARDNER, P. T.; WHITE, T. A. C.; MCPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative

contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chem.**, n. 68, p. 471-474, 2000.

HERCEG, Z.; HOVACEVIC, D. B.; KLJUSURIC, J. G.; JAMBRAK, A. R.; ZORIC, Z.; DRAGOVIC-UZELAC, V. Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. **Food Chem.**, n. 190, p. 665-672, 2016.

HYSON, D. A. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. **Adv. Nutr.**, N. 2, p. 408-420, 2011.

KALINOWSKA, M.; BIELAWSKA, A.; LEWANDOWSKA-SIWKIEWICZ, H.; PRIEBE, W.; LEWANDOWSKI, W. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. **Plant Physiol. Biochem.**, n. 84, p. 169-188, 2014.

KHANI, M. R.; SHOKRI, B.; KHAJEH, K. Studying the performance of dielectric barrier discharge and gliding arc plasma reactors in tomato peroxidase inactivation. **J. Food Eng.** n. 197, p. 107-112, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.012>

KOVAČEVIĆ, D. B.; PUTNIK, P.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; PEDISIĆ, S.; JAMBRAK, A. R.; HERCEG, Z. Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. **Food Chem.**, n. 190, p. 317-323, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.099>

MARCHESE, J. A.; MATTANA, R. S.; MING, L. C.; BROETTO, F.; VENDRAMINI, P. F.; MORAES, R. M. Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) **Miq. plants. Photosynthetica**, n. 46, p. 501-505, 2008.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidases isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant Cell Physiol.**, n. 13, p. 1091-1101, 1972.

MISHARA, B. B.; KUMAR, S.; WADHAWAN, S.; HAJARE, S. N.; SAXENA, S.; MORE, V.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Browning of litchi fruit pericarp: role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase and effect of gamma radiation. **J. Food Biochem.**, n. 36, p. 604-612, 2012.

MISRA, N. N.; KEENER, K. M.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. **J. Biosci. Bioeng.**, n. 118, p. 177-182, 2014.

PANKAJ, S. K.; MISRA, N. N.; CULLEN, P. J. Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, n. 19, p. 153-157, 2013.

PANKAJ, S. K.; WAN, Z.; COLONNA, W.; KEENER, K. M. Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. **J. Sci. Food Agric.**, n. 97, p. 4016-4021, 2017.

RAMAZZINA, I.; BERARDINELLI, A.; RIZZI, F.; TAPPI, S.; RAGNI, L.; SACCHETTI,

G.; ROCCULI, P. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. **Postharvest Biol. Technol.**, n. 107, p. 55-65, 2015.

RANA, S.; MEHTA, D.; BANSAL, V.; SHIVHARE, U.S.; YADAV, S. K. Atmospheric cold plasma (ACP) treatment improved in-package shelf-life of strawberry fruit. **J. Food Sci. Technol.**, n. 57, p. 102-112, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04035-7>

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. . Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.**, n. 66, p. 401-436, 1999.

RODRÍGUEZ, Ó.; GOMES, W. F.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Sci. Technol.**, n. 84, p. 457-463, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.010>

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Anal. Methods**, n. 5, p. 5990–5999, 2013.

SANTOS-JR, L. C. O.; CUBAS, A. L. V.; MOECKE, E. H. S.; RIBEIRO, D. H. B.; AMANTE, E. R. Use of cold plasma to inactivate *Escherichia coli* and physicochemical evaluation in pumpkin puree. **J. Food Prot.**, n. 81, p. 1897-1905, 2018.

SILVA, L. C. A.; ALMEIDA, P. S.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Inactivation of Polyphenoloxidase and Peroxidase in Apple Cubes and in Apple Juice Subjected to High Intensity Power Ultrasound Processing. **J. Food Process. Preserv.**, n. 39, p. 2018-2087, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12451>

SUROWSKY, B.; FISCHER, A.; SCHÜETER, O.; KNORR, D. Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, n. 19, p. 146-152, 2013.

TAKAI, E.; KITANO, K.; KUWABARA, J.; SHIRAKI, K. Protein inactivation by low temperature atmospheric pressure plasma in aqueous solution. **Plasma Process. Polym.**, n. 9, p. 77-82, 2012.

TAPPI, S.; BERARDIRIELLI, A.; RAGNI, L.; ROSA, M. D.; GUARNIERI, A.; ROCCULI, P. Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, n. 21, p. 114-122, 2014.

TAPPI, S.; GOZZI, G.; VANNINI, L.; BERARDINELLI, A.; ROMANI, S.; RAGNI, L. Cold plasma treatment for fresh-cut melon stabilization. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, n. 33, p. 225-233, 2016.

TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Kinetics of freshly squeezed orange juice quality changes during ozone processing. **J. Agric. Food Chem.** n. 56, p. 6416-6422, 2008.

VUKIC, M.; VUJADINOVIC, D.; GOJKOVIC, V.; GRUJIC, R. Influence of cold plasma

treatment on textural and color characteristics of two tomato varieties. **Qual. Life**, n. 7, p; 12-16, 2016.

WANG, R. X.; NIAN, W. F.; WU, H. Y.; FENG, H. Q.; ZHANG, K.; ZHANG, J.; FANG, J.. Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation. **Eur. Phys. J.**, n. 66, p. 276, 2012.

WISSEMANN, K. W.; LEE, C. Y.. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. **Am. J. Enol. Vitic.**, n. 31, p. 206-211, 1980.

5 NMR EVALUATION OF APPLE CUBES AND APPLE JUICE COMPOSITION SUBJECTED TO TWO COLD PLASMA TECHNOLOGIES.

Esta seção contém o resumo, a introdução, os resultados, a discussão, a conclusão e as referências do artigo que foi publicado na revista científica LWT- Food Science and Technology.

Abstract

This study evaluated the effects of two cold plasma technologies, glow discharge plasma and dielectric barrier discharge plasma (DBD), on the chemical composition of apple cubes and apple juice analyzed by ^1H NMR coupled with chemometrics. The effects of different technologies (glow discharge and DBD) and operating conditions (processing time, gas flowrate, and excitation frequency) were evaluated on the concentration of sugars and organic acids of apple juice and apple cubes. Changes in sugars and organic acids were observed after the application of both plasma technologies. Glow discharge plasma application induced the decrease in sucrose content and the increase in glucose, fructose, and malic acid. Dielectric barrier discharge plasma induced sugar reduction and increased malic acid content. Cold plasma technology depolymerized sucrose into glucose and fructose by cleavage at the ether bond. DBD plasma further induced glucose and fructose consumption, most probably through the phenylpropanoid mechanism. Cold plasma technology could be used to modulate apple products' sensory characteristics, altering both sweetness and sugar-acid ratios.

1. INTRODUCTION

Apples are used in many food products, both as a marketed ingredient and as a hidden ingredient. Products such as tarts, granola, dried fruit mixes, and others use minimally processed or dried apple slices or apple cubes in their composition, where apples are marketed as ingredients. However, several fruit-based products incorporate apple puree or apple juice as hidden ingredients due to their sugar, pectin, organic acid, vitamin, and phenolic content. All these organic compounds regulate the sweetness, acidity, antioxidant capacity, and viscosity of fruit-based products without significantly impacting the product taste.

Preservation technologies have been studied to reduce spoilage to allow a continuous supply of apples and apple products throughout the year. Heat treatment (pasteurization or sterilization processes) is the leading preservation technique used to inactivate microorganisms and enzymes in fruit juices because of its effectiveness and high cost-benefit (MISRA *et al.*, 2014). However, heat-based processes alter several nutritional and sensory parameters of fruit juices, such as taste, aroma, color, vitamin, and phenolic content (WANG *et al.*, 2012). Consumers are currently demanding fruit products with a more natural appearance and fresh flavor, less sucrose and additives, and no artificial preservatives.

To meet consumer demands, apple products began to be mixed in other food products, acting as natural sweeteners and flavoring agent due to their sugar content and malic acid content. But new non-thermal preservation technologies are still required to reduce the changes imparted by the heat-based process (WANG *et al.*, 2012; MISRA *et al.*, 2014).

Among the non-thermal technologies, cold plasma was suitable for preserving several fruits and fruit-based products (BOURKE *et al.*, 2018; CASTRO *et al.*, 2020; HOSSEINI *et al.*, 2020; ZIUZINA *et al.*, 2014). Cold plasma processing consists of subjecting a food matrix to an ionized gas produced from an electrical discharge (RAMAZZINA *et al.*, 2015). The treatment can be carried out at ambient temperature, avoiding the adverse effects of heat (HERCEG *et al.*, 2016).

Cold plasma can be produced under atmospheric conditions or vacuum. Depending on the technique, there are advantages and disadvantages. For instance, in the glow discharge plasma, a gas stream is produced and delivered in a chamber containing many samples, but low pressures are required. In the dielectric barrier discharge, processing can be carried out at ambient temperature and pressure, but a lower amount of sample can be processed at a time. Several reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) are generated in both technologies, which may cause changes in the food matrix (ALVES FILHO *et al.*, 2016; NIEMIRA, 2012). The chemical modifications induced by plasma application can be either

positive or negative, improving or degrading some food matrix's nutritional and sensory properties. Changes to organic compounds depend on the type of plasma technology, voltage, gas, gas flowrate, exposure time, food structure, and composition (CAMPELO *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2017).

Studies on the preservation of apples and apple-based products using cold plasma technology have already reported the effectiveness of this technology in reducing the microbial load (SUROWSKY *et al.*, 2014) and extending their shelf-life (TAPPI *et al.*, 2014). However, few studies have addressed the chemical changes induced by cold plasma technologies on apples and apple-based products (RAMAZZINA *et al.*, 2016; FARIAS; RODRIGUES; FERNANDES, 2020). Therefore, an evaluation of the effects of cold plasma technologies on apple macro- and micro-components is required for their application. NMR analysis can be used to evaluate some of its macro- and micro-components, such as sugars and organic acids.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analytical method is an essential tool for detecting and measuring many compounds in different products, such as sugars and organic acids in fruits, and for comparing samples using multivariate statistics (SPRAUL *et al.*, 2009). In this work, NMR analysis results were evaluated by chemometrics, which consists of applying statistics and mathematical methods to process or chemical data, aiming to understand the associations between the variables.

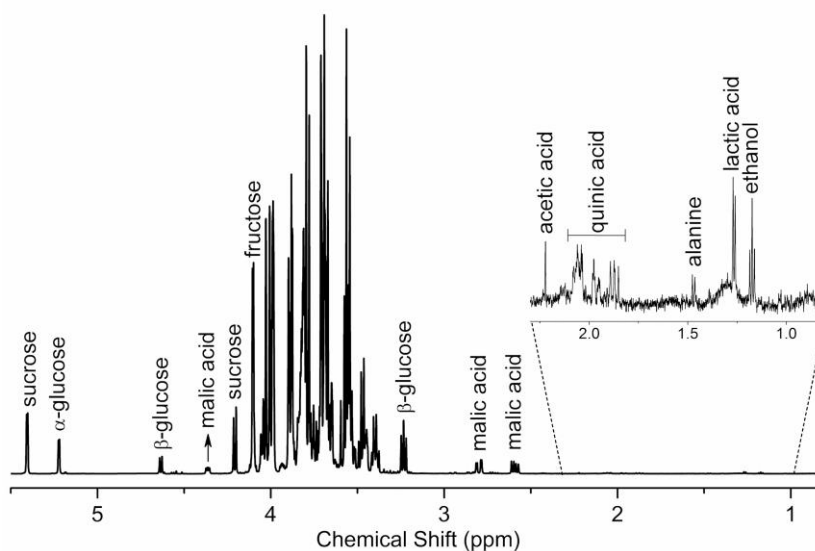
This work evaluates the effects of two cold plasma technologies (dielectric barrier discharge and glow discharge plasma) on apple cubes and apple juice composition attained by NMR analysis. The chemical changes in the composition of apple cubes and apple juice were reported and analyzed utilizing chemometrics. The sugar and organic acid composition changes were correlated to the product sweetness, acidity, and sweet/acid relation.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. NMR analysis and compound quantification

The composition of samples prepared using apple juice and apple cubes before and after cold plasma processing was investigated by ^1H NMR coupled to multivariate statistical analysis. Initially, the main organic compounds were identified. Figure 4 presents a representative ^1H NMR spectrum obtained from the control sample (untreated apple juice). Only the compounds between the chemical shifts δ 0.8 and 5.5 are illustrated due to the absence of compounds in the aromatic region (δ 5.5 to 9.0). The compounds' structures, ^1H and ^{13}C chemical shifts, multiplicity, correlations, and constant coupling are described in Supplementary Material.

Figure 4- ¹H NMR spectrum from non-processed apple juice (control sample) with the identified compounds



Fonte: Farias et al., (2021)

Although the α and β -glucose signals (at δ 5.22 and 4.63 respectively) are near the pre-saturation region of the non-deuterated water (δ 4.76), the evaluation of the saturation profile did not show significant influence on their signals. Sucrose was found to be the main organic compound in non-processed apple products.

Sucrose, glucose, and fructose were the main organic compounds found in the apple samples. These compounds were also seen as the main organic compounds in the Granny Smith, Pink Lady, and Jonagold varieties (YI *et al.*, 2017). These compounds are directly related to the samples' sweetness and are an essential quality indicator for minimally processed apples and apple juices.

Malic acid was also present in high concentrations in the samples, while citric and quinic acids were determined in lower concentrations. This observation corroborates with the results reported for Granny Smith apples, which contain 7.9 g/L of malic acid and 0.3 g/L of citric acid on average (DEL CAMPO *et al.*, 2006; YI *et al.*, 2017).

Table 4 presents the quantification of the main compounds found in apple juice and cubes applying NMR analysis. Only the compounds significantly affected by plasma application were quantified. Alanine, ethanol, quinic acid, lactic acid, and acetic acid did not change significantly and were not quantified. The statistical significance of the changes was

accessed by principal component analysis (PCA), which will be presented and discussed further in this article.

Table 4 - The concentration of fructose, glucose, sucrose, and malic acid of the untreated and plasma-treated apple products.

Operating Condition	Sucrose (mg/mL)	Glucose (mg/mL)	Fructose (mg/mL)	Malic Acid (mg/mL)
<i>Apple juice subjected to Glow Discharge Plasma</i>				
Control	5.971 ± 0.041 ^g	2.587 ± 0.017 ^a	6.106 ± 0.431 ^c	0.452 ± 0.006 ^b
10 mL/min 10 min	5.918 ± 0.006 ^g	4.920 ± 0.013 ^d	8.061 ± 0.128 ^h	0.690 ± 0.013 ^g
10 mL/min 20 min	5.582 ± 0.020 ^f	4.680 ± 0.032 ^c	7.831 ± 0.011 ^{gh}	0.664 ± 0.001 ^f
10 mL/min 30 min	5.927 ± 0.050 ^g	4.980 ± 0.026 ^d	7.333 ± 0.106 ^{efg}	0.718 ± 0.005 ^h
20 mL/min 10 min	4.902 ± 0.027 ^d	4.000 ± 0.028 ^b	6.860 ± 0.024 ^d	0.583 ± 0.004 ^d
20 mL/min 20 min	5.279 ± 0.042 ^e	4.376 ± 0.028 ^f	6.940 ± 0.287 ^{ef}	0.624 ± 0.005 ^e
20 mL/min 30 min	4.359 ± 0.013 ^b	3.621 ± 0.016 ^e	5.544 ± 0.033 ^b	0.519 ± 0.003 ^c
30 mL/min 10 min	4.639 ± 0.033 ^c	3.982 ± 0.025 ^b	6.285 ± 0.054 ^c	0.569 ± 0.004 ^d
30 mL/min 20 min	5.642 ± 0.028 ^f	4.739 ± 0.033 ^c	7.377 ± 0.048 ^{fg}	0.667 ± 0.003 ^f
30 mL/min 30 min	2.913 ± 0.023 ^a	2.519 ± 0.010 ^a	4.195 ± 0.066 ^a	0.347 ± 0.007 ^a
<i>Apple juice subjected to Dielectric Barrier Discharge Plasma</i>				
Control	12.925 ± 0.013 ^e	3.643 ± 0.044 ^e	8.505 ± 0.101 ^e	0.446 ± 0.008 ^a

50 Hz 15 min	10.476 ± 0.024 ^d	1.559 ± 0.004 ^a	6.111 ± 0.152 ^{ab}	0.958 ± 0.014 ^d
200 Hz 15 min	8.151 ± 0.007 ^c	1.807 ± 0.005 ^b	7.006 ± 0.082 ^d	0.500 ± 0.001 ^c
400 Hz 15 min	5.936 ± 0.071 ^b	2.084 ± 0.036 ^c	6.348 ± 0.094 ^b	0.451 ± 0.017 ^a
600 Hz 15 min	5.593 ± 0.025 ^a	2.154 ± 0.016 ^d	6.049 ± 0.043 ^a	0.457 ± 0.010 ^a
900 Hz 15 min	5.537 ± 0.008 ^a	1.506 ± 0.007 ^a	5.586 ± 0.045 ^c	0.375 ± 0.004 ^b

Apple cubes subjected to Dielectric Barrier Discharge Plasma

Control	12.925 ± 0.013 ^f	3.643 ± 0.044 ^e	8.505 ± 0.101 ^c	0.446 ± 0.008 ^b
50 Hz 15 min	9.437 ± 0.051 ^c	3.550 ± 0.050 ^d	8.355 ± 0.075 ^c	0.811 ± 0.000 ^a
200 Hz 15 min	6.133 ± 0.011 ^a	3.636 ± 0.008 ^{de}	6.964 ± 0.054 ^a	0.795 ± 0.004 ^a
400 Hz 15 min	6.844 ± 0.030 ^b	3.100 ± 0.029 ^b	7.733 ± 0.052 ^b	0.611 ± 0.009 ^c
600 Hz 15 min	11.977 ± 0.037 ^d	3.224 ± 0.027 ^c	7.876 ± 0.037 ^b	0.771 ± 0.010 ^d
900 Hz 15 min	12.153 ± 0.010 ^e	2.723 ± 0.003 ^a	6.822 ± 0.036 ^a	0.808 ± 0.010 ^a

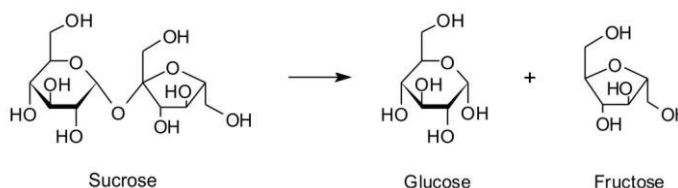
Fonte: elaborada pelo autor.

As a general trend, plasma application reduced sucrose concentration in both apple juice and cubes. The reduction in sucrose concentration for apple juice subjected to glow discharge plasma was between 1% and 51.2%, showing high dependence on the operating conditions that were employed. Increases in processing time and air flow rate increased the reduction in sucrose in the glow plasma system. The decrease in sucrose concentration for apple juice subjected to DBD plasma was between 18.9 and 57.1%, showing a high dependence on the excitation frequency. The reduction range attained for the apple cubes subjected to DBD plasma (between

6.0 and 52.5%) was lower than the reduction observed for the apple juice, which may explain the higher difficulty in plasma species to diffuse into the fruit matrix and react with sucrose molecules.

Although the maximum reduction levels in sucrose content were in the same order of magnitude for both plasma systems, the DBD plasma system converted a higher sucrose amount into glucose, fructose, and other components. Due to the natural variation of in apple sugar content between fruits and lots, the reduction of sucrose observed for apple juice subjected to DBD plasma (7.388 mg/mL) was much higher than for the apple juice subjected to glow discharge plasma (3.058 mg/mL), indicating that the DBD plasma produces a greater amount of plasma species that can break the ether link between glucose and fructose (Figure 5).

Figure 5 - Decomposition of sucrose into glucose and fructose.



Fonte: Farias et al., (2021)

The changes observed in glucose and fructose concentration differed considerably between glow discharge plasma and DBD plasma. While the concentration of fructose and glucose increased after glow discharge plasma application, it decreased when DBD plasma was applied.

The increase in fructose and glucose in apple juice subjected to glow discharge plasma was slightly higher than the sucrose concentration reduction, increasing total soluble sugars. This slight increase may be due to the decomposition of starch and glycoside compounds that NMR does not detect. Decomposition of glycoside compounds would generate an aglycone compound and glucose, fructose, or other sugar molecules. Such reactions have already been reported after plasma application in compounds such as anthocyanins and alkaloids (LINHARES *et al.*, 2020). Furthermore, apples in the stage of maturity used in this work still contain a certain amount of starch, which may depolymerize, generating glucose and other short-chain sugars. Depolymerization of starch and oligosaccharides have been reported previously in cold plasma treatment (ALMEIDA *et al.*, 2017; ZHU, 2017).

The concentration of fructose and glucose decreased after DBD plasma application when compared to the control sample. Thus, while sucrose produces glucose and fructose, these

two compounds are being consumed in other reactions. Glucose and fructose are consumed to produce energy by the fruit defense system through the phenylpropanoid mechanism (DIXON; PAIVA, 1995; MATSUDA *et al.*, 2005). All experiments were carried out with fresh fruit, cut or juiced, and then subjected to plasma application. As such, the samples had viable cells (apple cubes) and viable enzymes (apple juice and cubes), which may have responded to the reactive oxygen species (ROS) generated by the DBD plasma application activating the phenylpropanoid mechanism. Furthermore, air plasma generates singlet and nitrogen radicals that can react with fructose and glucose, increasing these two sugars' reduction (WANG; HOLLINGSWORTH; KASPER, 1999).

The glow discharge plasma and the DBD plasma systems, although being plasma systems, operate in very different conditions of excitation frequencies, generating different plasma species. The results presented herein indicate that glow discharge plasma generates ROS in a concentration and composition that does not activate the phenylpropanoid mechanism. In contrast, the DBD plasma generates the ROS that activates the apple's defense system, leading to glucose and fructose consumption.

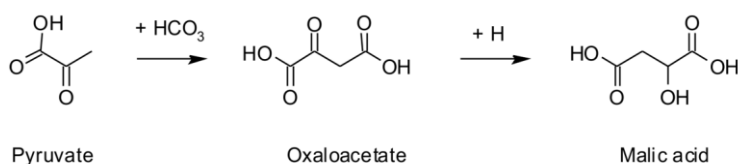
The effects of DBD plasma application on freshly produced apple juice differed from the effects observed for its application in pasteurized orange juice regarding sugar content. While total sugar content decreased in freshly made apple juice, it increased slightly in pasteurized orange juice, where the fruit's defense mechanism is inactive (ALVES FILHO *et al.*, 2016).

Overall, the concentration of malic acid tended to increase after plasma application. The highest increase (115 %) in malic acid concentration was observed for apple juice subjected to DBD plasma at an excitation frequency of 50 Hz. The increase was much lower, applying other excitation frequencies (up to 12%). Apple cubes subjected to the same process presented a considerable increase in malic acid content (between 37 and 82%). The matrix difference, in this case, played a fundamental role in generating and maintaining malic acid levels in apple cubes and not in apple juice. The solid matrix may have protected malic acid from highly oxidizing ROS, such as ozone, generated at increased concentrations at higher excitation frequencies. Glow discharge plasma application resulted in an increase in malic acid content, which was higher at shorter processing times and air flowrate. The increase in processing time and flowrate decreased the malic acid content, as could be observed more clearly when operating for 30 min at a 30 mL/min air flow rate.

The increase in malic acid content may be related to the reduction of sucrose and glucose. As sucrose and glucose are consumed for energy production, pyruvate is produced via

glycolysis due to the partial activation of defense mechanisms. Pyruvate may be converted into oxaloacetate and further on to malic acid through the cytosolic malate production route (Figure 6), which depends on only two cytoplasmatic enzymes (pyruvate carboxylase and malate-dehydrogenase) and does not depend on fully functioning mitochondria, as the oxidative TCA and the glyoxylate pathways (KÖVILEIN *et al.*, 2020; ONIK *et al.*, 2019).

Figure 6- Cytosolic malate production pathway.



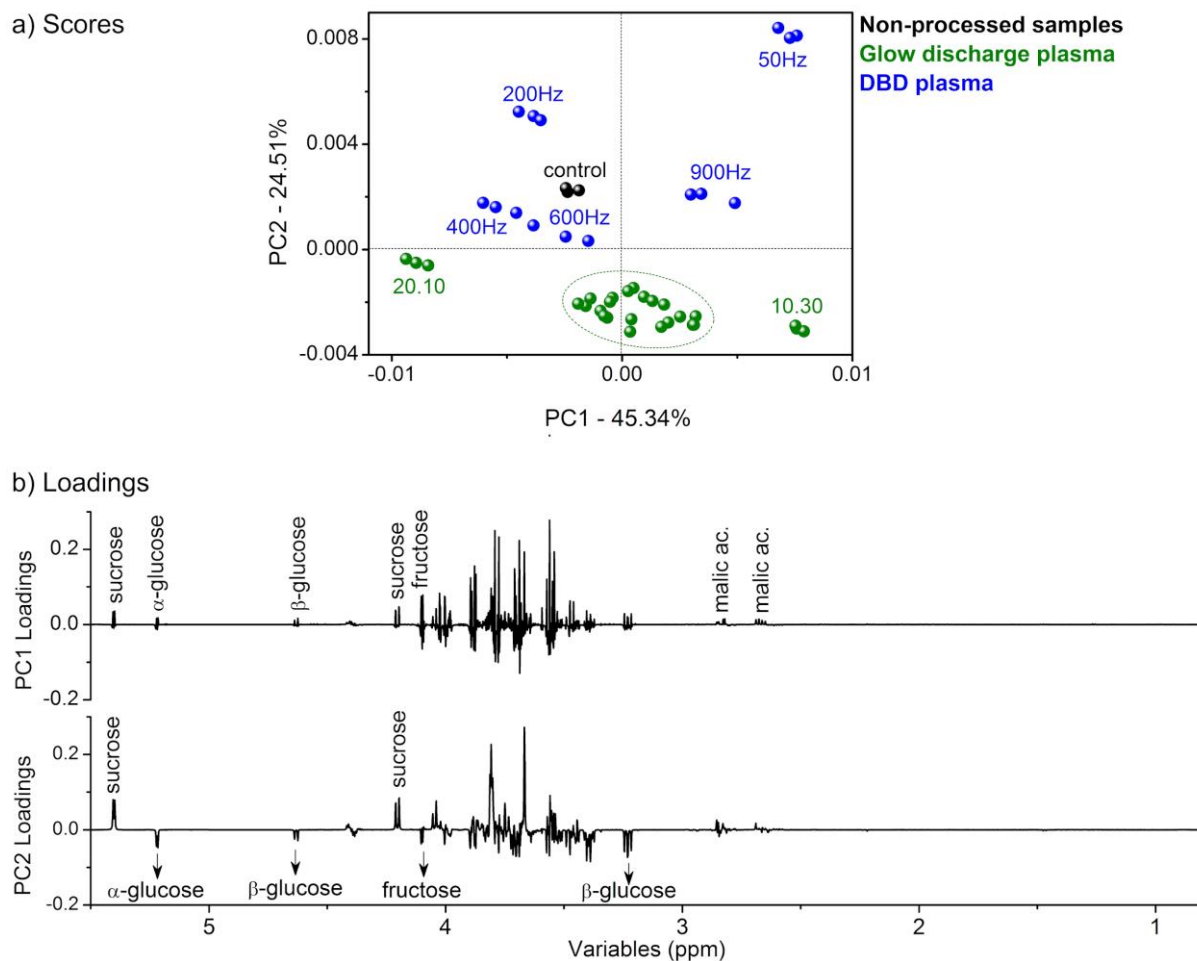
Fonte: Farias et al., (2021)

2.2. PCA analysis

An unsupervised chemometric method by Principal Component Analysis (PCA) was applied to explore the changes on sample composition. The analysis was carried out on the ^1H NMR dataset composed of apple samples before (control) and after non-thermal processing. The region affected by the non-deuterated water suppression according to the saturation profiling (δ 4.66 to 5.00) was excluded before evaluation.

To detail the effect of non-thermal processing on apple product composition, the impact of plasma processing was first evaluated with separate PCAs for apple juice and apple cubes (Figures 7 and 8). Figure 7 presents the PCA for the apple juice subjected to different processing conditions by glow discharge plasma (green) varying the plasma flowrate from 10 to 30 mL/min and treatment duration from 10 to 30 min and subjected to different processing conditions by DBD plasma (blue) varying the treatment frequency from 50 to 900 Hz. Both PC1 and PC2 were relevant axes for apple juice discrimination according to the non-thermal processing influence, which retained 69.8% of the total variance.

Figure 7 - PC1 × PC2 scores coordinate system with control apple juice (non-processed material) marked in black color, apple juice subjected to glow discharge plasma in green, apple juice subjected to dielectric barrier discharge plasma in blue (a); and loadings plot with the relevant compounds for samples discrimination (b).



Fonte: Farias et al., (2021)

Apple juice processed by glow discharge plasma and DBD plasma presented significant differences retained by the PC2 axis (24.51% of the captured variance), with glow discharge plasma samples at negative values of PC2 due to the simultaneous high amounts of α and β -glucose (δ 5.21 and δ 4.64) and fructose (δ 4.11), and the DBD plasma samples at positive values of PC2 due to the higher amounts of sucrose.

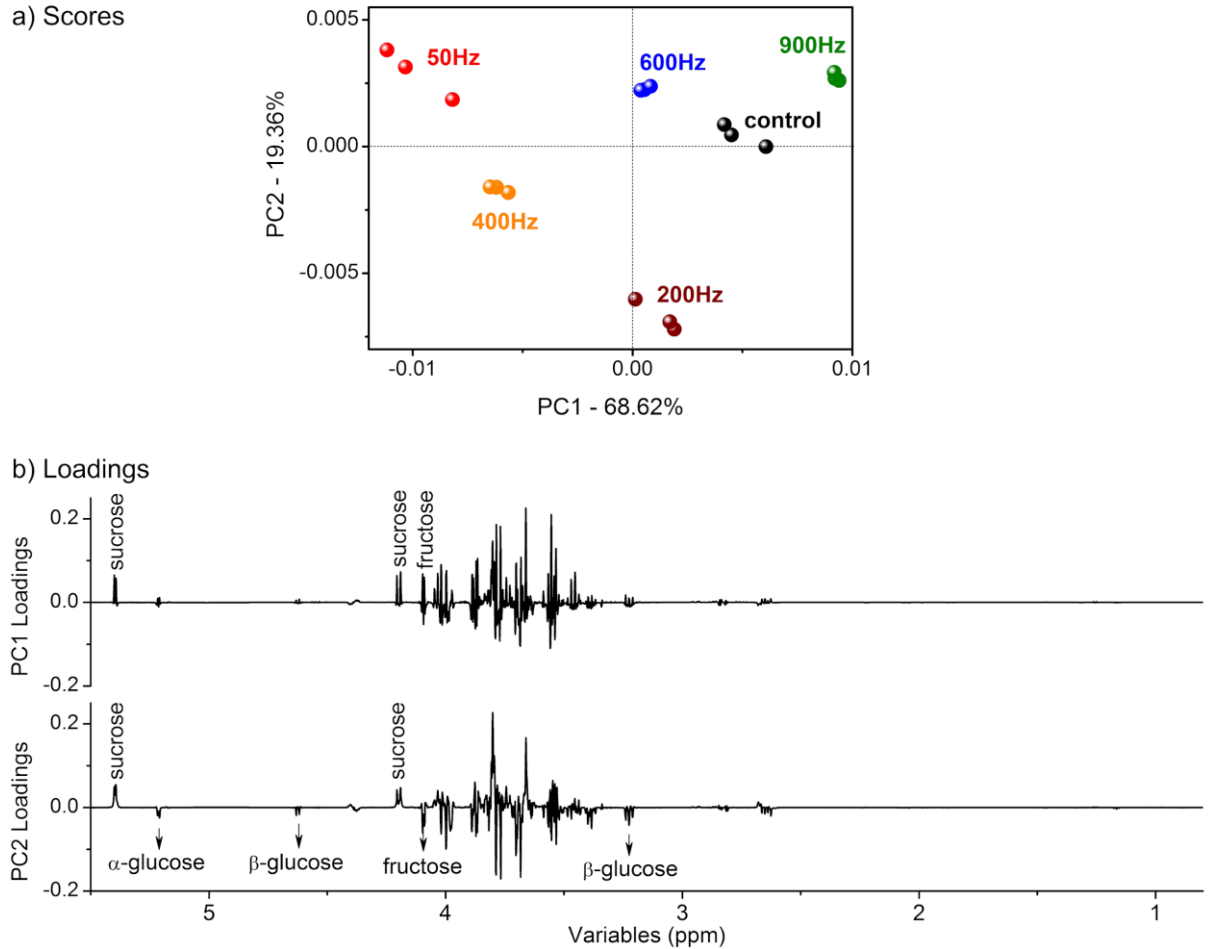
Among the glow discharge plasma samples, most processing conditions did not result in significant differences, with samples concentrated in neutral values of PC1. Apple juice processed by glow discharge plasma presented the most significant compound variation retained in the PC1 axis (45.34% of the total variance), which was related by samples processed

at 20 mL/min for 10 min and 10 mL/min for 30 min located at negative and positive values of PC1, respectively. The sample subjected to 10 mL/min of air flow rate for 30 min was marked by a higher sucrose content, glucose, and malic acid (at δ 2.67 and 2.83). In comparison, the sample subjected to 20 mL/min of air flow rate for 10 min was marked by a higher ratio between glucose + fructose and sucrose.

The apple juice subjected to DBD plasma processing at excitation frequencies of 200, 400, and 600 Hz presented similar composition to the non-processed apple juice (control) by their clustering at negative scores of PC1 and positive of PC2. The juices subjected to DBD plasma at excitation frequencies of 50 Hz showed a significant difference from the other condition, placed in high positive values of both PC1 and PC2, given its higher sucrose and malic acid amounts.

PC1 and PC2 were relevant axes for apple juice discrimination according to the non-thermal processing influence, which retained 88.0% of the total variance. Apple cubes subjected to DBD plasma processing at excitation frequencies of 50, 200, and 400 Hz (Figure 8) presented the most significant composition effect. Since the high signals intensity on loadings plot is related to high compounds variability among the samples, apple cubes subjected to DBD plasma operating at 50 and 400 Hz showed a relevant impact on the decrease of sucrose (δ 5.42) and fructose (δ 4.11), represented by the negative values of PC1 that retained 68.62% of the total variance. Also, the processing of apple cubes at 200 Hz resulted in increased glucose and fructose content compared to the other apple cube samples treated by DBD plasma.

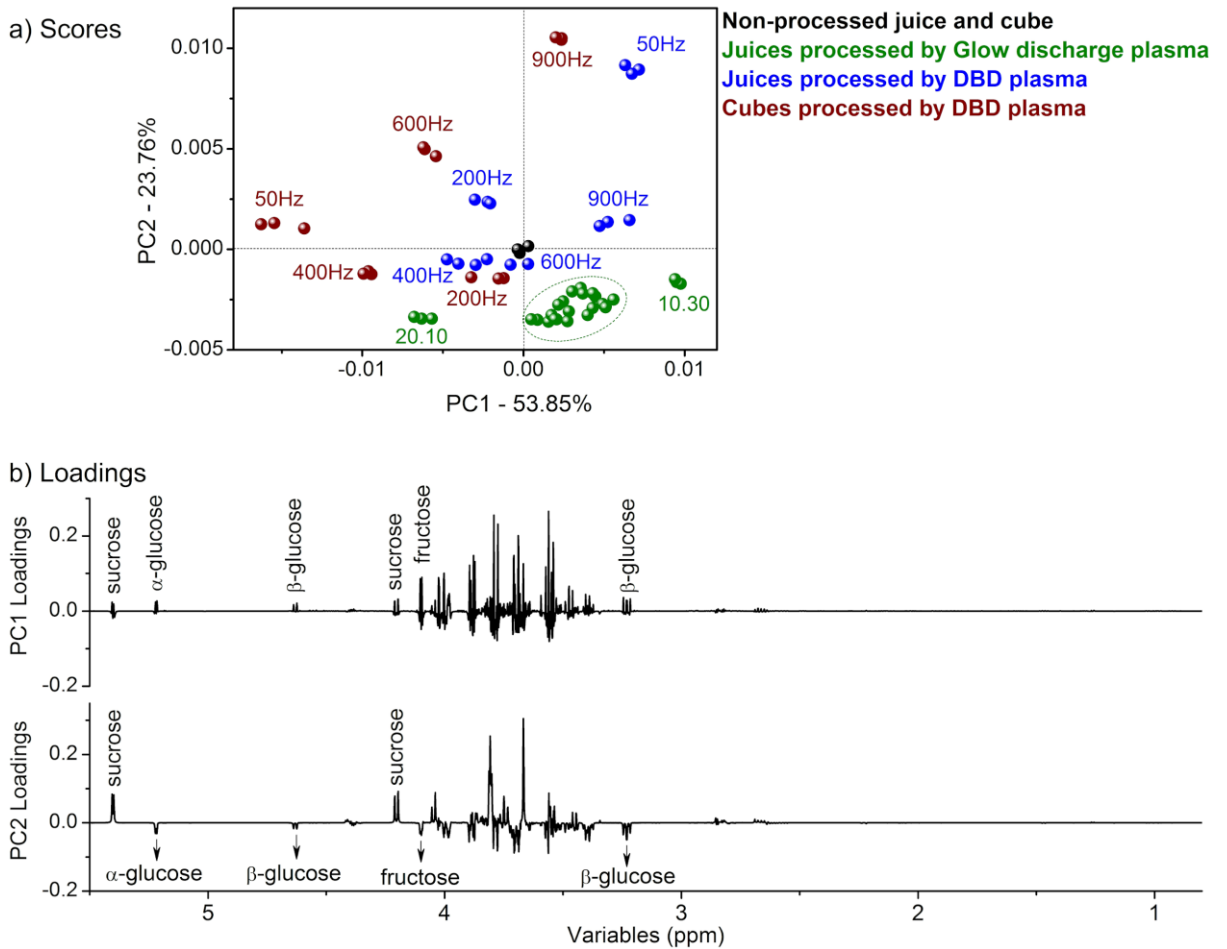
Figure 8 - PC1 × PC2 scores coordinate system with control apple cubes (non-processed material) marked in black color, apple cubes subjected to dielectric barrier discharge plasma in colors (a); and loadings plot with the relevant compounds for samples discrimination (b).



Fonte: Farias et al., (2021)

Figure 9 a presents the resulting scores with the control samples marked in black color, apple juice subjected to glow discharge plasma in green, apple juice subjected to dielectric barrier discharge plasma in blue, and apple cubes subjected to dielectric barrier discharge plasma in red. Figure 9 b shows the respective loadings plotted in line format.

Figure 9 - PC1 × PC2 scores coordinate system with control apple juice (non-processed material) marked in black color, apple juice subjected to glow discharge plasma in green, apple juice subjected to dielectric barrier discharge plasma in blue, and apple cubes subjected to dielectric barrier discharge plasma in red (a); and loadings plot with the relevant compounds for samples discrimination (b).



Fonte: Farias et al., (2021)

Both PC1 and PC2 were relevant axes for apple juice discrimination according to the non-thermal processing influence, which retained 77.61% of the total variance. The complete principal component analysis of the data confirms the differences between the plasma technologies and the matrixes (juice and cubes). Three clusters can be observed through the scores plot. Juice samples subjected to glow discharge plasma placed mainly at positive values of PC1 and negative values of PC2 mainly because of their simultaneous high content of α and β -glucose (δ 5.21 and δ 4.64) and fructose (δ 4.11). Apple juice samples subjected to DBD plasma placed mostly near neutral values of PC1 and PC2 and positive values of both PC1 and

PC2. And apple cubes samples subjected to DBD plasma placed mainly at negative values of PC1 and positive values of PC2 because of the lower contents of sucrose, glucose, and fructose, except for the samples subjected to 900 Hz, which presented higher amounts of sucrose compared to the others processed cubes.

These clusters indicate that glow plasma tends to decrease sucrose content and increase glucose and fructose content slightly. DBD plasma application tends not to modify apple juice unless applied at low excitation frequencies (50 Hz).

The PCA showed a good separation among the processes, indicating the trends observed for apple products' non-thermal treatment. Alves Filho et al. (2016) had also demonstrated a clear separation of the sample slightly greater with 82.1% of the total variance in the PC1 and PC2 scores in their work with orange juice, evaluating the application of ozone and atm plasma at 70 kV for different treatment times (15, 30, 45 and 60 s). Based on ANOVA single factor analysis, variation tendencies observed in the PCA evaluations corroborated with the quantitative results.

According to Misra et al. (2014), who carried out a study on the kinetics of peroxidase inactivation in different media subjected to DBD plasma, enzyme inactivation was faster in liquid media than in liquid media whole fruits. Plasma does not have great penetrating power, acting more intensely on the surface of the sample. As such, the juice will be more exposed to plasma species than the apple cubes, which have the protection of the cell walls.

2.3. Total sugar concentration and sweetening power

A food product's sweetness should not be determined by its total sugar content because each sugar has its sweetening power. Table 5 presents the total sugar content of the apple products studied herein and its sweetening power.

Table 5 - Total sugar concentration of fructose, sweetening power, and sugar-acid ratio.

Operating Condition	Total sugar (mg/mL)	Sweetening power	Sugar-Acid Ratio
<i>Apple juice subjected to Glow Discharge Plasma</i>			
Control	14.66 ± 0.48 ^c	1826 ± 77 ^f	32.4 ± 1.4 ^d
10 mL/min 10 min	18.90 ± 0.12 ^g	2326 ± 21 ^e	27.4 ± 0.4 ^{bc}

10 mL/min 20 min	18.09 ± 0.06 ^f	2236 ± 6 ^e	27.2 ± 0.1 ^{bc}
10 mL/min 30 min	18.24 ± 0.03 ^f	2208 ± 6 ^e	25.4 ± 0.2 ^a
20 mL/min 10 min	15.76 ± 0.03 ^d	1952 ± 11 ^d	27.0 ± 0.3 ^{abc}
20 mL/min 20 min	16.60 ± 0.31 ^e	2031 ± 51 ^b	26.6 ± 0.4 ^{abc}
20 mL/min 30 min	13.52 ± 0.06 ^b	1647 ± 8 ^b	26.0 ± 0.3 ^{ab}
30 mL/min 10 min	14.91 ± 0.01 ^c	1827 ± 4 ^c	26.2 ± 0.2 ^{abc}
30 mL/min 20 min	17.76 ± 0.10 ^f	2169 ± 13 ^e	26.6 ± 0.3 ^{abc}
30 mL/min 30 min	9.63 ± 0.09 ^a	1191 ± 14 ^a	27.7 ± 0.8 ^c

Apple juice subjected to Dielectric Barrier Discharge Plasma

Control	25.07 ± 0.10 ^f	3008 ± 16 ^f	56.2 ± 1.3 ^d
50 Hz 15 min	19.06 ± 0.16 ^e	2269 ± 26 ^e	19.9 ± 0.5 ^c
200 Hz 15 min	18.02 ± 0.16 ^d	2218 ± 6 ^d	36.0 ± 0.3 ^a
400 Hz 15 min	15.49 ± 0.21 ^c	1910 ± 26 ^c	34.4 ± 1.7 ^{ab}
600 Hz 15 min	14.94 ± 0.06 ^b	1832 ± 8 ^b	32.7 ± 0.6 ^b
900 Hz 15 min	13.44 ± 0.03 ^a	1675 ± 7 ^a	35.8 ± 0.4 ^a

Apple cubes subjected to Dielectric Barrier Discharge Plasma

Control	25.08 ± 0.10 ^f	3008 ± 16 ^f	56.2 ± 1.3 ^d
---------	---------------------------	------------------------	-------------------------

50 Hz 15 min	21.34 ± 0.15 ^c	2627 ± 18 ^a	26.3 ± 0.2 ^a
200 Hz 15 min	16.73 ± 0.05 ^a	2066 ± 9 ^c	21.0 ± 0.1 ^c
400 Hz 15 min	17.68 ± 0.10 ^b	2228 ± 13 ^b	28.9 ± 0.6 ^b
600 Hz 15 min	23.98 ± 0.05 ^e	2775 ± 5 ^e	29.9 ± 0.5 ^b
900 Hz 15 min	21.70 ± 0.03 ^d	2577 ± 5 ^c	26.8 ± 0.4 ^a

Fonte: elaborada pelo autor.

Plasma application changed the sugar composition profile of the apple juice and apple cubes and changed the sweetness of these products (measured by their sweetening power). The effect of glow discharge plasma on the sweetening power of apple juice samples depended on the operating condition applied, resulting in an increase or decrease of the sweetening power. DBD plasma resulted in a reduction of the sweetness power of both apple juice and cubes.

The highest increase in sweetening power (27%) was observed for apple juice subjected to 10 mL/min of air plasma flowrate for 10 min, a condition that resulted in the highest amount of fructose in the juice. While, the highest decrease in sweetening power (44%) was observed for apple juice subjected to DBD plasma applied at an excitation frequency of 900 Hz for 15 min due to the reduction of sucrose, glucose, and fructose in the juice.

The differences observed between the two cold plasma technologies are considerable. Glow plasma technology showed to increase the sweetening power of apple juice, which can be very interesting to produce apple juice that will be used as a natural sweetening agent. In this case, lesser volumes of apple juice could be employed to attain the same sweetening effect.

DBD plasma application significantly reduced the apple juice sweetening power, producing a juice with lower total sugar content and lower sweetness. Commercial application of such products could favor products labeled as low sugar content.

Previous work with cashew apple juice (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017) subjected to glow discharge plasma has also shown reduced sucrose content when applied at 10 mL/min air plasma flowrate for 15 min, condition very similar to the results presented herein for apple juice. The work presented by Rodriguez et al. (2017) did not estimate the sweetening power of cashew apple juice. Still, differently from this work, their glucose and fructose content did not

increase; thus, the sweetening power of cashew apple juice was likely to decrease.

The reduction of sucrose accompanied by the increase in glucose and fructose has been reported for thermal treatment of cashew apple juice and passion fruit juice, leading to juices with higher sweetness (DAMASCENO *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2017). In both cases, the juice's acidity induced the hydrolysis of sucrose at pasteurization temperatures (> 90 °C). Sweetness increase can be achieved by thermal treatment, but it is accompanied by degradation of several organic compounds with consequent deleterious impact on the juices' sensory quality (DAMASCENO *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2017). Glow discharge plasma, however, could be used to increase the sweetening power of apple juices without presenting a major impact on the sensory and nutritional quality of fruit juices (ALVES FILHO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2019; PAIXÃO *et al.*, 2019).

2.4. Sugar-acid ratio

The sugar-acid ratio is very important for the taste and flavor of fruit juices, and influences the sweetness perception (COLARIC *et al.*, 2005; LÓPEZ *et al.*, 2007; PETKOVSEK *et al.*, 2007). Acids are used to regulate this sweetness perception of sugars, reducing the sweet taste. Lower sugar-acid ratios result in a lower perception of the sweetness. Still, very low sugar-acid ratios (< 20 for apples) increase the acidity of the product and the sour taste (PETKOVSEK *et al.*, 2007).

Table 2 presents the sugar-acid ratio for the control samples and the samples subjected to non-thermal processing. All samples subjected to cold plasma showed a lower sugar-acid ratio than the control (untreated) sample due to the increase in malic acid. DBD plasma application resulted in a higher reduction sugar-acid ratio (up to 65%) than glow discharge plasma application (up to 21%). The higher reduction attained by DBD plasma was due to the concomitant increase in malic acid and reduction of sugars (sucrose, glucose, and fructose).

The perceived sweetness intensity as a function of the sugar-acid ratio was correlated by Sharma *et al.* (1991) using Equation 2.

$$s = 0.02 SAR^{1.3} \tag{2}$$

Where, s is the perceived sweetness intensity (varying from 0 to 10), and SAR is the sugar-acid ratio (w/w %).

The perceived sweetness intensity of the untreated apple juice was 3.7. After DBD plasma treatment, the perceived sweetness intensity varied between 1.0 and 2.1, with the lowest

value attained after treatment for 15 min at 50 Hz. Nowadays, apple juice is blended with other more expensive juices to reduce cost and improve the preservation of the blended juice due to its sugar and malic acid content. Although apple juice does not have a pronounced taste, a limited amount of apple juice can be blended with other juices because of its high perceived sweetness intensity. DBD plasma-treated apple juice could be added in higher amounts since 1.3 L of DBD treated apple juice would have the same amount of sugar and malic acid as 1.0 L of the untreated juice. Still, it would have only a third of the perceived sweetness intensity.

Glow discharge plasma-treated apple juice would be a better choice for blended juices, where the cost is not an issue, but apple juice is added to increase sugar and organic acid content. In this case, the same content of sugars and malic acid would be obtained in 0.80 L of glow plasma-treated juice (treatment condition: 10 min at 10 mL/min air plasma flowrate). However, the perceived sweetness intensity would be half the perceived sweetness intensity of the untreated apple juice. In this context, plasma treatment can modulate the desired characteristics of apple juice to be sold as apple juice or to be blended with other juices.

A second flavor characteristic influenced by the sugar-acid ratio is the sourness of a food product. The perceived sourness intensity as a function of the sugar-acid ratio was correlated by Sharma et al. (1991) using Equation 3.

$$SO = 15.02 SAR^{-1.03} \quad (3)$$

Where, *SO* is the perceived sourness intensity (varying from 0 to 10), and *SAR* is the sugar-acid ratio (w/w %).

The sugar-acid ratio of all samples was above 20 or within its standard deviation, denoting that the juices and cubes would still be considered sweet. The perceived sourness intensity of the untreated apple juice was 0.2. After plasma treatment, the perceived sourness intensity varied between 0.4 and 0.7, with the highest value attained after treatment for 15 min at 50 Hz. Although an increase is observed in the perceived sourness intensity after plasma treatment, its value is still below 1.0, indicating that the juice does not become sour.

3. CONCLUSION

Cold plasma processing changed the composition of apple cubes and apple juice. The changes strongly depended on the processing conditions and cold plasma technology.

Glow discharge plasma tended to reduce sucrose content and increase glucose, fructose, and malic acid. These changes significantly increased the sweetening power and reduced the sugar-acid ratio of the apple juices. The most significant changes were attained operating at 20

mL/min of air plasma flowrate for 10 min and at 10 mL/min of air plasma flowrate for 30 min.

Dielectric barrier discharge plasma reduced the sucrose, glucose, and fructose content and increased malic acid content. DBD plasma decreased the sweetening power and the sugar-acid ratio of apple juice and apple cubes. The most significant changes were attained at 50 and 900 Hz.

Cold plasma technology depolymerized sucrose into glucose and fructose by cleavage at the ether bond. DBD plasma further induced glucose and fructose consumption, most probably through the phenylpropanoid mechanism. Therefore, cold plasma treatment alters apple products' sensory characteristics and could be used to modulate both sweetness and sugar-acid ratios.

REFERENCES

- ALMEIDA, F. D. L.; GOMES, W. F.; CAVALCANTE, R. S.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Fructooligosaccharides integrity after atmospheric cold plasma and high-pressure processing of a functional orange juice. **Food Research International**, n. 102, p. 282-290, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.072>
- ALMEIDA, F. D. L.; CAVALCANTE, R. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 32, p. 127-135, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.001>
- ALVES FILHO, E. G.; ALMEIDA, F. D. L.; CAVALCANTE, R. S.; DE BRITO, E. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. ¹H NMR spectroscopy and chemometrics evaluation of non-thermal processing of orange juice. **Food Chemistry**, n. 204, p. 102-107, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.121>
- ALVES FILHO, E. G.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, F. A. N.; DE BRITO, E. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; CAVALCANTE, R. S.; ALMEIDA, F. D. L.; RODRIGUES, S. An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 53, p. 63-69, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.10.001>
- ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; DE BRITO, E. S.; WURLITZER, N. J.; FERNANDES, F. A. N.; RABELO, M. C.; FONTELES, T. V.; & RODRIGUES, S. Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using ¹H qNMR and GC-MS coupled to chemometrics. **Food Chemistry**, 265, 23-31, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.038>
- BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Application of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**, n. 61, p. 207-213, 1998.
- BELTON, P. S.; DELGADILLO, I.; GIL, A.; ROMA, P.; CASUSCELLI, F.; OLQUHOUN, I.; DENNIS, M.; SPRAUL, M. High-field proton NMR studies of apple juices. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 1997.
- BEVILACQUA, A.; PETRUZZI, L.; PERRICONE, M.; SPERANZA, B.; CAMPANIELLO, D.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Nonthermal technologies for fruit and vegetable juices and beverages: overview and advances. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 1, p. 2-62, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12299>
- BOURKE, P.; ZIUZINA, D.; BOEHM, D.; CULLEN, P. J.; KEENER, K. The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 615-626, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.001>

CAMPELO, P. H.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; DE BRITO, E. S.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Modulation of aroma and flavor using glow discharge plasma technology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 62, p. 102363, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102363>

CASTRO, D. R. G.; MAR, J. M.; SILVA, L. S.; SILVA, K. A.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. A.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N.; CAMPELO, P. H. Dielectric barrier atmospheric cold plasma applied on camu-camu juice processing: Effect of the excitation frequency. **Food Research International**, n. 131, 109044, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109044>

COLARIC, M.; VEBERIC, R.; STAMPAR, F.; HUDINA, M. Evaluation of peach and nectarine fruit quality and correlations between sensory and chemical attributes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 15, p. 2611-2616, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2316>

CURTIS, D. W.; STEVENS, D. A.; LAWLESS, H. T. Perceived intensity of the taste of sugar mixtures and acid mixtures. **Chemical Senses**, v. 9, n. 2, p. 107-120, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1093/chemse/9.2.107>

DAMASCENO, L. F.; FERNANDES, F. A. N.; MAGALHÃES, M. M. A.; BRITO, E. S. Evaluation and optimization of non enzymatic browning of “cajuina” during thermal treatment. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, n. 25, p. 313-320, 2008.

DEL CAMPO, G.; BERREGI, I.; CARACENA, R.; SANTOS, J. I. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, n. 2, p. 462-468, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.039>

DIXON, R. A.; & PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

FARIAS, T. R. B.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Effect of dielectric barrier discharge plasma excitation frequency on the enzymatic activity, antioxidant capacity and phenolic content of apple cubes and apple juice. **Food Research International**, n. 136, p. 109617, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109617>

FERNANDES, F. A. N.; SANTOS, V. O.; RODRIGUES, S. Effects of glow plasma technology on some bioactive compounds of acerola juice. **Food Research International**, n. 115, p. 16-22, jul. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.042>

FONTELES, T. V.; LEITE, A. K. F.; DA SILVA, A. R. A.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Sonication Effect on Bioactive Compounds of Cashew Apple Bagasse. **Food and Bioprocess Technology**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1960-x>

HERCEG, Z.; HOVACEVIC, D. B.; KLJUSURIC, J. G.; JAMBRAK, A. R.; ZORIC, Z.; DRAGOVIC-UZELAC, V. Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. **Food Chemistry**, n. 190, p. 665–672, 2016.

HOBBS, L. Sweeteners from Starch. **Starch**, Elsevier, p. 797-832 DOI:

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00021-5>

HOSSEINI, S. M.; ROSTAMI, S.; HOSSEINZADEH SAMANI, B.; LORIGOOINI, Z. The effect of atmospheric pressure cold plasma on the inactivation of *Escherichia coli* in sour cherry juice and its qualitative properties. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 870-883, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1364>

KÖVILEIN, A.; KUBISCH, C.; CAI, L.; OCHSENREITHER, K. Malic acid production from renewables: a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 513-526, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.6269>

LINHARES, M. F. D.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; FONTELES, T. V.; WURLITZER, N. J.; DE BRITO, E. S.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Thermal and non-thermal processing effect on açai juice composition. **Food Research International**, n. 136, p. 109506. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109506>

LÓPEZ, M. L.; VILLATORO, C.; FUENTES, T.; GRAELL, J.; LARA, I.; ECHEVERRÍA, G. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of ‘Pink Lady®’ apples stored in different conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 55-66, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.009>

MATSUDA, F.; MORINO, K.; ANO, R.; KUZAWA, M.; WAKASA, K.; MIYAGAWA, H. Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 3, p. 454-466, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pci042>

MCBRIDE, R. L. Sweetness of binary mixtures of sucrose, fructose, and glucose. **Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance**, v. 12, n. 4, p. 584-591, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1037/0096-1523.12.4.584>

MISRA, N. N.; KEENER, K. M.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, n. 118, p. 177-182, 2014.

NIEMIRA, B. A. Cold Plasma Decontamination of Foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, n. 3, p. 125-142, 2012.

ONIK, J. C.; XIE, Y.; DUAN, Y.; HU, X.; WANG, Z.; LIN, Q. UV-C treatment promotes quality of early ripening apple fruit by regulating malate metabolizing genes during postharvest storage. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, e0215472, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215472>

ORLOWSKA, M.; KOUTCHMA, T.; GRAPPERHAUS, M.; GALLAGHER, J.; SCHAEFER, R.; DEFELICE, C. Continuous and pulsed ultraviolet light for nonthermal treatment of liquid foods. Part 1: effects on quality of fructose solution, apple juice, and milk. **Food Bioprocess Technology**, n. 6, p. 1580-1592, 2013.

PAIXÃO, L. M. N. M. N.; FONTELES, T. V. V.; OLIVEIRA, V. S. S.; FERNANDES, F. A. N. A. N.; RODRIGUES, S. Cold plasma effects on functional compounds of siriguela juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 1, p. 110–121, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s11947-018-2197-z>

PETKOVSEK, M. M.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). **Scientia Horticulturae**, v. 114, n. 1, p. 37-44, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.05.004>

RAMAZZINA, I.; BERARDINELLI, A.; RIZZI, F.; TAPPI, S.; RAGNI, L.; SACCHETTI, G.; ROCCULI, P. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 107, p. 55-65, 2015.

RAMAZZINA, I. L. E. A. N. A.; TAPPI, S.; ROCCULI, P.; SACCHETTI, G.; BERARDINELLI, A.; MARSEGLIA, A.; RIZZI, F. Effect of cold plasma treatment on the functional properties of fresh-cut apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 42, p. 8010-8018, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02730>

RODRÍGUEZ, Ó.; GOMES, W. F.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Science and Technology**, n. 84, p. 457-463, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.010>

SHARMA, D. D.; SOUZA, V. F. D.; MAZZA, G. Psychophysical and psychometric evaluation of commercial apple juices. **Journal of Food Quality**, n. 14, 391-405, 1991.

SOARES, M. V. L.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; NOVOTNY, E. H.; CANUTO, K. M.; WURLITZER, N. J.; NARAIN, N.; DE BRITO, E. S. Tracking thermal degradation on passion fruit juice through Nuclear Magnetic Resonance and chemometrics. **Food Chemistry**, n. 219, p. 1-6, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.127>

SPRAUL, M.; SCHÜTZ, B.; HUMPFER, E.; MÖRTTER, M.; SCHÄFER, H.; KOSWIG, S.; RINKE, P. Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. S1, p. S130-S137, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrc.2528>

SUROWSKY, B.; FRÖHLING, A.; GOTTSCHALK, N.; SCHLÜTER, O.; KNORR, D. Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, n. 174, p. 63-71, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.031>

TAPPI, S.; BERARDINELLI, A.; RAGNI, L.; DALLA ROSA, M.; GUARNIERI, A.; ROCCULI, P. Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 21, p. 114-122, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.012>

TIEFENBACHER, K. F. Technology of Main Ingredients—Sweeteners and Lipids. **Wafer and Waffle, Elsevier**, p. 123-225, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809438-9.00003-X>

WANG, R. X.; NIAN, W. F.; WU, H. Y.; FENG, H. Q.; ZHANG, K.; ZHANG, J.; FANG, J.

Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation. **The European Physical Journal**, n. 66, p. 276, 2012.

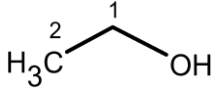
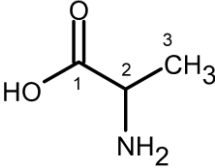
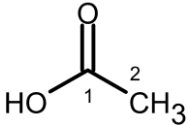
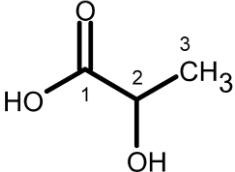
WANG, Y.; HOLLINGSWORTH, R. I.; KASPER, D. L. Ozonolytic depolymerization of polysaccharides in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, n. 319, p. 141-147, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00113-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00113-5)

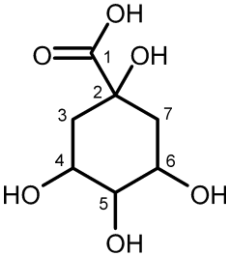
YI, J.; KEBEDE, B. T.; HAI DANG, D. N.; BUVÉ, C.; GRAUWET, T.; VAN LOEY, A.; HU, X.; HENDRICKX, M. Quality change during high pressure processing and thermal processing of cloudy apple juice. **LWT**, n. 75, p. 85-92, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.041>

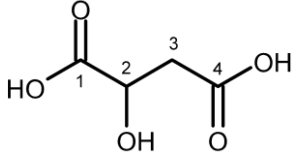
ZHU, F. Plasma modification of starch. **Food Chemistry**, 232, 1–7, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.024>

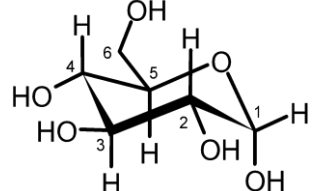
ZIUZINA, D.; PATIL, S.; CULLEN, P. J.; KEENER, K. M.; BOURKE, P. Atmospheric cold plasma inactivation of Escherichia coli, Salmonella enterica serovar Typhimurium and Listeria monocytogenes inoculated on fresh produce. **Food Microbiology**, n. 42, p. 109-116, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.007>

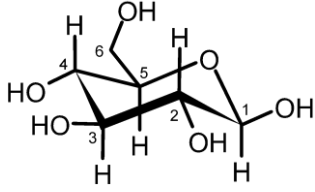
APPENDIX A - ORGANIC COMPOUNDS IDENTIFIED IN THE APPLE PRODUCTS BY NMR ANALYSIS.

<i>Compound</i>	<i>Structures</i>	$\delta^1\text{H}$ (<i>multip.* J in Hz</i>)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ <i>ref.</i>	$\delta^{13}\text{C}$ <i>ref.</i>	
<i>Alcohols</i>	<i>Ethanol</i>		1 - 3.65 (o) 2 - 1.18 (t 7.20)	54.5 21.2	3.64 (q 7.08) 1.17 (t 7.08)	60.3 19.6
<i>Amino Acids</i>	<i>Alanine</i>		2 - 3.94 (o) 3 - 1.49 (d 7.2)	56.7 19.2	3.90 (q 7.3) 1.52 (d 7.3)	53.4 19.1
<i>Organic Acids</i>	<i>Acetic Acid</i>		1 - no 2 - 2.06 (s)	181.2 25.1	2.08 (s)	184.1 26.0
	<i>Lactic Acid</i>		3 - 1.27 (d 7.2) 2 - 4.12 (o)	23.0 71.4	1.37 (d 7.2) 4.42 (q 7.2)	22.9 71.4

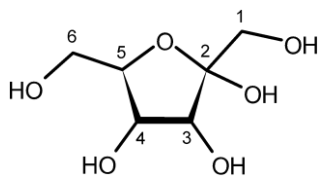
<i>Quinic Acid</i>		3 - 1.88 (<i>dd</i> 13.2, 10.4)	41.2	1.86 (<i>dd</i> 13.6, 10.8)	43.8
		7 - 1.93 (<i>m</i>)	38.8	1.95 (<i>dd</i> 14.8, 3.4)	40.5
		3,7 - 2.03 (<i>m</i>)	41.2	2.04 (<i>m</i>)	43.8
		4 - 3.55 (<i>o</i>)	o	3.54	77.3
		5 - 4.00 (<i>o</i>)	71.2	4.01	69.1
		6 - 4.11 (<i>o</i>)	73.0	4.13	73.1

<i>Malic Acid</i>		3 - 2.83 (<i>o</i>)	48.5	2.68 (<i>dd</i>)	45.5
		3 - 2.65 (<i>dd</i> 4.6, 16.4)	48.5	2.85 (<i>dd</i> 3.0, 15.4)	45.5
		2 - 4.52 (<i>m</i>)	74.7	4.28 (<i>m</i>)	73.2

<i>Sugars</i>	<i>α-glucose</i>		1 - 5.21 (<i>d</i> 4.08)	95.4	5.25 (<i>d</i> 3.80)	95.4
			2 - 3.47 (<i>m</i>)	72.3	3.89-3.36 (<i>o</i>)	72.2
			3 - 3.77 (<i>m</i>)	75.6	n	76.0
			4 - 3.56 (<i>m</i>)	74.0	n	72.8
			5 - 3.72 (<i>m</i>)	63.9	n	64.2
			6 - 3.85 (<i>m</i>)	75.5	n	74.5

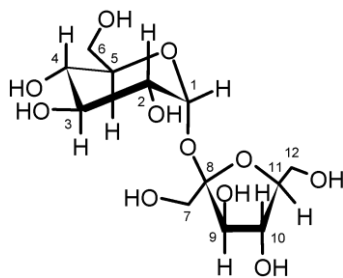
<i>β-glucose</i>		1 - 4.66 (<i>d</i> 7.80)	99.3	4.66 (<i>d</i> 8.10)	99.2
		2 - 3.26 (<i>m</i>)	77.5	3.25 (<i>t</i> 8.40)	77.6
		3 - 3.75 (<i>m</i>)	63.6	n	56.1
		4 - 3.48 (<i>m</i>)	78.8	n	79.0
		5 - 3.41 (<i>m</i>)	72.2	n	72.8
		6 - 3.90 (<i>m</i>)	63.7	n	63.1

Fructose



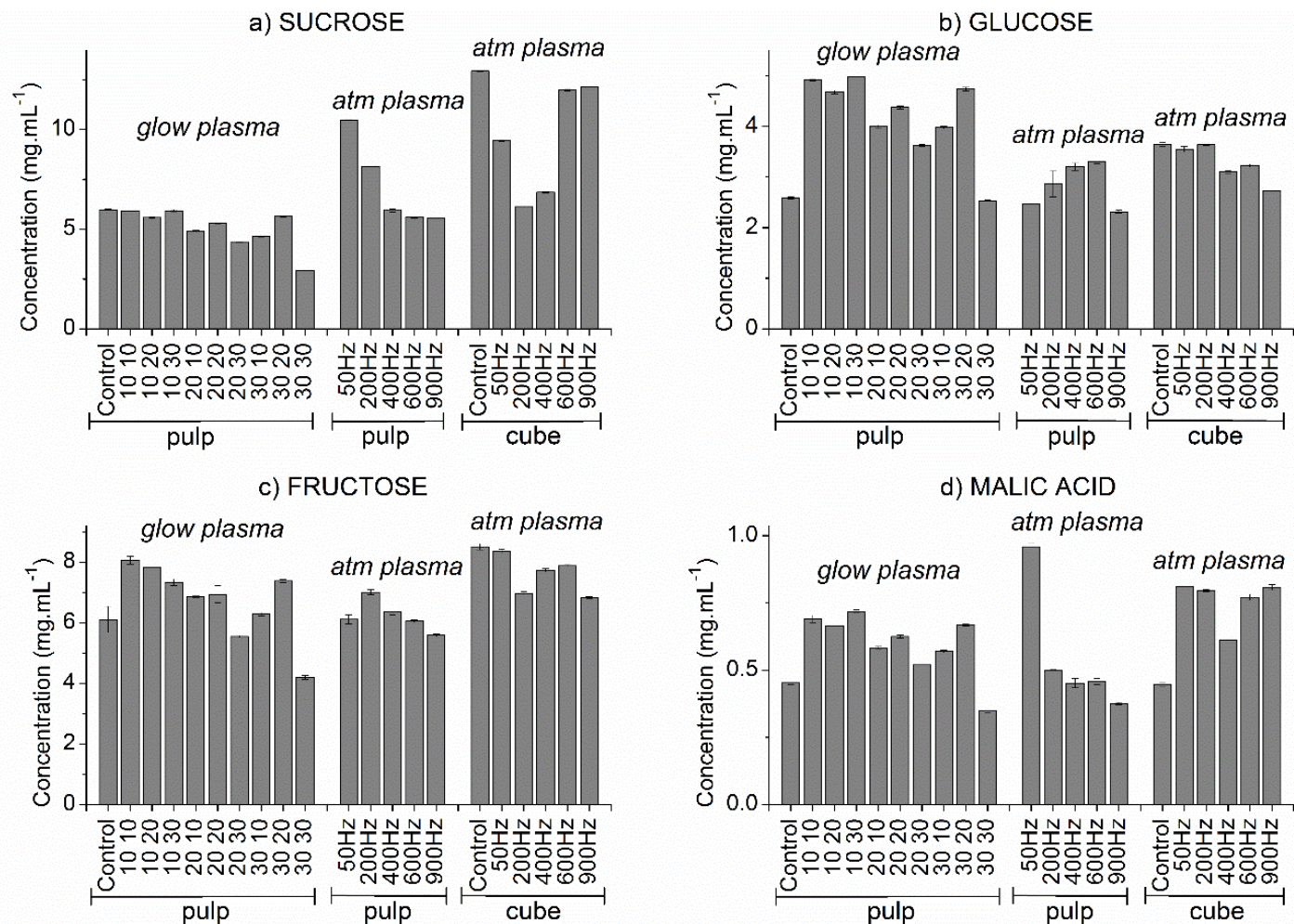
1 - o	o	3.58 (<i>m</i>)	65.6
2 - no	107.4	no	104.2
3 - 4.10 (<i>dd</i> 3.55)	77.5	4.11 (<i>m</i>)	78.2
4 - 4.10 (<i>d</i> 3.55)	78.5	4.11 (<i>m</i>)	77.4
5 - 3.82 (o)	83.8	3.82 (<i>m</i>)	83.6
6 - 4.02 (o)	66.5	4.01 (<i>m</i>)	66.1
1 - 5.43 (<i>d</i> 3.7)			
2 - 3.56 (o)	95.2	5.44 (<i>d</i> 3.8)	94.7
3 - 3.76 (o)	74.5	3.89-3.57 (<i>m</i>)	73.5
4 - 3.48 (o)	75.7	3.74 (<i>m</i>)	75.3
5 - 3.85 (o)	72.1	3.47 (<i>m</i>)	71.8
6 - 3.82 (o)	75.8	3.83 (<i>m</i>)	74.9
	62.9	3.81 (<i>m</i>)	62.8
	65.4	3.66 (<i>m</i>)	64.0
1' - 3.82 (o)	104.7	no	106.3
2' - no	79.3	4.20 (<i>t</i> 8.4)	79.0
3' - 4.22 (<i>m</i>)	77.0	4.08 (<i>d</i> 9.0)	76.6
4' - 4.05 (<i>m</i>)	84.1	3.87 (<i>m</i>)	84.0
5' - 3.89 (o)	64.8	3.81 (<i>m</i>)	65.0
6' - 3.68 (o)			

Sucrose



s – simplet; *d* – duplet; *t* – triplet; *q* – quadruplet; *dd* – double duplet; *o* – overlapping signal; *n* – no information; *no* – not observed

APPENDIX B - CONCENTRATIONS (MG.ML⁻¹) OF SUCROSE, GLUCOSE, FRUCTOSE AND MALIC ACID FROM APPLE JUICES PREPARED USING PULP AND CUBES BEFORE AND AFTER DIFFERENT PROCESSING (GLOW AND ATM PLASMA PROCESSING).



6 COMPARATIVE STUDY OF TWO COLD PLASMA TECHNOLOGIES ON THE ENZYMATIC ACTIVITY, ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC CONTENT OF APPLE JUICE

Esta seção contém o resumo, uma breve introdução, os resultados, a discussão, a conclusão e as referências do artigo que foi submetido para publicação na revista científica *Journal of Food Processing and Preservation*.

Abstract

Cold plasma is a potential alternative to traditional thermal conservation methods and presents itself as a promising technique for preserving and retaining quality parameters. This research evaluates the application of dielectric barrier discharge (DBD) plasma and glow discharge plasma on browning enzyme activity, total phenolic content, and antioxidant capacity of apple juice. DBD plasma operating at excitation frequencies between 50 and 900 Hz, and glow plasma discharge operating at air plasma flowrates between 10 and 30 mL/min for 10 to 30 min were evaluated. Both plasma systems induced partial inactivation of polyphenol oxidase and peroxidase in apple juice, contributing to an increase in total phenolics content and antioxidant activity. DBD plasma induced a higher increase in total phenolic content than glow discharge plasma. The excitation frequency of 50 Hz provided an apple juice with the highest total phenolic content and antioxidant capacity. DBD plasma technology presented better efficacy in increasing total phenolic content and antioxidant capacity in apple juice. DBD plasma and glow discharge plasma have same efficacy in inactivating browning enzymes in apple juice.

1. INTRODUCTION

Apples are a source of vitamins, malic acid, fibers, and phenolic compounds that have antioxidant properties and promote health benefits to humans (HYSON, 2011). Apples are one of the most cropped and consumed fruits in the world, with a global production of over 86 million tons/year. India, China, and Brazil figure as the leading world producers of apples (FAO, 2018). Apples are cropped for direct human consumption, take part in many industrialized products (juices, sweets, jams), and serve as a base ingredient where pectin is used. Apple juice is consumed worldwide directly as apple juice or mixed in concentrated form with several other fruits acting as natural replacement for sugar, and to reduce the cost of more expensive fruit juices.

Pasteurization is the primary treatment used in the industry to inactivate microorganisms and undesired enzymes in fruit juices (ANTHON; BARRETT, 2002). However, heat may alter some sensory and nutritional properties of fruit juices. Thermolabile compounds such as vitamins, pigments, phenolics, and other diminish during pasteurization (WANG *et al.*, 2012).

Non-thermal technologies that minimize the adverse effects of heat-based processes are being tested in fruit juice processing (WANG *et al.*, 2012; ALVES FILHO *et al.*, 2018; BEVILACQUA *et al.*, 2018; CASTRO *et al.*, 2020b). Some technologies, such as high-pressure processing, are being used in the industry. Other, like ultrasound and cold plasma, are still under development.

Cold plasma is a technology that consists of subjecting foods to ionized gas comprised of ions, electrons, singlets, free radicals, ozone, photons, and other ionized species. The ionized gas is produced through electrical discharge, radiofrequency, or microwave and generates a broad range of reactive chemical species (RAMAZZINA *et al.*, 2015). The process is carried out at room temperature, reducing the adverse effects caused by heat, thus contributing toward the maintenance of most sensory characteristics, while decontaminating the product (MISRA *et al.*, 2014; HERCEG *et al.*, 2016).

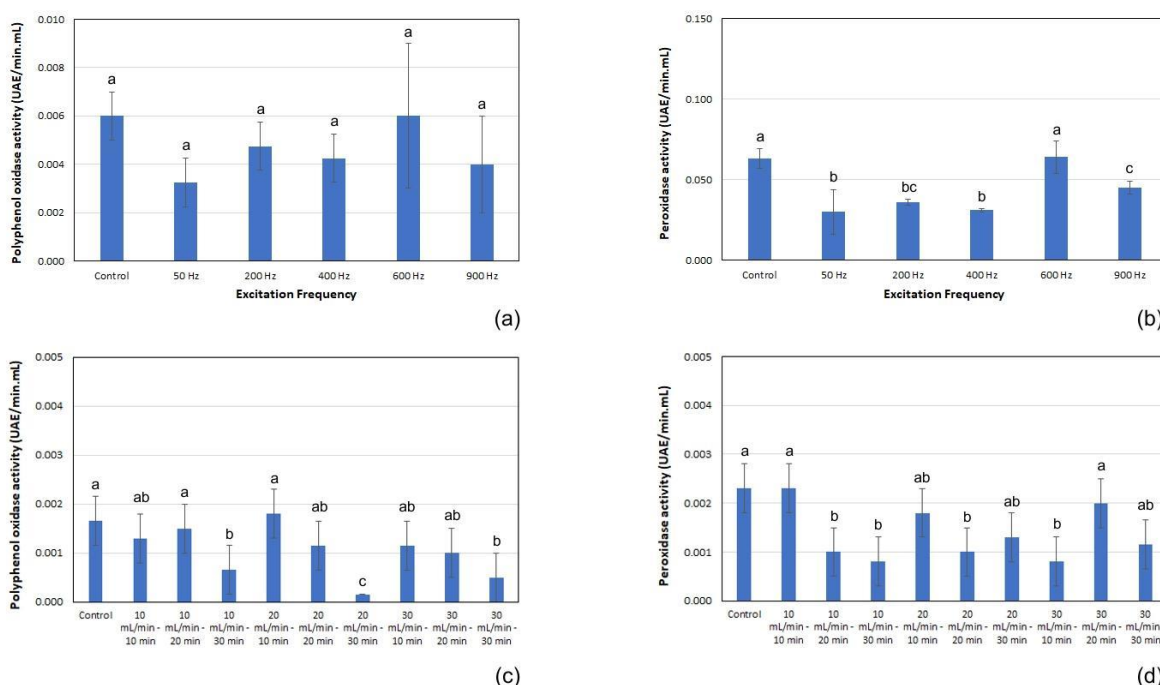
This work presents a comparative study between two cold plasma technologies (atmospheric dielectric barrier discharge plasma and glow discharge plasma), evaluating the inactivation of browning enzymes (polyphenol oxidase and peroxidase), total phenolic content, and antioxidant capacity.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Enzyme inactivation

Figure 10 presents the polyphenol oxidase and peroxidase activities on apple juice subjected to different plasma excitation frequencies and different operating conditions in glow discharge plasma. PPO was partially inactivated in the juice on all plasma excitation frequencies and in all glow discharge conditions. POD activity decreased in the juice on most plasma excitation frequencies, except for the assay carried out at 600 Hz (DBD plasma), where no statistical difference ($p < 0.05$) was noticed. POD activity showed a lower degree of decrease in glow discharge plasma, and half of the operating conditions did not present statistical difference ($p < 0.05$) when compared to the untreated apple juice.

Figure 10- PPO and POD enzyme activity in apple juice subjected to dielectric barrier discharge plasma operating at different excitation frequencies (a, b), and to glow discharge plasma at different operating conditions (c, b).



Fonte: elaborada pelo autor.

The DBD plasma treatment carried out at 50 Hz presented the highest decrease in apple juice in both PPO (-50 %) and POD (-56 %). Inactivation of PPO and POD at 50 Hz was also observed in tomatoes subjected to in-package plasma application (PANKAJ *et al.*, 2013). In related work, Tappi *et al.* (2014) were able to inactivate PPO (-58 %) in apples partially, but using a higher voltage between the DBD electrodes. Castro *et al.* (2020) reported high inactivation of PPO in camu-camu pulp using the same plasma equipment used in this work, showing that the degree of inactivation of PPO and POD enzymes depend on the food matrix and operating conditions.

The glow discharge plasma treatment carried out at 20 mL/min air plasma for 30 min resulted in the highest reduction in PPO (-88 %) with a lower reduction in POD (-43 %). The treatment carried out at 10 mL/min air plasma for 30 min resulted in the highest reduction in

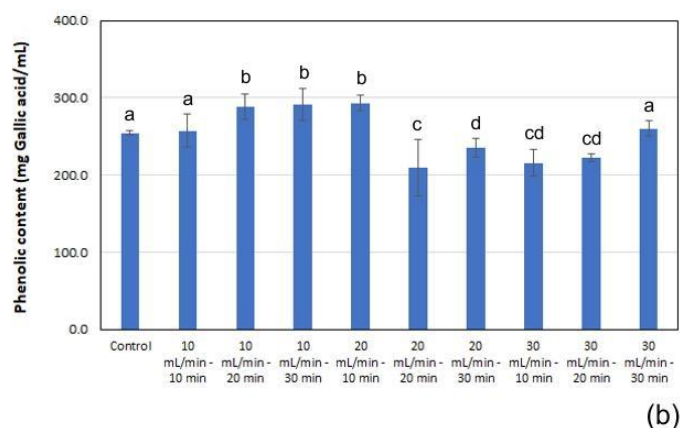
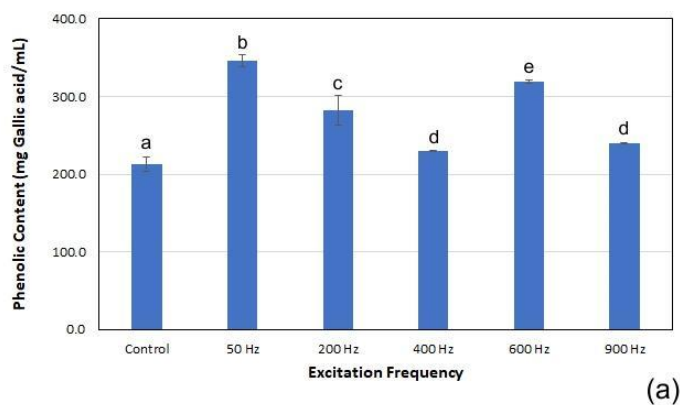
POD (-65 %) with a lower reduction in PPO (-58 %). Inactivation of PPO in glow discharge plasma was reported for seriguela juice achieving approximately 90% of inactivation when subjected to 20 mL/min of air plasma for 15 min (PAIXÃO *et al.*, 2019). Most research reports that a higher degree (> 50 %) of inactivation of both enzymes requires a minimum of 10 min of plasma application (BUBLER *et al.*, 2016; PAIXÃO *et al.*, 2019; CASTRO *et al.*, 2020b).

The loss in enzymatic activity may be attributed to chemical modifications caused by plasma species ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{HOO}\cdot$, and $\text{NO}\cdot$) in reactive amino acids side-chains (cysteine, tryptophan, tyrosine, and aromatic rings of phenylalanine) as proposed by Takai *et al.* (2012). This chemical modification would be responsible for the inactivation of PPO and POD in apples, melons, and potatoes subjected to DBD plasma (TAPPI *et al.*, 2014, 2016; BUBLER *et al.*, 2016). The inactivation of PPO and POD could also be related to changes in the secondary structure of these molecules resulting in the reduction of the amount of α -helix structures as proposed by Surowsky *et al.* (2013). The changes in the α -helix structures are time-dependent, and its occurrence increases with increasing plasma application time as noticed in the juice subjected to glow discharge plasma where the inactivation of both PPO and POD increased after more extended application periods.

2.2. Phenolic compounds

Figure 11 presents the concentration of total phenolics compounds in apple juice after plasma treatment. Apple juice not subjected to plasma treatment presented a total phenolic content of 212.6 ± 9.1 mg gallic acid equivalent/mL (DBD plasma batch) and 254.8 ± 2.6 mg gallic acid equivalent/mL (glow plasma batch).

Figure 11 - Total phenolic content in apple juice subjected to dielectric barrier discharge plasma operating at different excitation frequencies (a), and to glow discharge plasma at different operating conditions (b).



Fonte: elaborada pelo autor.

Plasma application increased the phenolic content on apple juice subjected to DBD plasma processing on all excitation frequencies. Only three conditions applied in glow plasma increased the phenolic content on the juice (10 mL/min of air plasma applied for 20 and 30 min, and 20 mL/min of air plasma applied for 10 min). When the juice comes in contact with the plasma at 50 Hz, there is an increase in the content of phenolic compounds due to the stress condition in the fruit, which uses a defense mechanism releasing phenolic compounds that are secondary metabolites of this mechanism. However, when the frequency of 200 Hz and the others (400, 600 and 900 Hz) are submitted, the amount of phenolics is lower, since they are

considered frequencies that end up damaging these compounds, causing degradative reactions.

The trends for the phenolic content followed an inverse relationship with PPO enzyme activity for DBD plasma application between 50 and 400 Hz. Lower PPO activities induced higher phenolic content in the juice. This result is expected because both PPO and POD use phenolic compounds as substrate against oxidants (ROBARDS *et al.*, 1999). With the decrease in enzyme activity, these enzymes consume fewer phenolics compounds. The increase in phenolic content at 600 Hz could not be correlated to enzyme activity and might have been caused by the depolymerization of polyphenols, as suggested by Sarangapani *et al.* (2017).

Most studies carried out by our group with glow discharge plasma reported an increase of phenolic contents under all operating conditions for cashew apple, seriguela, orange, and camu-camu juice (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017; ALVES FILHO *et al.*, 2019; PAIXÃO *et al.*, 2019; CASTRO *et al.*, 2020a). However, acerola juice presented a decrease in phenolic content after long applications of plasma (FERNANDES *et al.*, 2019). Apple juice presented a different trend. The phenolic content increased after the application of plasma at a low flow rate (10 mL/min) and decreased after the application of plasma at a high flow rate (30 mL/min). The change in behavior may be related to the hydrolysis or hydrogenation of phenolic compounds, as observed with terpenoids and sesquiterpenoids (CAMPELO *et al.*, 2020b).

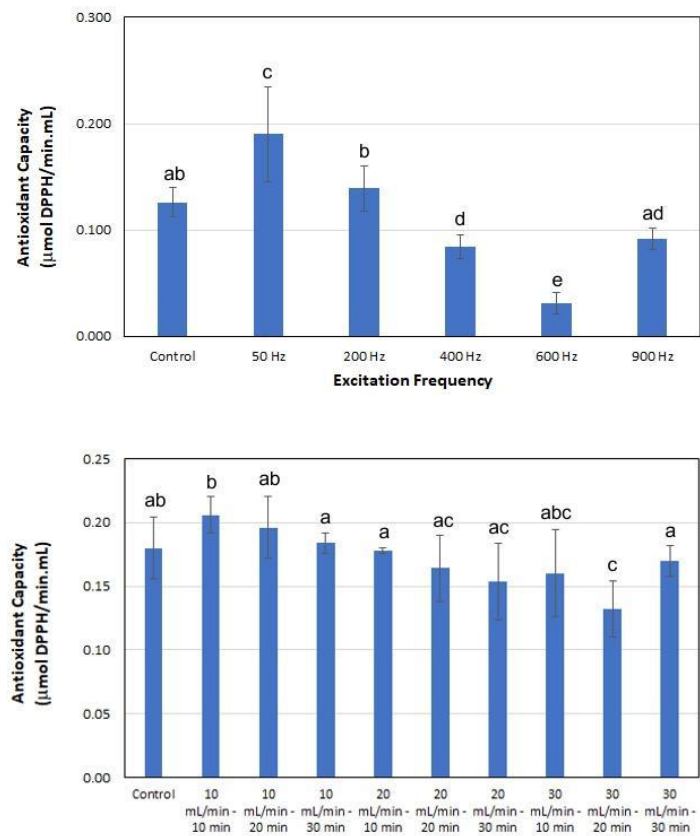
The decrease in POD and PPO enzyme activities and the consequent increase in total phenolic compounds is a positive effect of plasma processing. In this sense, DBD plasma processing has an advantage over glow plasma processing.

Other plasma technologies, such as jet plasma processing, increased the phenolic content in fruit juices. Herceg *et al.* (2016) reported the increase of phenolic content in pomegranate juice applying jet plasma, correlating the increase in phenolic content to processing time and gas flowrates. They concluded that the decomposition of the cell membrane caused the increase because it facilitated the hydrolysis and depolymerization of polyphenolics and ellagitannins. A similar conclusion was proposed by Laroussi and Leipold (2004).

2.3. Antioxidant Activity

Figure 12 presents the antioxidant activity of the untreated and treated apple juice. The untreated apple juice presented an antioxidant activity of 0.126 ± 0.014 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$ (DBD plasma batch) and 0.180 ± 0.024 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$ (glow plasma batch) measured by the DPPH method.

Figure 12 - Antioxidant capacity of apple juice subjected to dielectric barrier discharge plasma operating at different excitation frequencies (a), and to glow discharge plasma at different operating conditions (b), measured by the DPPH method.



Fonte: elaborada pelo autor.

The antioxidant capacity of the treated apple juice increased significantly ($p < 0.05$) when applying plasma at excitation frequencies of 50 (50 %) and 200 Hz (10 %), which is in line with the increase observed in total phenolics content. The operation at 600 Hz showed a steep decrease in antioxidant content even though the phenolic content increased. Different excitation frequencies may induce different chemical reactions (CAMPELO *et al.*, 2020a), resulting in the degradation of phenolics with high antioxidant capacity while not significantly

affecting phenolics with low antioxidant capacity. Changes in the antioxidant capacity were not observed in kiwis and probiotic orange juice subjected to DBD plasma processing (RAMAZZINA *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2017), while it increased in pears (Chen *et al.*, 2019). Thus, the effect of DBD plasma processing on phenolics content and antioxidant capacity is directly related to the chemical reactions induced by the plasma species formed at each excitation frequency.

The antioxidant capacity of the apple juice treated with glow discharge plasma had a higher correlation with total phenolic content, increasing with the increase in total phenolic content. The application of glow discharge plasma at a 10 mL/min air plasma flowrate for 10 min resulted in the highest antioxidant capacity. As a general trend, the antioxidant capacity decreased with longer applications and higher air plasma flowrates. Tangerine peels and acerola juice subjected to glow discharge plasma also presented a high correlation between total phenolic content and antioxidant capacity (WON *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2019).

The correlation between operating conditions and antioxidant capacity is highly dependent on the food matrix and its constituents. Plasma-treated acerola juice (FERNANDES *et al.*, 2019) increased its antioxidant capacity when subjected to glow discharge plasma operating at a high air plasma flow rate (30 mL/min). However, apple juice (this study) and cashew apple juice (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017) treated in the same equipment and conditions increased its antioxidant capacity when subjected to glow discharge plasma operating at low air plasma flow rate (10 mL/min).

3. CONCLUSIONS

Both glow discharge plasma and dielectric barrier discharge plasma induced partial inactivation of the enzymes polyphenol oxidase and peroxidase in apple juice, contributing to an increase in total phenolics content and antioxidant activity.

Plasma processing induced significant changes in the total phenolics content and antioxidant activity in apple juice. DBD plasma induced a higher increase in total phenolic content than glow discharge plasma. The excitation frequency of 50 Hz provided an apple juice with the highest total phenolic content and antioxidant capacity. The effect of plasma processing on phenolics content and antioxidant capacity is directly related to the chemical reactions induced by the plasma species formed at each excitation frequency (in DBD plasma) and each air plasma flowrates (in glow discharge plasma). Further in-depth studies should be

carried out to elucidate how the main phenolics present in fruit juices react with plasma species to allow better prediction of plasma application conditions on different fruit juices.

REFERENCES

- ALMEIDA, F. D.L.; GOMES, W. F.; CAVALCANTE, R. S.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Fructooligosaccharides integrity after atmospheric cold plasma and high-pressure processing of a functional orange juice. **Food Res Int**, n. 102, p. 282-290, 2017.
- ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M.A.; BRITO, E. S.; WURLITZER, N. J.; FERNANDES, F. A. N.; RABELO, M. C.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using ¹H qNMR and GC-MS coupled to chemometrics. **Food Chem**, n. 265, p. 23-31, 2018.
- ALVES FILHO, E. G.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. D. E.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; CAVALCANTE, R. S.; ALMEIDA, F. D. L.; RODRIGUES, S. An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. **Innov Food Sci Emerg Technol**, n. 53, p. 63-69, 2019.
- ANTHON, G. E.; BARRETT, D. M. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. **J Agric Food Chem**, n. 50, p. 4119-4125, 2002.
- BEVILACQUA, A.; PETRUZZI, L.; PERRICONE, M.; SPERANZA, B.; CAMPANIELLO, D.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Nonthermal technologies for fruit and vegetable juices and beverages: overview and advances. **Compr Rev Food Sci Food Saf.**, n. 17, p. 2-62, 2018.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Sci Technol**, n. 30, p. 25-30, 1995.
- BUBLER, S.; EHLBECK, J.; SCHLÜTER, O. K. Pre-drying treatment of plant related tissues using plasma processed air: Impact on enzyme activity and quality attributes of cut apple and potato. **Innov Food Sci Emerg Technol**, n. 40, p. 78-86, 2016.
- CAMPELO, P. H.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; BRITO, E. S.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Modulation of aroma and flavor using glow discharge plasma technology. **Innov Food Sci Emerg Technol**, Elsevier, n. 62, p. 102363. 2020.

CAMPELO, P. H.; ALVES-FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; BRITO, E. S.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Modulation of aroma and flavor using dielectric barrier discharge plasma technology in a juice rich in terpenes and sesquiterpenes. **LWT - Food Sci Technol**, p. 109644, 2020.

CASTRO, D. R. G.; MAR, J. M.; SILVA, L. S.; SILVA, K. A.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. Á.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N.; CAMPELO, P.H. Dielectric barrier atmospheric cold plasma applied on camu-camu juice processing: Effect of the excitation frequency. **Food Res Int**, Elsevier, n. 131, p. 109044, 2020.

CASTRO, D. R. G.; MAR, J. M.; SILVA, L. S.; SILVA, K. A.; SANCHES, E. A.; ARAÚJO BEZERRA, J.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N.; CAMPELO, P. H. Improvement of the Bioavailability of Amazonian Juices Rich in Bioactive Compounds Using Glow Plasma Technique. **Food Bioprocess Technol Food and Bioprocess Technology**, n. 13, p. 670-679, 2020.

CHEN, C.; LIU, C.; JIANG, A.; GUAN, Q.; SUN, X.; LIU, S.; HAO, K.; HU, W. The effects of cold plasma-activated water treatment on the microbial growth and antioxidant properties of fresh-cut pears. **Food Bioprocess Technol**, n. 12, p. 1842-1851, 2019.

COUTINHO, N. M.; SILVEIRA, M. R.; ROCHA, R. S.; MORAES, J.; FERREIRA, M. V. S.; PIMENTEL, T. C.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; ANADHEERA, C. S.; BORGES, F. O.; MATHIAS, S. P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S.; CRUZ, A. G. Cold plasma processing of milk and dairy products. **Trends Food Sci Technol**, n. 74, p. 56-68, 2018.

FERNANDES, F. A. N.; SANTOS, V. O.; RODRIGUES, S. Effects of glow plasma technology on some bioactive compounds of acerola juice. **Food Res. Int.**, Elsevier, n. 115, p. 16-22, 2019.

HERCEG, Z.; HOVACEVIC, D. B.; KLJUSURIC, J. G.; JAMBRAK, A. R.; ZORIC, Z.; DRAGOVIC-UZELAC, V. Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. **Food Chem**, n. 190, p. 665-672, 2016.

HYSON, D. A. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. **Adv Nutr**, n. 2, p. 408-420, 2011.

LAROUSSE, M.; LEIPOLD, F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. **Int J Mass Spectrom**, n. 233, p. 81-86, 2004.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidases isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant Cell Physiol.**, n. 13, p. 1091-1101, 1972.

MISRA, N. N.; PATIL, S.; MOISEEV, T.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; KEENER, K. M.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. **J Food Eng.**, p. 125, p. 131-138, 2014.

PAIXÃO, L. M. N. M. N.; FONTELES, T. V. V.; OLIVEIRA, V. S. S.; FERNANDES, F. A. N. A. N.; RODRIGUES, S. Cold plasma effects on functional compounds of siriguela juice. **Food Bioprocess Technol**, n. 12, p. 110-121, 2019.

PANKAJ, S. K.; BUENO-FERRER, C.; MISRA, N. N.; MILOSAVLJEVIC, V.; O'DONNELL, C. P.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Applications of cold plasma technology in food packaging. **Trends Food Sci Technol**, n. 35, p. 5-17, 2014.

PANKAJ, S. K.; MISRA, N. N.; CULLEN, P. J. Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. **Innov Food Sci Emerg Technol**, n. 19, p. 153-157, 2013.

RAMAZZINA, I.; BERARDINELLI, A.; RIZZI, F.; TAPPI, S.; RAGNI, L.; SACCHETTI, G.; ROCCULI, P. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. **Postharvest Biol Technol**, n. 107, p. 55-65, 2015.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem**, n. 66, p. 401-436, 1999.

RODRÍGUEZ, Ó.; GOMES, W. F.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Sci Technol**, n. 84, p. 457-463, 2017.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Anal Methods**, n. 5, p. 5990-5999, 2013.

SARANGAPANI, C.; O'TOOLE, G.; CULLEN, P. J.; BOURKE P. Atmospheric cold plasma dissipation efficiency of agrochemicals on blueberries. **Innov Food Sci Emerg Technol**, Elsevier Ltd, n. 4, p. 235-241, 2017.

SUROWSKY, B.; FISCHER, A.; SCHÜETER, O.; KNORR, D. Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. **Innov Food Sci Emerg Technol**, n. 19, p. 146-152, 2013.

SUROWSKY, B.; SCHLUTER, O.; KNORR, D. Interactions of non-thermal atmospheric pressure plasma with solid and liquid food systems: A review. **Food Eng Rev.**, n. 7, p. 82-108, 2015.

TAKAI, E.; KITANO, K.; KUWABARA, J.; SHIRAKI, K. Protein inactivation by low temperature atmospheric pressure plasma in aqueous solution. **Plasma Process Polym**, n. 9, p. 77-82, 2012.

TAPPI, S.; BERARDIRIELLI, A.; RAGNI, L.; ROSA, M. D.; GUARNIERI, A.; ROCCULI, P. Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. **Innov Food Sci Emerg Technol**, n. 21, p. 114-122, 2014.

TAPPI, S.; GOZZI, G.; VANNINI, L.; BERARDINELLI, A.; ROMANI, S.; RAGNI, L. Cold

plasma treatment for fresh-cut melon stabilization. **Innov Food Sci Emerg Technol**, n. 33, p. 225-233, 2016.

WANG, R. X.; NIAN, W. F.; WU, H.Y.; FENG, H.Q.; ZHANG, K.; ZHANG, J.; FANG, J. Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation. **Eur Phys J**, n. 66, p. 276, 2012.

WISSEMANN, K. W.; LEE, C. Y. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. **Am J Enol Vitic**, n. 31, p. 206–211, 1980.

WON, M. Y.; LEE, S. J.; MIN, S. C. Mandarin preservation by microwave-powered cold plasma treatment. **Innov Food Sci Emerg Technol**, n. 39, p. 25-32, 2017.

ZIUZINA, D.; HAN, L.; CULLEN, P. J.; BOURKE, P. Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for Salmonella enterica serovar Typhimurium, Listeria monocytogenes and Escherichia coli. **Int J Food Microbiol**, n. 210, p. 53-61, 2015.

7 EFEITO DO PLASMA FRIO NO PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E QUALIDADE DA POLPA DO ARAÇÁ-BOI

Esta seção é uma parte da tese em formato de artigo que contém o resumo, o abstract, uma breve introdução, os resultados, a discussão, a conclusão e as referências para posterior publicação em revista científica.

RESUMO

Novas tecnologias estão sendo estudadas e aplicadas para minimizar o impacto negativo nos atributos de qualidade de alimentos submetidos ao tratamento térmico, com isso, o processamento não térmico surge como uma alternativa benéfica. O plasma frio é considerado uma alternativa potencial aos métodos térmicos tradicionais de conservação. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a aplicação do plasma frio sobre os aspectos qualitativos da polpa do araçá-boi e caracterizar o perfil aromático. Utilizou-se o plasma atmosférico de barreira dielétrica (DBD) com frequência de 50, 200, 400, 600 e 800 Hz, com voltagem entre as barreiras de 20 kV e tempo de exposição das amostras nos tempos de 10, 15 e 20 min. Para o plasma a vácuo de descarga luminescente, os tempos utilizados foram 10, 20 e 30 min e com três vazões diferentes de gás (10, 20 e 30 mL/min). As análises avaliadas foram: vitamina C, peróxido de hidrogênio e perfil de compostos orgânicos voláteis. Os resultados mostraram que o teor de vitamina C das amostras tratadas com os dois tipos de equipamentos foram similares à amostra-controle, não havendo perda de vitamina. Contudo, em 20 min de processamento (plasma DBD), maiores teores foram observados. A análise estatística mostrou diferenças estatísticas apenas para o plasma DBD. Para o peróxido de hidrogênio, houve aumento de sua concentração na maioria das condições quando o plasma de descarga luminescente foi aplicado e redução de peróxido de hidrogênio para a aplicação com o plasma DBD. A caracterização do perfil de compostos voláteis (21 compostos identificados) mostrou que as diferentes condições operacionais do plasma frio e o tipo de equipamento influencia na mudança da composição das polpas de araçá-boi. Nesse sentido, o plasma frio pode ser utilizado como uma técnica para preservação e retenção dos parâmetros de qualidade do araçá-boi, a partir de condições de processo estudadas que podem aumentar o teor de vitamina C, reduzir o teor de peróxido de hidrogênio e influenciar na modificação dos compostos voláteis.

ABSTRACT: New technologies are being studied and applied to minimize the negative impact on the quality attributes of foods subjected to heat treatment, with non-thermal processing emerging as a beneficial alternative. Cold plasma is considered a potential alternative to traditional thermal methods of preservation. Therefore, the objective of this research was to evaluate the application of cold plasma on the qualitative aspects of the guava pulp and to characterize the aromatic profile. The atmospheric dielectric barrier plasma (DBD) was used with a frequency of 50, 200, 400, 600 and 800 Hz, with a voltage between the barriers of 20 kV and exposure time of the samples in the times of 10, 15 and 20 min. For the glow discharge vacuum plasma, the times used were 10, 20 and 30 min and with three different gas flows (10, 20 and 30 mL /min). The analyses evaluated were: vitamin C, hydrogen peroxide and volatile organic compound profile. The results showed that the vitamin C content of the samples treated with the two types of equipment were similar to the control sample, with no loss of vitamin. However, at 20 min of processing (plasma DBD) higher levels were observed. The statistical analysis showed statistical differences only for the DBD plasma. For hydrogen peroxide there was an increase in its concentration in most conditions when the glow discharge plasma was applied and a decrease in hydrogen peroxide for the application with the DBD plasma. The characterization of the volatile compounds profile (21 compounds identified) showed that the different operational conditions of the cold plasma and the type of equipment influences the change of the composition of the araçá-boi pulps. In this sense the cold plasma can be used as a technique for preservation and retention of the quality parameters of the guava-pulp, from the studied process conditions that can increase the vitamin C content, reduce the hydrogen peroxide content and influence the modification of volatile compounds.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca por possuir diversas variedades de frutas exóticas. Assim, considerando o caráter exótico e os benefícios para a saúde, por serem fontes de compostos bioativos, a introdução dessas frutas na cadeia alimentar representa uma importante atividade econômica (NERI-NUMA *et al.*, 2013). Dentre elas, o araçá-boi (*eugenia stipitata*), que é um fruto da região amazônica que apresenta importantes compostos nutricionais e funcionais, já que é rico em vitaminas, fibras, antioxidantes (carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos) e compostos voláteis (ARAÚJO *et al.*, 2019; NERI-NUMA *et al.*, 2013).

Em relação às características físicas e sensoriais do araçá-boi, o fruto é arredondado,

cor amarelo-claro e com polpa carnuda e succulenta, de aromas agradáveis, porém, com caráter ácido, o que limita o consumo *in natura* (ARAÚJO *et al.*, 2019; NERI-NUMA *et al.*, 2013; FRANCO; SHIBAMOTO, 2000). Com isso, o processamento industrial é considerado uma alternativa para a formulação de alguns produtos, como: geleias, sucos, doces e sorvetes (NEVES *et al.*, 2015).

Para conservá-los, principalmente os sucos, a tecnologia mais utilizada para inativar micro-organismos e enzimas é o tratamento térmico (por meio de processos de pasteurização ou esterilização) (MISRA *et al.*, 2014). Porém, o uso do calor pode alterar alguns parâmetros de qualidade, como sabor, aroma, cor e valor nutricional desses produtos, uma vez que possuem componentes termossensíveis, como: vitaminas e pigmentos (WANG *et al.*, 2012).

Em virtude disso, as indústrias de bebidas estão em busca de desenvolver sucos e néctares ricos nutricional e sensorialmente atraentes (BHARDWAJ; PANDEY, 2011; SOUZA FILHO *et al.*, 2000). Dessa forma, o processamento com frutas exóticas é um potencial para pesquisas científicas que estudam e caracterizam os principais compostos presentes nessas frutas que influenciam a qualidade dos produtos alimentícios (FRANCO; SHIBAMOTO, 2000).

Portanto, novas tecnologias estão sendo estudadas e aplicadas para minimizar o impacto negativo nos atributos de qualidade desses produtos. Com isso, o processamento não térmico surge como uma alternativa benéfica (WANG *et al.*, 2012; MISRA *et al.*, 2014). Dentre elas, tem-se o plasma frio, que consiste em submeter a matriz alimentar a um gás ionizado composto por partículas (íons, elétrons, fótons, radicais livres) produzidos a partir de uma descarga elétrica, que é responsável por iniciar inúmeras reações químicas de significativa importância (RAMAZZINA *et al.*, 2015).

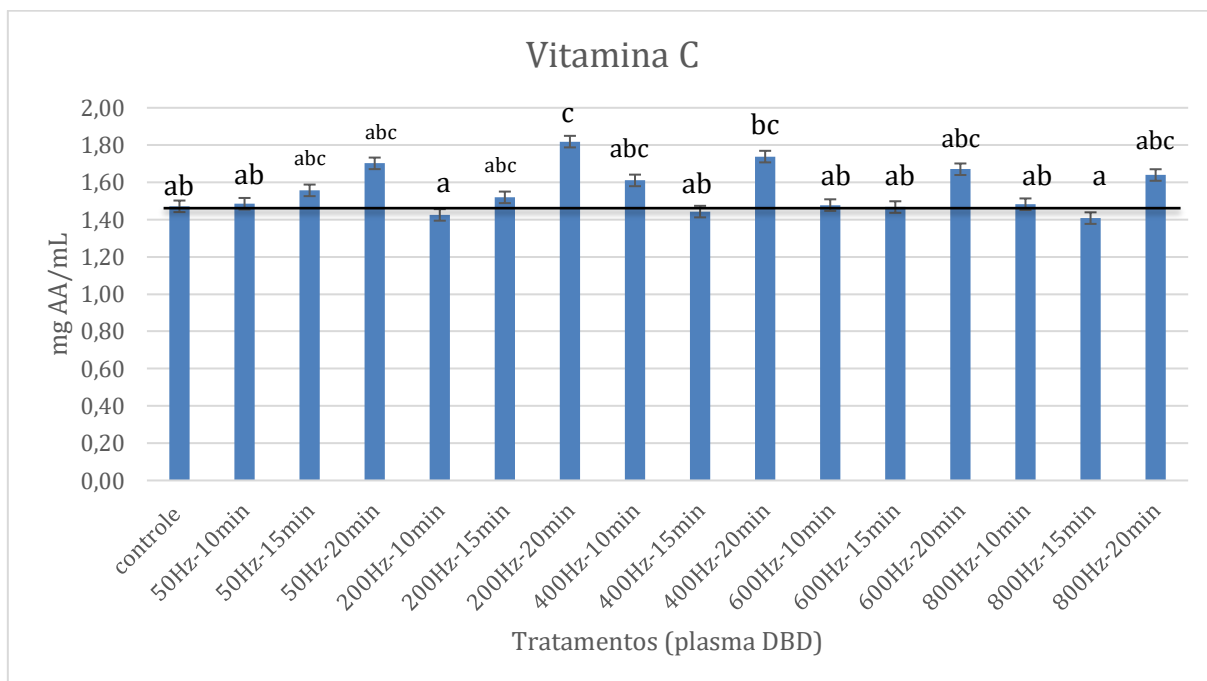
Em vista disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a aplicação do plasma frio sobre os aspectos qualitativos (vitamina C, peróxido de hidrogênio e o perfil de compostos orgânicos voláteis) da polpa do araçá-boi.

2.RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Vitamina C

Para as amostras da polpa do araçá-boi tratadas com o plasma atmosférico DBD, a Figura 13 mostrou que a vitamina C das polpas submetidas às condições avaliadas apresentaram valores médios próximos ao valor da amostra-controle (1,50 mg AA/mL). E a análise estatística (Tabela 6) mostrou diferenças significativas na maioria dos tratamentos.

Figura 13 – Concentração de vitamina C das amostras da polpa do araquá-boi submetidas ao tratamento com plasma frio atmosférico em diferentes frequências (50, 200, 400, 600 e 800 Hz) e tempos (10, 20 e 30 min) e amostra controle (sem tratamento). A linha horizontal é utilizada para verificar o aumento ou redução da concentração do composto em relação ao da amostra controle.



Fonte: elaborada pela autora.

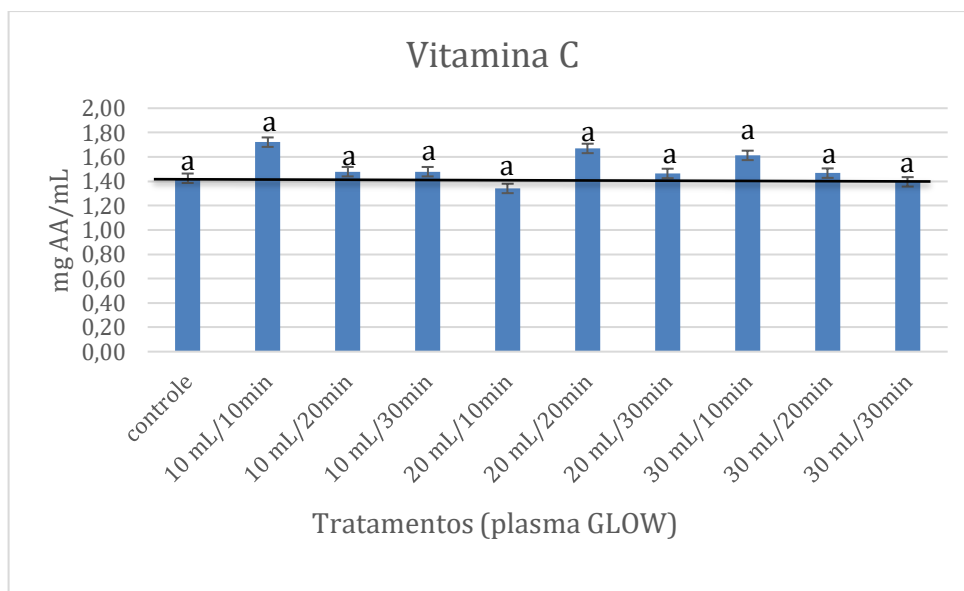
Observou-se que houve redução da vitamina C em duas condições (frequência de 200 Hz por 10 min de processamento e frequência de 800 Hz por 15 min de processamento). Contudo, foi observado que em todas as diferentes frequências submetidas no tempo de 20 min o teor de vitamina C aumentou em relação à amostra não tratada, mostrando, assim, que nesse tempo, e com o tratamento do plasma a polpa, apresentou maiores concentrações de vitamina C. O aumento dessa vitamina também foi encontrado em estudos com o araquá-boi (ARAÚJO *et al.*, 2021), em morangos (GANI *et al.*, 2016) e em suco de goiaba (CHENG *et al.*, 2007) submetidos ao ultrassom (tecnologia de conservação não térmica).

O aumento da vitamina C está relacionado à ativação da enzima desidroascorbato redutase. O ácido ascórbico sofre oxidação e forma a molécula de ácido desidroascórbico, e esta é naturalmente convertida de volta em ácido ascórbico devido à ação da enzima desidroascorbato redutase por meio do ciclo ascorbato-glutationa (NOCTOR; FOYER, 1998).

Uma das espécies reativas formadas pelo plasma frio é o óxido nítrico (LIU *et al.*, 2017), que é uma molécula que pode regular o ciclo ascorbato-glutationa e aumentar a atividade da enzima (desidroascorbato redutase) (SUN *et al.*, 2015) e, conseqüentemente, ocorrer um aumento na concentração de vitamina C, comportamento assim encontrado no presente trabalho.

Assim como no plasma atmosférico DBD, as amostras submetidas ao tratamento com o plasma a vácuo de descarga luminescente também apresentaram valores médios similares ao valor da amostra-controle (1,45 mg AA/mL), como mostrado na Figura 14. Porém, apenas nas condições de processamento de 20 mL-10min e 30 mL-30min houve uma redução. No entanto, para a análise estática (Tabela 6), não houve diferenças significativas entre os tempos e tratamentos.

Figura 14 – Concentração de vitamina C das amostras da polpa do araçá-boi submetidas ao tratamento com plasma descarga luminescente em diferentes fluxos de gás (10, 20 e 30/ mL) e tempos (10, 20 e 30 min) e amostra controle (sem tratamento). A linha horizontal é utilizada para verificar o aumento ou redução da concentração do composto em relação ao da amostra controle.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 6 – Concentração de vitamina C e peróxido de hidrogênio da polpa do araçá-boi sem tratamento e com tratamento de plasma frio (DBD e descarga luminescente)

Condição operacional	Vitamina C (mg AA/mL)	Peróxido de Hidrogênio ($\mu\text{mol/L}$)
<i>Plasma de descarga luminescente</i>		
Controle	1.42 \pm 0.10 ^a	107.50 \pm 10.14 ^a
10 mL/min 10 min	1.72 \pm 0.51 ^a	131.34 \pm 7.54 ^a
10 mL/min 20 min	1.47 \pm 0.09 ^a	114.50 \pm 15.32 ^a
10 mL/min 30 min	1.47 \pm 0.14 ^a	125.50 \pm 1.17 ^a
20 mL/min 10 min	1.34 \pm 0.05 ^a	117.34 \pm 4.72 ^a
20 mL/min 20 min	1.66 \pm 0.29 ^a	106.34 \pm 13.67 ^a
20 mL/min 30 min	1.46 \pm 0.09 ^a	108.33 \pm 4.24 ^a
30 mL/min 10 min	1.61 \pm 0.23 ^a	120.34 \pm 2.35 ^a
30 mL/min 20 min	1.46 \pm 0.02 ^a	129.34 \pm 2.25 ^a
30 mL/min 30 min	1.39 \pm 0.06 ^a	106.00 \pm 2.83 ^a
<i>Plasma de barreira dielétrica (dbd)</i>		
Controle	1.47 \pm 0.15 ^{ab}	157.34 \pm 4.72 ^{abc}
50 Hz 10 min	1.48 \pm 0.02 ^{ab}	185.50 \pm 4.95 ^a
50 Hz 15 min	1.55 \pm 0.08 ^{abc}	151.00 \pm 7.07 ^{bc}
50 Hz 20 min	1.70 \pm 0.08 ^{abc}	154.67 \pm 1.41 ^{abc}
200 Hz 10 min	1.42 \pm 0.08 ^a	158.17 \pm 1.18 ^{abc}
200 Hz 15 min	1.51 \pm 0.02 ^{abc}	149.33 \pm 2.83 ^{bc}

200 Hz 20 min	1.81 ± 0.00 ^c	136.67 ± 2.35 ^c
400 Hz 10 min	1.61 ± 0.02 ^{abc}	175.50 ± 6.83 ^{ab}
400 Hz 15 min	1.44 ± 0.03 ^{ab}	157.67 ± 20.74 ^{abc}
400 Hz 20 min	1.73 ± 0.08 ^{bc}	175.83 ± 0.71 ^{ab}
600 Hz 10 min	1.47 ± 0.02 ^{ab}	152.67 ± 6.13 ^{bc}
600 Hz 15 min	1.46 ± 0.04 ^{ab}	153.84 ± 1.18 ^{bc}
600 Hz 20 min	1.67 ± 0.06 ^{abc}	152.67 ± 0.94 ^{bc}
800 Hz 10 min	1.48 ± 0.02 ^{ab}	149.17 ± 7.30 ^{bc}
800 Hz 15 min	1.40 ± 0.05 ^a	157.00 ± 9.90 ^{abc}
800 Hz 20 min	1.63 ± 0.24 ^{abc}	151.00 ± 13.19 ^{bc}

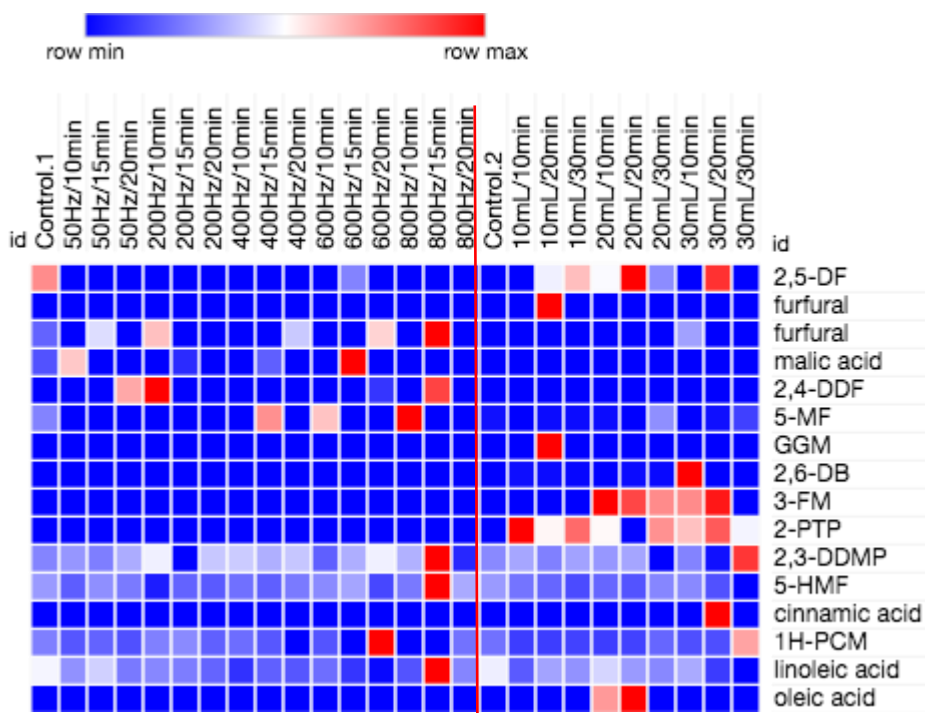
Fonte: elaborada pela autora.

2.2 Perfil dos compostos orgânicos voláteis

Para o perfil dos compostos orgânicos voláteis, um total de 15 compostos foram identificados, dentre os quais as classes de: aldeídos, ácidos, entre outros em anexo (Apêndice A).

Uma análise de *heat map* foi realizada para apresentar, por meio de intensidade de cores, a concentração dos compostos em cada tratamento realizado na polpa de araçá-boi. O *heat map* mostrou que o plasma DBD, no geral, alterou de forma branda as concentrações dos compostos (Figura 15), já que estes se mantiveram estáveis, principalmente nos tempos de 20 min de processamento.

Figura 15 - *Heat map* a partir do efeito do plasma frio (lado direito da linha vermelha - plasma de descarga luminescente, lado esquerdo da linha vermelha – plasma DBD) sobre os compostos orgânicos voláteis presentes na polpa de araçá-boi.

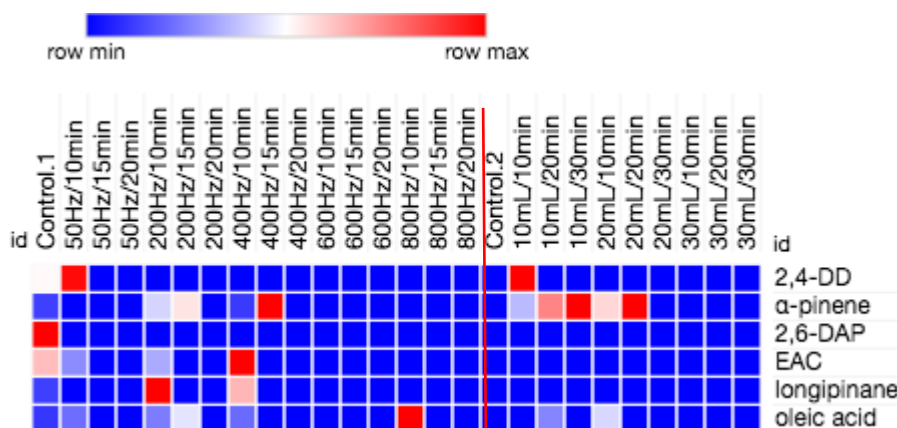


Fonte: elaborada pela autora.

No entanto, o plasma DBD foi responsável por aumentar a intensidade de alguns compostos quando as maiores frequências (600 e 800 Hz) eram submetidas e com os tempos de 10 e 15 min. Por exemplo: na condição de 800 Hz-15 min (frequência do plasma e tempo de exposição) houve a formação dos compostos 2,4-dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, 2,3-dihydro-3,5 dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one e 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde. Quando comparada à amostra-controle, a aplicação do plasma reduziu o composto 2,5-dimethyl furan.

Em relação aos voláteis, 6 compostos foram identificados (Figura 16 e Apêndice B). O *heat map* indicou que houve maiores aumentos de concentrações quando as menores frequências foram utilizadas (50, 200 e 400 Hz) e também nos tempos de 10 e 15 min. Quando comparada à amostra-controle, a aplicação do plasma em todas as condições reduziu o composto 2',6'-dihydroxyacetophenone.

Figura 16 - *Heat map* a partir do efeito do plasma frio (lado direito da linha vermelha - plasma de descarga luminescente, lado esquerdo da linha vermelha – plasma DBD) sobre os compostos orgânicos voláteis presentes na polpa de araçá-boi



Fonte: elaborada pela autora.

Ao avaliar o *heat map* para o plasma de descarga luminescente, observou-se que, na maioria das condições (fluxo e tempo), houve um aumento nas concentrações dos compostos (mostrados pela cor vermelha na Figura 15), com destaque para os compostos: 3-furoic acid, methyl ester e 2-propyl-tetrahydropyran-3-ol, mostrando, assim, que o plasma de descarga luminescente influenciou na formação desses compostos.

Em relação aos compostos voláteis, o *heat map* indicou que, na maioria das condições, ocorreu uma estabilidade nas concentrações (cores azuis) em relação à amostra-controle, com exceção para os compostos α -pineno, que aumentou sua concentração quando taxas de gás de 10 e 20 mL/min foram submetidos (existindo, assim, uma formação desse composto na polpa submetida ao plasma) e o composto 2,4-dimethyl-1,3-dioxolane na condição com 10 mL/10min.

Araújo *et al.* (2021), em estudo com araçá-boi, avaliaram por *heat map* a influência do ultrassom em compostos de interesse e mostraram que, dependendo da intensidade e tempo de processamento, ocorriam aumentos e reduções desses compostos. Poodi *et al.* (2018) explicam que o colapso que ocorre nas bolhas formadas nas amostras submetidas ao ultrassom pode levar à degradação ou hidrólise de alguns compostos (CASTRO; CAPOTE, 2007).

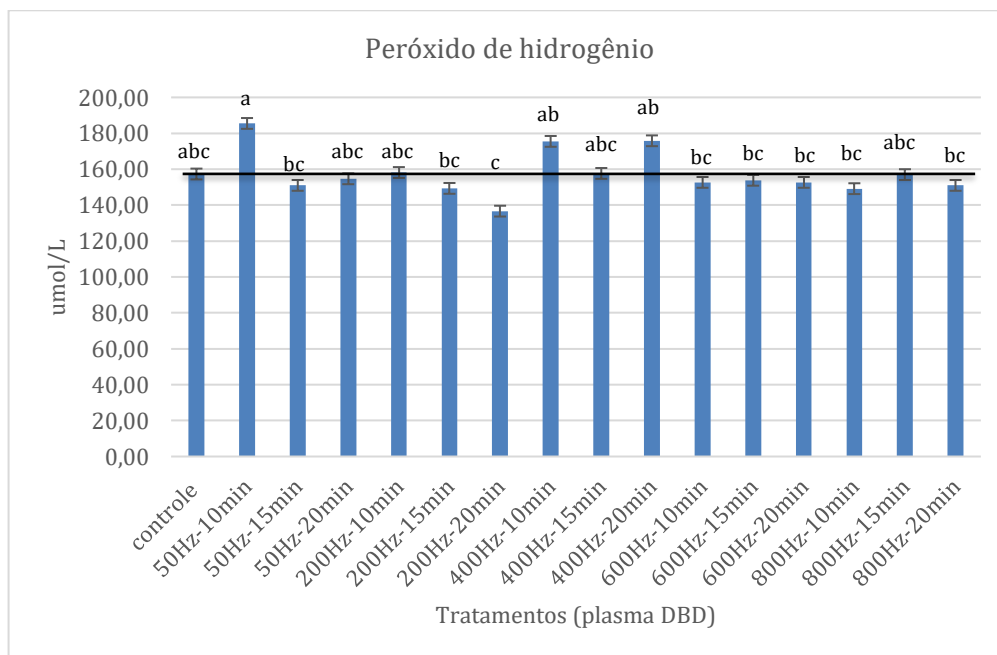
Em virtude do comportamento que ocorre com o ultrassom relacionado com o plasma frio, a formação ou redução de compostos orgânicos voláteis do araçá-boi foi influenciada pela ação do plasma frio por ser um gás composto por diversas espécies e partículas (NIEMIRA;

GUTSOL, 2011), as quais são responsáveis por diversas reações químicas, dentre elas: isomerização, cisão, hidrogenação, hidrólise, dimerização, oxidação, desamidação, nitração, sulfoxidação, desidrogenação e/ou hidroxilação de aminoácidos (TAKAI *et al.*, 2013).

2.3 Peróxido de hidrogênio

Para a determinação do teor de peróxido de hidrogênio, observou-se (Figura 17) que, para o plasma DBD, em apenas três condições de frequências e tempos de processamento (50 Hz-10 min, 400 Hz-10 min e 400 Hz-20 min) houve aumento. No entanto, em quase todos os tratamentos a quantidade de peróxido foi inferior à amostra controle (Tabela 6), apresentando diferenças estatísticas entre as condições de processamento para esse tipo de plasma.

Figura 17 – Concentração de peróxido de hidrogênio das amostras da polpa do araçá-boi submetidas ao tratamento com plasma frio DBD em diferentes frequências (50, 200, 400, 600 e 800 Hz) e tempos (10, 20 e 30 min) e amostra-controle (sem tratamento). A linha horizontal é utilizada para verificar o aumento ou redução da concentração do composto em relação ao da amostra controle.

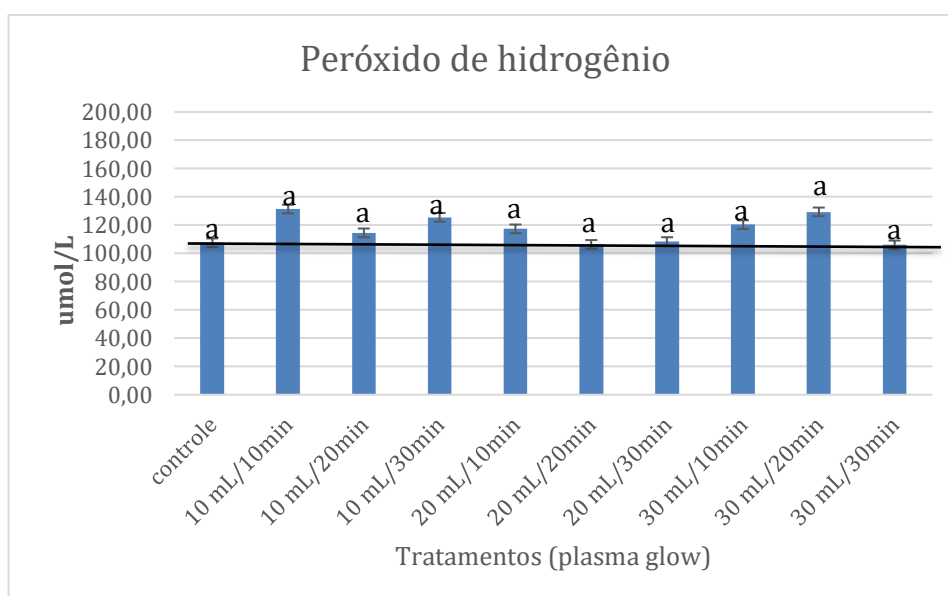


Fonte: elaborada pela autora.

Todavia, a aplicação com o plasma de descarga luminescente obteve maiores

concentrações de peróxido de hidrogênio (Figura 18), mas para a análise estatística, não foram apresentadas diferenças significativas.

Figura 18 – Concentração de peróxido de hidrogênio das amostras da polpa do araçá-boi submetidas ao tratamento com plasma descarga luminescente em diferentes fluxos de gás (10, 20 e 30/ mL) e tempos (10, 20 e 30 min) e amostra controle (sem tratamento). A linha horizontal é utilizada para verificar o aumento ou redução da concentração do composto em relação ao da amostra controle.



Fonte: elaborada pela autora.

O plasma frio forma diversas espécies reativas de oxigênio, as quais tendem a se ligar com estruturas para a sua formação, sendo, então, oxidantes ou redutores de elétrons, formando substâncias reativas como o peróxido de hidrogênio (OLIVEIRA, 2011). Dessa forma, trata-se de um oxidante eficiente na conversão de SO_2 em SO_4^{2-} , oxidação de sulfeto de hidrogênio, oxidação de componentes inorgânicos, hidrólise de formaldeído, carboidratos, componentes nitrogenados e fenóis (MATTOS *et al.*, 2003).

Tendo em vista as reações as quais o peróxido de hidrogênio é responsável, o aumento da sua concentração pela ação do plasma influenciou na modificação de alguns compostos voláteis (α - pinene, 2,5-dimethyl furan, 3-furoic acid, methyl ester, 2-propyl-tetrahydropyran-3-ol, 2,3-dihydro-3,5 dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one e 1H-pyrazole-3-carboxylic acid, 5-methyl, ethyl ester), como mostrados por meio do *heat map* (Figura 15 e 16).

3 CONCLUSÃO

Os dois tipos de plasma (DBD e descarga luminescente) contribuíram para o aumento da vitamina C. Para o plasma DBD, na maioria das condições, a vitamina C se manteve estável em comparação ao controle, não existindo diferenças entre as condições de processo utilizadas.

A caracterização do perfil de compostos voláteis mostrou que as diferentes condições operacionais do plasma frio e o tipo de equipamento influenciam na mudança da composição das polpas de araçá-boi, causando degradação ou formação desses compostos. O plasma DBD, na maioria das condições, não modificou os compostos, com exceção das frequências de 600 Hz e 800 Hz, que apresentaram maiores concentrações dos compostos identificados.

Nesse sentido, o plasma frio pode ser utilizado como uma técnica para preservação e retenção dos parâmetros de qualidade do araçá-boi, a partir de condições de processo estudadas que podem aumentar o teor de vitamina C e reduzir o teor de peróxido de hidrogênio, como foi observado, principalmente, para o plasma DBD.

REFERÊNCIAS

ALVES FILHO, E. G.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, F. A. N.; DE BRITO, E. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J.; RODRIGUES, S. An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 53, p. 6369, 2017.

ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; DE BRITO, E. S.; WURLITZER, N. J.; FERNANDES, F. A. N.; RABELO, M. C.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using ¹H qNMR and GC-MS coupled to chemometrics. **Food Chemistry**, v. 265, p. 23-31, 2018.

ARAÚJO, F. F.; NERI-NUMA, I. A.; FARIAS, D. P.; CUNHA, G. R. M. C.; PASTORE, G. M. Wild Brazilian species of Eugenia genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57-72, 2019.

ARAÚJO, F. F.; FARIAS, D. P.; NERI-NUMA, I. A.; DIAS-AUDIBERT, F. L.; DELAFIORI, J.; SOUZA, F. G.; CATHARINO, R. R.; SACRAMENTO, C. K.; PASTORE, G. M. Influence of high-intensity ultrasound on color, chemical composition and antioxidant properties of araçá-boi pulp. **Food Chemistry**, v. 338, p. 127747, fev. 2021.

BHARDWAJ, R. L.; PANDEY, S.; BLENDS, J. A Way of Utilization of Under-Utilized Fruits, Vegetables, and Spices: A Review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 51, p. 563-570, 2011.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. F. Ultrasound-assisted analytical chemical reactions. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 227-254, 2007.

CHENG, L. H.; SOH, C. Y.; LIEW, S. C.; TEH, F. F. Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1396-1401, 2007.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES S.; CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V. Ultrasound-Assisted Air-Drying of Apple (*Malus domestica* L.) and Its Effects on the Vitamin of the Dried Product. **Food Bioprocess Technol.**, v. 8, n. 7, p. 1503-1511, 2015.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: Umbu-
caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and
cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.
1263-1265, 2000.

GANI, A.; BABA, W. N.; AHMAD, M.; SHAH, U.; KHAN, A. A.; WANI, I. A.; GANI, A. Effect of ultrasound treatment on physico-chemical, nutraceutical and microbial quality of strawberry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 496-502, 2016.

LIU, Z.; XU, D.; LIU, D.; CUI, Q.; CAI, H.; LI, Q.; CHEN, H.; KONG, M. G. Production of
simplex RNS and ROS by nanosecond pulse N₂/O₂ plasma jets with homogeneous shielding
gas for inducing myeloma cell apoptosis. **Journal Of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n.
19, p. 195204, abr. 2017.

MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de
hidrogênio: importância e determinação Hydrogen peroxide: importance and determination.
Quím. Nova, v. 26, n. 3, 2003.

MISRA, N. N.; KEENER, K. M.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; CULLEN, P. J. In-
package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. **Journal of
Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 177-182, 2014.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.;
MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; DE CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.;
MAR´OSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant,
antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh
— Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p.
70-76, 2013.

NIEMIRA, B. A.; GUTSOL, A. Nonthermal Plasma as a Novel Food Processing Technology.
Nonthermal Processing Technologies For Food, p. 271-288, 2011.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under
control. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 49, p. 249-279, 1998.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, Avaliação da Atividade Antioxidante In
Vitro e Atividade antifúngica de Pimentas do Gênero Capsicum spp.** 2011. Dissertação
(Mestrado) – Departamento de Nutrição, – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

OVENSTON, T. C. J.; REES, W. T. The Spectrophotometric determination of small

amounts of hydrogen peroxide in aqueous solutions. **Analyst**, v. 75, p. 204-208, 1950.

PANKAJ, S. K.; MISRA, N. N.; CULLEN, P.J. Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 153157, 2013.

PINO, J. A.; QUIJANO, C. E. Volatile constituents of Camu-camu (*Myrciaria dúbia* (HBK) McVaugh) leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 205-207, 2008.

POODI, Y.; BIMAKR, M.; GANJLOO, A.; ZARRINGHALAMI, S. Intensification of bioactive compounds extraction from feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.) leaves using ultrasonic waves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 37-50, 2018.

RAMAZZINA, I.; BERARDINELLI, A.; RIZZI, F., TAPPI, S.; RAGNI, L.; SACCHETTI, G.; ROCCULI, P. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 107, p. 55-65, 2015.

RODRÍGUEZ, Ó.; GOMES, W. F.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 457-463, 2017.

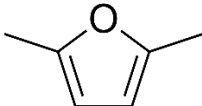
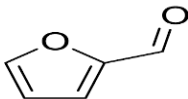
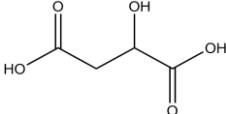
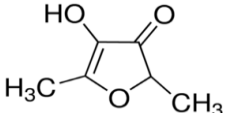
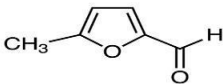
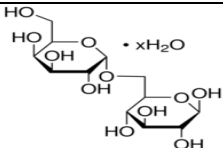
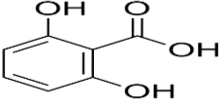
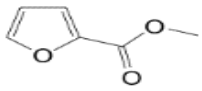
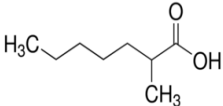
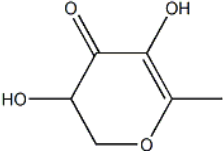
SELIMOVIĆ, A.; SALKIĆ M. Direct Spectrophotometric Determination of L-Ascorbic acid in Pharmaceutical Preparations using Sodium Oxalate as a Stabilizer. **International Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 11, n. 2, p. 106, 2011.

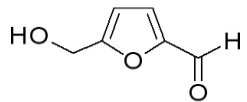
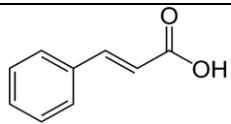
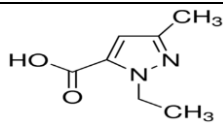
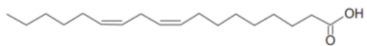
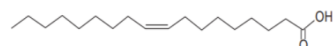
SOUZA FILHO, M. S. M.; LIMA, J. R.; NASSU, R. T.; MOURA, C. F. H.; BORGES, M.D.F. Formulações de néctares de frutas nativas das regiões norte e nordeste do Brasil. **Bol. CEPPA**, v. 18, p. 275–283, 2000.

TAKAI, E.; KITAMURA, T.; KUWABARA, J.; IKAWA, S.; YOSHIZAWA, S.; SHIRAKI, K.; KAWASAKI, H.; ARAKAWA, R.; KITANO, K. Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution. **Journal Of Physics D: Applied Physics**, v. 47, n. 28, p. 285403, 2014.

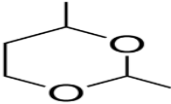
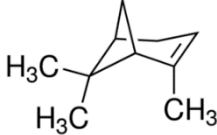
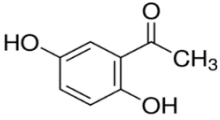
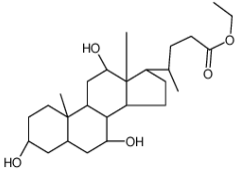
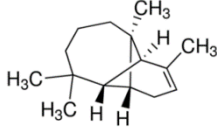
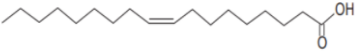
WANG, R. X.; NIAN, W. F.; WU, H. Y.; FENG, H. Q.; ZHANG, K., ZHANG, J.; FANG, J. Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation. **The European Physical Journal**, v. 66, n. 10, p. 276, 2012.

APÊNDICE A- PERFIL DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Composto	Fórmula molecular	Estrutura
2,5-dimethyl furan	C_6H_8O	
Furfural	$C_5H_4O_2$	
Acid malic	$C_4H_6O_5$	
2,4-dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	$C_6H_8O_4$	
5-methyl-2-furaldehyde	$C_6H_6O_2$	
D-glucose,6-O-á-D galactopyranosyl-melibiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	
2,6-dihydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_4$	
3-furoic acid, methyl ester	C_6H_6O	
2-propyl-tetrahydropyran-3-ol	$C_8H_{16}O_2$	
2,3-dihydro-3,5 dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	$C_6 H_8 O 4$	

5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde	$C_6H_6O_3$	
cinnamic acid	$C_9H_8O_2$	
1H-pyrazole-3-carboxylic acid, 5-methyl, ethyl ester	$C_7H_{10}N_2O_2$	
linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	
oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	

APÊNDICE B- PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Composto	Fórmula molecular	Estrutura
2,4-dimethyl-1,3-dioxolane	$C_5H_{10}O_2$	
a-pinene	$C_{10}H_{16}$	
2',6'-dihydroxyacetophenone	$C_8H_8O_3$	
ethyl isoallocholate	$C_{26}H_{44}O_5$	
longipinane	$C_{15}H_{26}$	
oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	

8 CONCLUSÃO

Os dois sistemas de plasma (descarga DBD e descarga luminescente) induziram a inativação parcial das enzimas PPO e POD no suco de maçã, contribuindo para aumentar o teor de fenóis e da atividade antioxidante. O plasma DBD com frequência de excitação de 50 Hz proporcionou um suco de maçã com o maior conteúdo de fenólico total e capacidade antioxidante e com menor mudança de cor. De forma geral, as alterações nos parâmetros de cor não comprometeram a qualidade do produto.

O plasma de descarga luminescente reduziu o teor de sacarose e aumentou a glicose, a frutose e o ácido málico da maçã. Essas alterações aumentaram, significativamente, o poder adoçante e reduziram a relação açúcar-ácido dos sucos de maçã. As alterações mais significativas foram alcançadas operando a 20 mL/10min e a 10 mL/30min de fluxo de plasma. O plasma de barreira dielétrica reduziu o teor de sacarose, glucose e frutose, aumentou o teor de ácido málico, diminuiu o poder adoçante e a relação açúcar-ácido do suco e cubos de maçã, com mudanças mais significativas alcançadas nas condições de 50 e 900 Hz. O tratamento com o plasma frio também altera as características sensoriais dos produtos de maçã e pode ser utilizado para modular tanto a doçura como a relação açúcar-ácido.

Nas polpas de araçá-boi o plasma influenciou no aumento do teor de vitamina C e na redução de peróxido de hidrogênio, principalmente com o plasma DBD. A caracterização do perfil de compostos voláteis mostrou que as diferentes condições operacionais do plasma frio e o tipo de equipamento influenciam na mudança da composição das polpas de araçá-boi, causando degradação ou formação de compostos voláteis.

Portanto, o plasma frio pode ser utilizado como uma técnica para preservação e retenção dos parâmetros de qualidade das frutas estudadas, a partir de condições de processo avaliadas para alcançar os objetivos específicos.