

Estudo do processo de assadura num forno não industrial e o seu efeito em algumas propriedades físico químicas do fruto

Elsa Catarina do Nascimento Fontes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por

Professora Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa

Professora Maria de Lurdes Antunes Jorge

**Bragança
2014**

O traballo que se presenta teve o apoio financeiro do proxecto: “*RED/AGROTEC – Red transfronteriza España Portugal de experimentación y transferencia para el desarrollo del sector agropecuario y agroindustrial*”, proxecto financiado polo POCTEP



UE
FEDER
Investimos no seu futuro

Aos meus pais

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível com a ajuda de várias pessoas, às quais gostaria de agradecer.

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, por todo o acompanhamento, orientação e por todos os conhecimentos que me transmitiu. Agradeço pela compreensão, ajuda e amizade, estando sempre presente ao longo deste trabalho.

À minha coorientadora Professora Lurdes por ter estado presente ao longo de todo o trabalho.

A todos os colegas de laboratório, Dona Maria do Céu Fidalgo, Luana Fernandes e Teresa Delgado por toda a ajuda e carinho demonstrado.

Ao professor Doutor José Alberto Pereira por ter disponibilizado alguns dos seus equipamentos para a realização do trabalho e a todas as pessoas presentes no laboratório de Agro Biotecnologia pela simpatia e disponibilidade estando sempre prontos a ajudar.

Aos meus amigos Sílvia Pedro, Susana Lourenço e Eduardo Rosendo por terem estado sempre presentes ao longo desta caminhada, com eles por perto foi tudo bem mais fácil.

Às pequenas Patrícia, Ana, Lídia e Sónia, pelos anos que passamos juntas em Bragança.

Não esquecendo aquelas amigas de sempre, Diana e Roxanne que mesmo longe estavam sempre por perto.

Agradeço às minhas colegas de casa, Tatiana, Cristina, Karina pelo carinho durante este pouco tempo que passamos juntas.

Agradeço à minha família em especial aos meus pais por terem feito com que isto fosse possível e por estarem sempre presentes. Às minhas irmãs, Carmen e Sara que apesar de serem umas chatas estiveram sempre comigo.

Aos meus sobrinhos, Rodrigo e Inês, mesmo sendo pequeninos conseguiam sempre alegrar o meu dia.

Todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, a elas um Muito Obrigada!

Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
Capítulo 1-Introdução	1
1.1 Enquadramento do tema.....	2
1.2 Importância da castanha na economia.....	2
1.3 Propriedades físico-químicas da castanha europeia (<i>Castanea sativa</i> Mill.).....	4
1.4 Reações de escurecimento.....	6
1.5 Secagem	8
Capítulo 2- Objetivos do trabalho	11
Capítulo 3- Material e Métodos	13
3.1 Avaliação da atividade da polifenoloxidase em castanha	14
3.1.1 Obtenção de extratos enzimáticos	14
3.1.2 Determinação da atividade da polifenoloxidase.....	15
3.1.3 Quantificação do teor de proteína presente nos extratos	15
3.2 Processamento térmico aplicado às castanhas.....	15
3.2.1 Cor.....	16
3.2.2 Determinação da atividade da água (a_w).....	17
3.2.3 Determinação da densidade.....	17
3.2.4 Avaliação dos teores de humidade e matéria seca.....	17
3.2.5 Teor de proteína bruta	18
3.2.6 Determinação dos açúcares redutores	18
3.2.6.1 Extração.....	18
3.2.6.2 Quantificação pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS)	18
3.2.6.3 Avaliação do escurecimento não-enzimático - Reações de Maillard.....	19
3.2.6.4 Avaliação do escurecimento enzimático (PPO)	19
3.3 Análise estatística.....	19
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	20
4.1 Avaliação da atividade da polifenoloxidase.....	21
4.2 Processamento térmico.....	24
4.3 Cor.....	25
4.4 Atividade da água.....	29
4.5 Densidade.....	30
4.6 Proteína bruta	30
4.7 Açúcares redutores	31
4.8 Escurecimento não enzimático - Reações de Maillard.....	32

4.9 PPO	34
Capítulo 5- Conclusão.....	38
Referências Bibliográficas	40

Resumo

A castanha (*Castanea sativa* Mill.) é um fruto seco de grande importância em Portugal, sendo geralmente consumida após processamento térmico, tal como cozimento ou assadura. Alguns estudos foram já realizados sobre desidratação de castanha com ar quente. Contudo, poucos têm abordado a questão de se utilizarem temperaturas elevadas em torno dos 200 °C, tais como as aplicadas no processo de assadura. Desse modo, no presente trabalho pretendeu-se estudar o processo de assadura de castanhas num forno não industrial e o seu efeito em algumas propriedades físico-químicas do fruto. Para tal, testaram-se previamente três métodos de extração da polifenoloxidase (PPO) em castanhas frescas e verificou-se que os melhores resultados foram obtidos para a extração com tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,5 e polivinilpirrolidona (PVPP).

Em relação ao efeito do pH (6,0 a 7,5) e da concentração de substrato (catecol) (20 a 100 mM), verificou-se que na maioria das situações a velocidade inicial não variou significativamente.

Em relação ao efeito da assadura a 200 °C, verificou-se que no final do processamento (30 minutos) as amostras ainda apresentavam um teor significativo de água. Em relação à cinética de secagem, só foram detetados os períodos de estabilização e de velocidade de secagem constante. Em termos de cor, os valores de luminosidade (L^*) diminuíram tanto nos frutos inteiros como cortados, ao contrário do tom avermelhado (a^*), o qual aumentou, originando uma variação de cor (ΔE^*) significativa face ao início. A atividade da água (a_w) manteve-se praticamente constante ao longo do tempo de assadura, diminuindo para 0,90 só após os 30 minutos. A densidade e os teores de proteína e de açúcares redutores oscilaram ao longo do processamento, variando entre 1,22 e 1,41 g/ml, 4,07 e 5,31%, e 0,70 e 1,30 mg glucose/g de peso seco, respetivamente. Relativamente à ocorrência de reações de Maillard, ao longo do processo de assadura não se observou uma formação significativa de produtos intermediários e finais dessas reações. Contudo, no futuro aconselha-se a realizar uma amostragem mais superficial ao fruto e não ao fruto inteiro para se dosearem esses compostos, uma vez que estas reações poderão ocorrer em maior extensão à superfície.

Já em relação à atividade da PPO, esta manteve-se ativa até aos 30 minutos, podendo justificar em parte o escurecimento observado.

Palavras-Chave: Castanha (*Castanea sativa* Mill.), assadura, composição físico-química, PPO, Reações de Maillard.

Abstract

Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is a dry fruit of great importance in Portugal, being generally consumed after thermal processing, as baking or roasting. Some studies had already been performed on chestnut dehydration with hot air. However, few have used temperatures around 200 °C, such as those applied in roasting. So, in the present work it was intended to study the process of chestnut roasting in a domestic oven and its effects in some physic-chemical properties of the fruit. For such, Previously three extraction methods for poliphenoloxidase (PPO) in fresh chestnuts had been tested and it was verified that the best results were obtained with an extraction of sodium phosphate buffer 100 mM at pH 7,5 and polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). In relation to the effect of pH (6,0 to 7,5) and substrate concentration (catechol) (20 to 100 mM), in the majority of the situations the initial rate for PPO did not vary significantly.

In relation to the effect of roasting at 200 °C, it was verified that in the end of the processing (30 minutes) the samples still presented a significant water content. In relation to the drying kinetics, the only drying periods observed were the stabilization and constant rate drying periods. In color terms, the values of luminosity (L^*) decreased in the entire and cut fruits, in contrast to the a^* parameter that had increased, originating a significant color variation (ΔE^*) in relation to the beginning. The water activity (a_w) remained practically constant throughout the roasting time, decreasing to 0,90 only after 30 minutes. The density and protein and reducing sugars contents had oscillated throughout the processing, varying between 1,22 and 1,41 mg/ml, 4,07 and 5.31%, and 0,70 and 1,30 mg glucose/g of dry weight, respectively. Regarding the occurrence of Maillard reactions, a significant formation of intermediate and final products of these reactions was not observed throughout the roasting process; however, in the future it is advisable to carry through a superficial sampling to the fruit instead the entire fruit because these compounds may be produced in higher extension at the surface. In relation to PPO activity, this enzyme remained active until 30 minutes, justifying in part the color change observed in the fruits.

Keywords: Chestnut (*Castanea sativa* Mill.), roasting, physic-chemical properties, PPO, Maillard reactions.

Índice de figuras

Figura 1- Produção Mundial de Castanha em 2012.	3
Figura 2- Produção anual de castanha em Portugal entre 1986 e 2012.....	4
Figura 3- Curvas de secagem típicas de um produto alimentar em relação à quantidade de água do produto e velocidade de secagem.....	10
Figura 4- Atividade enzimática da PPO (fração solúvel) a diferentes valores de pH e de concentração de catecol;.....	22
Figura 5- Curva de secagem obtida durante a assadura de castanhas num forno doméstico a 200 °C.....	25
Figura 6- Parâmetros L^* , a^* e b^* avaliados na castanha inteira e cortada a meio ao longo da assadura a 200 °C	27
Figura 7- Parâmetros c^* , h^* e ΔE^* avaliados na castanha inteira e cortada a meio ao longo da assadura a 200 °C.	28
Figura 8- Valores da a_w na castanha ao longo da assadura a 200 °C	29
Figura 9- Teores de proteína (%), expressos em peso seco e peso fresco, na castanha ao longo da assadura a 200 °C	31
Figura 10- Açúcares redutores (mg glucose/g), expressos em peso seco e peso fresco, na castanha ao longo da assadura a 200 °C	32
Figura 11- Avaliação da ocorrência das Reações de Maillard ao longo da assadura da castanha a 200 °C	33
Figura 12- Atividade enzimática da PPO ao longo do tempo para as concentrações de catecol de 40 (A) e 80 (B) mM.....	34
Figura 13- Castanhas antes e após terem sido submetidas a assadura a 200 ° C durante 5 e 30 minutos.	37

Índice de tabelas

Tabela 1- Condições utilizadas na determinação da PPO mencionadas em trabalhos publicados.....	8
Tabela 2- Valores de absorvância a 395 e 420 nm em função do tempo para os três métodos estudados no presente trabalho utilizando catecol a 10 mM.....	21
Tabela 3- Velocidades iniciais médias (Δ Abs/ (min.50 μ l de extrato)) para a atividade enzimática da PPO a diferentes valores de pH e de concentração de catecol	23
Tabela 4- Concentração de proteína (μ g/ μ l) para cada extrato enzimático obtido a diferentes valores de pH	24
Tabela 5- Valores médios de densidade da castanha ao longo da assadura a 200 ° C ..	30
Tabela 6- Valores médios da atividade enzimática da PPO, avaliada a partir das velocidades iniciais (Δ Abs/min) determinadas em extratos de castanhas assadas a 200 °C.....	35
Tabela 7- Parâmetros da cor da castanha avaliada aos 0, 5 e 30 minutos de assadura..	35

Capítulo 1

Introdução

1.1 Enquadramento do tema

De entre os frutos secos, a castanha foi e continua a ter elevada importância na alimentação humana, principalmente da população do Norte de Portugal, sendo consumida tanto em cru como processada. Em períodos de crise alimentar, a castanha era um dos poucos recursos existentes utilizados pela população (devido à falta de alimentos). Contudo, este fruto foi perdendo importância como elemento base na alimentação do meio rural. No entanto, nos tempos atuais, com a procura da formulação de novos produtos, este fruto tem ganho relevo na gastronomia (Serra, 1987), e em particular na cozinha *gourmet*.

Classificado por Miller, o castanheiro é uma árvore que pertence ao género *Castanea*, encontrando-se incluído na Família Fagaceae, que se subdivide em 3 principais subfamílias, Fagoideae, Quercoideae e Castaneoideae, sendo nesta última que se inclui a espécie em estudo (Silva, 2007).

1.2 Importância da castanha na economia

Relativamente à origem do género *Castanea*, referências apontam para o Oriente e a China (Vavilov, 1950), falando-se ainda na possibilidade da América do Norte (Guerreiro, 1957). Em relação à espécie *Castanea sativa* Mill., pensa-se que tenha tido origem no Mediterrâneo oriental, destacando-se a Ásia Menor, Balcãs e Cáucaso (Paiva, 2001).

Em relação à produção de castanha existem diversas variedades, designadamente a europeia (*Castanea sativa*) a chinesa (*Castanea mollissima*), a japonesa (*Castanea crenata*) e a americana (*Castanea dentata*). De acordo com a FAO, em 2012, a produção mundial de castanha rondava os 2,0 milhões de toneladas, distribuídas por uma superfície de aproximadamente de 536642 ha (FAOSTAT, 2012). A China é o maior produtor, contribuindo com 1,65 milhões de toneladas por ano (Figura 1).

A Europa é responsável por cerca de 6,4% da produção mundial, com relevância para a Itália, Grécia e Portugal, correspondendo a 41, 22 e 15% da produção europeia, respetivamente (FAOSTAT, 2012).

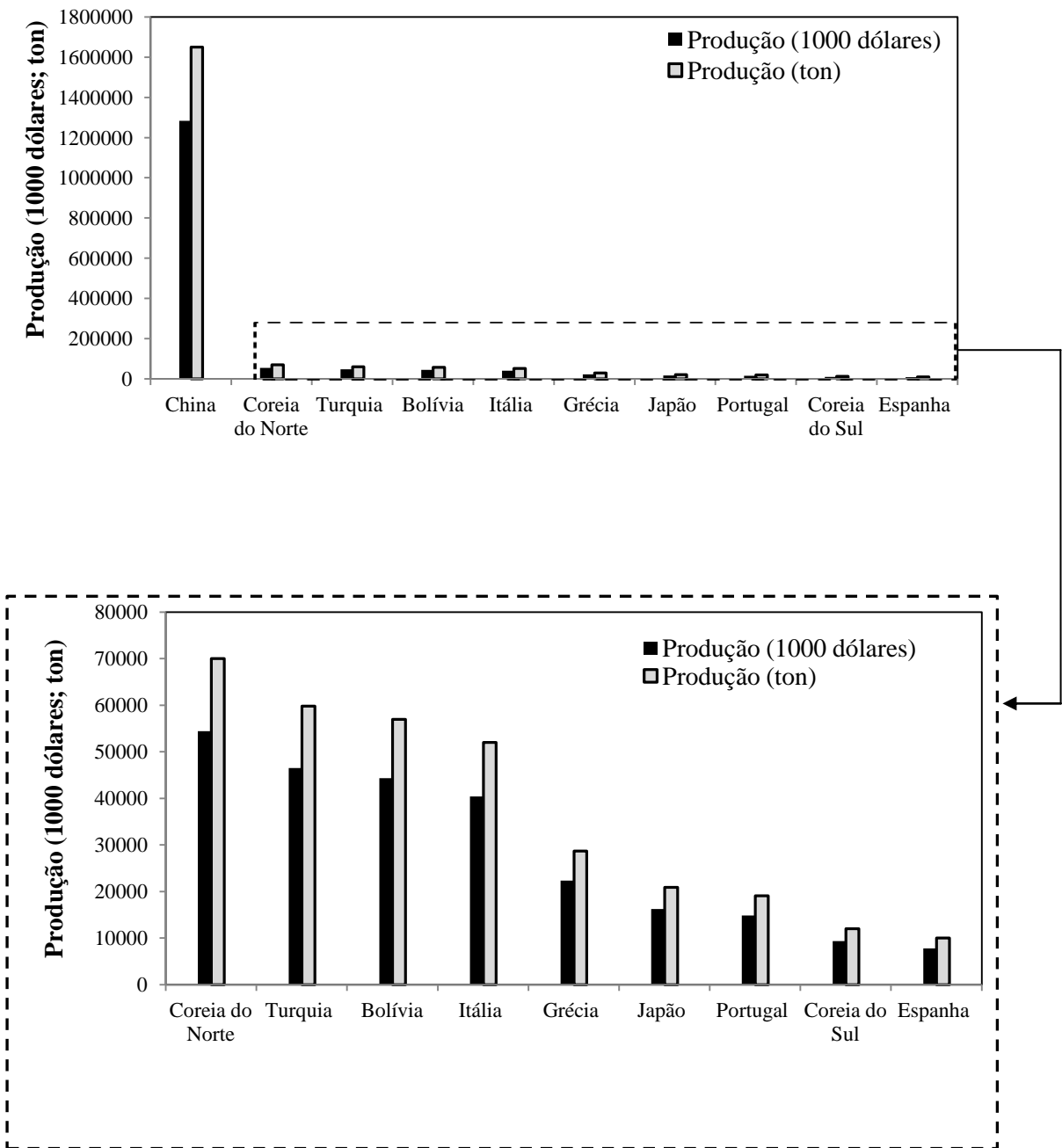


Figura 1-Produção Mundial de Castanha em 2012 (Fonte: FAOSTAT, 2014).

A produtividade portuguesa de castanha, tem sofrido alterações ao longo dos anos. Segundo os dados do INE (2014), entre os anos de 1994 e 2000 verificou-se uma subida na produção. De acordo com a Figura 2, os anos 2000, 2003 e 2006 foram os que apresentaram os valores mais elevados de produção. No ano de 2012, houve um atraso da maturação dos frutos como consequência da seca, reduzindo a produção. Contudo, a diminuição de precipitação não teve apenas consequências negativas. No final do ciclo observou-se um aumento significativo do calibre médio dos frutos, beneficiando-os. Face a 2011, campanha que registou a pior produção dos últimos 18 anos, verificou-se

um aumento de 4,7% de produção. Também no ano de 2013, a produção de castanha aumentou 20% face ao ano anterior (INE, 2013).

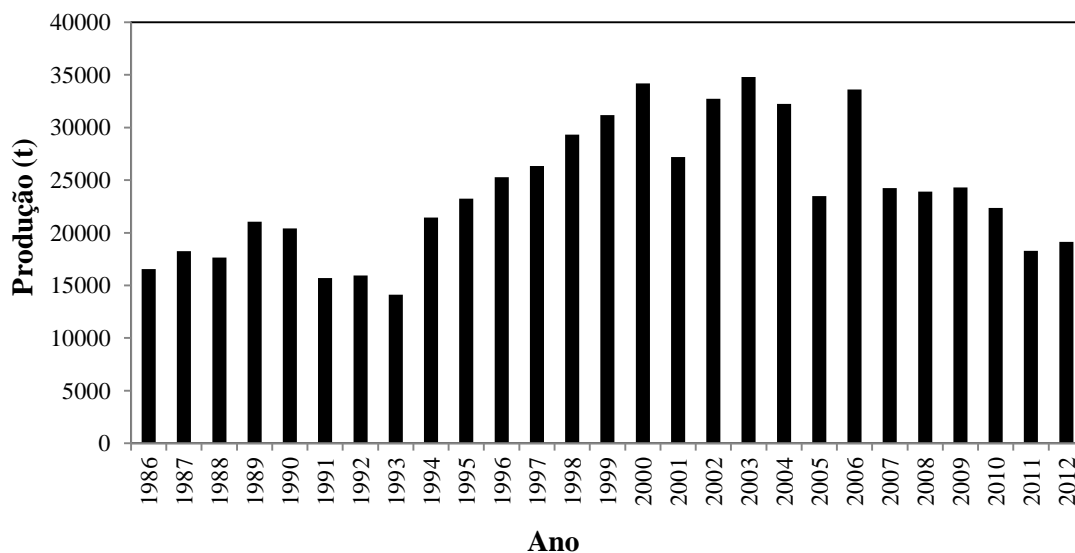


Figura 2-Produção anual de castanha em Portugal entre 1986 e 2012 (Fonte: INE, 2014).

Em relação à área de produção, a principal área está localizada na região de Trás-os-Montes (Nordeste de Portugal), tendo um papel importante na economia e na paisagem, contribuindo com 84% da produção nacional (Borges *et al.*, 2008).

Cerca de 70 a 80% da castanha da região de Trás-os-Montes tem como destino o mercado externo (em fresco e transformada), sendo 65% para países da União Europeia e 15% para Países Terceiros. Somente 20 a 30% é que tem como destino o mercado interno (MADRP, 2007).

1.3 Propriedades físico-químicas da castanha europeia (*Castanea sativa* Mill.)

Em completo estado de maturação, a castanha, ao contrário da maioria dos frutos secos, contém um conteúdo de água superior a 50%, o que pode dificultar a sua conservação. A castanha após colheita é geralmente armazenada sob refrigeração até consumo ou processamento posterior. Devido à elevada quantidade de água presente, quando armazenada sob refrigeração a atividade enzimática continua a ocorrer, observando-se em simultâneo a perda de peso e também o desenvolvimento de fungos (Rodrigues *et al.*, 2012). A atividade enzimática é a principal responsável pela alteração

da composição química da castanha, principalmente no que diz respeito ao conteúdo de hidratos de carbono e vitaminas (Desmaison & Adrian, 1986).

A castanha é um fruto com um baixo teor proteico (cerca de 3%) e tem a vantagem de não conter glúten (Vasconcelos *et al.*, 2007). Além disso, de acordo com estudos realizados, a castanha é considerada um dos frutos secos com menor teor de gordura. O valor médio para o teor de gordura total nas castanhas ronda os 2,4 g/100g de parte edível. Podemos afirmar que a castanha comparativamente com outros frutos secos, como o amendoim (44,57 g/100g), a avelã (63,18 g/100g), a castanha de caju (42,06 g/100g) e o pistácio (45,83g/100g) (Freitas *et al.*, 2011) apresenta valores de gordura baixos. Relativamente à sua composição lipídica, este fruto seco não tem colesterol e é rico em ácidos gordos polinsaturados (Carvalho & Silva, 2000), apresentando valores baixos de ácidos gordos saturados, tendo dessa forma um perfil lipídico adequado.

Os hidratos de carbono são os nutrientes maioritários na castanha, principalmente o amido, seguido pela sacarose. Este dissacarídeo é um dos parâmetros mais importantes na avaliação da qualidade da fruta (Vasconcelos *et al.*, 2010). Bernárdez *et al.* (2004) referem valores de sacarose que variam entre 6,5 e 19,5%, enquanto os conteúdos de glucose e frutose são muito menores. As percentagens de amilose e amilopectina na castanha são de 33 e 67% (Vasconcelos *et al.*, 2010), respetivamente. Quanto ao teor de hidratos de carbono, este encontra-se sujeito a diversas modificações, de acordo com a origem dos frutos, temperatura de armazenamento, humidade relativa do ar, tempo decorrido desde a sua colheita e ainda o nível de oxigénio e embalagem (Vasconcelos *et al.*, 2010).

Em relação ao conteúdo de fibras, este ronda os 22,85 mg/100g (Vasconcelos *et al.*, 2010). A castanha é rica essencialmente em fibra insolúvel, sendo a sua ingestão benéfica para o organismo humano, levando a uma diminuição da velocidade de absorção dos açúcares, gorduras e de alguns minerais como o sódio (USDA, 2005).

O potássio, de entre os minerais encontrados na castanha, é aquele que está presente em maior quantidade (754 mg/100 g). Pelo contrário, o cobre é o que está presente em menor quantidade (0,8 mg/100 g). O ferro apresenta um valor médio de 8,1 mg/100 g, representando 100% da Dose Diária Recomendada (DDR) para homens e 44,4% da DDR para mulheres (Borges *et al.*, 2008).

Os principais compostos fenólicos encontrados na castanha são o ácido gálico e o ácido elágico (Vasconcelos *et al.*, 2010). Estes ácidos têm sido associados como tendo vários efeitos positivos para a saúde, tais como, propriedades antioxidantes e serem

capazes de diminuir o risco de doenças cardiovasculares (De Pascual-Teresa *et al.*, 2000).

A castanha apresenta-se também como sendo uma fonte rica de várias vitaminas, destacando-se as vitaminas E e C, com um valor médio em torno dos 1,9 mg/100g e 15,6 mg/100g, respetivamente (Vasconcelos *et al.*, 2010). Outras vitaminas que se podem encontrar no fruto são a tiamina (B1: 0,14 mg/100g), riboflavina (B2: 0,02 mg/100g), niacina (B3: 1,10 mg/100g), piridoxina (B6: 0,35 mg/100g) e ainda o folato (58 mg/100g) (Vasconcelos *et al.*, 2010).

1.4 Reações de escurecimento

Um dos fatores importantes que determina a qualidade dos frutos “*in natura*” é a cor (Medeiros & Raseira, 1998). As alterações na cor podem ocorrer através de dois tipos de reações: as de origem não enzimática ou enzimática (Johson *et al.*, 1998). No caso das reações enzimáticas dá-se principal destaque às atividades das enzimas polifenoloxidase e peroxidase (Whitaker, 1994; Troiani *et al.*, 2001). No caso das reações não enzimáticas, estas incluem-se as Reações de Maillard e as Reações de Caramelização.

O escurecimento não enzimático ou reações de Maillard apresentam-se como sendo um conjunto de reações em que determinadas condições os açúcares redutores podem reagir com as proteínas e assim produzir pigmentos de cor escura e ainda modificações no odor e sabor dos alimentos, que em alguns casos são desejáveis (assados) e indesejáveis quando se desenvolvem cores anómalas durante o armazenamento. O escurecimento não enzimático envolve reações que podem ser observadas nas frutas e nos vegetais. As reações de escurecimento não enzimático são aceleradas pelo calor, podendo ocorrer nos processos de pasteurização, esterilização e desidratação (Ordóñez *et al.*, 2005).

O escurecimento enzimático ocorre como resultado da oxidação de compostos fenólicos endógenos catalisada pela polifenoloxidase (PPO). PPO é um termo que descreve um grande número de enzimas, incluindo a tirosinase, a catecol oxidase e a lacase (Whitaker *et al.*, 2003). A PPO catalisa, na presença de oxigénio, a oxidação de mono e di-fenóis a *o*-quinonas. (Hui, 2006) Estes produtos são altamente reativos e podem polimerizar-se espontaneamente para formar compostos de alto peso molecular ou pigmentos castanhos, ou reagir com os aminoácidos e proteínas aumentando a cor

acastanhada (Vámos-Vigyazo, 1995; McEvily *et al.*, 1992). Os produtos que resultam do escurecimento enzimático apresentam um papel fisiológico muito importante. Existe uma relação entre a atividade da PPO e os compostos fenólicos variando com a temperatura, o pH e ainda a disponibilidade de oxigénio nos tecidos (Hui, 2006).

Apresentando o nome de tirosinase, fenolase, catecol oxidase, catecolase, *o*-difenoil oxidase e monofenol oxidase, a PPO foi descoberta no ano de 1856 por Shoenbein, em cogumelos. Nas plantas a PPO tem apresentado um peso molecular entre os 57 e 62 KDa (Whitaker *et al.*, 2003). De acordo com Mendonça & Guerra (2003), esta enzima encontra-se no grupo das oxirredutases e contém o cobre como grupo prostético. A PPO além de poder ser encontrada em tecidos vegetais (principalmente em frutas e hortaliças), também pode ser encontrada em microrganismos (principalmente em fungos) e em alguns animais (Mendonça & Guerra, 2003).

Os pigmentos característicos do escurecimento enzimático, os quais podem ocorrer durante o manejo, armazenamento e processamento de frutas e vegetais, fazem com que haja modificações organoléticas e nutricionais, que por vezes podem afetar a aparência dos produtos, o que leva a uma mais fácil rejeição destes (Ding *et al.*, 2002).

São duas as reações que a PPO catalisa na presença do oxigénio molecular: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois e a oxidação de *o*-difenois em compostos de cor ligeiramente amarela, as *o*-quinonas. As quinonas formadas sofrem uma série de reações não enzimáticas para formar pigmentos escuros, os quais se denominam de melaninas (Whitaker *et al.*, 2003).

Relativamente à atividade da PPO, esta é geralmente superior em frutos verdes do que em frutos maduros (Lamikanra, 2002). A PPO não possui um pH ótimo, apresentando-se ativa numa elevada gama de valores de pH (3 a 7). A valores de pH abaixo de 3, a enzima encontra-se inativa (Hui, 2006).

A PPO tem sido determinada em diversos frutos. Algumas das condições utilizadas na sua determinação encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1-Condições utilizadas na determinação da PPO mencionadas em trabalhos publicados

Fruto	Método	Referência
Uvas	Obtenção dos extratos enzimáticos: Solução tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0) + polivinilpirrolidona (PVPP) 1%. Determinação da atividade da PPO: Solução tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0) e catecol 0,01M (30 ° C durante 30 minutos). Adição de ácido perclórico 2M e leitura de absorvância a 395 nm.	Freitas <i>et al.</i> , 2008
Maçãs	Obtenção dos extratos enzimáticos: Tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 5,0). Determinação da atividade da PPO: Catecol em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 5,0). A leitura de absorvância foi feita a 405 nm.	Jang & Moon, 2011
Morangos	Obtenção dos extratos enzimáticos: Tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 7,0) + PVPP 4% (w/v) + Triton X-100 1% (v/v) + NaCl 1M. Determinação da atividade da PPO: Catecol em tampão fosfato 0,07 M (pH 5,8) e leitura de absorvância a 420 nm.	Sulaim & Silva, 2013

Em termos gerais, a obtenção dos extratos enzimáticos da PPO em frutos tem envolvido soluções tampão de fosfato de sódio com valores de pH compreendidos entre os 5,8 e 7,0, demonstrando a importância deste parâmetro, sendo necessário determinar as melhores condições para cada fruto sob estudo. Relativamente ao substrato utilizado, o mais referido é o catecol.

1.5 Secagem

O processo de secagem de produtos agrícolas foi sempre considerado de grande importância na preservação dos alimentos (Yaldiz *et al.*, 2001). Em países tropicais e subtropicais, a secagem de frutos ao sol é bastante comum (Doymaz, 2008). Por se apresentar como sendo um método de baixos custos, a secagem ao sol é facilmente utilizada, tendo assim grande popularidade (Doymaz, 2008). No entanto, há certos fatores que podem dificultar ou inviabilizar esta técnica, tais como chuva, poeiras, vento e ainda insetos e roedores (Yaldiz *et al.*, 2001). Para melhorar a qualidade dos alimentos, as técnicas de secagem ao sol são em diversas situações substituídas por

métodos de secagem ou desidratação mecânica, o que faz com que a qualidade dos produtos seja melhor (Doymaz, 2008).

O principal objetivo do método de secagem é a remoção da água para valores em que se verifique uma redução da atividade microbiana e das reações químicas enzimáticas, com a principal vantagem de aumentar a vida de prateleira do produto. Verifica-se, em simultâneo, uma diminuição do peso e volume, havendo assim um contributo para a redução de custos de embalagem e de manuseio das mesmas, incluindo ainda o seu transporte e um aumento da disponibilidade dos produtos ao longo do ano. Outro dos objetivos da secagem é a elaboração e processamento de alimentos secos de boa qualidade no que diz respeito às características nutricionais e organolépticas (Valentas *et al.*, 1997).

Relativamente à secagem de frutos, este processo é considerado lento e deve ser efetuado de forma a não permitir alterações indesejáveis no produto seco (Somogyi *et al.*, 1996). Dependendo das especificações de cada produto alimentar, os métodos de secagem têm sido adaptados com base no que se deseja obter. A secagem pode ser efetuada utilizando diversos equipamentos. Além disso, o mesmo processo pode ser classificado dependendo do tipo de funcionamento, dividindo-se assim em dois tipos: descontínuo, onde o material é colocado no interior do secador e a secagem ocorre durante um certo período de tempo, ou contínuo, onde o material é continuamente colocado no secador e posteriormente removido de forma contínua.

Durante a secagem é importante salientar que existem dois principais processos de transporte que ocorrem em simultâneo: verifica-se inicialmente uma transferência de massa de água do interior do alimento para a sua superfície, e ainda uma transferência de calor do ambiente para a superfície do alimento e para o interior deste por condução (Brennan, 2006). Durante a secagem distinguem-se diversos períodos de secagem (Figura 3). O primeiro período (A-B) designa-se período transitório de estabilização, no qual o material se adapta às condições de secagem. Segue-se um segundo período designado de período de velocidade de secagem constante (B-C). Neste período a quantidade de água disponível no produto é ainda elevada. No terceiro período a velocidade de secagem é decrescente (C-D), até se atingir o teor de humidade de equilíbrio.

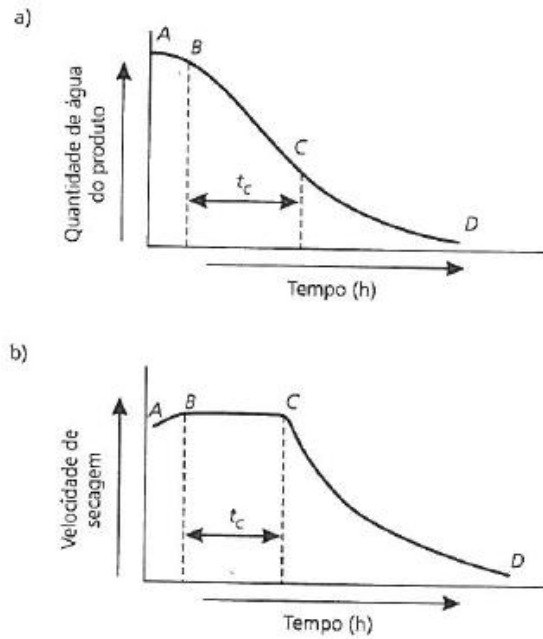


Figura 3 - Curvas de secagem típicas de um produto alimentar em relação à quantidade de água do produto e velocidade de secagem (Fonte: Brennan *et al.*, 1980)

Uma característica evidente no processo de secagem é a mudança de cor significativa (Krokida & Maroulis, 1997). Deve ainda ser salientado que a estrutura do material, o teor de humidade inicial e a área de superfície de contacto são fatores que influenciam o processo de secagem (Perussello, 2008).

Ao longo destes últimos anos, diversos estudos têm abordado os efeitos da cinética de secagem na castanha (Singh *et al.*, 2008). Contudo, estes trabalhos têm aplicado temperaturas de secagem em torno dos 50 a 90 °C, as quais são mais baixas do que as aplicadas durante a assadura das castanhas. Esta geralmente é realizada em torno dos 200 °C, não se conhecendo as causas do escurecimento dos frutos que se observa durante este processo.

Capítulo 2

Objetivos do trabalho

De modo a avaliar algumas alterações que as castanhas sofrem durante a assadura num forno não industrial, no presente trabalho pretendeu-se:

- Determinar as melhores condições de obtenção de extratos celulares com PPO em castanha;
- Realizar a assadura da castanha num forno doméstico para avaliar o efeito na cor, atividade da água, densidade e nos teores de proteína e açúcares redutores;
- Avaliar a atividade da PPO e a ocorrência das reações não enzimáticas (Reações de Maillard) durante a assadura de castanhas.

Capítulo 3

Material e Métodos

3.1 Avaliação da atividade da polifenoloxidase em castanha

3.1.1 Obtenção de extratos enzimáticos

Na obtenção de extratos enzimáticos foram inicialmente testados três métodos:

Método 1: Seguiu-se o método descrito por Andrade de Freitas (2008), com algumas modificações. Pesaram-se 10 g de castanha fresca, trituraram-se e homogeneizaram-se com 40 ml de solução tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 6,0, durante 2 minutos usando o homogeneizador Ultra-Turrax T25 basic (IKA-WERKE). A solução foi filtrada através de gaze, tendo o filtrado sido centrifugado a 5000 rpm durante 20 minutos a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante, denominada fração enzimática solúvel, foi congelado a -80 °C. O precipitado foi homogeneizado com 20 ml de NaCl 1M preparado em solução tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 6,0. A solução foi centrifugada nas mesmas condições anteriores. A este sobrenadante chamou-se fração ligada ionicamente, e foi também congelado a -80 °C.

Método 2: Seguiu-se o método de Clemente (2002), tendo 10 g de castanhas trituradas sido homogeneizadas com 40 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,5. De seguida, foi adicionada polivinilpirrolidona (PVPP) (1%, m/v). A solução foi filtrada através de gaze. O filtrado foi centrifugado a 5000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e colocado a uma temperatura de -80 °C. O precipitado foi homogeneizado com 20 ml de NaCl 1M preparado em solução tampão fosfato de sódio a pH 7,5. A solução foi centrifugada nas mesmas condições. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a uma temperatura de -80 °C.

Método 3: Seguiu-se o método descrito por Sulaiman & Silva (2013), no qual 10 g de amostra de castanha previamente triturada com 20 ml de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M a pH 7,0; 4 % (m/v) de PVPP e 1 % de Triton X-100. Por fim, adicionaram-se 50 µl de NaCl 1M, tendo a solução sido agitada durante 3 minutos. A solução foi centrifugada a 14000 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido e colocado a -80 °C.

3.1.2 Determinação da atividade da polifenoloxidase

Em todas as amostras obtidas pelos métodos anteriores, a atividade da polifenoloxidase foi avaliada segundo o método descrito por Andrade de Freitas (2008), sujeito a ligeiras modificações. Misturaram-se 50 µl de extrato enzimático com 2,0 ml de solução tampão fosfato de sódio com uma concentração igual à anteriormente utilizada na extração. Por fim, adicionou-se 1 ml de catecol 10 mM. Em simultâneo preparou-se um branco com 2,05 ml de tampão fosfato e 1 ml de catecol 10 mM. A absorvância das soluções foi medida a 395 e 420 nm, no espectrofotómetro Ultravioleta/Visível da Scansai ao longo do tempo (0 a 15 minutos).

Depois de se ter escolhido o método que originou a maior atividade enzimática nos extratos de castanha (Método 2), realizaram-se ensaios de determinação da atividade da polifenoloxidase a diferentes concentrações de catecol (20, 40, 60, 80 e 100 mM) preparadas em tampão fosfato de sódio (3 ml) com 50 µl de extrato enzimático, de modo a avaliar o efeito da concentração de substrato na velocidade inicial. A absorvância das soluções foi medida a 420 nm, sendo os resultados expressos como a variação da absorvância em função do tempo.

3.1.3 Quantificação do teor de proteína presente nos extratos

A determinação de proteínas totais foi realizada segundo o Método de Bradford, no qual se utiliza o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250. Um dos princípios deste método é a interação que existe entre o corante BG-250 e as proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.

A 100 µl do extrato enzimático, adicionaram-se 100 µl de NaOH 1M e 5 ml do reagente de Bradford. Deixou-se em repouso durante 5 min e fez-se a leitura da absorvância a 595 nm. De forma a quantificar as proteínas presentes nos extratos, preparou-se previamente uma reta de calibração com Albumina Sérica Bovina (BSA), na gama dos 5 a 100 µg de proteína.

3.2 Processamento térmico aplicado às castanhas

A castanha utilizada neste ensaio apresentava-se congelada, tendo sido utilizada uma marca branca comercial. As castanhas foram assadas a 200 °C, sendo retiradas

amostras (15 frutos) ao longo do tempo, designadamente aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Foi também recolhida uma amostra inicial (0 minutos) correspondente ao controlo.

As massas iniciais dos frutos, bem como após o processamento térmico, foram determinadas. Diversas propriedades físico-químicas foram também avaliadas ao longo do processamento.

3.2.1 Cor

Com o objetivo de avaliar as alterações de cor da castanha devido ao processo de assadura, foi analisada a cor antes e depois da assadura, ao longo dos respetivos tempos, recorrendo a um colorímetro Minolta CR-400, no espaço de cor *CIE Lab* através das coordenadas L^* , a^* , b^* , c^* e h^* , usando o software Spectra Magic Nx (versão CM-S100W 2.03.0006, Konica Minolta Company, Japão). L^* é uma medida aproximada da luminosidade, variando entre o negro e o branco, estando os valores compreendidos no intervalo de 0 a 100, respetivamente.

A coordenada a^* apresenta valores positivos para a cor vermelha e valores negativos para a cor verde, enquanto a coordenada b^* apresenta valores positivos para a cor amarela e valores negativos para a cor azul (Delgado *et al.*, 2014).

O c^* (croma ou saturação) foi calculado pela seguinte equação:

$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$ e o h^* (ângulo hue ou tonalidade) foi calculado pela equação:

$$h^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

O croma (c^*) é utilizado para determinar a pureza ou a saturação da cor (Rajasekar *et al.*, 2012). O ângulo Hue (h^*) é um atributo segundo o qual as cores são geralmente definidas como avermelhado, esverdeado, etc., e denota a distinção subtil ou a variação de cor (tonalidade) (Rajasekar *et al.* 2012). Este atributo está relacionado com as diferenças do coeficiente de reflexão em diferentes comprimentos de onda e é considerado o atributo qualitativo de cor (Fernández-Vázquez *et al.*, 2013).

A fim de analisar a variação de cor, devido ao processo de assadura, foi também calculada a variação total de cor (ΔE^*) pela seguinte equação:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

O colorímetro foi previamente calibrado com uma amostra branca padrão. Foram utilizados o iluminante C e um ângulo de 2°.

As medições de cor foram realizadas no início da experiência, tempo zero, no final de cada tempo de assadura e posteriormente nas castanhas cortadas a meio, em ambos, os lados.

3.2.2 Determinação da atividade da água (a_w)

A atividade da água nas amostras de castanha, sujeitas aos diferentes tempos de assadura foi avaliada no medidor de atividade da água Novasina (Labswift- a_w). O funcionamento do aparelho foi previamente verificado através da análise dos padrões de 11% ($a_w = 0,114$), 58% ($a_w = 0,565$) e 84% ($a_w = 0,830$).

3.2.3 Determinação da densidade

A densidade da castanha foi determinada recorrendo a um picnómetro para sólidos. Pesaram-se rigorosamente 0,5 g de amostra de castanha e por cada réplica realizaram-se duas pesagens, num total de 6 valores. De seguida determinaram-se as massas do picnómetro cheio com água e do picnómetro cheio com água e a porção de amostra. Na realização dos cálculos foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Densidade da água} = \frac{\text{massa (picnómetro + água)} - \text{massa picnómetro}}{\text{volume picnómetro}(50\text{mL})}$$

$$\text{Densidade da castanha} = \frac{\text{amostra} * \text{densidade da água}}{m(\text{picnómetro} + \text{água}) + m(\text{amostra}) - m(\text{picnómetro} + \text{água} + \text{amostra})}$$

3.2.4 Avaliação dos teores de humidade e matéria seca

Os teores de humidade nas amostras de castanha ao longo da assadura foram determinados por perda de peso, após liofilização. Desse modo, o teor de humidade foi calculado pela seguinte expressão:

$$\text{Teor de humidade (\%)} = \frac{\text{massa}(\text{água que sublimou})}{\text{massa}(\text{amostra inicial})} * 100 = \frac{\text{massa inicial} - m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} * 100$$

O teor de matéria seca (%) foi determinado por diferença: $100 - \text{Teor de humidade (\%)}$.

3.2.5 Teor de proteína bruta

O método utilizado para determinar o teor de proteína bruta foi o de Kjeldahl. Desse modo, pesou-se 1 g de amostra para um tubo de Kjeldahl, tendo-se de seguida adicionado uma pastilha de catalisador (Kjetabs Cx). Esta apresenta uma composição de 5 g de sulfato de potássio e 0,5 g de sulfato de cobre (II). Por fim, adicionaram-se 15 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Os tubos foram colocados a digerir num bloco digestor a uma temperatura de 400 °C. Posteriormente à digestão completa e arrefecimento das amostras, os tubos foram colocados no analisador de Kjeldahl (Velp Scientifica UDK 152). Neste efetuou-se a destilação da amónia produzida, sendo recolhida num excesso de ácido bórico. De seguida fez-se a titulação do ião dihidrogenoborato com ácido clorídrico (0,5 N), onde o fator de conversão utilizado foi de 5,3 (Borges *et al.*, 2008), obtendo-se assim os valores percentuais de proteína bruta.

3.2.6 Determinação dos açúcares redutores

3.2.6.1 Extração

Pesou-se 0,2 g de amostra liofilizada, adicionou-se 10 ml de etanol a 60% e colocou-se a agitar (VMR- Incubating Orbital Shaker) durante 1h. Após esse período, as amostras foram transferidas para tubos Falcon e centrifugadas para assim se poder retirar o sobrenadante para posterior quantificação.

3.2.6.2 Quantificação pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS)

Em tubos Falcon colocaram-se 1,5 ml do reagente DNS e 1,5 ml de soluções padrão de glucose (0,050 a 0,3 g/l) ou de amostra.

Posteriormente todos os tubos foram agitados e colocados num banho-maria a uma temperatura de 90 °C por um período de 10 minutos, para que se desenvolvesse a coloração castanha. Em seguida, os tubos foram retirados do banho-maria e arrefecidos em água até atingirem a temperatura ambiente. A todos os tubos foi adicionado 500 µl da solução de tartarato de sódio e potássio. Após agitação, avaliaram-se as absorvâncias a 575 nm.

3.2.6.3 Avaliação do escurecimento não-enzimático - Reações de Maillard

O escurecimento não-enzimático foi avaliado segundo a metodologia descrita por Karadeniz *et al.* (2000) e He *et al.* (2012). Pesaram-se 2 g de amostra liofilizada e adicionaram-se 10 ml de ácido acético-formaldeído (2-1%, v/v). Após 1h sob agitação, o sobrenadante foi recolhido para tubos Falcon, sendo posteriormente centrifugado. Como as amostras se encontravam com excesso de coloração houve a necessidade de diluir (200 µl de amostra em 3,8 ml de solução de ácido acético-formaldeído). Após a diluição, a absorvância da solução obtida foi avaliada aos comprimentos de onda de 280 e 420 nm, de modo a avaliar a formação de produtos intermediários e finais das reações de Maillard, respetivamente.

3.2.6.4 Avaliação do escurecimento enzimático (PPO)

A atividade da PPO nas amostras de castanha sujeitas ao tratamento térmico foi avaliada após a obtenção de extratos pelo Método 2, descrito na secção 3.1.1., e de acordo com a metodologia descrita na secção 3.1.2.

3.3 Análise estatística

Para avaliar o efeito da concentração de catecol e do pH na atividade enzimática aplicou-se uma ANOVA a dois fatores, após se ter verificado a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias pelos métodos de Shapiro-Wilk e de Levene, respetivamente. No caso da assadura das castanhas aplicou-se uma ANOVA a um fator. Quando se detetaram diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de Tukey. O software utilizado foi o SPSS (v.20, SPSS Inc, Chicago, IL).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Avaliação da atividade da polifenoloxidase

No início do nosso estudo procedeu-se à avaliação da atividade da enzima PPO em amostras de castanha fresca. Uma vez que a atividade enzimática da PPO varia com as condições experimentais, tais como o pH, temperatura, concentração da solução tampão e tipo de substrato procedeu-se à sua determinação por três métodos, tal como descrito na secção 3.1.1. As velocidades iniciais obtidas encontram-se na Tabela 2

Tabela 2 - Valores de absorvância a 395 e 420 nm em função do tempo para os três métodos estudados no presente trabalho utilizando catecol a 10 mM

Método	Frações	$\lambda= 395 \text{ nm}$	$\lambda= 420 \text{ nm}$
Método 1 (pH=6,0)	Fração solúvel	0,060±0,002(2,74%)	0,045± 0,001(3,2%)
	Fração ligada ionicamente	0,033±0,001(2,28%)	0,083±0,009 (10.6 %)
Método 2 (pH=7,5)	Fração solúvel	0,136± 0,005 (3.80 %)	0,138±0,003 (2,21%)
	Fração ligada ionicamente	0,142±0,005 (3.34%)	0,138±0,03(2.21%)
Método 3 (pH=7,0)	Fração solúvel	0.061± 0.002 (4.10%)	0.065±0.001 (1.95%)
	Fração ligada ionicamente	0,092±0,007 (7,43%)	-

Observando a tabela constatou-se que os melhores resultados foram obtidos para o método 2, uma vez que foi o único para o qual se observou variação de absorvância ao longo do tempo a 420 nm e para a fração solúvel. Desse modo, optou-se por utilizar este método nas determinações posteriores.

De seguida, procedeu-se ao estudo do efeito do pH e da concentração de catecol na atividade enzimática da PPO extraída a partir de castanha fresca. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Figura 4. Ao observar os gráficos aos diferentes valores de pH, constatou-se um rápido aumento da absorvância, tendo os maiores valores sido obtidos a pH 6,5. Contudo, ao determinar as velocidades médias enzimáticas iniciais (Tabela 3) constatou-se não existirem diferenças significativas entre pHs, salvo raras exceções.

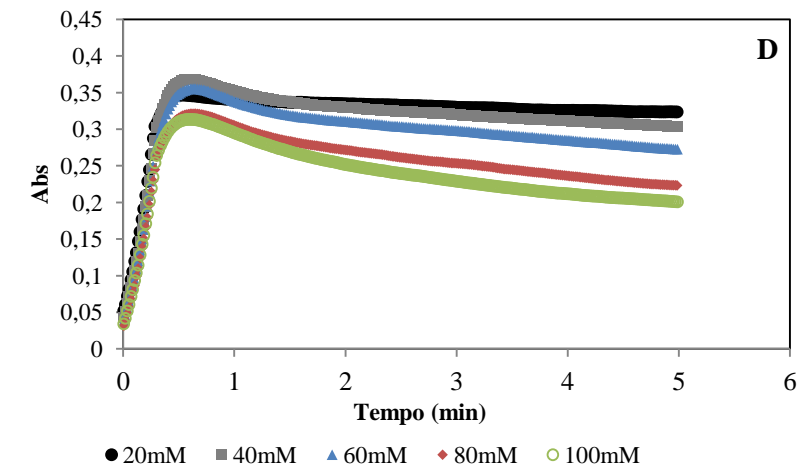
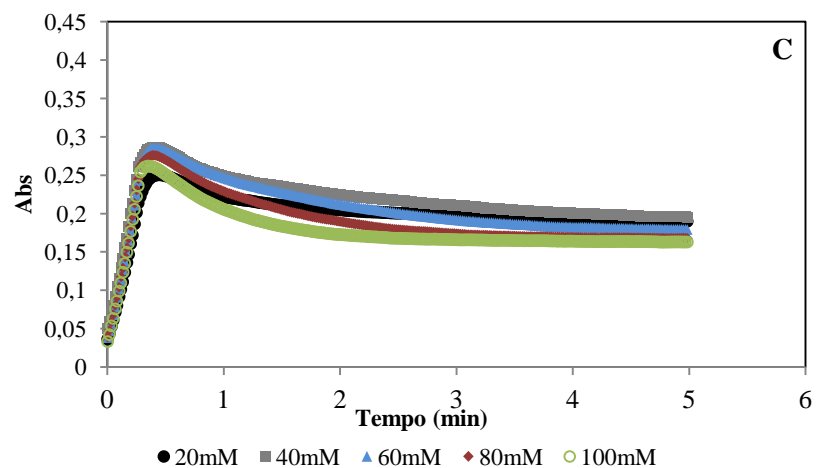
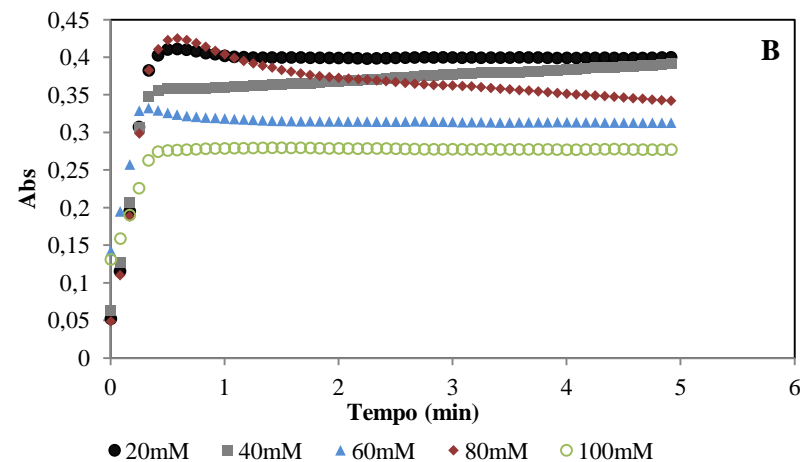
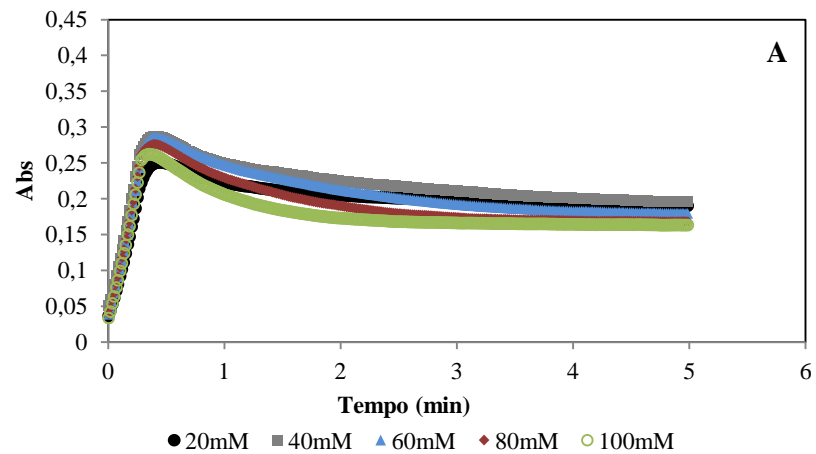


Figura 4 - Atividade enzimática da PPO (fração solúvel) a diferentes valores de pH e de concentração de catecol;
 A (pH 6,0); B (pH 6,5); C (pH7); D (pH7,5).

Tabela 3 - Velocidades iniciais médias (Δ Abs/ (min.50 μ l de extrato)) para a atividade enzimática da PPO a diferentes valores de pH e de concentração de catecol

pH	Concentração de catecol				
	20	40	60	80	100
6,0	0,79 \pm 0,11 ^{a,A}	0,79 \pm 0,11 ^{a,A}	0,82 \pm 0,06 ^{a,A}	0,78 \pm 0,023 ^{a,A}	0,72 \pm 0,05 ^{a,A}
6,5	1,01 \pm 0,06 ^{a,B}	0,95 \pm 0,06 ^{a,b,A}	0,66 \pm 0,21 ^{b,c,A}	1,08 \pm 0,08 ^{a,B}	0,50 \pm 0,04 ^{c,B}
7,0	0,77 \pm 0,04 ^{a,A}	0,90 \pm 0,15 ^{a,A}	0,86 \pm 0,03 ^{a,A}	0,81 \pm 0,06 ^{a,A}	0,86 \pm 0,01 ^{a,C}
7,5	0,83 \pm 0,06 ^{a,A}	0,86 \pm 0,04 ^{a,A}	0,85 \pm 0,06 ^{a,A}	0,81 \pm 0,05 ^{a,A}	0,76 \pm 0,07 ^{a,A,C}

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=3). As letras minúsculas comparam concentrações para o mesmo valor de pH. As letras maiúsculas comparam diferentes valores de pH para a mesma concentração.

Para o pH 6,5, observaram-se em algumas situações valores máximos de velocidade, no entanto também se constatou a existência de alguma variabilidade nos valores de velocidade média inicial determinadas para as várias concentrações estudadas.

Na gama de concentrações aplicadas, verificou-se que na maioria das situações não se observaram diferenças significativas nos valores da velocidade inicial com a concentração, não tendo sido possível observar a cinética de Michaelis-Menten.

Verificou-se que a pH 6,5 existiu uma maior variabilidade de valores e que a este pH existiram diferenças significativas entre as concentrações (p=0,001). Em contrapartida para os restantes valores de pH não se observaram diferenças significativas entre as concentrações de catecol (pH7,0: p=0,325; pH7,5: p=0,329; pH6,0: p=0,649).

Ao avaliar o efeito do pH para cada concentração de catecol, verificou-se que para as concentrações de 20, 80 e 100 mM existiram diferenças significativas entre os pHs, valores de “p” iguais a 0,008; 0,001 e <0,001, respetivamente. Contrariamente, nas concentrações de 40 e 60 mM não se observaram diferenças significativas entre os valores de pH, apresentando valores de “p” superiores a 0,05.

Posteriormente determinou-se a quantidade de proteína presente em cada extrato, utilizando o método de Bradford. Através da Tabela 4 verificou-se que o teor máximo de proteína foi obtido no extrato enzimático de pH 6,0, com um valor médio igual a

1,58 µg/µl. Contudo, não se observaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre as amostras.

Tabela 4 - Concentração de proteína (µg/ µl) para cada extrato enzimático obtido a diferentes valores de pH

pH	Concentração proteína (µg/µl)
6,0	1,58 ± 0,03
6,5	1,43 ± 0,03
7,0	1,48 ± 0,09
7,5	1,51 ± 0,11

Os valores representam média ± desvio (n=3)

Ao exprimir as velocidades em $\Delta \text{Abs}/(\text{min.g de proteína})$, os valores obtidos para os diferentes valores de pH foram os seguintes: 0,0099±0,0005 (pH 6,0), 0,0118±0,0035 (pH 6,5), 0,0114±0,007 (pH 7,0) e 0,0109±0,0005 (pH 7,5), para a gama de concentrações de catecol entre os 20 e os 100 mM.

4.2 Processamento térmico

Foi estudada a cinética de secagem ao longo da assadura de castanhas (200 °C), estando os resultados obtidos apresentados na Figura 5. Verificou-se que durante os primeiros 5 minutos, a variação do teor de água, expresso em g água/g matéria seca e designado por W, não foi significativa, possivelmente porque estava a ocorrer a difusão da água do interior do alimento para a superfície, uma vez que se partiu de castanha congelada (período de estabilização). Após 5 minutos, observou-se uma perda de água linear ao longo do tempo, indicando um período de velocidade de secagem constante, com uma velocidade igual a 0,036 g água/(g matéria seca.min). Uma vez que não se atingiu o valor de W de equilíbrio, a castanha no final da assadura ainda continha um teor de água elevado.

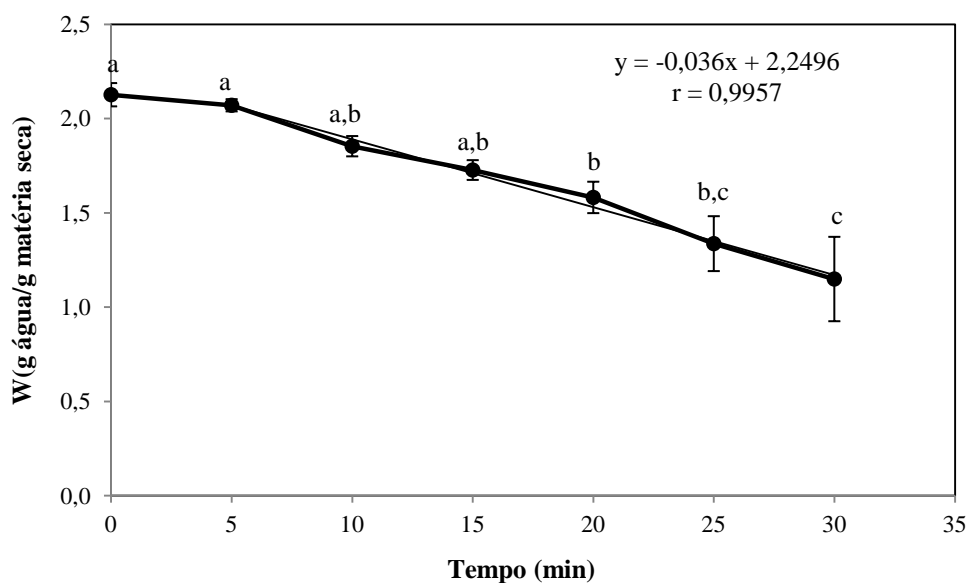


Figura 5 - Curva de secagem obtida durante a assadura de castanhas num forno doméstico a 200 °C (Letras diferentes significam que os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$))

Refira-se que não foi observado o período de velocidade decrescente, resultado do tempo de secagem não ter sido suficiente. Desse modo não foi possível calcular as equações de modelos cinéticos que normalmente se aplicam na secagem de frutos, tais como o Modelo de Page, *Two-term*, Wang e Singh, Thompson, Logarítmico, Henderson e Pabis Modificado, e o da Difusão (Delgado *et al.*, 2014).

4.3 Cor

Relativamente à cor, verificaram-se alterações significativas nesta propriedade, tanto para a castanha inteira como cortada após processamento térmico. Os valores de luminosidade medidos na castanha inteira e na castanha cortada apresentaram valores distintos durante o tempo de processamento. Da análise dos resultados constatou-se que tanto para a castanha inteira como cortada se observaram diferenças significativas ($p < 0,001$) ao longo do tempo. Para a castanha inteira houve uma diminuição do valor de L^* nos primeiros 5 minutos (Figura 6A), mantendo-se este praticamente inalterado ao longo do restante tempo de assadura. Em contrapartida, na castanha cortada (Figura 6B) só se observou uma diminuição significativa após 5 minutos de processamento térmico; contudo, existiu um decréscimo significativo dos valores de L^* ao longo da assadura,

mais acentuado do que na castanha inteira, diminuindo ao longo do tempo de processamento.

Em relação aos valores de a^* , tanto na castanha inteira como na cortada (Figuras 6C e 6D, respetivamente) observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$). Na castanha inteira os valores oscilaram ao longo do tempo. No entanto, entre os 25 e os 30 minutos verificou-se um aumento significativo deste parâmetro, indicativo de uma cor mais avermelhada. Relativamente à castanha cortada, os valores de a^* mantiveram-se constantes até ao tempo de 15 minutos, onde a partir do qual se verificou um aumento desta propriedade. Refira-se que ao longo do tempo de assadura, a castanha foi adquirindo uma tonalidade mais escura.

A coordenada b^* foi a que se manteve mais constante ao longo da assadura (Figuras 6E e 6F), indicando que o amarelecimento da castanha não foi muito significativo, ao contrário da perda de luminosidade e da aquisição de uma cor mais avermelhada.

Em relação aos valores de c^* , comparando a castanha inteira e cortada (Figuras 7A e 7B), verificou-se que a castanha inteira apresentou valores mais elevados deste parâmetro face à cortada. Contudo, para ambos os casos, na maioria das situações, os valores mantiveram-se constantes ao longo do tempo de processamento, não se observando grandes variações nos valores de saturação.

A tonalidade (h^*) nas castanhas inteiras manteve-se constante ao longo de quase todo o processo de assadura, diminuindo significativamente aos 30 minutos (Figura 7C). Em contrapartida, nas amostras cortadas, a diminuição observada na tonalidade ocorreu a partir dos 25 minutos, de modo mais ligeiro (Figura 7D).

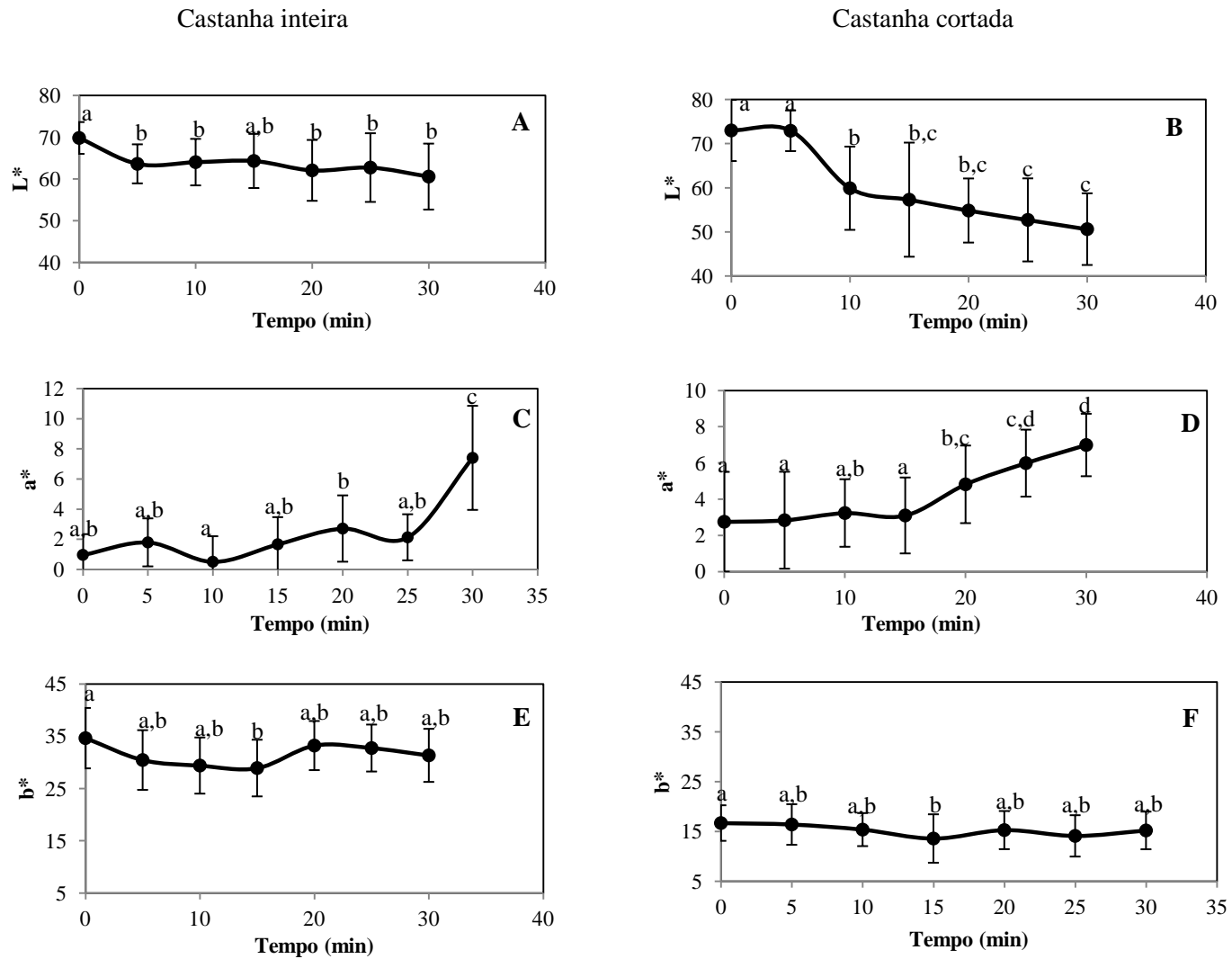


Figura 6 - Parâmetros L^* , a^* e b^* avaliados na castanha inteira e cortada a meio ao longo da assadura a 200 °C (Letras diferentes significam que os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$))

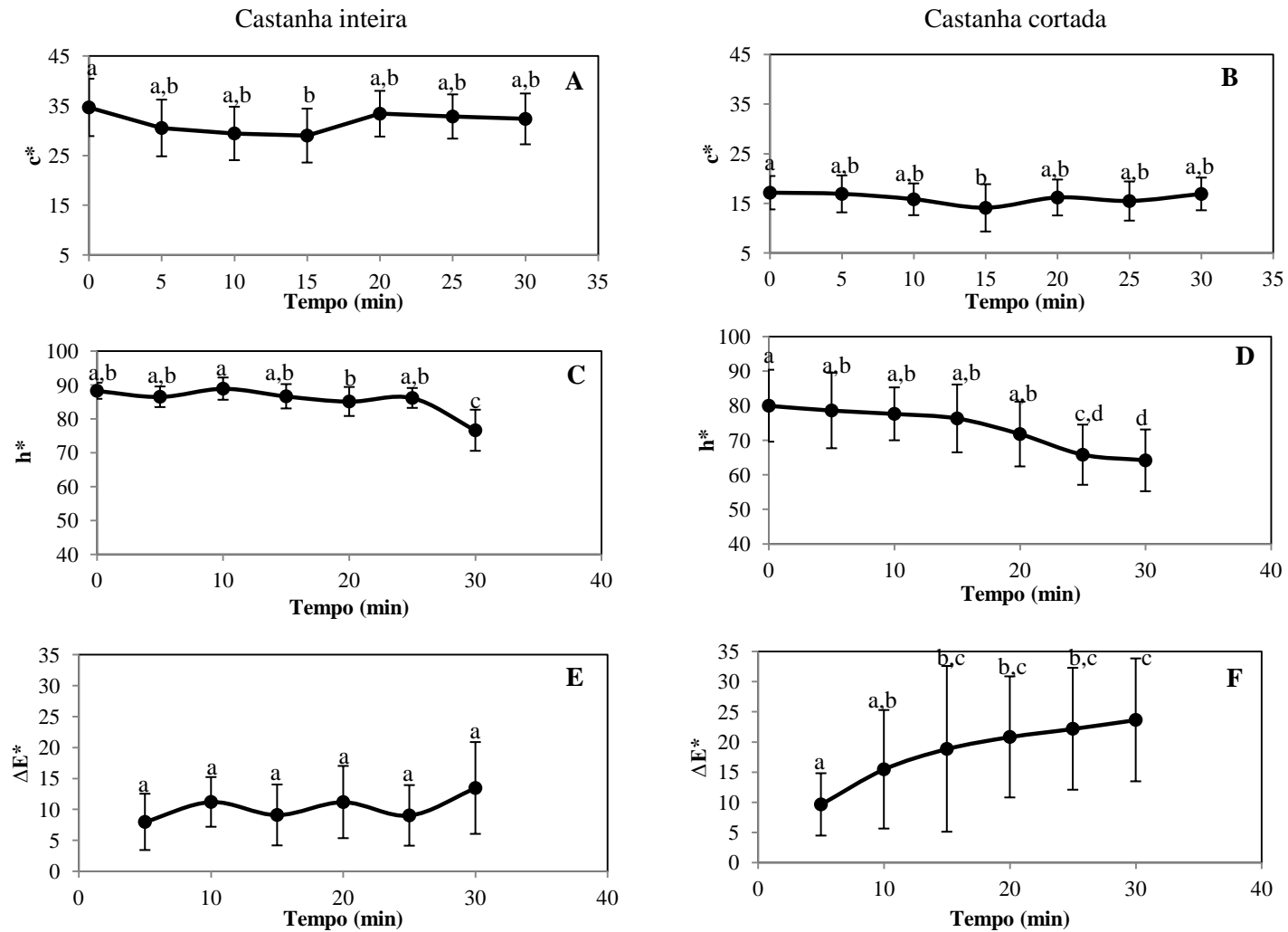


Figura 7- Parâmetros c^* , h^* e ΔE^* avaliados na castanha inteira e cortada a meio ao longo da assadura a 200 °C (Letras diferentes significam que os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$))

Os valores de ΔE^* obtidos para a castanha inteira e cortada encontram-se apresentados nas Figuras 7E e 7F, respetivamente. Para a castanha inteira não se observaram diferenças significativas ao longo do tempo de assadura entre os 5 e os 30 minutos. Ao comparar o valor médio de ΔE^* (10.3) obtido para a castanha inteira durante esse período com o valor de ΔE^* igual a 0, característico do tempo de 0 minutos, verificou-se que os valores foram significativamente diferentes ($p < 0,001$). Este facto indica que após 5 minutos de assadura, a cor exterior da castanha começa a modificar-se. Em relação à castanha cortada, uma vez que se observaram diferenças significativas nos valores de ΔE^* ao longo do tempo de assadura, optou-se por comparar os valores de ΔE^* obtidos para os 5 minutos com o valor 0. Verificaram-se também neste caso diferenças significativas ($p < 0,001$), mostrando novamente que a mudança de cor no interior da castanha ocorreu logo após 5 minutos de assadura.

4.4 Atividade da água

A atividade da água (a_w) é muito importante para avaliar a estabilidade dos alimentos. Como se pode observar na Figura 8, a a_w na castanha só variou significativamente após 30 minutos de assadura. No final do processo, o valor médio da a_w obtido foi de 0,90, indicando que ainda se podem desenvolver bactérias Gram-positivas, bolores e levedura (Ordóñez *et al.*, 2005). Ainda de acordo com Ordóñez *et al.* (2005) o *Staphylococcus aureus* pode desenvolver-se mas sem produção de enterotoxinas, apesar de poder ocorrer a produção de micotoxinas.

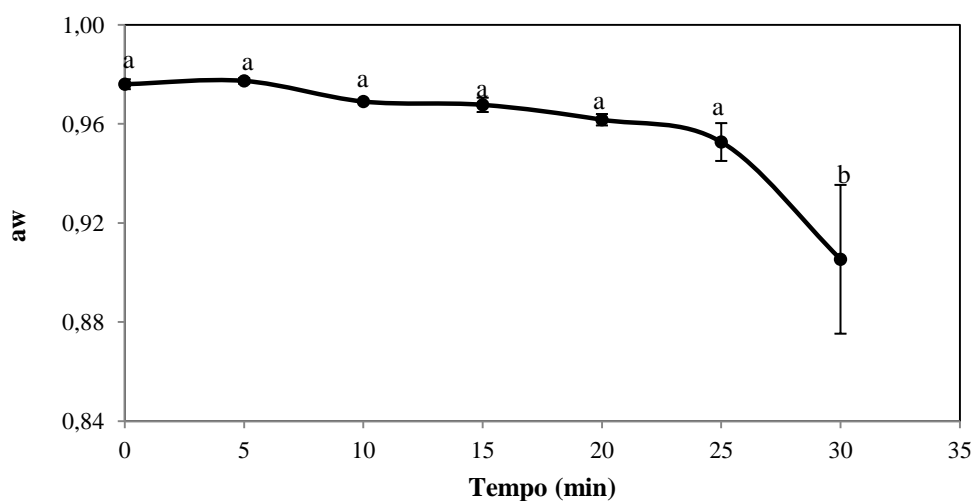


Figura 8 - Valores da a_w na castanha ao longo da assadura a 200 °C (Letras diferentes significam que os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$))

4.5 Densidade

Na determinação da densidade usou-se o método do picnómetro. Os dados determinados encontram-se na Tabela 5. Em relação aos valores médios de densidade obtidos verificou-se que o valor mínimo foi de 1,22 g/ml (tempo de 5 minutos) e o valor máximo foi de 1,41 g/ml (tempo de 25 minutos). Contudo, após análise estatística, verificou-se que não ocorreram diferenças significativas, entre as amostras ao longo do tempo de assadura ($p=0,202$).

Tabela 5 - Valores médios de densidade da castanha ao longo da assadura a 200 ° C

Tempo	Densidade (g/ml)
5	1,22 ± 0,12
10	1,31 ± 0,08
15	1,26 ± 0,11
20	1,26 ± 0,04
25	1,41 ± 0,15
30	1,26 ± 0,16

Os valores representam média ± desvio padrão (n=6).

4.6 Proteína bruta

Relativamente ao teor em proteína bruta (expresso em peso seco e peso fresco), verificou-se que ao longo do processamento, não se observaram grandes alterações (Figura 9). No entanto, entre os 25 e os 30 minutos verificou-se uma ligeira descida nos teores de proteína expressos em peso seco.

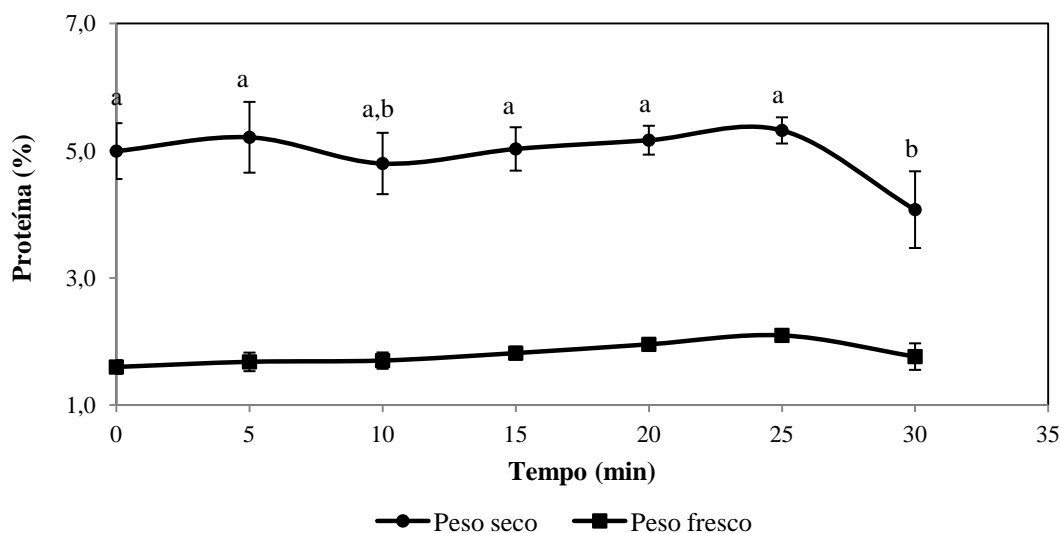


Figura 9 - Teores de proteína (%), expressos em peso seco e peso fresco, na castanha ao longo da assadura a 200 °C

Os valores de proteína bruta obtidos variaram entre os 4,07 e os 5,31%, em peso seco, e entre os 1,59 e 2,09%, em peso fresco.

O valor máximo de percentagem de proteína em peso seco ocorreu aos 25 minutos com um valor de 5,31%, o que corresponde a uma percentagem de 2,09% em peso fresco. Segundo Borges *et al.* (2008), o teor de proteína bruta da castanha varia entre os 4,87 e 7,37% em peso seco, valores idênticos aos obtidos no presente trabalho.

4.7 Açúcares redutores

A variação dos teores de açúcares redutores na castanha ao longo da assadura a 200 °C encontra-se representada na Figura 10. Os teores de açúcares redutores expressos em peso seco variaram entre os 0,70 mg glucose/g matéria seca, aos 30 minutos, e os 1,30 mg glucose/g matéria seca, aos 5 minutos de assadura. Em relação aos valores expressos em peso fresco, estes variaram entre os 0,25 mg glucose/ g matéria fresca, no início da assadura, e os 0,41 mg glucose/g matéria fresca aos 5 minutos.

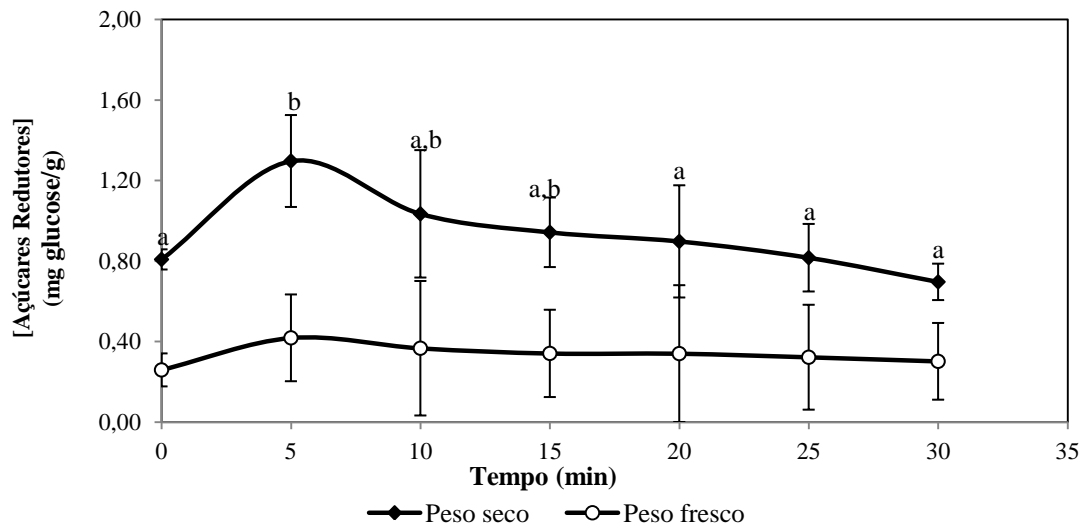


Figura 10 - Açúcares redutores (mg glucose/g), expressos em peso seco e peso fresco, na castanha ao longo da assadura a 200 °C

Verificaram-se variações significativas entre os teores de açúcares redutores, expressos em peso seco, das amostras a diferentes tempos de assadura ($p < 0,05$). Contudo, nessas diferenças significativas entre a amostra dos 5 minutos e as relativas aos 0, 20, 25 e 30 minutos não se observaram quaisquer tendências nos valores.

4.8 Escurecimento não enzimático - Reações de Maillard

As reações de Maillard são bastante comuns no processamento e armazenamento dos alimentos, ocorrem entre os grupos amino presentes nas proteínas e o grupo carbonilo, existente nos açúcares redutores (Ordóñez *et al.*, 2005). O escurecimento não enzimático foi avaliado pela leitura das absorvâncias dos extratos a 280 e 420 nm, ao longo da assadura da castanha, tal como descrito por Karadeniz *et al.* (2000) e He *et al.* (2012). Os resultados obtidos encontram-se descritos na Figura 11

Para os valores de absorvância a 420 nm, indicativos da formação de produtos finais das reações de Maillard, observou-se que ao tempo 0, já se obteve um valor inicial de absorvância, devido possivelmente à formação de compostos durante o processo de queima, aplicado previamente ao descasque e congelamento por azoto líquido da castanha. Posteriormente, verificou-se um aumento da absorvância entre os 5 e os 15 minutos. Contudo, observou-se um decréscimo das absorvâncias a este comprimento de onda para tempos de assadura maiores.

Em relação à absorvância a 280 nm, verificou-se uma oscilação nos valores obtidos, sugerindo a pequena formação de produtos intermediários das reações de Maillard.

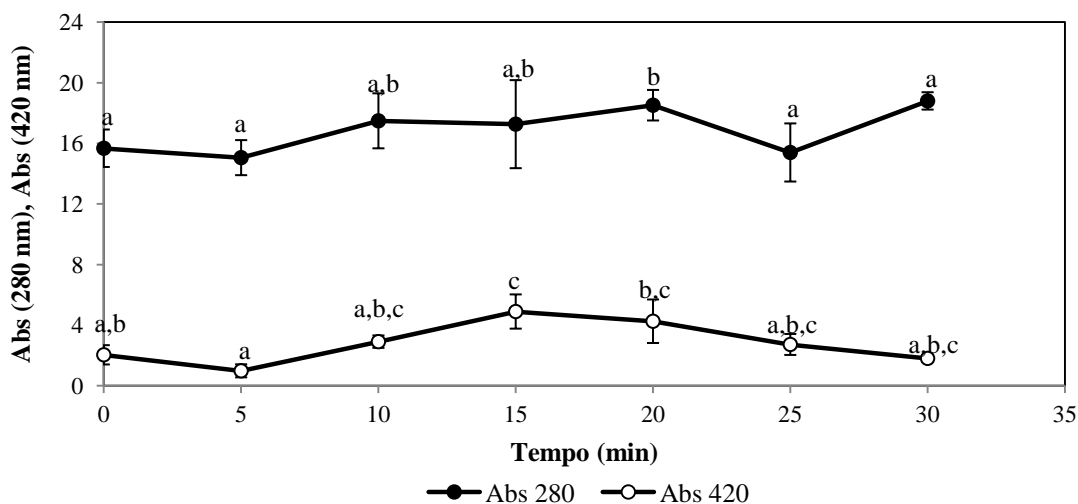


Figura 11 - Avaliação da ocorrência das Reações de Maillard ao longo da assadura da castanha a 200 °C

Em termos gerais e ao analisar os valores obtidos, estes não aumentaram significativamente ao longo da assadura da castanha, uma vez que as amostras correspondentes aos 0 e 30 minutos não foram significativamente diferentes entre si. Deste modo a formação de produtos intermediários e finais das reações de Maillard não foi significativa durante o período estudado.

Deve ser referido que as pequenas variações nas absorvâncias detetadas ao longo do tempo de assadura também podem ter sido devidas ao facto das reações de Maillard ocorrerem mais à superfície da castanha e, quando no presente trabalho se recolheram as amostras, triturou-se o fruto inteiro, o qual foi utilizado nas extrações realizadas posteriormente. Desse modo, esses compostos podem ter sido “diluídos” na restante amostra e não serem identificados. No futuro, sugere-se a amostragem de uma camada superficial de castanha (por exemplo, 2 mm) e que esta passe a ser analisada em relação à presença desses compostos em vez do fruto inteiro.

4.9 PPO

Após as análises anteriormente descritas na Secção 4.1, efetuou-se um segundo estudo para a avaliação da atividade enzimática da PPO em castanhas sujeitas a assadura. Neste caso apenas se analisaram castanhas nos tempos 0, 5 e 30 minutos de assadura, uma vez que esses tempos pareceram ter sido os que originaram as maiores variações nas propriedades anteriormente avaliadas na castanha.

A extração da polifenoloxidase foi apenas feita pelo Método 2 (solução tampão de fosfato de sódio e PVPP) para um pH de 7,5. Neste ensaio apenas se utilizaram as concentrações de 40 e 80 mM de catecol, uma vez que se obtiveram valores de velocidade inicial semelhantes aos das outras concentrações.

Verificou-se um aumento do valor das absorvâncias ao longo do tempo, como se pode constatar através da Figura 12, indicando a existência de atividade enzimática e explicando em parte as mudanças de cor observadas nos frutos.

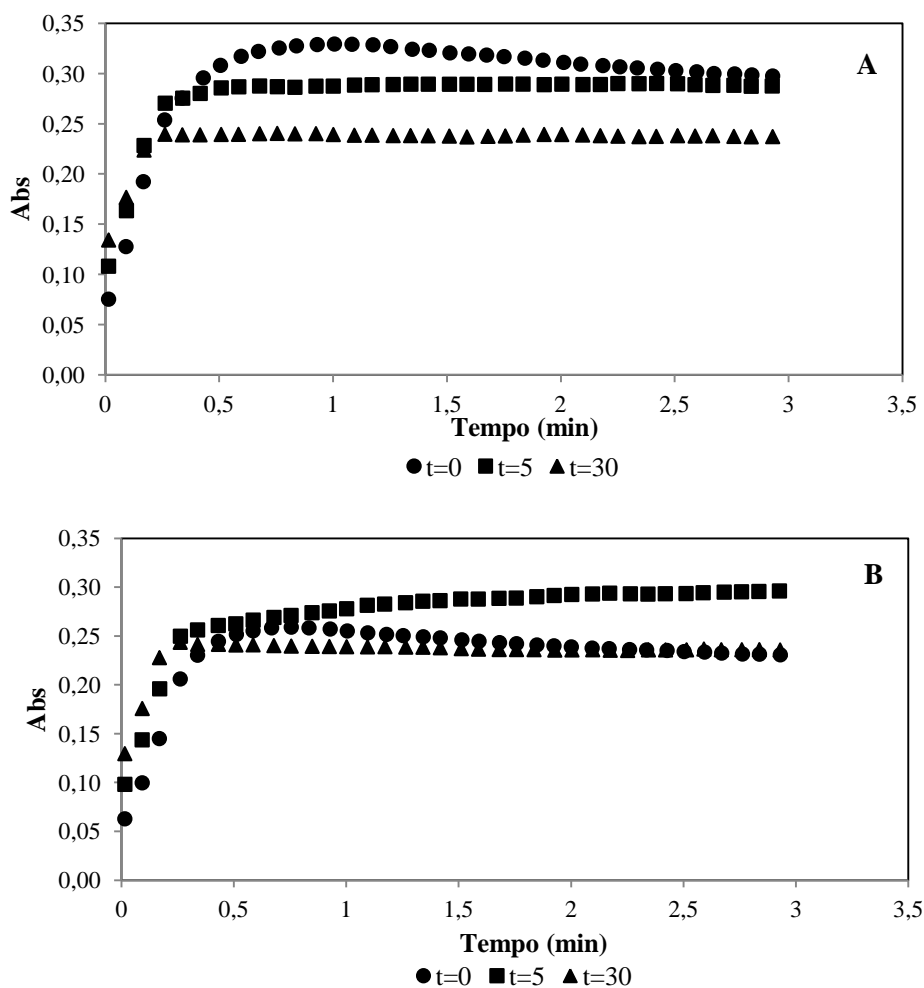


Figura 12 - Atividade enzimática da PPO ao longo do tempo para as concentrações de catecol de 40 (A) e 80 (B) mM

Verificou-se novamente que para as duas concentrações de catecol utilizadas se obtiveram valores idênticos de velocidade inicial (Tabela 6). Em relação ao tempo de assadura, os menores valores de velocidade inicial foram determinados após 30 minutos.

Tabela 6 - Valores médios da atividade enzimática da PPO, avaliada a partir das velocidades iniciais ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) determinadas em extratos de castanhas assadas a 200 °C

Tempo de assadura (min)	Concentrações de catecol (mM)	
	40	80
0	0,52±0,16	0,69±0,13
5	0,57±0,26	0,50±0,11
30	0,48±0,07	0,51±0,12

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=3)

Neste ensaio determinaram-se novamente os parâmetros relativos à cor. Os resultados obtidos (Tabela 7) indicaram, na maioria das situações, a existência de diferenças significativas do tempo de assadura igual a 30 minutos ($p < 0,05$) face ao início (tempo 0). As amostras que não foram submetidas ao tratamento térmico apresentaram os valores mais elevados de luminosidade (L^*), existindo, contudo, algumas amostras com uma cor mais escura. Estes resultados podem ser observados na Figura 13. As amostras que apresentaram menor luminosidade foram as do tempo de assadura igual a 30 minutos.

Tabela 7 - Parâmetros da cor da castanha avaliada aos 0, 5 e 30 minutos de assadura

Cor	Tempo (min)		
	0	5	30
L^*	75,11±4,26 ^a	63,30±5,26 ^b	59,93±6,02 ^b
a^*	0,98 ±1,28 ^a	1,55±2,24 ^a	10,49±4,04 ^b
b^*	29,81±6,80 ^a	31,25±6,86 ^a	34,51±4,94 ^a
c^*	29,85±6,79 ^a	31,37±6,81 ^{a,b}	36,26±5,09 ^b
h	87,90±2,48 ^a	86,72±4,62 ^a	73,32±6,50 ^b
ΔE^*	-	15,75±4,72 ^a	20,23±8,68 ^a

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=3)

Relativamente à coordenada a^* , pôde-se verificar que o tempo de 0 minutos apresentou os valores mais baixos neste parâmetro, ao contrário dos valores mais elevados determinados no tempo de 30 minutos. Estes resultados indicam assim que as amostras apresentaram um tom mais avermelhado ao longo da assadura, como pode ser observado na Figura 13.

Em relação à coordenada b^* , os valores obtidos novamente não variaram muito. Verificou-se que o tempo de 30 minutos foi o que apresentou o valor mais elevado deste parâmetro. Contudo, este valor médio não foi diferente significativamente dos de 0 e 5 minutos, indicando que a castanha não ficou significativamente mais amarela.

Quanto à saturação (c^*), obteve-se o valor mais elevado aos 30 minutos, verificando-se diferenças significativas nos diferentes tempos. O valor de tonalidade (h^*) relativo ao tempo de 0 minutos apresentou o maior valor, enquanto o tempo de 30 minutos apresentou o valor mais baixo, como se pode verificar através da Tabela 7. Em termos de variação da cor (ΔE^*), verificou-se que esta foi significativa logo após os 5 minutos.

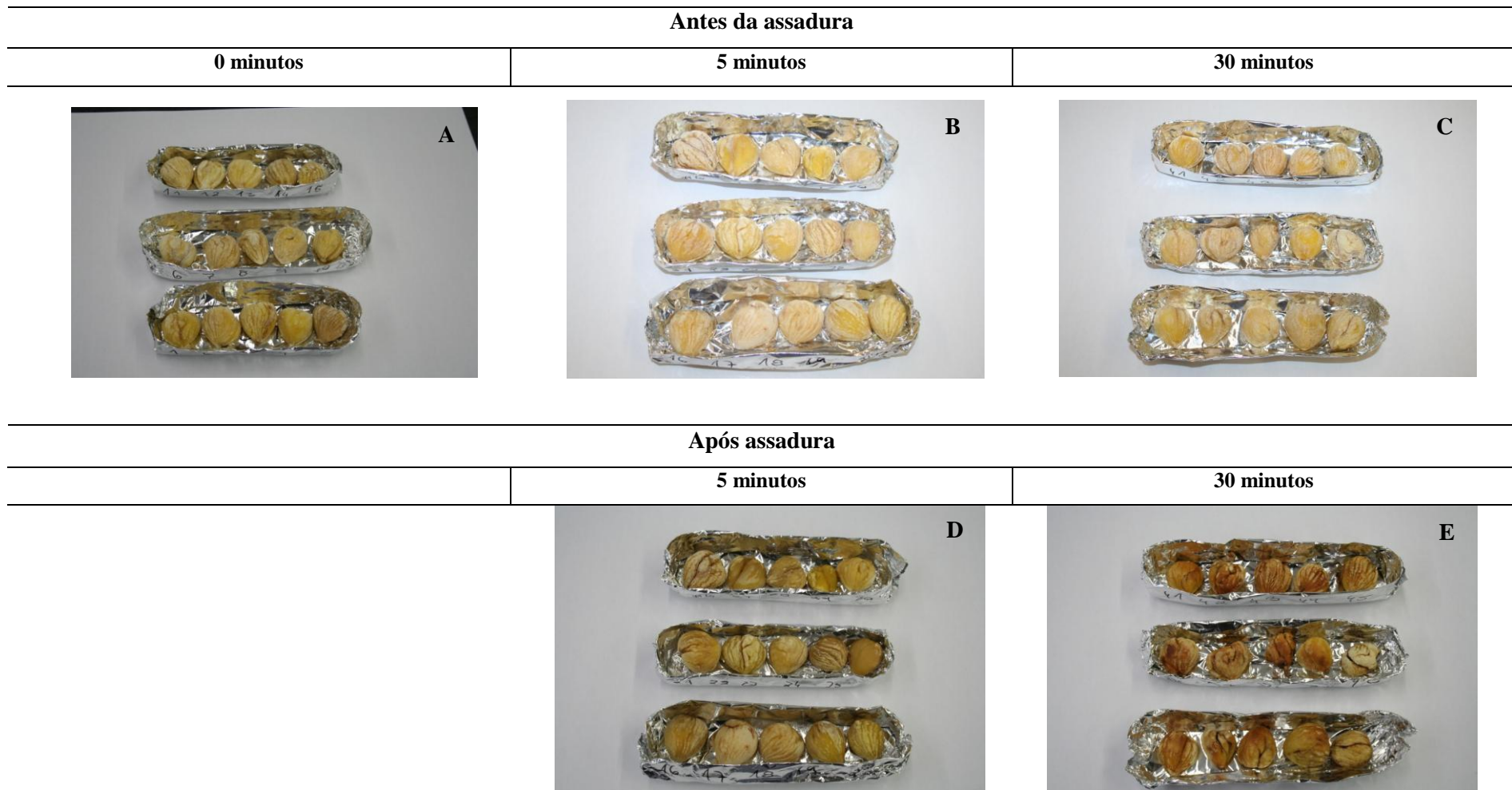


Figura 13 - Castanhas antes e após terem sido submetidas a assadura a 200 ° C durante 5 e 30 minutos.

Capítulo 5

Conclusão

No presente trabalho, após se ter efetuado a assadura de castanhas a 200 °C, verificou-se que no final desse processo (30 minutos) a castanha ainda apresentava um teor de água elevado. Devido ao tempo de secagem não ter sido suficiente, não foi possível observar o período de velocidade de secagem decrescente. Das análises físico-químicas efetuadas, em relação à cor, verificaram-se alterações significativas tanto na castanha inteira como na castanha cortada a meio ao longo do processamento térmico, tendo as principais alterações sido observadas ao nível da luminosidade e do parâmetro a^* . Já em relação à atividade da água, só se observou uma alteração significativa neste parâmetro após 30 minutos de assadura, apresentando o produto final um valor de a_w igual a 0,90, o qual ainda pode acarretar o crescimento de microorganismos.

Relativamente ao escurecimento, a produção de compostos intermediários e finais das reações de Maillard não foi significativa face ao início. Já a enzima polifenoloxidase apresentou atividade desde o tempo zero até aos 30 minutos, explicando, em parte, a modificação de cor observada nos frutos. Refira-se que previamente testaram-se três métodos para avaliar a atividade da PPO em castanha fresca, tendo os melhores resultados sido obtidos para uma extração com solução tampão de fosfato de sódio 1M e polivinilpirrolidona. Na gama de valores de pH compreendida entre os 6,0 e 7,5, e de concentração de catecol entre os 20 e 100 mM, na maioria das situações não se observaram diferenças significativas nas velocidades iniciais da PPO.

Referências Bibliográficas

Anuário Hortofrutícola. (2007). Gabinete de Planeamento e Política Agro-Alimentar. Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa.

Bernárdez M.M., Miguélez J.D.M., Queijeiro J.G. (2004). HPLC determination of sugars in varieties of chestnut fruits from Galicia (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, 63-67.

Borges O., Gonçalves B., Carvalho J.L.S., Correia P., Silva A.P. (2008). Nutricional quality of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chemistry*, **106**, 976-984.

Brennan J. G. (2006). *Food Processing Handbook*. Weinheim: Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p 85-124.

Carvalho., Silva J.M. (2000). *Colesterol, Lípidos e Doença Vascular*. Edição Lidel–Edições Técnicas, Lda., Lisboa, p 292.

Clemente E. (2002) Peroxidase from oranges (*citrus sinenses* (L.) Osbeck. *Eur European Food Research and Technology*, **215**,164-168.

De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5331–5337.

Delgado T., Pereira J.A., Baptista P.,Casal S., Ramalhosa E. (2014). Shell's influence on drying kinetics, color and volumetric shrinkage of *castanea sativa* Mill.fruits. *Food Research International*, **55**, 426-435.

Desmaison A.M., Adrian J. (1986). La place de la châtaïne en alimentation. *Medicine et Nutrition*, **22**(3), 174-180.

Dietary Guidelines for Americans (2005). U.S. Department of Health and Human Services. U.S. Department of Agriculture.

Ding C.K., Chachin K., Ueda Y., Wang C.Y. (2002). Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. *Food Chemistry*, **76**, 213-218.

Doymaz I. (2008). Convective drying Kinetics of strawberry. *Chemical Engineering and processing*, **47**, 914-919.

FAOSTAT, (2012). <http://faostat.fao.org>

FAOSTAT, (2014). <http://faostat.fao.org>

Fernández-Vázquez R., Stinco C.M C., Hernanz D., Heredia F.J., Vicario I.M. (2013). Colour training and colour differences thresholds in Orange juice. *Food Quality and Preference*, **30**, 320-327.

Freitas A.A.D., Francelin M.F., Hirata G.F., Clemente E., Schmidt F.L. (2008). Atividade das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geleias. *Food Science and Technology*, **28**(1), 172-177.

Freitas J.B., Naves M.M.V. (2011). Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a saúde. *Revista de Nutrição*, **23**(2), 269-279.

Guerreiro M.G. (1957). *Castanheiro, alguns estudos sobre a sua ecologia e o seu melhoramento genético*. Alcobaça.

He L., Zhang X., Xu H., Xu C., Yuan F., Knez Z., Novak Z., Gao Y. (2012). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica*

granatum L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS assay, *Food & Bioproducts Processing*, **90**, 215-223.

Hui Y. H. (2006). *Food Chemistry and Food Processing*. USA: Blackwell Publishing. p 71-78, 126, 127, 487-535.

INE, (2013): http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_main

INE, (2014): http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_main

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

Johnson J. R., Braddock R. J., Chen C.S. (1998). Kinetics of Ascorbic Acid Loss and Nonenzymatic Browning in Orange Juice Serum: Experimental Rate Constants. *Journal of Food Science*, **60**, 502-505.

Karadeniz F., Durst R.W., Wrolstad R.E. (2000). Polyphenolic Composition of Raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5343-5350.

Krokida M.K., Maroulis Z.B., (1997). Effect Drying Method on Shrinkage and Porosity, *Drying Technology*, **15**, 2441-2458.

Lamikanra O. (2002). Fresh-cut Fruits and Vegetables. *Science, Technology, and Market*. USA: CRC Press LLC, p 142-159.

McEvily A.J., Iyengar R., Otwell W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **32**, 253-275.

Medeiros C. A., Raseira M. C. (1998). *A cultura do pessegueiro*. Brasilia: Embrapa SPI, p 350.

Mendonça S. C., Guerra N. B. (2003) Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. *Boletim SBCTA*, Campinas, **37**, n. 2, 113-116.

Ordóñez J.A., Rodriguez M.I.C., Álvarez L.F., Sanz M.L.G., Minguillón G.G.F., Perales L.H., Cotecero M.D.S. (2005). *Tecnologia de Alimentos*, Porto Alegre, **2**, Artmed, p 290.

Paiva J. (1998). *A crise ambiental, Apocalipse ou advento de uma Nova Idade*. Liga dos amigos de Conímbriga.

Perussello C. A. (2008). *Estudo dos Parâmetros de Processo e Modelagem Numérica da Secagem do Resíduo Sólido da Produção do Extrato Hidrossolúvel de Soja (Okara)*. Paraná, Brasil, Dissertação de mestrado apresentado à Faculdade de Engenharia e Ciências Térmicas, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Rajasekar D, C.Akoh C, G.Martino K, Daniel D.Maclean (2012). Physico chemical characteristics of juice extracted by blender and mechanical press from pomegranate cultivars grown in Georgia, *Food Chemistry*, **133**, 1383-1393.

Rodrigues P., Venâncio A., Lima N. (2012). Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts special reference to aflatoxins. *Food Research International*, **48**, 76-90.

Serra M.C. (1987). O castanheiro e a castanha na tradição e na cultura. *Encontro sobre Soutos e Castiçais*, p 15, Castelo de Vide, Portalegre e Marvão.

Silva J.S. (2007). *Do castanheiro ao teixo: as outras espécies florestais*. Liga para a proteção da natureza, p 217, Lisboa.

Singh G.D., Sharma R., Bawa A.S., Saxena D.C (2008). Drying and Rehydration characteristics of water chestnut (*Trapa natans*) as a function of drying air temperature. *Journal of Food Engineering*, **87**, 213-221.

Somogyi L.P., Ramaswamy H.S., Hui, Y.H. (1996). *Biology, Principles, and Applications in Processing fruits: Science and Technology*, **1**, Pennsylvania: Technomic Publishing Company.

Sulaiman A., Silva F.V.M. (2013). High Pressure Processing, thermal processing and freezing of “Camarosa” strawberry for the inactivation of polyphenoloxidase and control of browning. *Food Control*, **33**, 424-428.

Troiani E. P., Tropiani C.T., Clemente E. (2001). Atividade de peroxidase e polifenoloxidase em uva. *Encontro Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos*.

Valentas K. J., Rostein E., Singh R. P. (1997). Handbook of Food Engineering Practice. In G. H. Crapiste e E. Rotstein (Eds.), *Design and Performance Evaluation of Dryers*. USA: CRC Press LLC.

Vámos-Vigyazo L. (1995). Prevention of Enzymatic Browning in Fruits and Vegetables. *Central Food Research Institute*, **600**, 49-62.

Vasconcelos M.C., Bennett R.N., Rosa E.A., Ferreira Cardoso, J.V. (2007). Primary and secondary metabolite composition of kernels from three cultivars of Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Mill.) at different stages of industrial transformation *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 3508-3516.

Vasconcelos M.C., Bennett R.N., Rosa E.A., Ferreira-Cardoso J.V. (2010). Composition of European Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 1578-1589.

Vavilov N.I. (1950) The origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica*, Waltham.

Whitaker J. R. (1994). Principles of enzymology for the food sciences. 2.ed. New York: Marcel Dekker, p 625.

Whitaker J. R., Voragen, A. G. J., Wong D. W. S. (2003). *Handbook of Food Enzimology*. New York: Marcel Dekker, p 1108.

Yaldiz O, Ertekin C., Uzun H.I. (2001). Mathematical modeling of thin layer solar drying of sultana grape. *Energy*, **26**, 457-465.