

CONCENTRADO DE TOMATE AUTO-ESTÁVEL PELO
EFEITO COMBINADO DA ATIVIDADE
DE ÁGUA E ACIDEZ

31191

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parcer

Este exemplar
corresponde a
redação final
da tese defee-
dida por Denise

Denise Calil Pereira Jardim
Engenheira de Alimentos

Calil Pereira
Jardim e apu-
vada pela
comissão julga-
dora em

CONCENTRADO DE TOMATE AUTO-ESTÁVEL PELO
EFEITO COMBINADO DA ATIVIDADE
DE ÁGUA E ACIDEZ

13/12/91.

ImK

Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
E.
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de
Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas - SP - 1991

A meus pais e meus irmãos por
terem me ensinado a importância
de ter ideais.

A meus queridos sobrinhos.

BANCA EXAMINADORA

Theo K

Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
(Orientador)

[Signature]

Profa. Dra. Florencia Cecília Menegalli
(membro)

[Signature]

Profa. Dra. Sonia Presa Caggiani de Salzberg
(membro)

Suplente

Prof. Dr. Morris William Montgomery
(membro)

Campinas, 13 de Dezembro de 1991.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Theo G. Kieckbusch pela orientação do trabalho e compreensão durante a realização do mesmo.

Aos pesquisadores: Mirtha E. U. Eiroa, Rodrigo O. Teixeira Neto, Vera L. Pupo Ferreira, Cássia R. L. Carvalho e à Eng. Adriana Watanabe pela colaboração no aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Dr. Guillermo Favetto pelo estímulo, dedicação e amizade para a realização desta tese.

Aos membros da banca do exame de qualificação Dr. Contreras e Dra. M. Angela Petenate; e, ao Dr. Alfredo de A. Vitali pelas sugestões.

À Cássia Ap. de Campos Pinto pela amizade, grande cooperação e auxílio técnico.

À Eng. Liliana de C. Traldi Bezerra por ter fornecido importantes informações, sobre produtos de tomate, para o início do trabalho.

À Encarna, Giovani, Nice e Mariangela pela colaboração, amizade e paciência.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, pela oportunidade e facilidades concedidas.

À Cia. Industrial de Conservas Alimentícias - CICA e à Cia Industrial Mercantil PAOLETTI, pelas amostras de concentrado de tomate.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA-UNICAMP).

Aos funcionários da SEUN e à Márcia Soler pela força.

Aos funcionários da FEA que facilitaram a realização desta tese.

Aos amigos, sempre presentes e incentivadores, que mesmo em profissões ou especializações diferentes, após tantos anos aprenderam o conceito de av e métodos combinados nas conversas informais: Dal, Lú, Manoel, Júlio, Sílvia, Míriam, Lucinha, Moa, Helena e outros muito queridos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do trabalho.

À ABIA, pela doação das fotocópias deste tese.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
SUMMARY.....	ii
I-INTRODUÇÃO.....	1
II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
II.1. Tomate e derivados.....	4
II.2. Atributos de qualidade de produtos de tomate.....	8
II.3. Teoria dos obstáculos ou métodos combinados.....	13
II.4. Atividade de água (av).....	19
a. Significado de atividade de água.....	19
b. Estabilidade de alimentos e atividade de água.....	21
c. Depressores da atividade de água.....	26
d. Avaliação teórica da atividade de av de soluções.....	31
binárias	
d.1. Eletrólitos.....	31
d.2. Não eletrólitos.....	33
e. Estimativa da atividade de água de soluções de.....	33
multicomponentes	
II.5. Acidez e potencial hidrogeniônico (pH).....	34
II.6. pH e atividade de água.....	39
II.7. Potencial de óxido-redução.....	41
II.8. Conservantes.....	43
a. Ácido benzóico e benzoatos.....	44
b. Ácido sórbico e sorbatos.....	44
c. Ácido propiônico e propianatos.....	45
II.9. Sinergismo.....	45

III-METODOLOGIA.....	50
III.1.Ensaio com extrato de tomate.....	50
a.Ensaio preliminar.....	50
b.Ensaio de estabilidade.....	50
1.Primeiro delineamento experimental.....	51
2.Segundo delineamento experimental.....	51
III.2.Produto.....	52
III.3.Análises.....	53
3.1.Acidez total e curvas de acidez.....	53
3.2.Atividade de água teórica, experimental; e.....	53
curvas de calibração do higrômetro	
3.3.Brix (Sólidos solúveis).....	54
3.4.Cinzas.....	55
3.5.Cloreto de sódio.....	55
3.6.Consistência.....	55
3.7.Cor.....	55
3.8.Fibra bruta.....	56
3.9.Matéria-graxa.....	56
3.10.Microbiológica.....	56
3.11.Pectina.....	57
3.12.pH.....	57
3.13.Proteína.....	57
3.14.Sensorial.....	57
3.15.Sólidos totais.....	57
3.16.Visual.....	57
III.4.Formulação das amostras e inoculação.....	58
de microrganismos	

IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
IV.1. Produto.....	60
IV.2. Ensaio s preliminares.....	61
1. Efeito da adição de ácidos na cor do.....	61
concentrado de tomate	
2. Efeito da adição de ácidos na acidez do.....	65
concentrado de tomate	
3. Efeito da adição do ácido no grau Brix e.....	70
na aw do concentrado de tomate	
4. Efeito da adição de solutos na aw (teórica e.....	70
experimental) do concentrado de tomate	
5. Variação do grau Brix do concentrado de.....	76
tomate com o teor de sólidos totais	
IV.3. Ensaio s de estabilidade.....	78
a. Primeiro delineamento experimental.....	78
a.1. Estabilidade microbiológica das amostras.....	82
a.2. Estabilidade química e física das amostras.....	83
a.3. Seleção dos tratamentos.....	92
b. Segundo delineamento experimental.....	96
b.1. Estabilidade microbiológica das amostras.....	97
b.2. Caracterização e seleção dos tratamentos estáveis.....	108
b.3. Avaliação sensorial.....	110
V-CONCLUSÕES.....	111
VI-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

RESUMO

A atividade de água e o pH de concentrato de tomate (29°Brix) foram alterados para avaliar a inibição ao crescimento de microrganismos selecionados de grupos deteriorantes de produtos de tomate, aplicando-se a técnica dos métodos combinados. Amostras de concentrado de tomate foram inoculadas com 10^5 UFC/g de fungos, leveduras e bactérias lácticas. O primeiro ensaio experimental foi preparado combinando ácido acético (0,1 a 3,0%) com cloreto de sódio (2,0 a 10,0%), benzoato de sódio e sorbato de potássio (ambos de 0 a 0,15%). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente, não hermeticamente fechadas, em recipientes de vidro, não sofrendo deterioração durante um ano. Baseado nesses resultados o segundo experimento foi delineado com apenas dois ingredientes: ácido acético (0,1 a 2,5%) e cloreto de sódio (2,0 a 8,0%). Nove amostras diferentes foram preparadas e mantidas sob as mesmas condições do primeiro experimento, das quais 4 não deterioraram após um ano de armazenamento.

Os resultados indicam que há um grande potencial de uso desta técnica de preservação de concentrado de tomate, armazenado em tanques à granel. De acordo com estes resultados é proposto um modelo simples para o cálculo de tempo de vida-de-prateleira em função do conteúdo de NaCl e ácido acético do concentrado.

SUMMARY

Water activity and pH of tomato concentrate (29°Brix) were altered to evaluate their inhibitory effects on the growth of selected groups of microorganisms known to be spoilage agents of tomato products. The hurdle technology was applied. Samples were inoculated with 10^5 CFU/g of molds, yeasts and lactic acid bacteria. The first batch of tests were prepared with acetic acid (0.1 to 3.0%) combined with sodium chloride (2.0 to 10.0%), sodium benzoate and potassium sorbate (both up to 0.15%). The samples kept at room temperature in unhermetically sealed jars for one year did not deteriorate. Based on these results a second set of experiments was designed using only two ingredients: acetic acid (0.1 to 2.5%) and sodium chloride (2.0 to 8.0%). This batch was prepared under nine different sets of additive combinations four of which did not produce deterioration after one year of storage, under similar conditions as the ones used for the first batch.

The results indicate a good potential for the use of hurdle technology to preserve semi-processed tomato concentrate in bulk consequently a simple model is suggested for the prediction of the tomato concentrate shelf-life as function of NaCl and acetic acid content.

I-INTRODUÇÃO

O Brasil se situa entre os principais produtores mundiais de tomate. A maior parte da produção destina-se à industrialização. Produtos de tomate são significativos entre os industrializados do mercado interno e externo. Assim, escolheu-se para estudar um produto manufaturado relevante para a economia nacional.

O processamento do tomate concentrado (28-30°Brix) envolve inativação enzimática, concentração, pasteurização, resfriamento e acondicionamento em tambores de 200 litros. Estes tambores são estocados nas indústrias durante a safra para reprocessamento posterior durante o ano.

Um das principais dificuldades encontradas com esse produto pelas indústrias, diz respeito à deterioração microbiológica do concentrado por problemas inerentes ao processo tradicionalmente utilizado. É uma contaminação grave por fungos e por uma microbiota mista. A origem desta deterioração não foi ainda identificada podendo ser devido às várias reutilizações do tambor, à recravação, ao processamento ou outras fontes. Este fato vem acarretando uma perda econômica significativa para a indústria e repercussões negativas quanto à qualidade do produto. Em alguns casos retira-se a parte superficial deteriorada e reprocessa-se o produto com o risco de adicionar outros gastos; em outros casos há perda total do produto.

Os tambores também apresentam problemas como seu difícil manuseio após o enchimento e a sua lavagem. Outro problema

apresentado pelo produto processado tradicionalmente é a perda de cor pelo tratamento térmico, principalmente na operação do resfriamento.

Hoje, um dos maiores desafios para os pesquisadores de conservação de alimentos, das instituições e dos laboratórios industriais que desenvolvem processos e produtos, é processar e conservar seus produtos sem sacrificar a sua qualidade. A estabilidade e segurança dos sistemas de alimentos é a linha chave dos processadores os quais procuram ansiosamente para isso novos métodos físicos ou químicos de preservação.

O propósito do presente trabalho foi desenvolver um método de conservação para concentrado de tomate (denominado comercialmente como polpa industrial), que por uma combinação dos fatores de "stress" de microrganismos conferisse ao produto uma estabilidade microbiológica à temperatura ambiente, permitindo transporte e armazenagem à granel ou seja em tanques de grande capacidade. Por outro lado essa técnica permite obter um produto manufaturado sem tratamento térmico, para melhor retenção de suas qualidades sensoriais e nutricionais.

Avaliar nos dias de hoje, a adição de ingredientes como alguns solutos (como os sais), alguns ácidos e outros estabilizadores microbiológicos para concentrado de tomate, é oportuno pois há uma tendência deste mercado em apresentar ao consumidor os produtos de tomate já elaborados, como por exemplo: catchup, molhos prontos para macarronada, para carnes e outros.

A conservação de suco de tomate baseado na combinação de fatores foi estudada por SIDHU *et alii* (1986). Entretanto, nenhum trabalho foi desenvolvido para concentrado de tomate.

Na pesquisa aqui apresentada o efeito combinado de uma série de elementos conhecidos, usados na preservação de alimentos foi ensaiado, como sal, ácido acético, benzoato e sorbato.

O uso de compostos que liberam SO₂ (sulfitos, bissulfitos e metabissulfitos de sódio, potássio e cálcio) como agentes antimicrobianos na indústria de alimentos foi banido pelo órgão de controle dos Estados Unidos (F.D.A.) para uso em frutas e hortaliças frescas, e exigida a especificação no rótulo de alimentos embalados quando presentes em níveis detectáveis. Esses compostos apresentam outros problemas inerentes ao seu uso como elevada volatilidade, elevado poder corrosivo e alterações de sabor, cor e aroma dos alimentos (LEITÃO, 1990). É também o conservante mais identificado pelas campanhas de conscientização do consumidor com relação aos riscos de descontrole no processamento de alimentos e por isso seu uso começa a ser evitado pelas indústrias brasileiras.

Por esses motivos, o uso do SO₂ não foi considerado neste trabalho.

II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. TOMATE E DERIVADOS

O tomate é uma das culturas nacionais mais importantes, não só em volume de produção, como também em valor econômico, pois é a hortaliça mais industrializada na forma de inúmeros sub-produtos.

O tomate, *Lycopersicum esculentum*, é a espécie cultivada para a industrialização, e as demais como *L. pimpinellifolium*, *L. hirsutum*, *L. peruvianum* e outras são utilizadas em programas de melhoramento (MINAMI & FONSECA, 1983).

O plantio de tomate se inicia geralmente no mês de janeiro ou fevereiro. A colheita se dá aproximadamente 80 a 120 dias após o plantio, sendo que a safra sempre acontece entre maio e outubro, época em que a indústria trabalha ininterruptamente, prolongando-se às vezes quase até dezembro.

Somente no Estado de São Paulo foram plantados, em 1990, 8.260 hectares de tomate rasteiro (destinados à industrialização), produzindo 297.000 toneladas, segundo dados do Instituto de Economia Agrícola (INFORMAÇÕES ECONÔMICAS, 1991).

Os maiores produtores têm sido os estados de São Paulo, Pernambuco, Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro.

Hoje o Brasil situa-se entre os maiores produtores mundiais, juntamente com os Estados Unidos, Itália, Grécia, Egito, Turquia, Espanha e México.

No Brasil, a indústria de tomate iniciou-se durante a Segunda Guerra Mundial. Até então, a maior parte do tomate industrializado (principalmente concentrado) era importado da Argentina ou Itália, com alguma produção de origem caseira. A partir de 1950, a

indústria tomou um impulso muito grande.

O crescimento da indústria de tomate acelerou a partir de 1972 devido a uma alta muito grande no mercado mundial dos produtos derivados de tomate, provocando uma expansão da cultura e da capacidade de processamento, havendo uma remodelização nos equipamentos já existentes.

De acordo com a legislação brasileira, Extrato de tomate é o produto resultante da concentração da polpa dos frutos. O produto é designado por "Extrato de tomate" podendo também ser denominado "Massa de tomate" ou "Concentrado de tomate" (MINAMI & FONSECA, 1983).

O extrato, de acordo com o grau de concentração, é classificado em:

- a. puré de tomate;
- b. simples concentrado;
- c. duplo concentrado e
- d. triplo concentrado,

com as seguintes características, respectivamente:

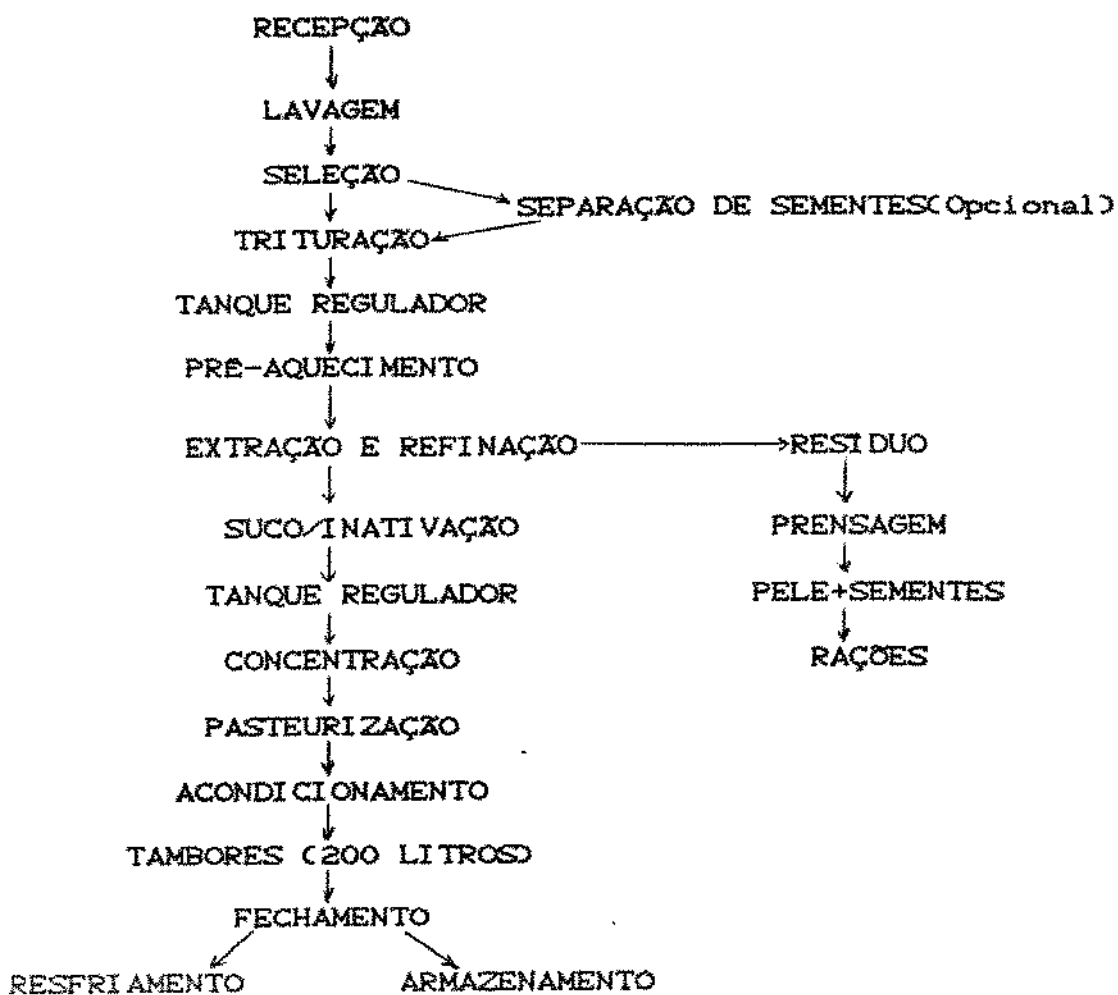
- a. matéria seca menos cloreto de sódio, mínimo 9,0% p/p;
- b. matéria seca menos cloreto de sódio, mínimo 18,0% p/p;
- c. matéria seca menos cloreto de sódio, mínimo 25,0% p/p e
- d. matéria seca menos cloreto de sódio, mínimo 33,0% p/p.

Ainda, pela legislação, o extrato de tomate deverá ser preparado com frutos maduros, bons, sem pele e sem semente. Será tolerada a adição de 1,0% de sacarose e de 3,0% de cloreto de sódio no produto final.

Nos últimos anos o mercado dos produtos de tomate prontos para o consumo, sobretudo os molhos, vêm tendo um desenvolvimento bastante significativo. As empresas mais importantes deste setor vêm investindo nesta direção preocupando-se com o desenvolvimento de métodos de conservação do extrato com a adição de diferentes ingredientes.

O extrato de tomate, triplo concentrado, acondicionado em tambores de 200 litros, objeto de estudo desta tese, é chamado de extrato industrial porque é matéria prima para reprocessamento e elaboração de vários subprodutos mais diluídos, temperados ou não.

O processamento tradicional do concentrado de tomate segue o seguinte esquema:



Até 1981 o processamento tradicional do concentrado de tomate era a pasteurização com enlatamento a quente em latas retangulares de 20 litros, as quais eram em seguida resfriadas ao ar livre, ou imersas em água fria, geralmente sem agitação das latas. Esse resfriamento era lento e acarretava mudanças indesejáveis na qualidade do produto final.

A partir desse ano, TEIXEIRA NETO *et alii*(1981) desenvolveram um processo de resfriamento de polpas semi-concentradas em tambores de 200 litros promovendo a substituição quase total das latas de 20 litros, principalmente nas indústrias de polpa de tomate e de goiaba.

A estabilidade microbiológica de polpas enlatadas é obtida pelo tratamento térmico e fechamento hermético.

Além da pasteurização, existem outros métodos para conservação de produtos de baixa acidez, como o concentrado de tomate, destacando-se dentre eles a acidificação e o enlatamento asséptico.

O processo asséptico, ainda não encontrou ampla aceitação na indústria pois requer cuidado extremo devido a grande facilidade de contaminação.

A outra alternativa conhecida para a preservação do concentrado é a adição de ácidos inorgânicos, geralmente ácido clorídrico, economizando-se a etapa de pasteurização e do resfriamento (SIDHU *et alii*, 1984). Esse procedimento é realizado, principalmente durante a safra, para poder transportar a polpa da unidade processadora para a reprocessadora, geralmente situadas em centros distantes entre si. Desta forma durante a safra a entrada do produto nas reprocessadoras é mais rápida.

Uma das desvantagens deste processo é a necessidade da

neutralização do concentrado acidificado com hidróxido de sódio para viabilizar sua utilização.

Outro processo de conservação é o utilizado pela empresa KAGOME (MISHIMA, 1990) no Japão, que armazena toneladas de concentrado de tomate em tanques verticais de fibra de vidro, situados ao ar livre e dentro dos quais é feito vácuo controlado permanentemente; neste caso eles contam com o clima frio, característico da região a maior parte do ano, para ajudar na conservação da polpa.

II.2. ATRIBUTOS DE QUALIDADE DE PRODUTOS DE TOMATE

Os atributos de qualidade e os fatores de controle de qualidade dos produtos de tomate de maior importância são sabor, cor, consistência e pureza. A cor é o atributo mais relevante pois é o primeiro que impressiona o consumidor, sendo um parâmetro de aceitação ou não, tanto do extrato como dos produtos acabados. Infelizmente, é também uma das características que mais sofre mudanças durante o processo e o armazenamento (MINANI & FONSECA, 1983).

Há perda da cor do produto durante a concentração, pasteurização e resfriamento. Nessas etapas ocorrem reações de escurecimento não enzimático que levam à formação de pigmentos escuros.

A qualidade do suco de tomate conservado pelo abaixamento do pH foi avaliada por MUDAHAR *et alii* (1986). Para o estudo, adicionou-se 2,0% de açúcar, 0,7% de cloreto de sódio e 0,1% de ácido cítrico e abaixou-se o pH até 1,40 com ácido clorídrico. As amostras foram mantidas a temperaturas de 25° a 30°C.

O suco assim preservado apresentou escurecimento devido à reações não-enzimáticas e, a retenção do ácido ascórbico foi maior em pH mais baixo.

Para BRAVERMAN (1963), há três maneiras principais pelas quais pode ocorrer a reação de escurecimento não enzimático: 1. caramelização de açúcares, 2. oxidação de ácido ascórbico e 3. reação de Maillard. A composição e o pH do alimento assim como a temperatura a que o suco for submetido determinam o tipo de reação predominante.

Foi verificado por LUH *et alii* (1958), que a taxa de escurecimento é maior em amostras de suco de tomate armazenadas a temperaturas mais altas, após um certo período de estocagem. Nesses casos é possível a formação de furfural e hidroximetilfurfural a partir dos açúcares redutores através de catálise ácida ou reação de escurecimento. A baixas temperaturas o escurecimento não foi observável.

O comportamento em relação ao pH foi confirmado pelos resultados de WILLIAMS (1976); ou seja, em sistemas com alta atividade de água e pH ao redor de 5,0 observou-se um escurecimento muito pequeno; e, à pH igual a 9,5 a taxa de escurecimento atinge o seu grau máximo. O mesmo autor afirma que a reação de escurecimento também é catalisada por pequenas quantidades de oxigênio.

A cor vermelha, devido aos licopenos e carotenos presentes nos concentrados de tomate, torna-se amarronzada através de reações ainda não completamente elucidadas.

É demonstrado em vários trabalhos que o amarronzamento, no armazenamento, se inicia na camada superficial do produto, geralmente em contato com oxigênio.

OGLE & KRAMER (1984), estudaram as alterações de cor ocorridas em catchup durante 6 meses de armazenamento. Observaram que no primeiro mês de estocagem, houve deterioração na cor do produto situado na região do gargalo do frasco. Esse processo declinava progressivamente nos meses seguintes. Neste trabalho o oxigênio é apontado como o fator mais importante para a formação da "cor negra" devido a oxidação de ferro a íons ferrosos, os quais reagem com o tanino para tornar o produto mais escuro.

A consistência é um outro atributo importante que incide na qualidade dos produtos de tomate. Os fabricantes devem mantê-la dentro do exigido pelo consumidor.

Ela pode ser alterada pelas operações do processamento como a inativação enzimática (LUH & DAOUD, 1971), e o método de extração a quente ou a frio (MIERS *et alii*, 1970). Também a adição de ácidos podem influenciar na consistência do produto final (MUDAHAR *et alii*, 1986).

MUDAHAR *et alii*, 1986 observaram que a consistência de suco de tomate aumenta quando é acidificado, provavelmente devido a alta concentração de pectina e presença de pectina de baixa metoxilação.

Um dos componentes nutricionais do tomate e seus produtos é a vitamina C. O conteúdo em vitamina C depende da variedade e maturidade do fruto, em torno de 23mg por 100g de matéria-prima.

A vitamina C ou ácido L-ascórbico é fácil e rapidamente destruída durante o processamento e armazenamento dependendo das condições.

O ácido ascórbico é instável em presença de oxigênio e de calor

(LUH *et alii*, 1958). A temperaturas maiores de 25°C a degradação do ácido ascórbico é maior. À baixas temperaturas de estocagem (LUH *et alii*, 1958a), como por exemplo a 6°C, a retenção de ácido é maior.

A oxidação do ácido ascórbico é retardada com o abaixamento do pH (MUDAHAR *et alii*, 1986).

Sabe-se que o extrato de tomate é um produto com pH na faixa 4,3 a 4,8 o que limita a microbiota à bolores, leveduras e bactérias de baixa resistência térmica. Portanto, do ponto de vista microbiológico ou de saúde pública a preocupação com os produtos de tomate deve ser com fungos, leveduras e bactérias lácticas.

Em 1968 a N.C.A. (1968) fez uma listagem dos microrganismos potencialmente deterioradores dos produtos de tomate, como as espécies dos gêneros *Lactobacillus*; anaeróbios produtores de ácido butírico tais como: *C. pasteurianum* e *C. thermosaccharolyticum*; leveduras e o *B. coagulans*, produtor de "flat-sour". Mesmo em concentrados de tomate com alta viscosidade, espécies de lactobacilos e leveduras são frequentemente responsáveis pela deterioração (JONES, 1936).

A contaminação por lactobacilos e leveduras ocorre após a operação de enchimento. São espécies pouco resistentes ao calor.

O *B. thermoacidurans* (variedade do *B. coagulans*), outro microrganismo deteriorador de suco de tomate, ainda que com baixa concentração de esporos, causa séria perda comercial por deterioração por "flat-sour" (WHITE, 1951).

Se o produto estiver com um pH superior ou igual 4,8, poderá ocorrer o crescimento de *C. botulinum* (MONTVILLE, 1982) mesmo se apenas uma parte dos tomates estiver contaminada.

Com pH 4,24 poderá haver inibição dos esporos de *B. coagulans*, também presentes em produtos de tomate. Este microrganismo produz

grande quantidade de ácido sem gás durante o seu metabolismo, dando lugar ao que é conhecido como "flat-sour".

O código para alimentos do Registro Federal dos Estados Unidos (ITAL, 1990), define que produtos de tomate com pH final de equilíbrio menor que 4,7 não devem ser classificados como alimentos de baixa acidez ($av > 0,85$ e $pH \geq 4,6$) e dessa maneira ficam isentos do controle "a priori" da "Food and Drug Administration".

Os parâmetros para análises e controle de alguns produtos acabados de tomate geralmente adotados pela indústria brasileira são (MINANI & FONSECA, 1983) :

parâmetros	extrato	purê	catchup
acidez(%) ác. acético	1,4-1,7	0,9-1,5	2,1-2,4
salinidade NaCl(%)	3,0-3,7	1,3-2,0	2,0-3,0
pH	3,4-4,15	3,9-4,15	3,7-3,8
consistência Bostwick(cm)	8,0-10,0	11,0-13,0	7,0-10,0
sól. solúveis (°Brix)	21,0-22,0	10,0-12,0	36,5-37,5

II.3. TEORIA DOS OBSTÁCULOS OU MÉTODOS COMBINADOS

Técnicas de conservação de alimentos são conhecidas há milênios, embora alguns dos mecanismos atuantes só foram elucidados recentemente. Uma visão geral dos princípios ativos em cada um dos métodos comumente empregados é dada a partir da Seção II.4. O desafio maior é fazer uso combinado otimizado destes fatores, como sugerido pela Teoria dos Obstáculos.

A produção de Alimentos de Umidade Intermediária (A.U.I.) é uma extensão da tradicional secagem. Ao invés de remover considerável massa de água do produto, somente a parte necessária é retirada ou sequestrada através de ligação a umectantes para assegurar que o crescimento de microrganismos seja evitado ou reduzido.

O conceito dos A.U.I. foi ampliado com o nova geração dos chamados "Produtos Auto-Estáveis ("Shelf-stable products") ou Produtos prontos para o consumo" por LEISTNER & ROEDEL (1978). Estes produtos teriam uma atividade de água relativamente alta entre 0,90 e 0,95 e requereriam "obstáculos" adicionais para assegurar a sua estabilidade microbiológica; e obter um alimento com características de aroma e sabor aceitáveis para o consumo.

Alguns fatores estudados, combinados entre si de preferência com efeitos sinérgicos, conseguem a preservação de alimentos pelo chamado "Métodos Combinados" ou "Teoria dos Obstáculos".

Recentemente, este método tem recebido uma renovada atenção dos pesquisadores e principalmente dos laboratórios de desenvolvimento de produtos das próprias indústrias de alimentos e de ração animal que tem patenteado diferentes formulações. Entretanto, os antigos egípcios já o praticavam para preservação de carnes na forma de

mumificação.

Os "obstáculos" mais largamente utilizados são: F (temperatura alta/cozimento), t (temperatura baixa / resfriamento, congelamento), av (atividade de água/secagem, adição de açúcar, sal ou outro soluto), pH (acidez/acidificação), Eh (potencial de óxido redução / remoção de oxigênio) e preservativos (adição de antimicrobianos, cura, defumação).

Esses fatores, juntos, parcialmente juntos ou separados, dependendo de suas intensidades, podem promover a estabilidade microbiológica dos produtos alimentícios.

Resumindo uma palestra apresentada por LEISTNER (1990), várias situações podem ser consideradas, representadas pela Figura II.1 .

As situações são explicadas da seguinte maneira: a primeira é o exemplo de uma condição teórica, onde o alimento seria preservado pelos seis obstáculos: F, t, av, pH, Eh e conservantes, todos com a mesma intensidade. Neste caso nenhum microrganismo existente no alimento sobreviveria e o produto seria microbiologicamente estável.

A segunda condição é mais realista com os obstáculos apresentando intensidades diferentes. Os parâmetros t e Eh não são essenciais, enquanto o pH mostra alguma importância. A av e o(s) conservante(s), mostram-se como os principais fatores responsáveis pela estabilidade do produto, mesmo com a contaminação microbiana de proporção mediana.

Com baixa contaminação inicial de microrganismos, a terceira condição pode ser considerada. Neste caso há possibilidade de limitar os fatores em av e t, que agem mesmo quando utilizados de maneira não intensa e a estabilidade microbiológica do produto fica

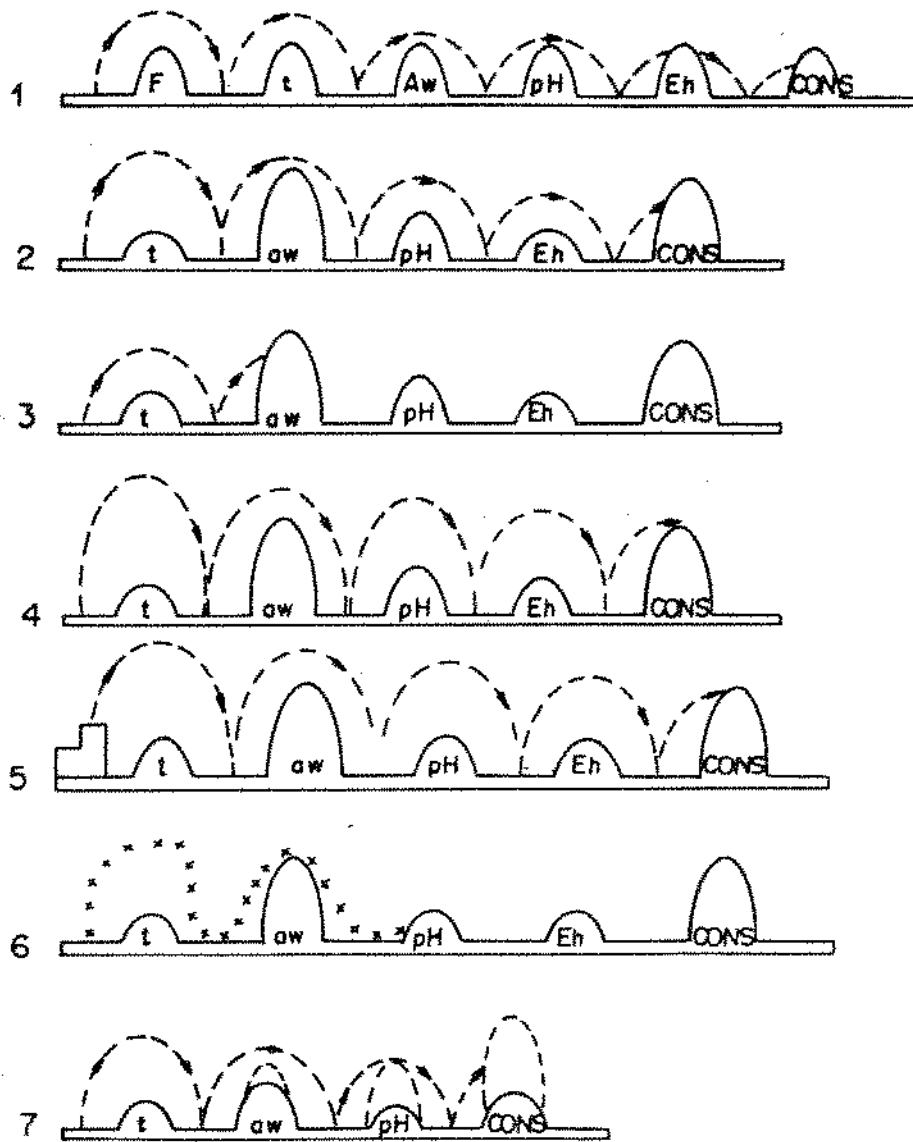


Figura II.1 - Exemplo de sete condições de estabilidade microbiológica de um produto alimentício (LEISTNER, 1990).

assegurada. No Japão a pré-embalagem asséptica de produtos cárneos tem sido praticada com perfeição. Com severa disciplina na higiene consegue-se números bem reduzidos de microrganismos em produtos de carne pré-embalados alcançando-se assim uma vida de prateleira de vinte dias a 10°C, embora no Japão pouco sal seja adicionado e seus produtos de carne apresentem alta av (LEISTNER, 1990).

O contrário ocorre, em outra condição, quando o número de microrganismos inicial é bastante elevado devido a falta de higiene no processamento. Esses microrganismos ultrapassam qualquer obstáculo existente estabelecendo-se um processo de deterioração ou possibilidade do produto causar envenenamento alimentar (situação nº 4).

A quinta condição mostra o "Efeito trampolim" quando o alto teor de vitaminas e nutrientes no alimento possibilita o desenvolvimento dos microrganismos, obrigando os obstáculos a agirem mais intensamente para evitar esse crescimento.

A injúria subletal dos microrganismos através do cozimento ilustra a sexta condição, pois prejudica o desenvolvimento destes. Mesmo que os esporos se tornem células vegetativas, os obstáculos promovem a estabilidade do produto sem a necessidade de serem utilizados intensamente.

A última condição apresentada por LEISTNER, ilustra o caso de produtos crus maturados, microbiologicamente estáveis. No produto pronto, a atividade de água torna-se o fator de obstáculo mais importante, uma vez que o pH no final do processo se eleva, a concentração de nitrito residual e o número de microrganismos da microbiota concorrente é pequeno. Nessa sequência de obstáculos será inibido o desenvolvimento de *Salmonella*, além de *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e os microrganismos

deterioradores.

Quanto ao nível em que esses fatores são necessários para a estabilidade dos alimentos, dependerá do tipo de alimento e de sua carga microbiana inicial (LEISTNER & ROEDEL, 1976).

A preparação de Produtos Auto-Estáveis deve ser feita sob condições higiênicas ou até procedimentos assépticos para assegurar uma baixa contagem inicial dos organismos tolerantes à av. A identificação do tamanho do inóculo é um dos mais importantes fatores para a microbiologia dos alimentos desta forma processados (ROBERTS, 1989).

Os obstáculos e suas interações podem ser estudados, tanto experimentalmente como através de modelos teóricos.

Os trabalhos mais recentes têm sido no desenvolvimento de programas computacionais para estudos teóricos das mais diversas interações entre os obstáculos; no desenvolvimento de novos produtos; na busca de relações sinérgicas entre agentes antimicrobianos (solutos, ácidos e conservantes) que não sejam prejudiciais à saúde do consumidor e que sejam bastantes efetivos; e, na determinação das transformações desejáveis e indesejáveis causadas pelos antimicrobianos nos mais diversos aspectos de qualidade do produto.

Além das várias vantagens da Teoria dos Obstáculos já citadas, tem-se ainda outras como: desenvolvimento de produtos de acordo com as necessidades, economia de energia, redução da quantidade de conservantes químicos como por exemplo do nitrito em carnes, estabilidade de alimentos que causam perda para a indústria por contaminação microbiana e o controle de qualidade das indústrias baseado apenas em algumas determinações.

A aplicação dos princípios de conservação de produtos por métodos combinados abrange uma vasta gama de alimentos e alguns exemplos serão mencionados a seguir:

Abacaxi de Umidade Intermediária foi desenvolvido por JAYARAMAN *et alii* (1975). O produto final continha 34,8% de umidade; 24,0% de sacarose; 38,2% de glicerol; 0,2% de sorbato de potássio e 260ppm de SO₂; com uma av de 0,79. De acordo com os autores o produto foi estável por mais de seis meses a 0°C; até seis meses a 25-30°C e por quatro meses à 37°C. A solução de imersão do produto poderia ser economicamente reutilizada sem afetar a sua qualidade. Apesar da estabilidade microbiológica, o alto conteúdo de glicerol no produto final deverá alterar as qualidades sensoriais.

Em 1983, ALZAMORA *et alii* estudaram o armazenamento não refrigerado do abacaxi em pedaços. O produto foi equilibrado em uma solução contendo glicose, ácido fosfórico, sorbato de potássio e bissulfito de sódio e tratado brandamente pelo calor. O produto foi microbiologicamente estável, mantendo suas qualidades de textura, cor e retenção de ácido ascórbico, durante quatro meses a 27°C.

Experimentos feitos por FAVETTO *et alii* em 1981, com carne em pedaços imersos e cozidos em solução de glicerol e cloreto de sódio, foram bem sucedidos.

O soro de queijo preservado por métodos combinados foi estudado por KANTEREWICZ *et alii*, em 1985. Este produto, normalmente é desidratado em *spray-dryer* para ser reutilizado na forma reidratada. Neste estudo ele foi concentrado parcialmente, teve sua av reduzida por cloreto de sódio ou glicerol. O pH foi abaixado com ácido cítrico e adicionou-se sorbato de potássio. Apresentou estabilidade microbiológica por tres meses armazenado a 30°C.

Um exemplo mais recente de "Produto Auto-Estável" foi desenvolvido por MEYER (1989). A sua contribuição na evolução desta técnica de preservação foi a de ter obtido a estabilidade de molhos para salada somente com o ajuste do pH e da aw, sem a adição de conservantes químicos.

Esses e mais outros exemplos de produtos preservados pela combinação dos obstáculos como iogurtes, carnes curadas, pickles e geleias, indicam a possibilidade de produzir alimentos estáveis microbiologicamente e de boa qualidade.

Mais especificamente com relação a produtos de tomate alguns trabalhos de certa forma envolveram fatores de obstáculos que podem levar a uma análise na direção de métodos combinados, muito embora este conceito não fosse considerado nas suas concepções iniciais. Enquadra-se nestes casos o trabalho de conservação de suco de tomate com adição de açúcar, cloreto de sódio, ácido cítrico e ácido clorídrico, apresentado por MUDAHAR *et alii* (1986). Um outro trabalho foi apresentado por VICINI *et alii* (1990) aonde estudou-se a estabilidade microbiológica de vários extratos de tomate a diferentes concentrações com adição de ácido.

De uma forma geral, não se encontrou na literatura científica tradicional trabalhos sobre a aplicação racional de métodos combinados para a conservação de produtos de tomate.

II.4. ATIVIDADE DE ÁGUA (aw)

a. Significado da atividade de água

A aw de um alimento quantifica o grau de ligação da água

contida no produto e conseqüentemente sua disponibilidade para agir como um solvente e participar das transformações químicas, bioquímicas e microbiológicas (LABUZA, 1977).

A nível termodinâmico, essa disponibilidade da água para interagir é medida pela energia livre de GIBBS, ou, em solução, pelo potencial químico (μ). Apesar de ser um conceito muito útil, o potencial químico não é facilmente mensurável, e G.N.LEWIS introduziu as seguintes definições, adaptadas de conceitos de gases ideais:

$$\mu - \mu^0 = R T \ln(f/f^0) = R T \ln(a_w)$$

O conceito de fugacidade é similar ao conceito de atividade.

O conceito de atividade de água se introduz como $a_w = f/f^0$ onde f é a fugacidade e f^0 representa a fugacidade no estado de referência. Se para ela escolhermos a água pura à pressão atmosférica, a a_w em qualquer solução é dada por $a_w = f/f_{\text{água pura}}$.

A atividade de água é definida como a taxa da fugacidade de água na solução, pela da água pura.

Para a maioria dos casos de interesse na área de alimentos a fugacidade equivale à pressão, e nesse caso $a_w = p/p^0$, onde p é a pressão de vapor da água de uma solução à temperatura T e p^0 é a pressão de vapor de água pura a mesma temperatura (MOORE, 1968).

Para uma solução ideal, a atividade de um componente (a) é igual à sua fração molar, X_a . Na maioria dos casos as soluções aquosas de solutos (eletrólitos e não eletrólitos), não apresentam comportamento ideal. Este desvio pode ser corrigido pelo coeficiente de atividade (γ), de maneira a fazer $a_a = X_a \cdot \gamma_a$.

Colocando-se um alimento em um ambiente com ar úmido, a fase mais ativa (isto é, a de maior a_w) cederá moléculas de água à outra, até haver igualdade das atividades de água. Em psicrometria, a atividade de água do ar úmido, $a_w = p/p^\circ$ é definida como a umidade relativa do ar. Então a_w (uma propriedade da substância) é igual a umidade relativa de equilíbrio (U.R.E.) (uma propriedade do gás). Em equilíbrio tem-se:

$$X_w \cdot \gamma_w = p/p^\circ = a_w = \text{U.R.E.} = \text{U.R.E.} (\% / 100)$$

A a_w de produtos alimentícios é menor que a unidade.

Os seguintes fatores contribuem para o abaixamento da a_w nos produtos (LONCIN & MEARSON, 1979):

- 1 - A dissolução de componentes diminui a pressão de vapor da água. Esta é a principal razão para o abaixamento da a_w em frutas secas e em produtos salgados;
- 2 - A água pode se ligar nos grupos hidrofílicos do material formando camadas, que são sucessivamente menos e menos ligadas;
- 3 - Líquidos presentes nos capilares estão sujeitos a uma pressão de sucção;
- 4 - Cristais podem aparecer em produtos sólidos para os quais a água de hidratação tem uma baixa pressão de vapor. Um exemplo é a sacarose cristalina a qual é menos hidrofílica que a sacarose amorfa.

b. Estabilidade de alimentos e atividade de água

A a_w é um dos parâmetros que define os limites inferiores da atividade química da água que pode agir dentro das seguintes funções:

1. como solvente para reagentes e para produtos;

2. como reagente;

3. como produto de reação (por exemplo, em reação de escurecimento não enzimático-reação de condensação) e,

4. como modificadora de atividade catalítica ou inibitória (KAREL, 1975).

Os efeitos da água nas reações químicas dos alimentos são mais complicados do que os seus efeitos no crescimento de microrganismos.

As velocidades de algumas transformações em alimentos, como função da a_w do produto, foram demonstradas esquematicamente na Figura II.2 apresentada por LABUZA (1970).

Em valores muito baixos de a_w , 0,2 a 0,4, a água está fortemente ligada e geralmente não está disponível para qualquer transformação (congelamento, secagem, etc). Sua disponibilidade de agir como solvente para reações, ou como reagente, aumenta com o aumento da a_w (LABUZA, 1975). Muitas transformações deteriorativas aumentam exponencialmente com a a_w .

Pela Figura II.2, valores de a_w acima de 0,6, pequenas alterações na a_w corresponde na maioria dos casos, a um aumento significativo do conteúdo de umidade do produto, e as taxas de velocidades de algumas transformações podem aumentar ou diminuir (LABUZA, 1980).

Com relação ao crescimento de microrganismos observa-se pela Figura II.2 que, em geral, os fungos são mais tolerantes a um decréscimo da a_w do que as leveduras, e estas mais que as bactérias.

Na Tabela II.1 estão listados os valores da a_w mínima requerida para o crescimento de algumas bactérias, leveduras e fungos encontrados em alimentos.

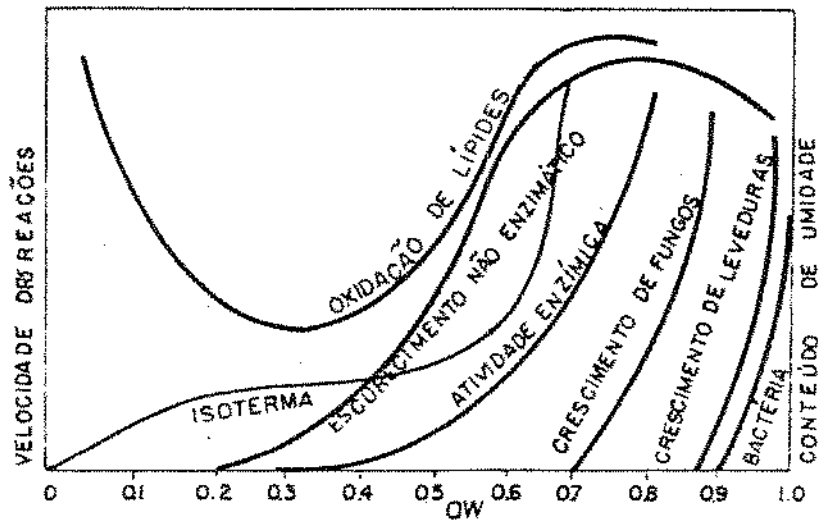


Figura II.2 - Mapa das transformações de alimentos em função da atividade de água (LABUZA, 1970).

Tabela II.1 - Atividade de água (aw) mínima para o crescimento de microrganismos associados com alimentos (LEISTNER & ROEDEL, 1976).

aw	Bactéria	Leveduras	Fungos
0,98	<i>Clostridium</i> (1), <i>Pseudomonas</i>	---	---
0,97	<i>Clostridium</i> (2)	---	---
0,96	<i>Flavobacterium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lactobacillus</i> ^a , <i>Proteus</i> ^a , <i>Pseudomonas</i> ^a , <i>Shigella</i>	---	---
0,95	<i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Clostridium</i> (3), <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i> ,	---	---
0,94	<i>Lactobacillus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> ^a , <i>Vibrio</i> ^a	---	---
0,93	<i>Lactobacillus</i> ^a , <i>Streptococcus</i>	---	<i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i>
0,92	---	<i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i>	---
0,91	<i>Corynebacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> (4), <i>Streptococcus</i> ^a	---	---
0,90	<i>Lactobacillus</i> ^a , <i>Micrococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Vibrio</i> ^a	<i>Hansenula</i> , <i>Saccharomyces</i>	---
0,88	---	<i>Candida</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Torulopsis</i> <i>Debaryomyces</i> ^a	<i>Cladosporium</i>
0,87	---	---	---
0,86	<i>Staphylococcus</i> (5)	---	<i>Paecilomyces</i>
0,80	---	<i>Saccharomyces</i> ^a	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Emericella</i> , <i>Eremascus</i>
0,75	<i>Bactéria halofílica</i>	---	<i>Aspergillus</i> ^a <i>Wallemia</i>
0,70	---	---	<i>Eurotium</i> , <i>Chrysosporium</i>
0,62	---	<i>Saccharomyces</i> ^a	<i>Eurotium</i> ^a , <i>Monascus</i>

a. algumas espécies; (1) *Cl. botulinum* do tipo C; (2) *Cl. botulinum* do tipo E e algumas espécies de *Cl. perfringens*; (3) *Cl. botulinum* tipos A e B e algumas espécies de *Cl. perfringens*; (4) *Staphylococcus* spp. anaeróbio; (5) *Staphylococcus* aeróbio.

Esta tabela é uma compilação de valores de a_w reportados por vários autores (LEISTNER & ROEDEL, 1976). As a_w mínimas requeridas para o crescimento de alguns microrganismos nem sempre estão em concordância entre os vários autores e portanto a Tabela II.1 deve ser considerada com critério.

A maioria dos valores da Tabela II.1 foi obtida sob diferentes condições ótimas de crescimento de microrganismos, usando substratos artificiais com a a_w ajustada com solutos (NaCl, por exemplo) ou por dessorção. A tolerância do microrganismo à a_w é diminuída se outros fatores de obstáculos, não forem mantidos nos níveis ótimos para crescimento de microrganismo.

Da Tabela II.1 é possível concluir que substratos com $a_w < 0,95$ inibem a multiplicação da maioria das bactérias GRAM negativas. Algumas bactérias GRAM positivas, desejáveis para a fermentação de produtos cárneos, toleram a_w mais baixas que 0,95. Certamente, linhagens de bactérias bem adaptadas, por exemplo, em salmouras para a "cura", são capazes de crescerem em um valor de a_w no qual a maioria das representantes deste gênero seria inibida.

No caso das bactérias patogênicas a que tolera o mais baixo nível de a_w é o *S. aureus*. Sob condições anaeróbicas este microrganismo é inibido em $a_w < 0,91$, e em condições aeróbicas em $a_w < 0,86$ (LEISTNER & ROEDEL, 1976).

A maior reação dos microrganismos frente a uma mudança na a_w do substrato, correspondente a uma alteração na concentração de solutos não penetrantes, é a regulação compensatória de seu conteúdo interno de solutos para um nível tal que excede a osmolaridade externa; assim o microrganismo evita a perda excessiva de água. Este "stress" osmótico dificulta o crescimento microbiano

(GOULD, 1985). A disponibilidade de um microrganismo crescer em um dado ambiente não é determinada exclusivamente pela *av*, mas depende também de uma interação complexa de vários outros fatores incluindo a microbiota competitiva (TROLLER, 1980).

c. Depressores da atividade de água

A *av* dos alimentos frescos é determinada somente pela natureza e concentração das espécies químicas de peso molecular relativamente pequeno, naturalmente dispersas no alimento. A concentração destes solutos (não iônicos ou ionizáveis) em alimentos frescos é relativamente pequena e conseqüentemente a *av* difere pouco do valor da umidade. CHIRIFE e FERRO FONTAN (1982), calcularam a *av* em várias frutas, vegetais e carnes e encontraram que os valores estão no intervalo 0,970 - 0,996.

O fenômeno da interação molecular, o qual aumenta ou diminui a pressão de vapor, é expresso em atividade do soluto (CHEN & KARNAS, 1980). Quando os solutos são dissolvidos em água ocorrem dois fenômenos: primeiro, a concentração de água é reduzida. Segundo, o soluto pode interagir com a água acarretando uma variação adicional na pressão de vapor. Como a *av* será relacionada com a pressão de vapor do sistema, ela pode mudar.

O soluto causa um aumento da quantidade de hidrogênio ligado (pontes de hidrogênio), entre as moléculas de água imediatamente adjacentes a ele. O resultado é um aumento da ordem ou estruturação da água, reduzindo sua concentração efetiva.

O aumento da vida de prateleira dos A.U.I. não refrigerados está baseado no princípio da adição de solutos para diminuir a disponibilidade química e biológica da água. Os solutos também

aumentam a viscosidade da fase líquida abaixando a taxa de difusão dos reagentes. A adição de solutos diminui a velocidade da maioria das reações na mesma ordem em que diminui a a_v (SLOAN & LABUZA, 1975).

Junto a essa propriedade de água ligada, alguns solutos exibem também outros efeitos desejáveis como: propriedades antimicrobianas, características reológicas, capacidade de adoçar e valor calórico.

Três classes gerais de compostos químicos são usados correntemente pelas indústrias como depressores de a_v : os polióis (propilenoglicol, glicerol, sorbitol), os açúcares (frutose, sacarose, dextrose) e os sais (cloreto de sódio, lactato de sódio). Os polióis são os mais desejáveis do ponto de vista de sorção de umidade devido aos seus baixos pesos moleculares e em alguns casos pelo fato de serem líquidos. O sorbitol, um açúcar, é tecnicamente um poliol. O cloreto de sódio e o cloreto de potássio são os sais de uso mais antigo e mais comumente utilizados como solutos.

A Figura II.3 ilustra o comportamento dos valores da a_v de soluções aquosas de alguns depressores de a_v , a várias concentrações (JARDIM, 1989).

Pela Figura II.3 observa-se que soluções aquosas de cloreto de sódio apresentam valores de a_v menores que as de sorbitol, glicerol e propilenoglicol às mesmas concentrações.

A adição de um íon sódio em A.U.I. está associada com uma grande mudança na a_v .

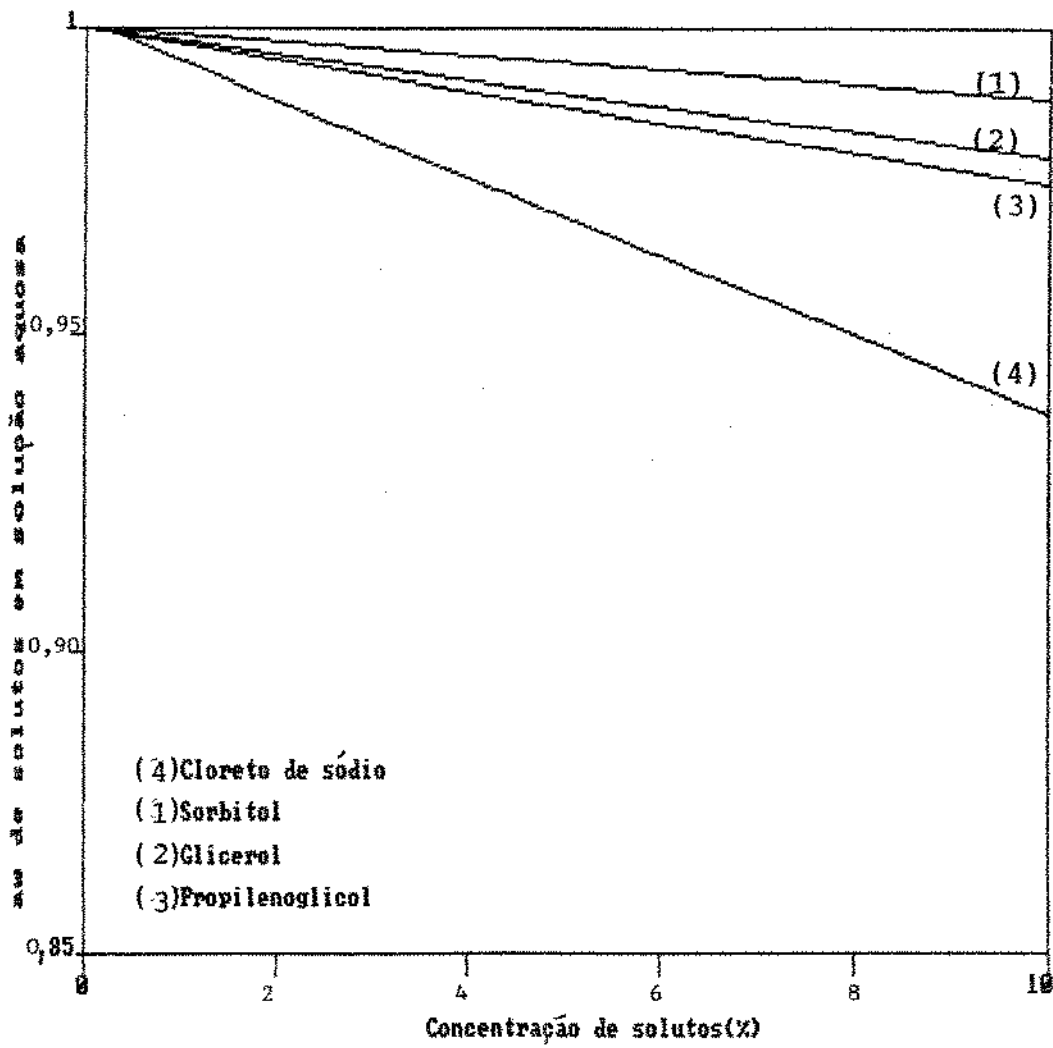


Figura II.3 - Valores de a_w de depressores de a_w em solução aquosa.

Dos polióis, o glicerol é o composto mais apropriado para controlar a av em AUI, mas os coeficientes de atividade de água são praticamente os mesmos em soluções de 5% e de 15%. O glicerol também afeta menos o sabor que o cloreto de sódio e a sacarose, e tem baixo peso molecular.

O propilenoglicol tem sido usado como um umectante plastificante do produto para alterações da textura e como agente antimicrobiano para a proteção do produto contra o crescimento de fungos e leveduras (KAPLOW, 1970).

Um outro soluto é o lactato de sódio que apresenta um desvio do comportamento ideal de umectância prevista em função dos grupos hidroxilas, acarretando uma redução da av maior do que a esperada.

Para a seleção de um soluto, devem ser considerados os seguintes fatores: sua capacidade de reduzir a av; o impacto no sabor; textura; solubilidade; ionização; compatibilidade com outras características do alimento; pH; limites fisiológicos; estabilidade; custo e segurança.

Os efeitos dos solutos no metabolismo de crescimento de microrganismos podem genericamente ser correlacionados com as medidas de av, mas dependem mais especificamente da permeabilidade do soluto na célula microbiana e de outras propriedades físicas e químicas das moléculas dos solutos (MEASURES & GOULD, 1986). Foi observado, por exemplo, que as taxas de crescimento de *Aspergillus amstelodami*, foram maiores com sacarose e glucose do que com cloreto de magnésio ou sódio ou glicerol à mesma av. Da mesma forma as leveduras osmotolerante, particularmente aquelas isoladas de fontes com alta concentração de açúcar, crescem mais em av menores quando se usa sacarose ou glicose como reguladoras da av, do que

quando se usa cloreto de sódio (MEASURES & GOULD, 1986).

Foram também feitos testes com pedaços de carne de porco a umidade intermediária com a mesma av (0,88), mas com diferentes conteúdos de umidade, apresentando respostas biologicamente diferentes com *S.aureus*, dependendo do método de preparação (SINSKEY, 1976). Houve crescimento nas amostras preparadas por desorção usando glicerol; e, morte dos microrganismos nas amostras preparadas na adsorção.

Estudos de viabilidade podem mostrar grandes diferenças entre solutos. ONISHI citado em MEASURES & GOULD (1986), encontrou que células de *Saccharomyces rouxii* que cresceram na presença de 18% de NaCl, mas que não cresceram na presença de 50% de glicose, perderam rapidamente K^+ quando lavadas com água. As células que não cresceram quando suspensas em solução tampão com 18% de NaCl morreram rapidamente a menos que glicose, uma fonte de energia, estivesse presente. Este autor conclui que o NaCl tinha um efeito específico na permeabilidade celular.

A Tabela II.2 apresenta os limites de crescimento de alguns microrganismos com alguns solutos (MEASURES & GOULD, 1986).

Tabela II.2. av limites para crescimento de microrganismos.

Microrganismos	Solutos		
	NaCl	Glucose	Glicerol
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,970	0,970	0,950
<i>Escherichia coli</i>	0,950	---	0,935
<i>Salmonella newport</i>	0,950	---	0,935
<i>Clostridium botulinum A</i>	0,945	---	0,930
<i>Bacillus cereus</i>	0,925	---	0,920
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,830	---	0,890
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,940	0,919	---
<i>Saccharomyces rouxii</i>	0,860	0,845 ^a	---
<i>Aspergillus flavus</i>	---	---	---
<i>Aspergillus chevalieri</i>	---	---	---
<i>Aspergillus amstelodami</i>	---	---	---
<i>Aspergillus echinulatus</i>	---	---	---
<i>Monascus bisporus</i>	---	---	---

^afoi relatada numa linhagem desta espécie que cresce em av=0,62

Os limites das concentrações dos solutos utilizados são baseados pelo gosto amargo no caso do propilenoglicol, pelo efeito na textura pelo glicerol, pela doçura dos açúcares, pela destruição da qualidade proteica para alguns produtos e pelo estabelecido pela legislação vigente do país.

O limite máximo para uso do glicerol geralmente é 5% para a maioria dos produtos (ANGELUCCI, 1989). Não há especificação de uso desse polioli em produtos de tomate.

O sorbitol, dependendo do produto, geralmente é usado de 5 a 10%.

O emprego do cloreto de sódio nos derivados de tomate está limitado, pela legislação brasileira, a 5% do produto final.

d. Avaliação teórica da av em soluções binárias

É possível estimar a av de soluções simples ou de misturas de multicomponentes (alimento) por modelos matemáticos teóricos ou semi-empíricos.

d.1. Eletrólitos

O cloreto de sódio (NaCl) é o principal eletrólito responsável pela redução da av em alimentos semi-úmidos como peixe salgado, azeitonas, queijos, etc. Por esta razão interessa ter uma equação que possa descrever com exatidão o comportamento de soluções de NaCl até concentrações próximas à saturação (aproximadamente 8 molal) (CHIRIFE, 1987).

PITZER, 1973 desenvolveu um sistema de equações para as propriedades termodinâmicas de eletrólitos baseado na análise melhorada do modelo de DEBYE-HUCKEL. As equações de Pitzer são

especialmente úteis para soluções de cloreto de sódio, pois é igualmente exato para soluções diluídas como para soluções mais concentradas.

Pitzer considera o coeficiente osmótico (Φ) como a relação da a_v com o produto da quantidade de soluto que ocasiona na solução um desvio de solução ideal (dado pela molalidade) com o número de partículas.

É definido por:

$$\Phi = - \frac{55,51 \ln a_v}{m_i \cdot v_i} \quad (\text{II.1})$$

onde: v_i = número de partículas do soluto dissociado

m_i = molalidade do soluto (i)

O coeficiente osmótico para eletrólitos é dado por:

$$\Phi - 1 = |Z_m \cdot Z_x| f + m \frac{(2v_m \cdot v_x) B_{mx}}{v} + m^2 \frac{(v_m \cdot v_x)^{3/2}}{v} \cdot C_{mx} \quad (\text{II.2})$$

onde:

v_m e v_x = número de íons de M e X

Z_m e Z_x = cargas de M e X

$v = v_m + v_x$

m = molalidade total da mistura

$$f = -A \left[\frac{I^{1/2}}{1 + b \cdot I^{1/2}} \right]$$

$$B_{mx} = \beta_{mx}^{(0)} + \beta_{mx}^{(1)} \exp(-\alpha I^{1/2}) \quad (\text{II.3})$$

onde:

$\beta_{mx}^{(0)}$ e $\beta_{mx}^{(1)}$ definem o segundo coeficiente virial

C_{mx} define o terceiro coeficiente virial

I é a força iônica $= 1/2 \sum m_i \cdot Z_i^2$

A é o coeficiente de Debye-Hückel e é igual a 0,392 a 25°C

b = constante = 1,2

$\alpha = 2$ (PITZER & MAYORGA, 1973)

para NaCl $\beta^{(0)}=0,0765$ $\beta^{(1)}=0,2664$ $C=0,00127$

Os valores de a_v calculados pela equação (II.1) quando comparados com os resultados experimentais de diversas fontes a várias temperaturas apresentam uma boa concordância.

Um aspecto importante quanto ao valor da a_v de soluções de NaCl é sua constância com a temperatura na faixa de 25 a 50°C.

d.2. Não eletrólitos

Baseado em uma simples análise termodinâmica de soluções, NORRISH (1966) propôs uma equação para sistemas binários a qual foi aplicada com sucesso para soluções de açúcares e soluções de polióis. Pode ser escrita assim:

$$a_v = x_v \cdot \exp \left(- K x_2^2 \right) \quad (\text{II.4})$$

onde:

x_v =fração molar da água

x_2 =fração molar do soluto

K =constante de interação

O valor da constante K depende primeiramente do peso molecular do soluto.

e. Estimativa da atividade de água de soluções de multicomponentes

Uma relação rigorosa e exata para o cálculo da atividade de água em soluções é dada pela equação de Gibbs-Duhem (MOORE, 1968):

$$\sum n_i d(\ln a_i) = 0 \quad (\text{II.5})$$

Ela exige entretanto, o conhecimento da variação das atividades de água dos componentes em função da variação da concentração de todos os constituintes da solução. ROSS (1975) assumindo que as interações soluto-soluto se cancelam, integrou a equação de Gibbs-Duhem e conseguiu expressar a a_v da mistura multicomponente em termos de a_v das soluções binárias:

$$a_v = (a_{v1}) \cdot (a_{v2}) \cdot (a_{v3}) \cdot (a_{v4}) \dots \quad (\text{II.6})$$

A equação (II.6) significa que a a_v de uma solução complexa pode ser calculada como o produto dos valores das a_v das soluções aquosas de cada componente, na mesma concentração utilizada para produzir a solução multicomponente. A validade da equação (II.6) para determinar teoricamente a a_v de misturas multicomponentes de solutos de interesse na preservação de alimentos foi bastante estudada por CHIRIFE *et alii* (1980).

Outros modelos tem sido sugeridos para o cálculo da atividade de água de misturas como o apresentado por FERRO FONTAN *et alii* (1980) e por CHEN (1989) mas todos mostram desvios semelhantes ao da equação de Ross (equação II.6), em relação aos valores experimentais.

II.5. ACIDEZ E POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

A relação entre o pH e a concentração do íon hidrogênio [H^+] é representada por $pH = - \log [H^+]$.

Em alimentos os ácidos de interesse são quase sempre os ácidos

fracos (HA), os quais se dissociam em H^+ e A^- . Em equilíbrio, a razão $[H^+].[A^-]/[HA]$ é uma constante (K_a); ou seja, $K_a=[H^+].[A^-]/[HA]$; que pode ser reescrito $[H^+]=K_a[HA]/[A^-]$ ou $pH=pK_a+\log[A^-]/[HA]$. Se $[A^-]$ e $[HA]$ estão em iguais concentrações, o log da taxa é zero, e $pH=pK_a$. Em outras palavras, $pK_a=pH$ quando a concentração de ácido dissociado e não dissociado são iguais. Ácidos fortes têm baixo pK_a , e portanto são quase totalmente dissociados em solução.

O pH de um alimento é um dos fatores que determina o crescimento e sobrevivência dos microrganismos durante o processamento, estocagem e distribuição. Os microrganismos são afetados pelos ions H^+ livres e pela concentração de ácido fraco não dissociado. Os ânions de alguns ácidos fracos (por exemplo ácido acético ou láctico) são metabolizados dentro da célula da bactéria, tanto que o H^+ é liberado, acidificando o interior da célula a níveis inibitórios. Outros ânions não são metabolizados a níveis tão alto, e portanto não acidificam o interior da célula (CORLETT & BROWN, 1980).

A grande maioria dos conservantes de uso alimentício é constituída de ácidos orgânicos fracos, com características lipolíticas, sendo portanto, solúveis na membrana celular, quando não dissociados e alcançando facilmente o protoplasma da célula microbiana (LEITÃO, 1990).

Entre os ácidos lipolíticos fracos, o acético é bastante efetivo visto que ele não é só condutor de prótons mas também pode produzir concentrações inibitórias de seu ânion dentro da célula.

Os microrganismos têm um valor mínimo, um máximo e um ótimo de pH para crescimento. Em geral, fungos crescem em um pH mais baixo

que as leveduras, e leveduras são mais tolerantes a baixos pH do que são as bactérias.

O pH de tolerância dos microrganismos pode também ser grandemente modificado pela natureza do ácido usado para acidificação. Por exemplo a *Saccharomyces baillii* cresce na presença de altas concentrações de ácido sórbico e benzóico, em valores de pH abaixo do pKa de ácidos orgânicos fracos.

LEISTNER & ROEDEL (1976), estudaram os efeitos dos ácidos tartárico, láctico, cítrico e acético com respeito a inibição de fungos e o acético foi acentuadamente o melhor. Concluíram que o ácido acético é mais efetivo pela sua molécula não dissociada que exerce poder inibitório do que pela sua capacidade de reduzir o pH. Em valores de pH equivalentes, tipos específicos de ácidos orgânicos têm um maior ou menor efeito para fungos e leveduras.

O ácido acético e seus sais são bastantes efetivos contra os fungos, mas podem inibir também bactérias lácticas e leveduras. Somente *Acetobacter spp.*, algumas lácticas, alguns fungos e leveduras são resistentes ao ácido acético. A presença de 1 a 2% de ácido não dissociado em carnes, peixes ou produtos vegetais geralmente destruirá ou inibirá todos os microrganismos, embora sob condições de uso particularmente de pouca higiene, muitos organismos ácido - tolerantes podem ocorrer. Este nível de ácido pode ser reduzido significativamente para produtos refrigerados ou produtos com alto conteúdo de açúcar ou sal. O crescimento da maioria das bactérias deterioradoras de alimentos e esporos é inibido por 0,1% e fungos micotoxigênicos por 0,3% de ácido não dissociado.

Geralmente 0,5% de ácido acético não dissociado é requerido para inibir o crescimento de leveduras, 0,1% de fungos, 0,05% de

enterobactérias.

Alguns exemplos de concentrações de ácidos não dissociados requeridas para inibir crescimento de microrganismos estão na Tabela II.3.

Tabela II.3-Concentração de ácido necessária para inibição de microrganismos (LEISTNER & ROEDEL, 1976).

ácidos orgânicos	concentrações de ácido (%)		
	leveduras	fungos	enterobactérias
acético	0,5	0,1	0,05
benzóico	0,05	0,1	0,01
sorbico	0,02	0,04	0,01

Em valores baixos de pH, um inóculo grande é necessário para iniciar o crescimento microbiano. Por outro lado, altas concentrações de NaCl, e extremos valores de pH são necessários para inibi-los.

A diminuição do pH pode contribuir para a conservação de alimentos de duas maneiras: pela inibição direta do crescimento de microrganismos e pela redução da resistência térmica em alimentos processados termicamente.

Existem algumas limitações para o uso de ácidos orgânicos como inibidores de microrganismos em alimentos:

- 1) geralmente são ineficientes quando a carga microbiana inicial é alta;
- 2) muitos microrganismos usam ácidos orgânicos como fonte de carbono metabolizável;
- 3) há inerente variação na resistência de linhagens individuais;

4) tipos resistentes podem ser selecionados sob as condições de uso.

A eficiência de um ácido orgânico nos alimentos é afetada pela av, pH, potencial de óxido-redução, substrato disponível e conteúdo de gordura. De igual importância na seleção de um ácido orgânico é a microbiota que o ácido orgânico pretende inibir ou destruir, por exemplo: número, tipo e resistência relativa dos microrganismos que vão estar presentes, junto com as suas capacidades de crescimento sob as condições de estocagem e uso.

Concentrações máximas não são usualmente especificadas para certos ácidos orgânicos, como por exemplo, o ácido acético. Por outro lado a adição se dá até um ponto em que a palatabilidade permite.

O ácido acético é reconhecido como seguro (GRAS) pela "Food and Drug Administration" (F.D.A.) dos Estados Unidos (DZIEZAK, 1990).

O ácido cítrico é o acidulante mais utilizado na indústria de alimentos (sorvetes, geléias, vegetais enlatados, etc); é um ácido forte e apresenta características como agente quelante de metais pesados (ANTUNES & CANHOS, 1983). Com respeito à inibição ou crescimento de microrganismos, ele não é tão eficaz porque pode ser substrato de sobrevivência para os mesmos.

O ácido fosfórico é um dos ácidos inorgânicos utilizados na indústria alimentícia. É um ácido forte e proporciona o pH mais baixo de todos os acidulantes. Ele é bastante utilizado na produção de bebidas carbonatadas (ANTUNES & CANHOS, 1983). Assim como o cítrico, pode ser substrato para o metabolismo de microrganismos.

O ácido láctico é utilizado para inibir a deterioração de azeitonas curadas, e para ajustar a acidez na produção de queijos (ANTUNES & CANHOS, 1983).

O ácido tartárico confere sabor extremamente ácido e por isso seu consumo pela indústria de alimentos vem sendo gradativamente substituído, especialmente pelo ácido fumárico (ANTUNES & CANHOS, 1983).

SAPERS *et alii* (1978), compararam a eficiência de alguns ácidos, observando a redução do pH em tomates enlatados, de forma caseira, com ácido cítrico, suco de limão e vinagre. O ácido cítrico e o suco de limão apresentaram abaixamento similar no pH. O vinagre, o acidulante mais fraco, necessitava maiores quantidades para alcançar a mesma redução de pH desejada.

O comportamento do ácido acético, componente principal da acidez do vinagre, é o de não alterar bruscamente o pH por ser um ácido fraco, mas a adição de pequenas quantidades são eficientes para inibirem o crescimento dos microrganismos.

Pela alta capacidade tampão de alguns alimentos grandes quantidades de ácido são fornecidas sem uma correspondente queda do pH.

Reafirma-se então que deve-se avaliar a acidez do meio.

II.6. pH E ATIVIDADE DE ÁGUA

Em regra geral, se um fator inibidor do crescimento é aumentado, outros fatores podem ser usados menos intensamente.

Geralmente, quando a a_w de um alimento é abaixada, o pH limite para crescimento é estreitado. Esses efeitos podem ocorrer com fungos, leveduras e bactérias.

As relações entre a_w e pH são ilustradas na Figura II.4 (MOSSELL, 1975).

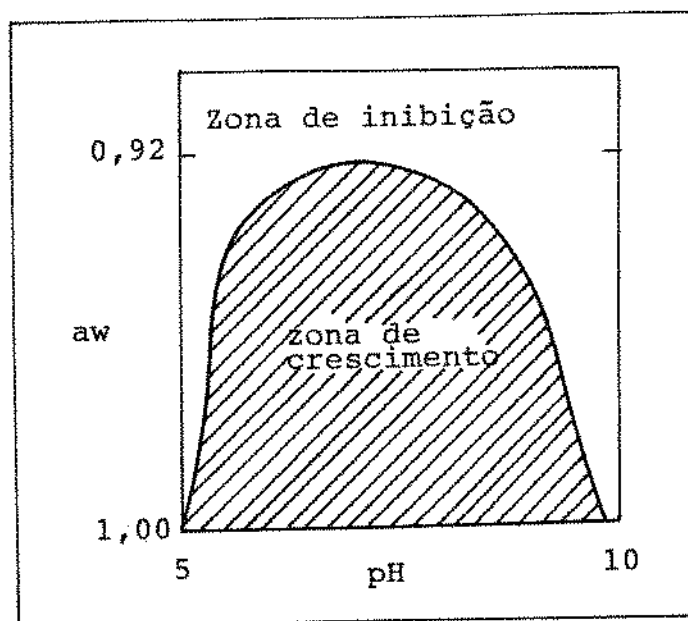


Figura II.4-Efeito da a_w e do pH no crescimento de microrganismos (MOSSELL, 1975).

TROLLER (1995), mostrou que quando misturas de umectantes e ácidos são testadas, o cloreto de sódio é mais eficiente que a sacarose ou glicose em soluções ácidas e que a quantidade de cloreto de sódio requerida para exercer um efeito bactericida poderia ser reduzida 30% quando usada na presença da metade da concentração de ácido inibidor de microrganismo.

A importância das interações a_w /pH para controlar o crescimento de microrganismos deterioradores de alimentos é reconhecida pelas autoridades sanitárias. Nos Estados Unidos, alimentos com um nível de $a_w < 0,95$ ou $pH \leq 4,6$ não requerem processamento térmico intenso (esterilização) porque não crescerá *Cl.botulinum*. LEISTNER & ROEDEL (1978), sugeriram que produtos cárneos sejam classificados em grupos de estabilidade, baseando em valores de a_w e pH. Esta sugestão resultou na adoção deste princípio como guia para o Mercado Comum Europeu para produtos de carne.

Entre outras transformações nos alimentos, o pH também influencia o escurecimento dos produtos. Aumentando o pH aumenta a taxa de escurecimento enzimático e não enzimático (WILLIAMS, 1976). A reação é lenta em pH ao redor de 5 e 6, e aumenta rapidamente com o aumento do pH.

II.7. POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUÇÃO

Enquanto o pH dos alimentos é facilmente medido e as implicações desses valores bem entendidas, é muito mais difícil medir o potencial de óxido-redução e; a relevância dos valores

obtidos, para a microbiologia não é clara.

O potencial de óxido-redução (Eh) é um índice do grau de oxidação de um substrato. Quanto mais oxidado um substrato, tanto mais positivo será o seu potencial.

O potencial de óxido-redução de um alimento influencia o tipo de microrganismo deteriorador que desenvolverá, uma vez que o Eh está relacionado com a concentração de oxigênio do ambiente no qual o alimento está armazenado (TILBURY, 1976).

O Eh do ambiente é um fator determinante de crescimento de microrganismos, por ser um agente seletivo ou um fator que influencia o metabolismo de microrganismos.

Microrganismos aeróbios requerem valores de Eh positivos para o crescimento, enquanto os anaeróbios frequentemente requerem valores negativos de Eh. Os microrganismos anaeróbios facultativos se desenvolvem em ambientes com Eh positivo ou negativo, como por exemplo as leveduras fermentativas e bactérias anaeróbias facultativas (BROWN & EMBERGER, 1980); este mesmo comportamento apresentam os microrganismos aeróbios facultativos. Os microrganismos aeróbios estritos (por exemplo *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, micrococos, *Pseudomonas*, *Acinobacter* e *Moraxellae*) utilizam oxigênio para a respiração. Embora eles devam ser proteolíticos ou lipolíticos, seus produtos de metabolismo incluem água e dióxido de carbono. Eles são uma fração importante da microbiota somente quando oxigênio (Eh positivo) está totalmente disponível (por exemplo a grande parte dos fungos), como é o caso de superfícies de carnes ou outros alimentos estocados "no ar" (BROWN & EMBERGER, 1980). Somente representantes de bactérias tolerantes à av do gênero *Micrococcus* são inibidas por um baixo potencial de óxido-redução.

Os A.U.I. que possuem baixo Eh e alta acidez podem se deteriorar somente por leveduras osmofílicas.

Durante o armazenamento o Eh é o fator de estabilidade extrínseca dos A.U.I..

Eh x av

A av mínima na qual ocorrerá crescimento, é menor sob condições aeróbicas do que sob condições anaeróbicas para aqueles microrganismos capazes de crescerem facultativamente.

As leveduras aparentemente toleram níveis mais baixos de av aerobicamente do que anaerobicamente.

Existem dificuldades em se medir o potencial de óxido-redução, o que impede muitos pesquisadores de estudar mais este parâmetro. O possível efeito do Eh influenciar a av mínima para crescimento de microrganismos precisaria ser melhor estudado (ROBERTS & SMART, 1976).

II.8. CONSERVANTES

Para a estabilidade de produtos alimentícios semi-úmidos é importante a incorporação de agentes antimicrobianos. Alguns tipos podem ser incorporados juntamente aos ingredientes a serem processados, outros podem simplesmente dispersar na superfície do produto. E outros, ainda, podem ser aplicados na embalagem que entrará em contato com o produto.

Um antimicrobiano deve ser adicionado principalmente para prevenir o crescimento de fungos e leveduras.

Os conservantes utilizados em alimentos podem manifestar suas

atividades através de um efeito letal sobre os microrganismos, com efeitos fungistáticos ou bacteriostáticos (LEITÃO, 1990).

São relativamente poucos os conservantes de uso liberado em alimentos, principalmente pelas exigências estabelecidas pelos órgãos oficiais de normatização de alimentos, com relação a inocuidade de aditivos necessariamente ingeridos conjuntamente com os alimentos.

a. Acido benzóico

O ácido benzóico livre apresenta baixa solubilidade em água, razão pela qual normalmente são empregados os seus sais (benzoato de sódio ou cálcio), com solubilidade mais elevada.

O ácido benzóico apresenta um $pK_a=4,20$, exercendo sua atividade antimicrobiana máxima na faixa de pH entre 0,5 e 4,0. O espectro de atividade antimicrobiana deste conservante é bastante amplo, com máxima eficiência contra as leveduras e bactérias, e ligeiramente inferior contra os bolores (LEITÃO, 1990). O uso principal dos benzoatos é na preservação de pickles, molhos ácidos, sucos de frutas e refrigerantes, margarina, geléias, peixes semi-preservedos.

O benzoato de sódio não apresenta alterações na cor nem no sabor dos alimentos. Deve ser usado a níveis que não excedam a quantidade requerida para produzir o efeito desejado. Níveis usuais correntes para alimentos são ao redor de 0,1%.

b. Acido sórbico e sorbatos

O ácido sórbico é o único ácido orgânico insaturado permitido para uso como conservante de alimentos. O ácido sórbico tem baixa solubilidade em água, entretanto o seu sal (sorbato de potássio)

apresenta maior solubilidade em água e é a forma mais utilizada deste conservante.

O ácido sórbico apresenta um $pK_a=4,8$, tendo sua atividade antimicrobiana aumentada com a diminuição do pH.

O espectro de sua ação antimicrobiana é relativamente amplo, particularmente contra bolores, leveduras e bactérias com reação de catalase positiva, sendo efetivo, portanto, na inibição da contaminação aeróbica de alimentos. Ele é praticamente ineficiente no controle de bactérias lácticas e nas do gênero *Clostridium* (LEITÃO, 1990).

Os sorbatos são eficazes na conservação de produtos como xaropes de chocolate, geléias, bolos, frutas secas e molhos para saladas.

c. Ácido propiônico e propionatos

O ácido propiônico e seus sais é um dos conservantes mais antigos, principalmente em produtos de panificação.

Em decorrência de seu poder corrosivo, o ácido propiônico líquido, é muito pouco utilizado; os sais, principalmente de sódio e cálcio, são muito empregados, liberando ácido livre no alimento em pH menor. O sal sódico tem elevada solubilidade em água apresentando $pK_a=4,9$ (LEITÃO, 1990).

O espectro da atividade antimicrobiana dos propionatos é bem peculiar. Eles são particularmente eficientes no controle de bolores e praticamente sem qualquer atividade contra as leveduras.

II.9. SINERGISMO

À medida que as combinações de agentes antimicrobianos estão

sendo mais corretamente utilizadas na indústria de alimentos, é preciso caracterizar melhor suas interações. Os agentes antimicrobianos combinados foram bastante estudados para a indústria farmacêutica, mas a aplicação de tais combinações para a preservação de alimentos não tem sido muito explorada (DAVIDSON & PARISH, 1989).

Na discussão feita com relação a acidez, av, Eh ou conservantes colocou-se que o valor ótimo de um parâmetro para ocorrência de reações nos alimentos pode ser modificado se outros parâmetros forem usados conjuntamente. Com este efeito aditivo e algumas vezes multiplicativo, pode-se usar quantidades menores de agregados para se obter a estabilidade do produto.

Quando dois antimicrobianos são usados combinados, três situações podem ocorrer (DAVIDSON & PARISH, 1989). Primeiro, pode haver um efeito acumulado: "o efeito combinado de dois agentes é igual à soma dos efeitos observados com os dois agentes testados separadamente ou igual a aquele do agente mais efetivo". A segunda ocorrência pode ser sinérgica: "o efeito observado com uma combinação é maior que a soma dos efeitos observados com os dois agentes independentemente". Sinergismo refere-se a um aumento da atividade antimicrobiana global de um componente quando na presença de um segundo agente antimicrobiano.

Finalmente, numa combinação um componente pode ter antagonismo com o outro. Isto ocorre quando a atividade antimicrobiana de um componente é reduzida na presença deste outro.

Interações sinérgicas são devidas geralmente a uma inibição seqüencial de um patamar bioquímico comum, usos de compostos que inibem enzimas que inativam os antimicrobianos; e outras interações (KROGSTAD & MOELLERING, 1986). Sinergismo é indicado, por exemplo,

pela inibição de crescimento em áreas aonde agentes individuais se encontram em concentrações subinibitórias (DAVIDSON & PARISH, 1989).

Os diagramas da Figura II.5 são representações de diferentes tipos de interações entre espécies móveis de reativos (solutos) (DUCKWORTH *et alii*, 1986):

a)efeito sinérgico, por exemplo sacarose (X) e ácido ascórbico (Y)

b)efeito sinérgico com abaixamento de ponto de mobilização, por exemplo prolina (X) e glicose (Y).

c)efeito antagônico, por exemplo sacarose (X) e glicose (Y).

Os dados para construção da Figura II.5 foram obtidos pela técnica NMR (Ressonância magnética nuclear/ordenada do gráfico) que permite mostrar que o comportamento de uma substância solúvel é peculiar àquela substância, mas que quando vários solutos diferentes estão presentes vários tipos de interações podem ocorrer.

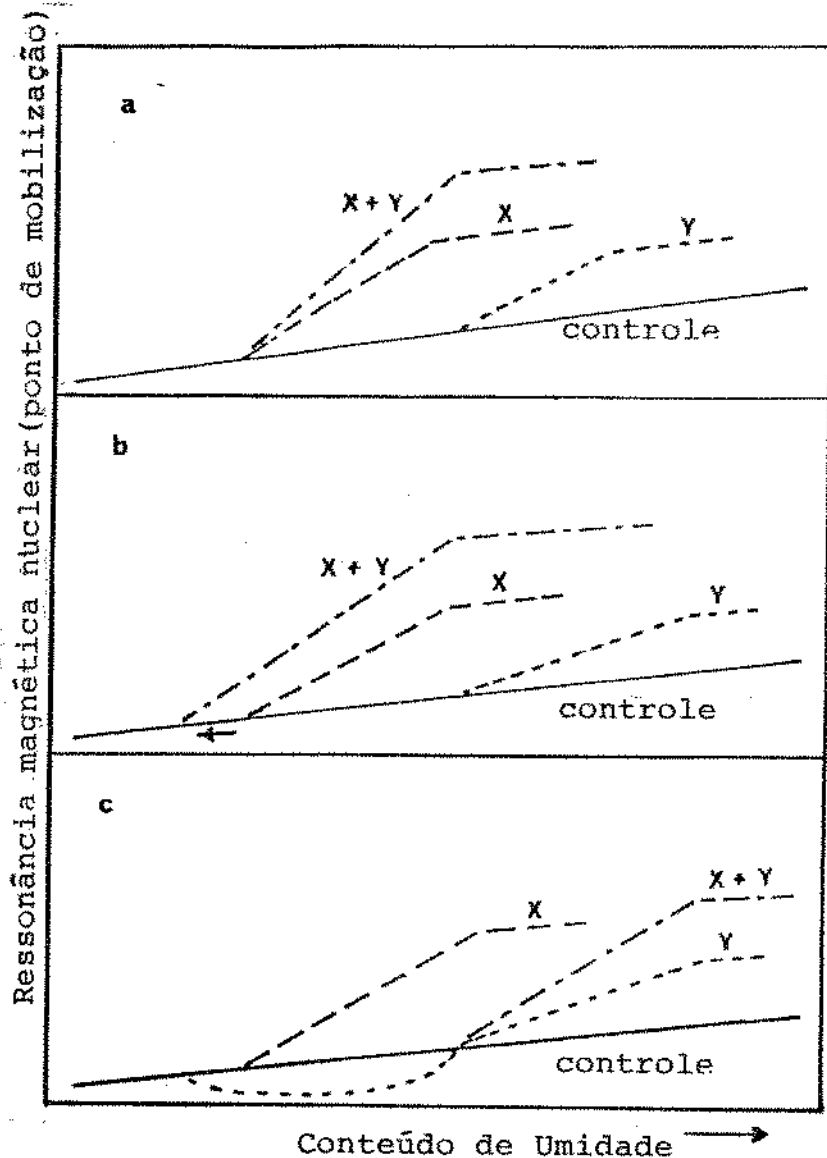


Figura II.5 - Representações de diferentes tipos de interações entre espécies móveis de solutos. Diagrama a: efeito sinérgico, por exemplo sacarose (X) e ácido ascórbico (Y). Diagrama b: efeito sinérgico com abaixamento do ponto de mobilização, por exemplo prolina (X) e glicose (Y). Diagrama c: efeito antagônico, por exemplo sacarose (X) e glicose (Y) (DUCKWORTH, 1986).

O lactato de sódio usado com cloreto de sódio produz um resultado sinérgico particularmente eficaz.

Açúcares adicionados de glicerol não produzem bom efeito, e a eficácia na redução da av é prejudicada quando se adiciona citrato (CANTUNES & CANHOS, 1983).

Já foi observado que não há efeito sinérgico entre diferentes conservantes e a av. No entanto, este efeito pode ocorrer entre a av e o pH, precisando ser melhor estudado de acordo com LEISTNER (1990). A adição de cloreto de sódio com ácido acético e óleos essenciais produz um excelente efeito sinérgico (KURITA & KOIKE, 1982).

Outras combinações já foram estudadas, como por exemplo, benzoato com dióxido de carbono mais cloreto de sódio ou sacarose; propionato com dióxido de carbono; sorbato com sacarose e cloreto de sódio ou com nisina com ácido acético; propionato com sorbato contra estafilococos; ácido benzóico com ácido bórico contra aspergillus, e outras.

Quando tais combinações são encontradas juntamente com a otimização dos outros obstáculos referidos nas seções anteriores, baixas concentrações de cada antimicrobiano são suficientes para a preservação efetiva dos alimentos.

III-METODOLOGIA

III.1. ENSAIOS COM EXTRATO DE TOMATE

Os ensaios programados visando definir as condições e formulações mais adequadas para o armazenamento da polpa industrial podem ser divididos em dois grupos.

a. ENSAIOS PRELIMINARES

Os objetivos dos ensaios preliminares foram dois: o primeiro foi avaliar as mudanças na qualidade e características do concentrado de tomate com a adição de ácidos e de solutos. Esperava-se levantar dados para poder selecionar alguns coadjuvantes de conservação e com isso simplificar a gama de variáveis a serem consideradas nos experimentos definitivos; o segundo objetivo foi avaliar diferenças de comportamento de extratos de origens diferentes.

b. ENSAIOS DE ESTABILIDADE

Foram feitas duas seqüências de experimentos. O primeiro denominado de 1^o DELINEAMENTO EXPERIMENTAL nos meses de novembro de 1989 a novembro de 1990, utilizando-se além de um soluto e um ácido, dois conservantes químicos.

A complementação foi feita nos meses de maio de 1990 a maio de 1991, chamado de 2^o DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, no qual as formulações excluíram os conservantes.

1. PRIMEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O 1º experimento foi estatisticamente delineado em superfície de resposta do tipo central rotacional de 2º ordem (BOX *et alii*, 1978; DANIEL, 1976) para combinar e avaliar os efeitos de quatro variáveis independentes: S (soluto-cloreto de sódio), A (ácido-ácido acético), C₁ (conservante 1 - benzoato de sódio) e C₂ (conservante 2-sorbato de potássio). Cada variável foi examinada em 5 níveis, igualmente espaçados e codificadas como -2, -1, 0, +1, +2. O experimento foi composto de 32 combinações das variáveis, preparadas em sequência aleatória, 25 das quais foram de combinações diferentes e 7 de repetições ao nível 0, formando o ponto central do delineamento. Os limites superiores das substâncias agregadas foram selecionadas de acordo com: a quantidade permitida por lei no produto diluído direto ao consumo - caso do cloreto de sódio; a quantidade geralmente agregada em produtos similares quando não previsto na lei para concentrado de tomate - caso dos conservantes, e pelo aspecto sensorial. Os limites inferiores foram estabelecidos pelas quantidades mínimas intencionais de variação dos fatores de obstáculos como: reduções da av, pH e mínima adição de conservantes.

2. SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O 2º experimento foi estatisticamente delineado em superfície de resposta do tipo central rotacional de 2º ordem (BOX *et alii*, 1978; DANIEL, 1976) para avaliar o efeito combinado de duas variáveis independentes: S (soluto-cloreto de sódio) e A (ácido-acético) na estabilidade do concentrado de tomate. Cada variável foi examinada em 5 níveis codificadas como -1,4142; -1; 0; +1; +1,4142. O experimento foi composto de 13 combinações das variáveis

sendo todos os ensaios realizados simultaneamente. Nove eram combinações diferentes e cinco de repetições ao nível 0, formando o ponto central do delineamento. Os limites superiores de S e A foram reduzidos em relação ao 1^o experimento.

Nos dois experimentos as amostras selecionadas foram avaliadas sensorialmente.

III.2. PRODUTO

Foi estudado o extrato de tomate triplo concentrado industrial, processo "hot-break", denominado comercialmente como polpa industrial. Não foi possível especificar a variedade de tomate usada porque para um mesmo lote a ser concentrado são utilizados tomates de várias procedências.

Foram feitos ensaios com extratos de duas indústrias situadas em locais diferentes, para verificar se a procedência e variedades dos tomates influenciam no comportamento dos concentrados. Para esta avaliação foram também feitas comparações com alguns dados encontrados na literatura.

As amostras para este trabalho foram fornecidas pela Cia. Industrial de Conservas Alimentícias-CICA, da unidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (codificada no experimento como Extrato de Tomate A); e, pela Cia. Industrial e Mercantil Paoletti, da unidade de Araçatuba, Estado de São Paulo (codificada no experimento como Extrato de Tomate B). Ambas processadas na safra de 1989.

As concentrações dos extratos fornecidos variavam de 28 e

30° Brix.

Para os ensaios preliminares utilizou-se produtos das duas fontes: extrato A acondicionado em tambor de 200 litros o qual foi reprocessado na Seção de Operações Unitárias/ITAL e recondicionado em latas número 10; e, extrato B já acondicionado nesse tipo de lata.

O concentrado de tomate para os ensaios do 1^o e 2^o delineamento experimental foi recebido da CICA, em latas de 20 litros para facilitar o manuseio.

Os produtos recebidos foram avaliados microbiológica, física e quimicamente.

III. 3. ANÁLISES

3.1. ACIDEZ TOTAL E CURVAS DE ACIDEZ

A acidez total foi determinada pelo método acidimétrico da A. O. A. C. ; n^o 9.119 (HORWITZ, 1980).

A acidez está expressa em percentagem de ácido cítrico.

A curva de acidez foi levantada para se determinar a quantidade exata de ácido que deve ser adicionada ao produto para o mesmo atingir a acidez ou o pH desejado.

3.2. ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w) TEÓRICA, EXPERIMENTAL; E. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO HIGRÔMETRO.

Como primeiro passo para a formulação do produto final foi necessário determinar as quantidades de soluto requeridas para alcançar níveis desejados de a_w.

Para o cálculo das a_w teóricas das soluções de cloreto de sódio

(NaCl), eletrólito forte, utilizou-se o Modelo de Pitzer (Seção II.4.d.1.).

Para o cálculo das av teóricas das soluções de glicerol e sorbitol, não-eletrólitos, utilizou-se o Modelo de Norrish (Seção II.4.d.2.).

Para o cálculo das av teóricas das misturas utilizou-se o Modelo de Ross (Seção II.4.e.), conhecendo-se experimentalmente a av do concentrado original.

A medida experimental da av das amostras foi feita em um higrômetro eletrônico, digital, "NOVASINA THERMOCONSTANTER", fabricado pela NOVASINA-Suíça, modelo EEJA-3, com 3 células para amostras e câmara com temperatura controlada.

A temperatura para leitura da av foi controlada a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Nos ensaios preliminares foram medidas as av dos concentrados puros e com adição de solutos a várias concentrações.

A metodologia para medida seguiu critérios conhecidos (JARDIM,1987).

Antes de cada série de determinações, a precisão do higrômetro era aferida e de acordo com a necessidade, construía-se uma curva de calibração à mesma temperatura com de soluções salinas saturadas, padrões de referência, dentro da faixa de trabalho do experimento.

3.3. BRIX (SÓLIDOS SOLÚVEIS)

O grau Brix foi determinado por refratômetro de acordo com L.M.F.C.P. (1968).

O refratômetro usado foi do modelo ABBÉ, fabricado pela THE BAUSCH & LOMB, U.S.A..

Periódicamente fazia-se a calibração do aparelho de acordo com

a especificação de seu catálogo.

Para produtos de tomate comumente se usa a leitura dos graus Brix como medida do teor de sólidos solúveis.

Todos os valores mencionados são com referência à temperatura de 20°C e, não foram corrigidos quanto à acidez pela inexistência de tabela de correção para ácido acético.

3.4. CINZAS

As cinzas foram determinadas para caracterização do concentrado de tomate original, pelo método da A.O.A.C., nº 11.019 (HORWITZ, 1980).

3.5. CLORETO DE SÓDIO

O cloreto de sódio foi determinado para caracterização do concentrado de tomate original, pelo método argentométrico de VOLHARD (CHARTER & FISHER, 1971).

3.6. CONSISTÊNCIA

A consistência foi determinada pela metodologia descrita em L.M.F.C.P., 1968; com um consistômetro Bostwick. Os resultados são dados em centímetros.

3.7. COR

A cor das amostras foi medida por meio do espectrofotômetro COMCOR 1500 PLUS (fabricado pela COMEXIM Mat. Primas. Indústria e Comércio Ltda.); com a configuração CRIIL e ângulo de 10 graus.

Para a análise as amostras foram diluídas a $8,5 \pm 0,1\%$ de sólidos solúveis, pela adição de água destilada (WOLCOTT *et alii*, 1980) e, em seguida desaeradas.

As leituras de cor foram feitas com o Iluminante C, e no

sistema Hunter onde L mede a luminosidade da amostra ou seja o quanto a cor é clara ou escura, a mede a intensidade de vermelho e b mede a intensidade de amarelo. Para a leitura, as amostras apresentavam opacidade comprovada.

Foram calculados os valores de diferença total da cor ($\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$) para comparação (FRANCIS & CLYDESDALE, 1975).

No 1^o delineamento experimental as amostras foram visualmente avaliadas e comparadas quanto a variabilidade da cor com um extrato de tomate adquirido no comércio em boas condições, por uma equipe de quatro julgadores com discriminação superior e normal para cores.

3.8. FIBRA BRUTA

A fibra bruta foi determinada para caracterização do concentrado de tomate original, pelo método AOCS-AOAC, n^o 7.061 e 7.065 (HORWITZ, 1980).

3.9. MATÉRIA-GRAXA

As substâncias graxas foram determinadas para caracterização do concentrado de tomate original, pelo Método de STOLD-WEIBULL (ANGELUCCI *et alii*, 1963).

3.10. MICROBIOLÓGICA

As amostras de concentrado de tomate original e inoculadas foram examinadas quanto ao desenvolvimento de bactérias lácticas, bolores e leveduras segundo a metodologia recomendada em SPECK (1984).

3.11. PECTINA

A pectina foi determinada para caracterização do concentrado de tomate original, pelo Método de CARRÉ & HAYNES (PEARSON, 1970).

3.12. pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, n^o4.7.2. (LARA et alii, 1976). Utilizou-se um pHmetro, marca INCIBRÁS.

3.13. PROTEINA

A proteína foi determinada para caracterização do concentrado de tomate original, pelo Método de KJELDAHL (ANGELUCCI, et alii, 1982).

3.14. SENSORIAL

Para a avaliação sensorial as amostras foram servidas quente, como molho, juntamente com macarrão (cozido sem sal). Para o preparo do molho, os concentrados de tomate foram diluídos para 10^o Brix.

Foram selecionados onze provadores para participarem do teste, representantes de diferentes grupos sociais, acostumados com macarrão com molho de tomate. Para a avaliação foi escolhido o Método Sensorial de Preferência (MORAES, 1978), e utilizou-se uma ficha que solicitava ao provador, também a sua preferência.

3.15. SÓLIDOS TOTAIS

Os sólidos totais foram determinados pelo método da AOAC, n^o 32.004 (HORWITZ, 1980).

3.16. VISUAL

Durante avaliação da vida de prateleira das amostras do 1º delineamento experimental, eram feitas observações visuais, sistemáticas e minuciosas, quanto à visível deterioração microbiológica, descoloração, secagem superficial e mudanças na cor do concentrado de tomate preparado.

Todas as observações eram anotadas. Quando era percebida alteração da cor, o que ocorria sempre na camada superficial do produto dentro do vidro, delineava-se essa camada na parte externa do frasco para observação do aumento da espessura da camada escurecida. Para esta avaliação eram utilizados os recipientes com as "contra-amostras", não usados para retirada de amostras para análises.

III.4. FORMULAÇÃO DAS AMOSTRAS E INOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS

As latas do concentrado de tomate, pasteurizadas e hermeticamente fechadas (ver Item III.2.), eram abertas no momento do preparo das misturas.

Nos ensaios do 1º delineamento experimental, agregou-se o cloreto de sódio, o benzoato de sódio, e o sorbato de potássio ao concentrado de tomate sob agitação e, em seguida colocou-se o ácido. A amostra era misturada em uma bateadeira tipo planetária, durante 15 minutos para homogeneização. Por fim fazia-se a inoculação dos microrganismos homogeneizando-se novamente por mais 5 minutos.

A inoculação foi feita com uma suspensão contendo algumas espécies de bactérias lácticas, bolores e leveduras comuns na microbiota deteriorante deste produto.

A suspensão de bactérias lácticas continha cepas de

Lactobacillus plantarum e *Lactobacillus fermentum*, a suspensão de leveduras cepas de *Zygosaccharomyces baillii* e *Saccharomyces cerevisiae* e a suspensão de bolores espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*.

Foram preparadas suspensões dos citados grupos de bactérias lácticas, leveduras e bolores em concentrações de: $5,1 \times 10^7$ UFC/ml; $1,4 \times 10^7$ UFC/ml e $2,8 \times 10^6$ UFC/ml respectivamente. As concentrações foram avaliadas em princípio pela Câmara de Petroff, seguido de plaqueamento nos meios adequados recomendados em SPECK (1984).

As amostras de concentrado de tomate foram inoculadas com as suspensões mencionadas, obtendo-se uma contaminação do produto de $1,3 \times 10^4$ UFC/g; $3,7 \times 10^4$ UFC/g e $7,0 \times 10^2$ UFC/g de bactérias lácticas, leveduras e bolores, respectivamente.

O 2º delineamento experimental realizado incluiu somente cloreto de sódio e ácido acético como aditivos. O procedimento foi idêntico ao descrito para o 1º experimento.

Foram preparadas suspensões de bactérias lácticas, leveduras e bolores em concentrações de: $3,3 \times 10^8$ UFC/ml; $1,2 \times 10^7$ UFC/ml e $3,0 \times 10^5$ UFC/ml respectivamente.

As amostras foram inoculadas com as suspensões mencionadas, obtendo-se uma contaminação inicial do produto de $1,3 \times 10^5$ UFC/g de bolores e leveduras e $4,4 \times 10^5$ UFC/g de bactérias lácticas.

IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. PRODUTO

As amostras de concentrado de tomate, recebidas das indústrias, foram avaliadas microbiologicamente não apresentando nenhum crescimento de bactérias, fungos e leveduras.

A caracterização química das amostras está apresentada na Tabela IV.1.

Tabela IV.1 - Caracterização dos concentrados de tomate usados nos ensaios.

Análise (%)	Extrato A	Extrato B	Extrato A*
Umidade	62,90	68,63	70,29
Cinzas	3,79	2,88	3,33
Matéria Graxa	0,51	0,41	0,85
Fibras	3,03	2,00	2,42
Proteína	5,22	5,28	4,52
Açúcares totais	19,22	16,81	13,78
Pectina	2,11	0,71	2,54
Açúcares Redutores	18,22	14,22	12,64
Cloreto de sódio	0,60	0,42	0,11
Acidez	2,81	2,32	1,58
Graus Brix	30,4	28,0	29,0
pH	4,4	4,45	4,33

* Utilizados nos 1^o e 2^o delineamentos experimentais

IV.2. ENSAIOS PRELIMINARES

Efeitos individuais com a adição de solutos e ácidos no concentrado de tomate foram avaliados.

1. Efeito da adição de ácidos na cor do concentrado de tomate

Avaliou-se a influência dos ácidos mais usados na indústria de alimentose nas percentagens citadas na Tabela IV.2. O ácido sórbico não foi usado por ser adstringente e de difícil dissolução.

Tabela IV.2 - Relação dos ácidos e suas concentrações.

Ácidos	Concentração (%)					
Acético P.A.	0,99	1,48	1,96	2,44	2,91	3,57
Cítrico anidro P.A.	0,10	0,20	0,50	0,99	1,96	2,90
Fosfórico P.A.	0,50	0,79	1,67	1,96	2,53	2,90
Láctico P.A.	0,99	2,44	3,85	5,66	7,41	9,09
Tartárico P.A.	0,50	0,99	1,96	2,90	3,85	4,76

Após a adição dos ácidos nos extratos de tomate A e B, as amostras eram bem homogeneizadas (com agitador mecânico) e analisadas.

A cor foi avaliada pela diferença total, ΔE , entre a cor do concentrado original e a do concentrado após adição e equilíbrio com os ácidos.

As Figuras IV.1 e 2 mostram as variações na leitura de cor dos concentrados de tomate A e B após a adição dos ácidos.

Observou-se que o ácido tartárico provoca uma alteração apreciável na cor do extrato, destacando-se dos demais, como se pode ver pelas curvas da Figura IV.1. Esta alteração pode ser visualmente constatada no concentrado diluído, devido ao surgimento de alguns pontos brancos dispersos aparentando ser um descolorimento de substâncias fibrosas. Devido a esse contundente resultado, o ácido tartárico foi descartado já nos ensaios com o extrato B (Figura IV.2).

Os demais ácidos apresentaram valores de ΔE considerados aceitáveis não se percebendo alterações visíveis da cor.

Comparando as Figuras IV.1 e 2 observou-se que os extratos A e B apresentaram comportamentos semelhantes perante a adição de ácidos.

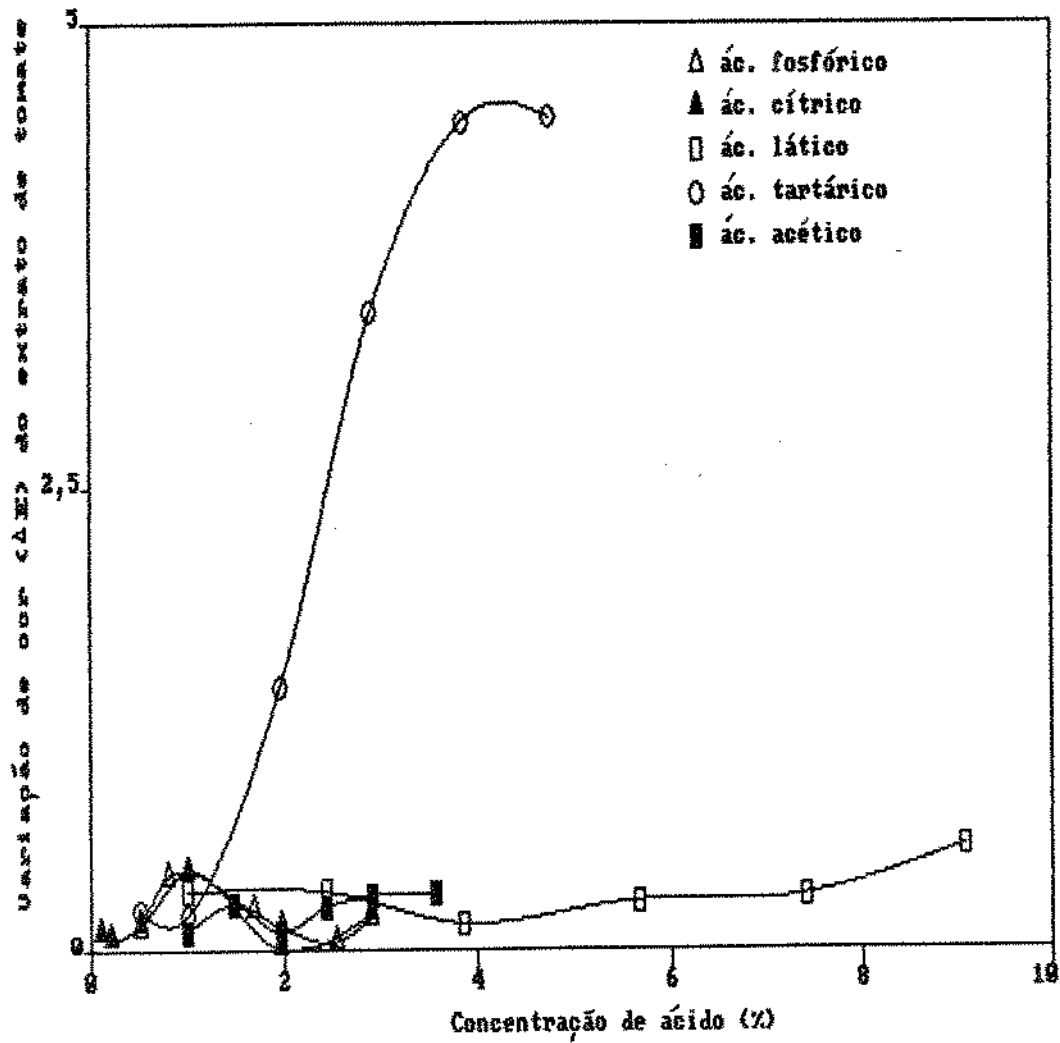


Figura IV.1 - Efeito dos ácidos na cor do extrato de tomate A.

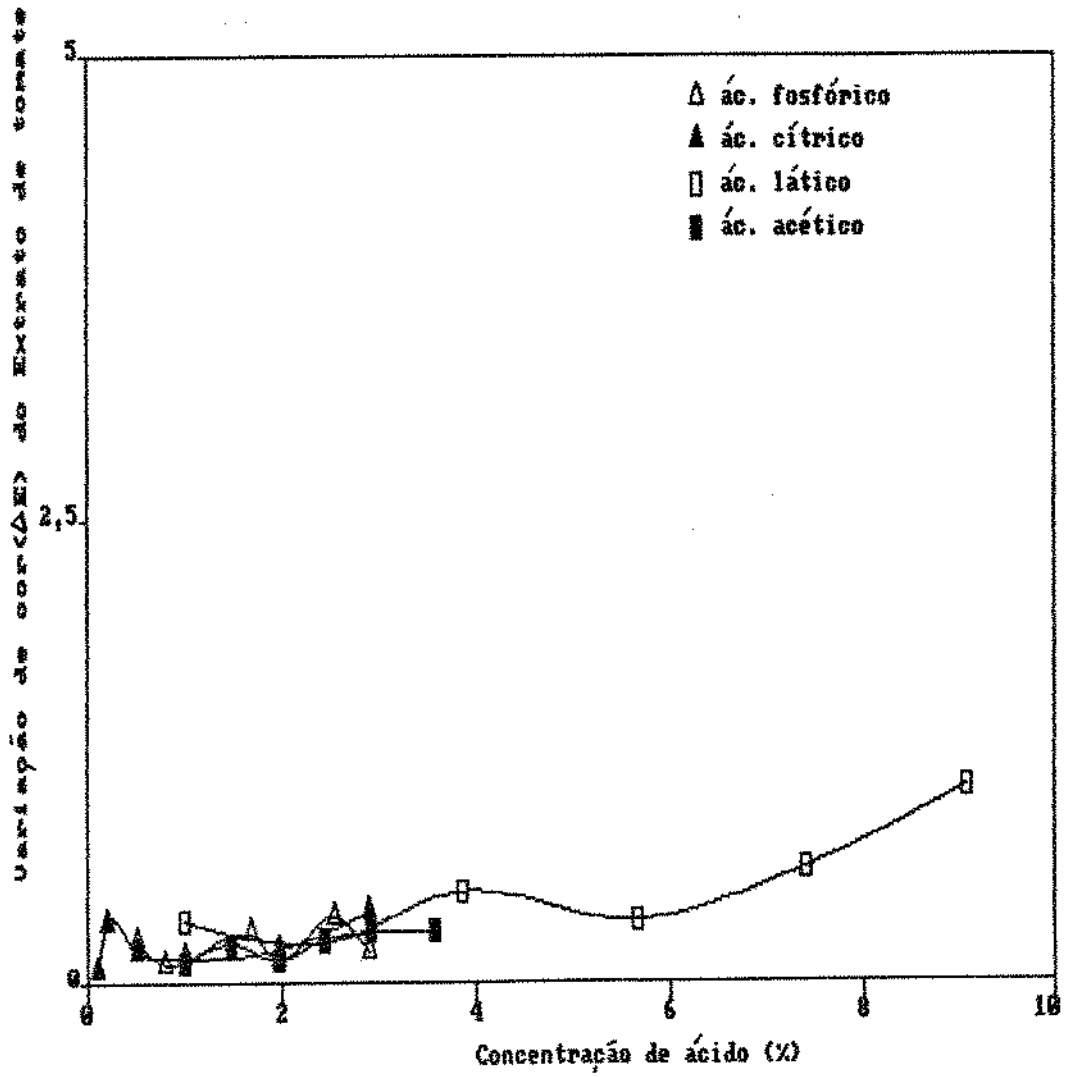


Figura IV.2 - Efeito dos ácidos na cor do extrato de tomate B.

2. Efeito da adição de ácidos na acidez e no pH do concentrado de tomate.

As amostras preparadas para os ensaios de cor, antes de diluir, foram utilizadas para verificação da variação da acidez e do pH do concentrado de tomate.

Alguns testes foram feitos com os extratos A e B para confirmar a similaridade de seus comportamentos.

Os resultados locados na Figura IV.3 indicam que o ácido fosfórico abaixa mais o pH do concentrado de tomate seguido pelo cítrico e pelo láctico, nas mesmas concentrações. O ácido acético, ácido não dissociado, abaixa pouco o pH do concentrado de tomate.

Para comparar o comportamento dos extratos A e B foram traçadas as curvas da Figura IV.4 obtidas com os ácidos cítrico e fosfórico. Observa-se claramente que os dois extratos se comportam de maneira parecida na variação do pH com a adição de ácidos.

Após esses resultados, decidiu-se realizar os testes complementares com ácidos, usando somente o extrato de tomate A.

Considerando que o ácido fosfórico foi o que apresentou maior efeito sobre o pH do concentrado de tomate e, o ácido acético ser um dos ácidos de reconhecidas propriedades antimicrobianas construiu-se as curvas de acidez desses ácidos.

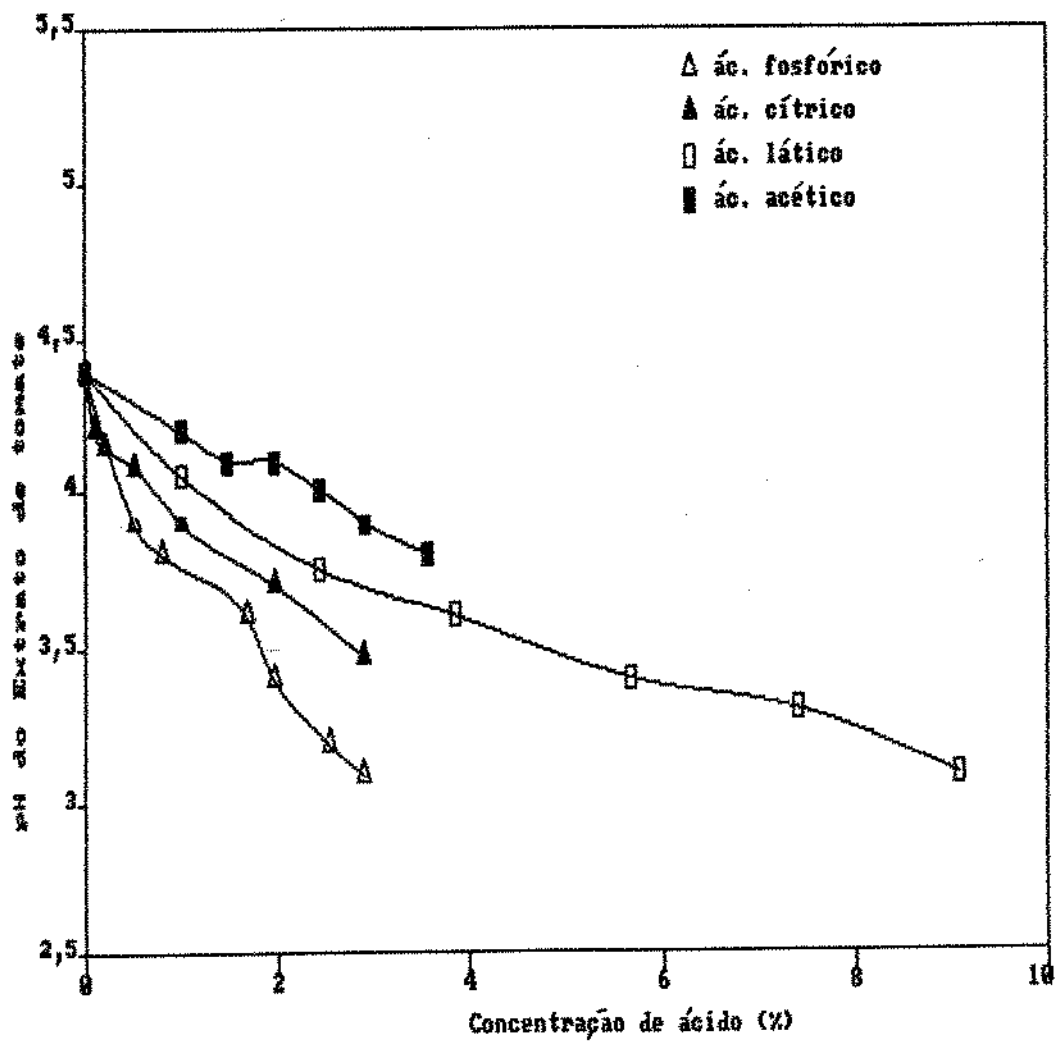


Figura IV.3 - Efeito dos ácidos no pH do extrato de tomate A.

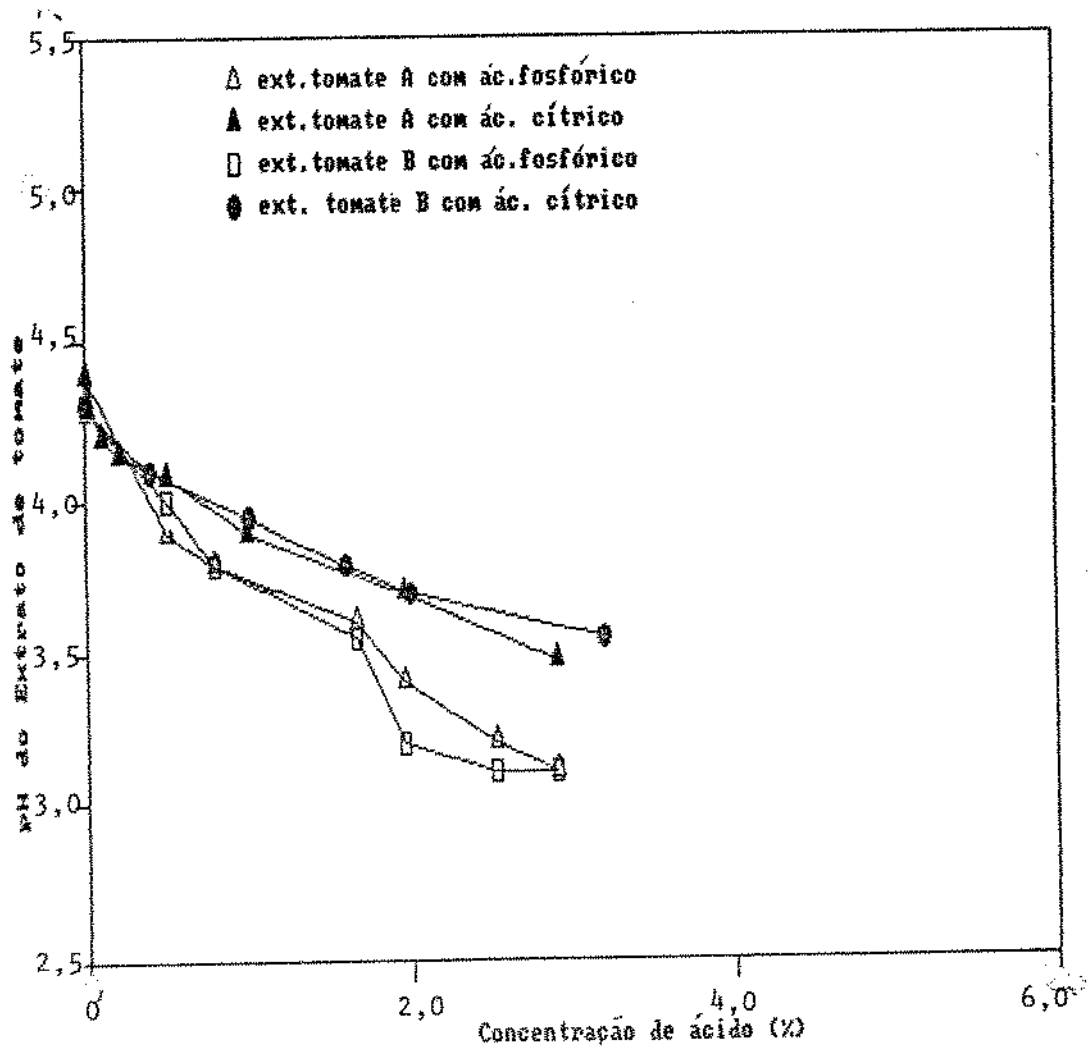


Figura IV.4 - Efeito dos ácidos no pH dos extratos de tomate A e B.

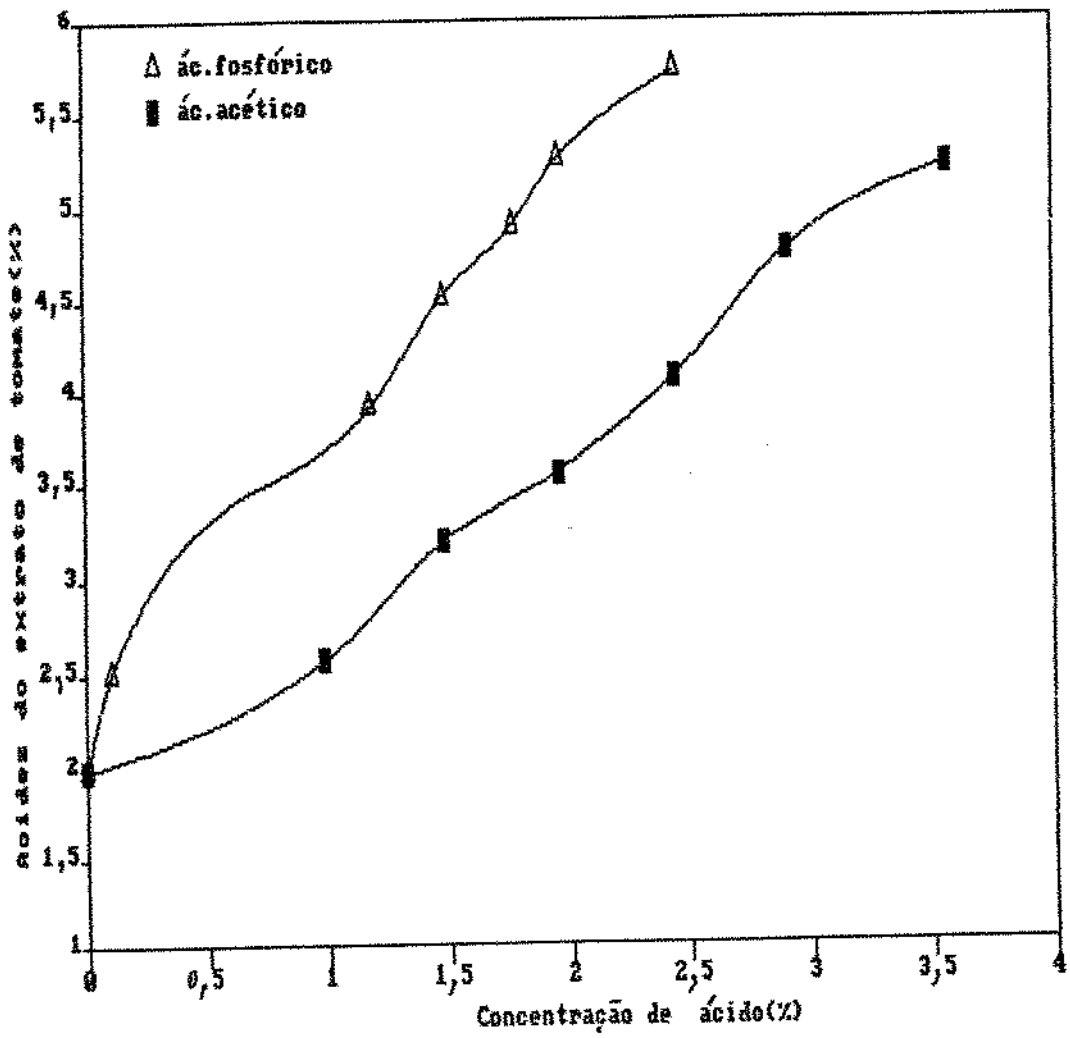


Figura IV.5 - Efeito dos ácidos na acidez do extrato de tomate.

Pela Figura IV.5 confirma-se que a adição do ácido acético no concentrado de tomate provoca menor aumento em sua acidez do que o ácido fosfórico.

Para selecionar o ácido a ser usado nos ensaios, entretanto, é preciso seguir critérios mais amplos do que a simples acidez do meio para inibir o crescimento de microrganismos deterioradores do produto.

O ácido cítrico além de possuir sabor forte pode formar citrato que poderá ser substrato para o metabolismo de crescimento dos microrganismos causando um efeito contrário ao desejado. Este efeito também pode ocorrer com a adição do ácido fosfórico com a formação de fosfato.

O ácido láctico apesar de ser um ácido fraco é menos tóxico aos microrganismos que o ácido acético.

O ácido acético não provoca grande alteração na cor do concentrado de tomate, e é um ácido orgânico não dissociado. Seu pK_a , a $25^{\circ}C$, é igual a 4,75, maior que os valores de pK_a dos outros ácidos; portanto mais tóxico aos microrganismos. O ácido sórbico, conservante bastante efetivo, possui $pK_a=4,8$; entretanto, o seu uso é mais restrito por apresentar baixa solubilidade em água e ser adstringente. O ácido acético possui boa solubilidade à temperatura ambiente e grande poder para inibir o crescimento de microrganismos, tendo esse efeito sido reconhecido por milênios.

Por esses motivos, preferiu-se escolher o ácido acético como um dos componentes das combinações estudadas para a estabilidade do concentrado de tomate.

3. Efeito da adição do ácido no grau Brix e na av do concentrado de tomate

Havia indícios de que a adição do ácido acético poderia diluir as amostras de concentrado à níveis comprometedores.

Para a avaliação da variação no grau Brix, adicionou-se 3,12% de ácido acético em uma amostra de concentrado de tomate com 19,9°Brix. Após a homogeneização da mistura o valor do grau Brix foi 19,7°. Uma adição de ácido acético desta ordem não compromete a concentração dos extratos de tomate.

Para um outro ensaio, preparou-se o concentrado de tomate com teores de ácido acético de 0 a 3% e verificou-se que ocorria uma ligeira redução nos valores da av do produto, da ordem de 0,003 av.

4. Efeito da adição de solutos na av (teórica e experimental) do concentrado de tomate.

Para a determinação experimental da av corrigiu-se os graus Brix dos extratos A e B para 28°Brix. Aos extratos agregou-se cloreto de sódio comercial, glicerol P.A. e sorbitol P.A., a 6 níveis de concentrações diferentes de cada um desses solutos.

Nas Figuras IV.6, 7 e 8, estão as curvas dos valores experimentais e teóricos da av dos extratos A e B em função de concentrações de solutos adicionadas.

Pelas curvas experimentais e teóricas das figuras, observa-se que há uma concordância razoável entre valores experimentais e preditos por equações. Este fato permite prever os valores de av após a adição de alguns desses solutos nos casos em que os extratos de tomate apresentarem av iniciais diferentes.

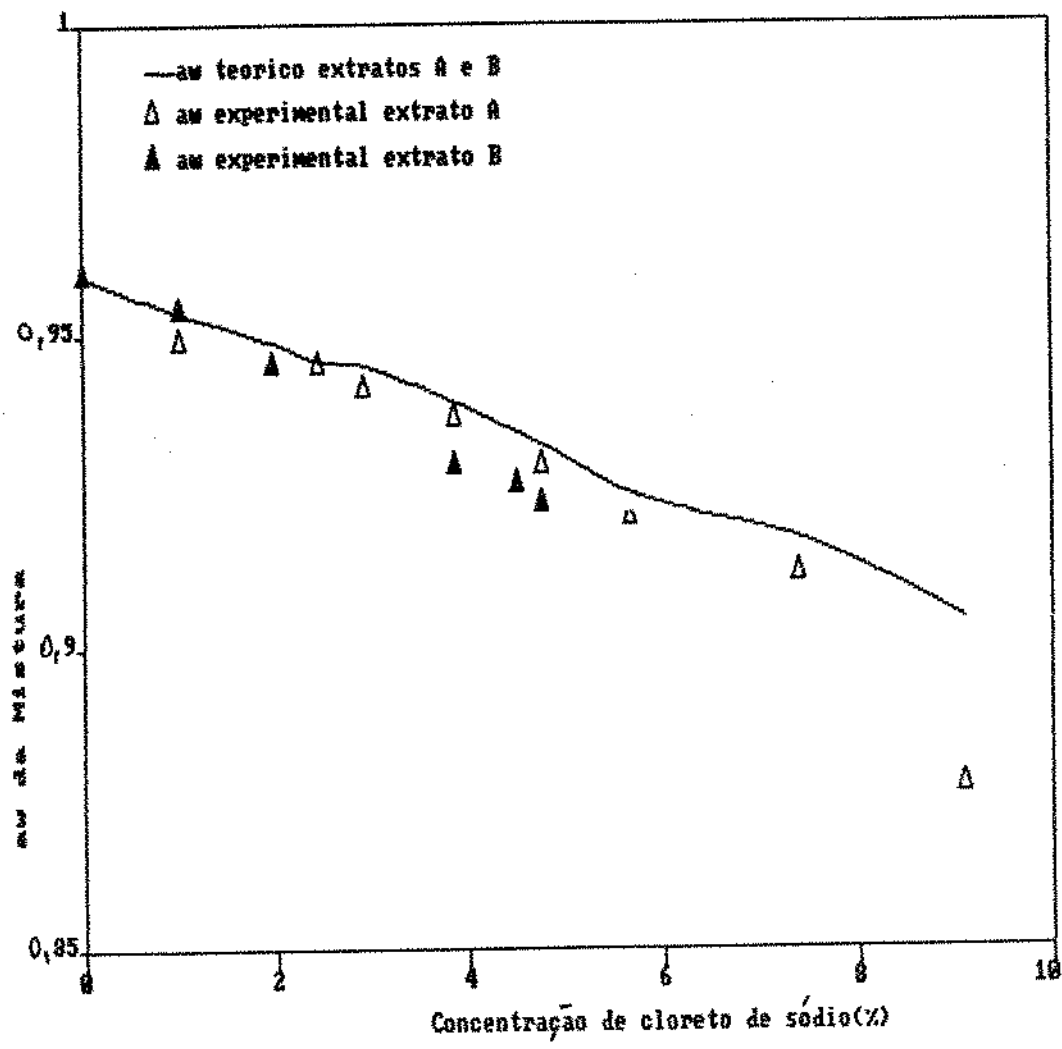


Figura IV.6 - Efeito do cloreto de sódio na aw dos extratos de tomate A e B.

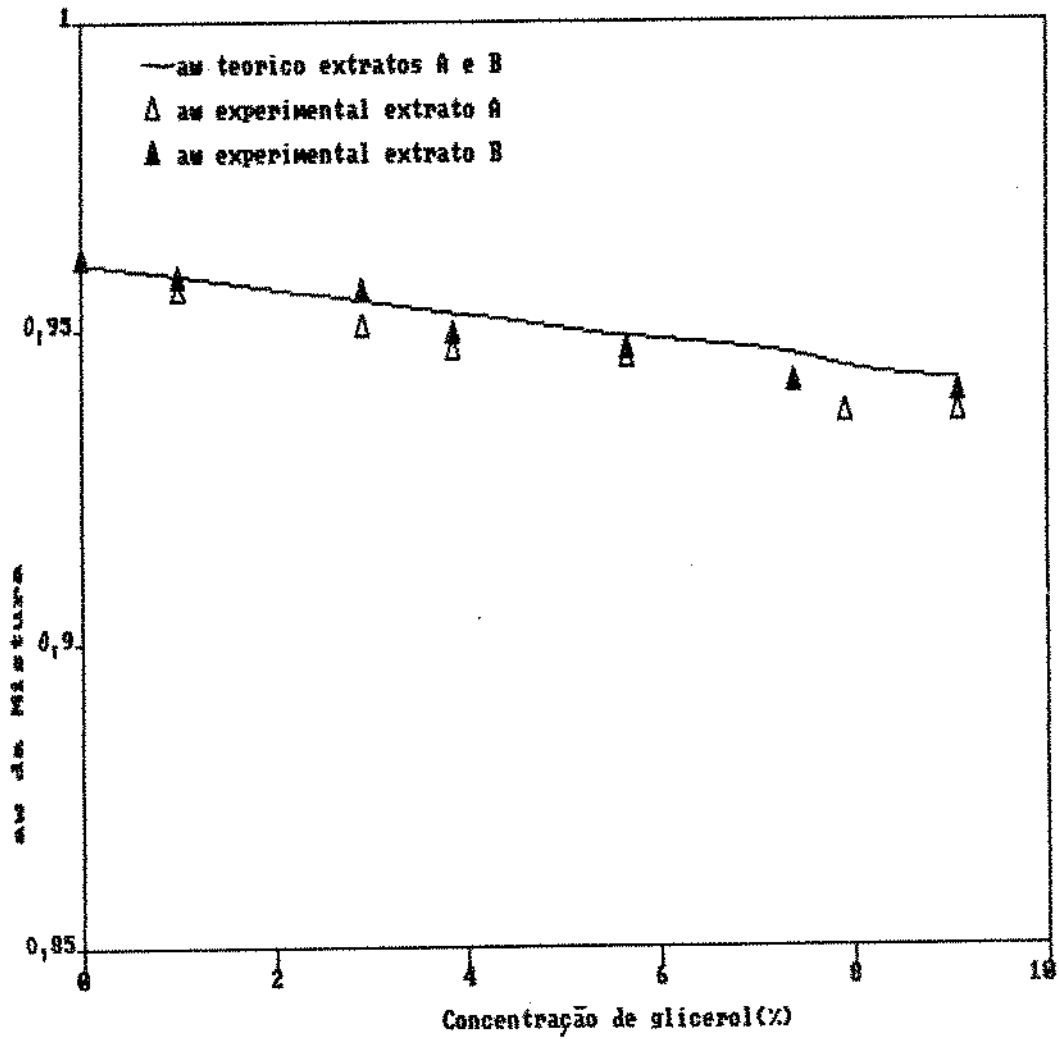


Figura IV.7 - Efeito do glicerol na aw dos extratos de tomate A e B.

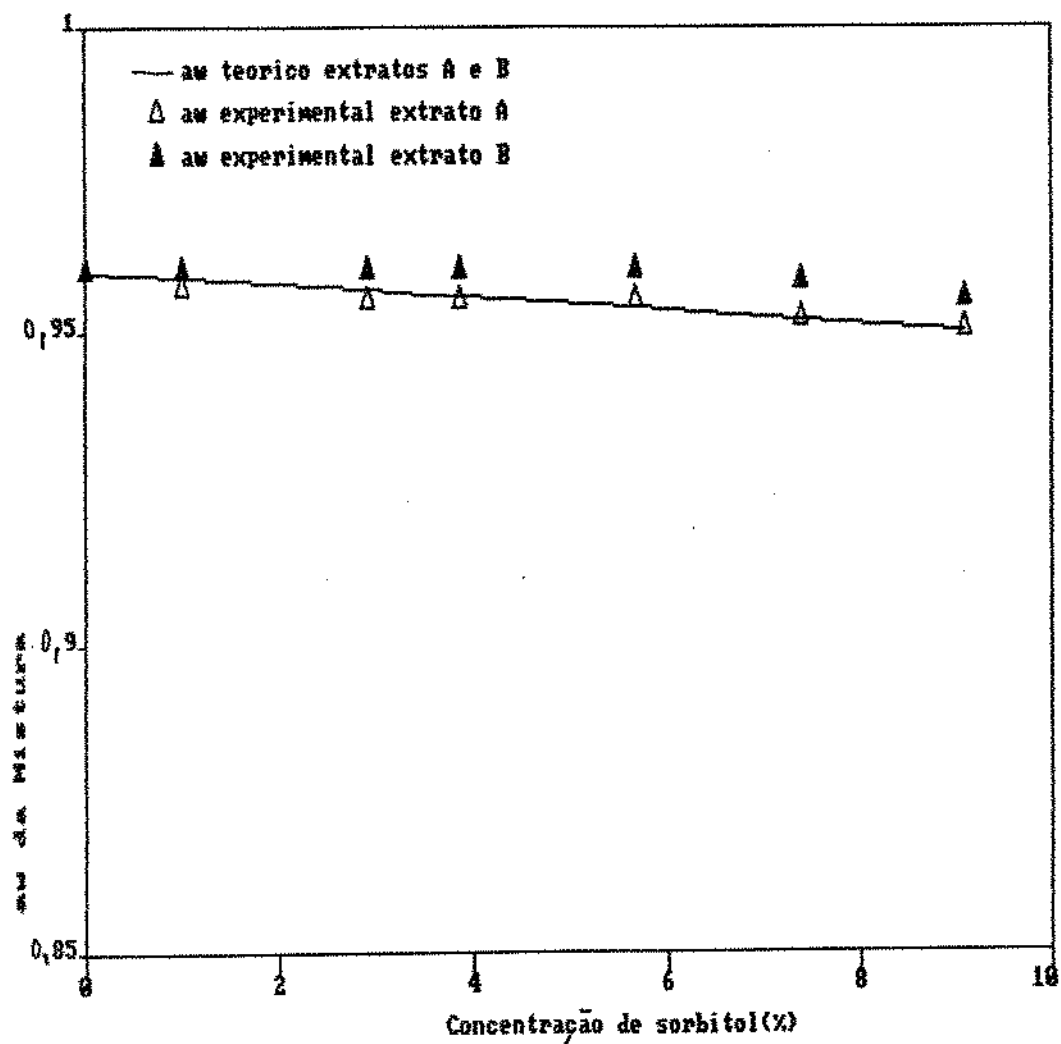


Figura IV.8 - Efeito do sorbitol na aw dos extratos de tomate A e B.

Os valores experimentais da av do extrato com o cloreto de sódio e com o glicerol apresentaram-se inferiores aos calculados. Essa constatação é importante do ponto de vista de estabilidade microbiológica, por se ter na prática valores de av ainda menores que os projetados.

Comparando-se os comportamentos dos extratos A e B, confirma-se que também em termos de av, as tendências nos dois casos são as mesmas.

Uma comparação da capacidade de redução da av do extrato de tomate provocada pelos solutos pode ser melhor avaliada pela Figura IV.9, a qual apresenta as curvas dos valores de av calculados para os três solutos e também para o propilenoglicol.

Observa-se que o cloreto de sódio é significativamente o maior depressor da av do produto, dentre os solutos testados devido ao seu baixo peso molecular, inclusive alta dissolução iônica e pelo íon sódio causar grande mudança na av dos produtos.

Outras tentativas usando equações teóricas foram investigadas para misturas de mais de um soluto citado, visando alcançar um efeito sinérgico na redução da av do concentrado de tomate. As reduções obtidas não foram significativas dentro de percentagens aceitáveis dos solutos.

Também determinou-se teórica e experimentalmente que a redução da av do concentrado de tomate provocada pela adição de 2% de sacarose não era significativa.

Conclui-se portanto que a tradição milenar de utilizar o NaCl como elemento redutor da av deve ser mantida.

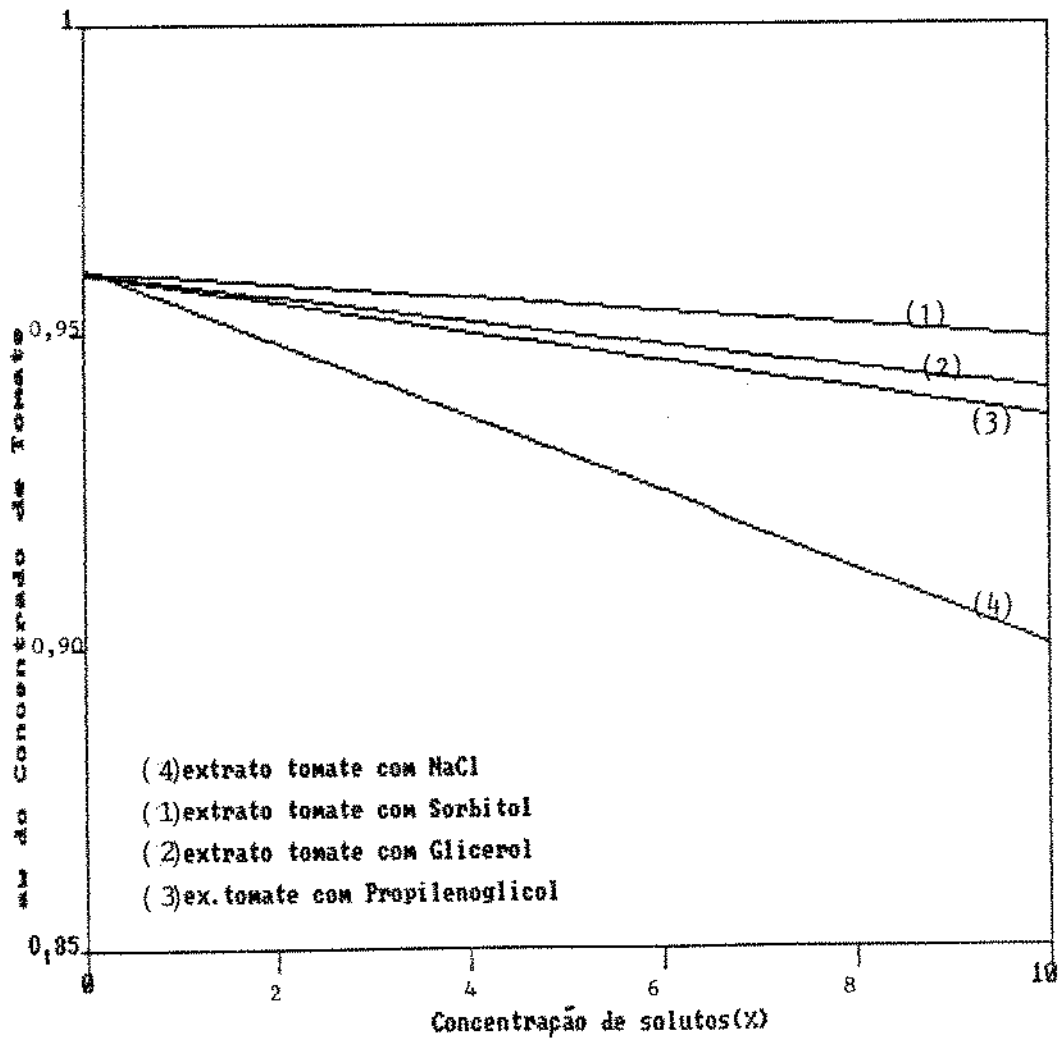


Figura IV.9 - Efeito de solutos na aw teórica do extrato de tomate.

5. Variação do grau Brix do concentrado de tomate com o teor de sólidos totais.

O objetivo desses ensaios foi verificar, finalmente, a similaridade de resultados obtidos com o extrato A e os da literatura.

Preparou-se amostras de extrato de tomate A com diferentes graus Brix. Comparou-se seus teores de sólidos totais com os dos apresentados por LEONARD *et alii* (1977), de extratos produzidos a partir de 3 diferentes variedades de tomate: VF-145, VF-134 e PETOMECH II.

Observa-se na Figura IV.10, que a correlação graus Brix versus concentração é muito semelhante, isto é, não depende das variedades de tomate estudadas.

Por este fato e pelos já apresentados, os experimentos finais foram desenvolvidos utilizando-se uma única amostra de extrato comercial.

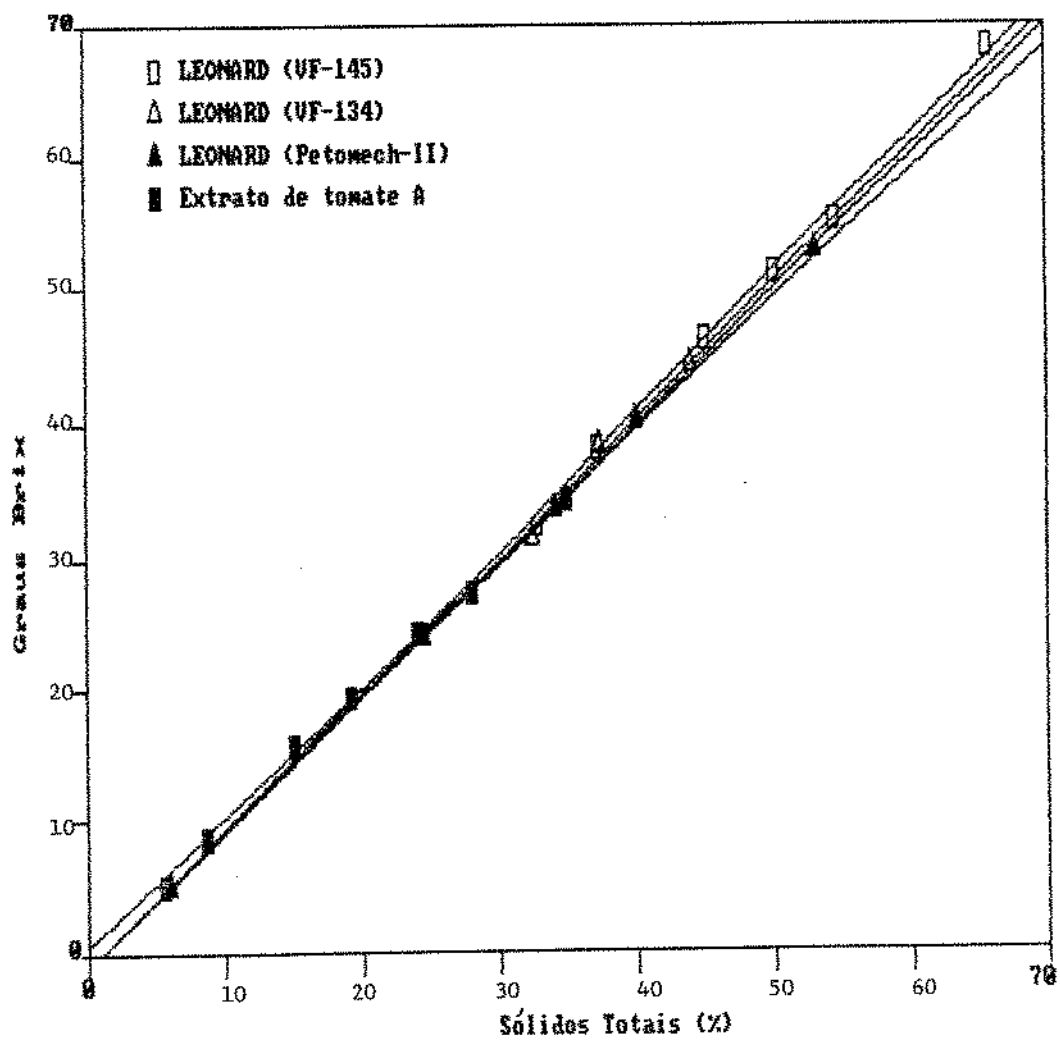


Figura IV.10 - Graus Brix vs Sólidos totais do extrato de tomate.

IV. 3. ENSAIOS DE ESTABILIDADE

a. Primeiro Delineamento Experimental

Monitorou-se a estabilidade química e microbiológica do concentrado de tomate, conservado pela combinação de quatro fatores de obstáculos: cloreto de sódio comercial, ácido acético glacial P. A., sorbato de potássio grau USP e benzoato de sódio grau USP.

O soluto e o ácido foram escolhidos pelas observações dos ensaios preliminares. Devido ao risco de proliferação de bactérias patogênicas resistentes à baixa av agregou-se sorbato de potássio. Como os produtos de tomate apresentam grande potencial de deterioração microbiana por leveduras, agregou-se benzoato de sódio que é inibidor deste grupo de microrganismos. O crescimento de fungos, além da acidez do meio, seria evitado pelos efeitos sinérgicos dos agregados.

As percentagens combinadas das substâncias objetivaram variar os níveis de obstáculos nas seguintes faixas: av de 0,93 a 0,88; pH de 4,1 a 3,8 e conservantes de 1500 a 0 ppm.

A estratégia de mudar uma variável de cada vez normalmente não dá a melhor resposta, porque assume que o valor ótimo de uma variável é independente dos outros; e isto geralmente não é verdadeiro. Daí a necessidade de se planejar adequadamente o experimento.

A Tabela IV.3. apresenta os valores escolhidos para os níveis codificados das variáveis.

Tabela IV.3 - Valores das variáveis em código e em suas unidades originais do 1º delineamento experimental.

Variável	codigo	-2	-1	0	+1	+2
	Unidades originais(%)					
Cloreto de sódio (S)	2	4	6	8	10	
Acido acético (A)	0,100	0,825	1,550	2,275	3,000	
Benzoato de sódio (C ₁)	0	0,0375	0,0750	0,1125	0,1500	
Sorbato de potássio (C ₂)	0	0,0375	0,0750	0,1125	0,1500	

Os valores reais das variáveis utilizadas no delineamento experimental estão apresentados na Tabela IV.4.

Além dessas combinações foi preparada uma amostra apenas com a adição do inóculo, para observação do comportamento do concentrado de tomate (29°Brix) sem qualquer fator de obstáculo.

Para cada tratamento a mistura final pesava 7.600 gramas que era repartida em dois recipientes de vidro transparente, com tampa rosqueável, não hermeticamente fechados, armazenados em caixas de papelão, sem incidência de luz, em sala de temperatura controlada a 25^o ± 2°C. Um dos recipientes era reservado para a avaliação visual e o outro para amostragem das análises periódicas.

Tabela IV.4 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do 1º delineamento experimental.

Tratamentos	S (%)	A (%)	C ₁ (%)	C ₂ (%)
1	8	0,825	0,0375	0,0375
2	4	2,275	0,0375	0,0375
3	4	0,825	0,1125	0,0375
4	8	2,275	0,1125	0,0375
5	8	0,825	0,0375	0,1125
6	4	2,275	0,0375	0,1125
7	4	0,825	0,1125	0,1125
8	8	2,275	0,1125	0,1125
9	4	2,275	0,1125	0,1125
10	8	0,825	0,1125	0,1125
11	8	2,275	0,0375	0,1125
12	4	0,825	0,0375	0,1125
13	4	2,275	0,1125	0,0375
14	8	0,825	0,1125	0,0375
15	8	2,275	0,0375	0,0375
16	4	0,825	0,0375	0,0375
17	2	1,550	0,0750	0,0750
18	10	1,550	0,0750	0,0750
19	6	0,100	0,0750	0,0750
20	6	3,000	0,0750	0,0750
21	6	1,550	0	0,0750
22	6	1,550	0,1500	0,0750
23	6	1,550	0,0750	0
24	6	1,550	0,0750	0,1500
25	6	1,550	0,0750	0,0750
26	6	1,550	0,0750	0,0750
27	6	1,550	0,0750	0,0750
28	6	1,550	0,0750	0,0750
29	6	1,550	0,0750	0,0750
30	6	1,550	0,0750	0,0750
31	6	1,550	0,0750	0,0750
32	6	1,550	0,0750	0,0750

A Figura IV.11. ilustra com fotografia os recipientes com as amostras de extrato de tomate formuladas.



Figura IV.11 - Recipientes com extrato de tomate do 1^o delineamento experimental. O recipiente codificado como 33 é o extrato de tomate original.

As amostras foram avaliadas à princípio semanalmente e depois em períodos mais longos quanto à: cor, av, pH, Brix, acidez, consistência, açúcares redutores, crescimento microbiano e aspecto visual. Esta última avaliação era feita diariamente, no início do armazenamento.

Após 12 meses, os resultados foram surpreendentes. O delineamento experimental foi elaborado prevendo-se a ocorrência de uma variação bastante grande das características químicas, físicas e microbiológicas das amostras durante o armazenamento, fato que não se verificou. Os resultados serão comentados a seguir.

O tratamento 31 (ver Tabela IV.4) apresentou erro experimental, de elaboração da mistura, e seus resultados foram descartados.

a.1. ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

As avaliações sobre o desenvolvimento microbiano mostraram que após uma semana de armazenamento houve inibição total das bactérias lácticas em todos os tratamentos e marcada redução da população de bolores e leveduras que oscilou entre valores da ordem de 10^1 UFC/g e <10 . Após 30 dias de armazenamento das amostras houve inibição total de bolores e leveduras em todos os tratamentos com exceção dos tratamentos 13,16,17 e 22 em que a população foi de 10^1 UFC/g. Após 60 dias de armazenamento todos os tratamentos apresentaram completa inibição de microrganismos.

As avaliações microbiológicas continuaram a serem feitas mesmo após terem atingido a estabilidade microbiológica dos tratamentos. Após 12 meses, com as amostras ainda estáveis, as análises foram interrompidas por ter sido atingido um período suficiente de estocagem para o extrato de tomate industrial.

A amostra de concentrado de tomate original, sem agregados, deteriorou no terceiro dia de armazenamento, mantida às mesmas condições que as amostras formuladas.

a.2. ESTABILIDADE QUÍMICA E FÍSICA DAS AMOSTRAS

Na Tabela IV.5 estão apresentadas algumas características dos extratos de tomate estudados. Também estão mostrados os valores teóricos da av da mistura.

Os valores da av experimentais foram mais baixos ou iguais aos calculados. Observa-se que os tratamentos com as mesmas quantidades de solutos apresentaram av da mesma ordem; e que dentro desses grupos os de av com valores mais baixos eram os tratamentos que possuíam teores de ácido mais altos. Mesmo que pequena, o ácido provoca uma redução do valor de av do produto, já comentado nos ensaios preliminares.

Também pela Tabela IV.5 observa-se que a acidez está mais interligada com os teores de ácido acético do que o pH.

Pelos resultados das análises periódicas observou-se que a av, pH, acidez, Brix e teor de açúcares redutores não mostraram variação com o tempo. Pequenas variações de uma ou outra análise, podem ser atribuídas à imprecisão das medidas experimentais.

Após a mistura do extrato de tomate com os ingredientes, provavelmente nenhum produto adicionado ao extrato ou fator externo durante o armazenamento, influenciou no teor de açúcares redutores. Todas as 32 amostras apresentaram teores de açúcares redutores próximos de $(11,5 \pm 1,5)\%$ dependendo da quantidade de concentrado de tomate na composição de cada tratamento.

Tabela IV.5 - Características dos extratos de tomate combinados, do 1^o experimento.

TRATAMENTOS	aw		ACIDEZ (%)	PH
	TEÓRICO	EXPERIMENTAL		
Puro	—	0,960	1,58	4,33
1	0,912	0,910	2,24	4,12
2	0,938	0,932	3,77	3,97
3	0,938	0,934	2,31	4,12
4	0,912	0,901	3,67	3,92
5	0,912	0,912	2,24	4,13
6	0,938	0,933	3,72	3,98
7	0,938	0,932	2,29	4,19
8	0,912	0,903	3,67	3,94
9	0,938	0,934	3,75	3,99
10	0,912	0,911	2,24	4,13
11	0,912	0,903	3,64	3,92
12	0,938	0,935	2,32	4,15
13	0,938	0,932	3,76	3,97
14	0,912	0,913	2,19	4,14
15	0,912	0,901	3,63	3,93
16	0,938	0,932	2,33	4,12
17	0,949	0,943	3,04	4,07
18	0,898	0,885	2,98	3,99
19	0,925	0,926	1,58	4,29
20	0,925	0,916	4,45	3,89
21	0,925	0,923	2,98	4,03
22	0,925	0,922	2,95	4,03
23	0,925	0,921	2,98	4,02
24	0,925	0,922	2,96	4,04
25	0,925	0,924	2,94	3,99
26	0,925	0,924	2,93	4,00
27	0,925	0,922	2,93	4,01
28	0,925	0,921	2,92	4,03
29	0,925	0,922	2,96	4,03
30	0,925	0,921	2,94	4,00
32	0,925	0,925	2,97	4,00

A cor e a consistência, atributos de qualidade importantes para mercado do concentrado de tomate também foram avaliados.

A cor foi avaliada por três formas: física, visual simples e visual em câmara especial.

A avaliação física da cor foi feita periodicamente. Os resultados das análises das amostras na 32^a semana de armazenamento estão apresentados nas Figuras IV.12 a 15 e esse comportamento se repetiu em praticamente todos os períodos analisados. Pelas figuras pode-se concluir que as diversas formulações não tiveram maior importância para os parâmetros L, a e b das amostras. As Figuras IV.12 a 14 apresentam os gráficos da intensidade de luz (Lhunter); do componente vermelho (ahunter) e do componente amarelo (bhunter) das amostras com zero dias e com 32 semanas de armazenamento. Estão representados também, os valores da amostra P (extrato de tomate original), para comparação. Os valores de P nos gráficos b das Figuras IV.12 a 14 são repetições dos valores dos gráficos a de cada uma das figuras.

Os valores da amostra 25 representada nas figuras são as médias das amostras 25 a 32.

Pelas Figuras IV.12 a 14 observa-se que, durante o armazenamento, os tratamentos de 1 a 25 não diferiram quanto à luminosidade, o componente amarelo apresentou pequena variação e o vermelho apresentou variações. Comparando os valores de ahunter dos tratamentos a zero dias com os da amostra P nota-se que houve redução da cor vermelha da maioria das amostras. Esta redução pode ter ocorrido no momento da mistura do extrato com os ingredientes, pela incorporação de oxigênio, causando um escurecimento não enzimático. Os valores L e b não demonstraram influência desse tipo. Entretanto, nenhuma variação chegou a comprometer o produto.

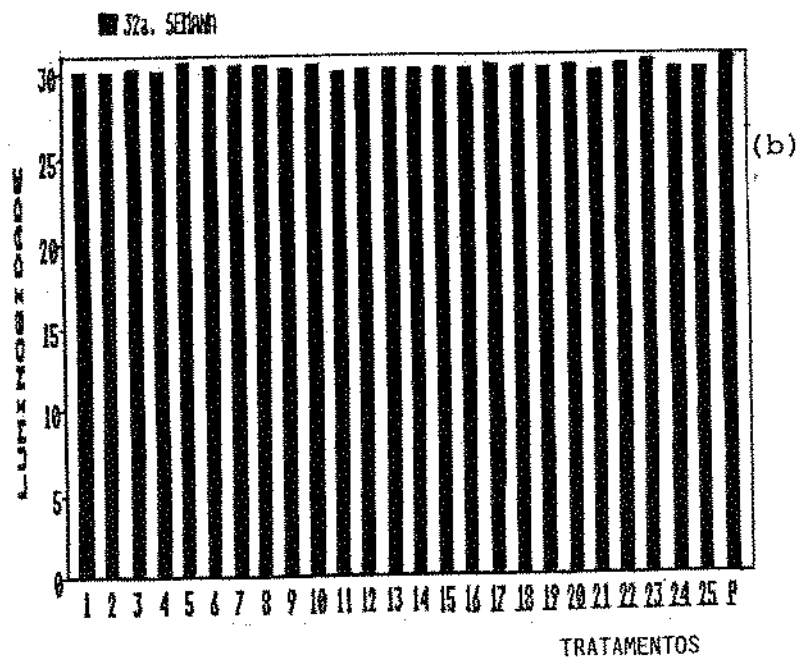
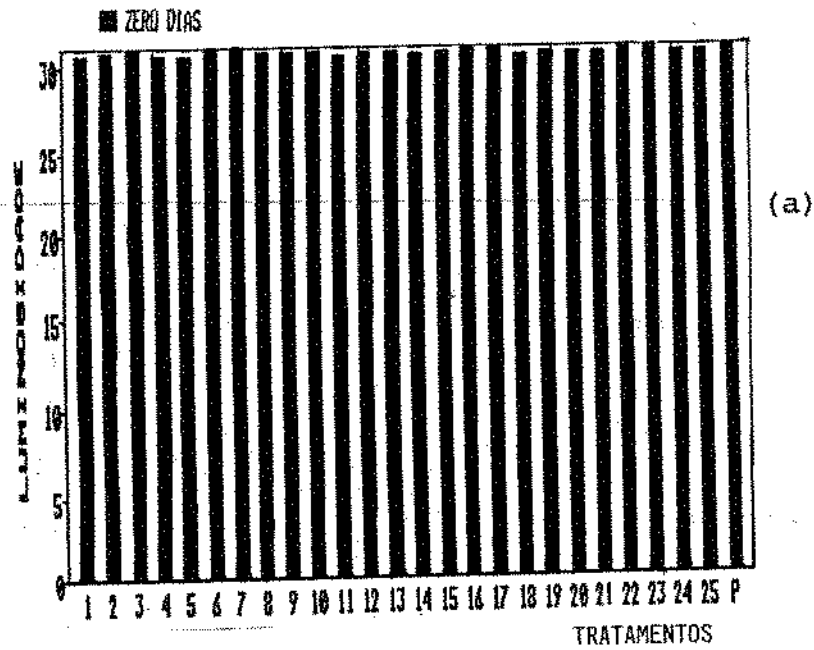


Figura IV.12 - Valores L Hunter dos extratos de tomate combinados com zero dias (gráfico a) e com 32 semanas de armazenamento (gráfico b), por avaliação física.

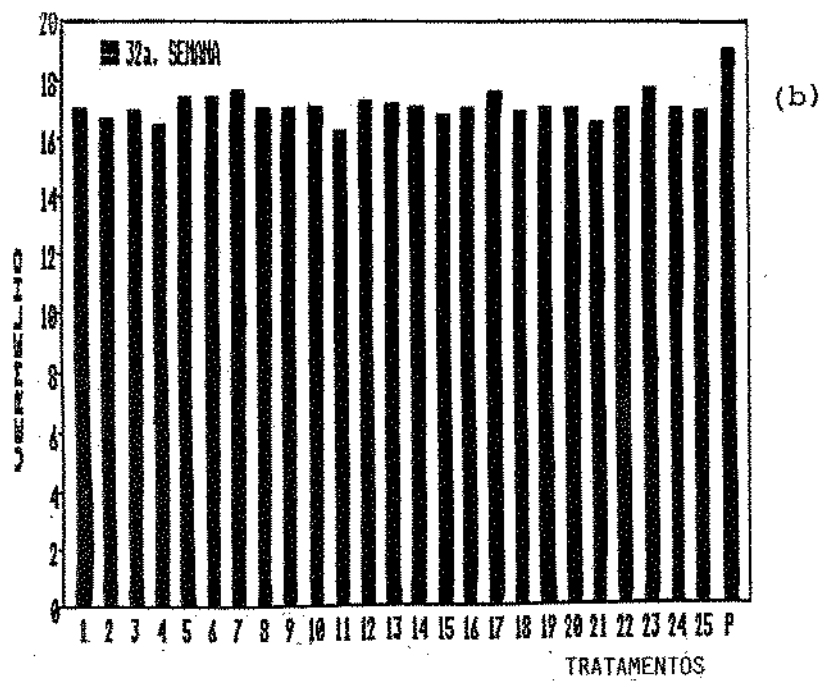
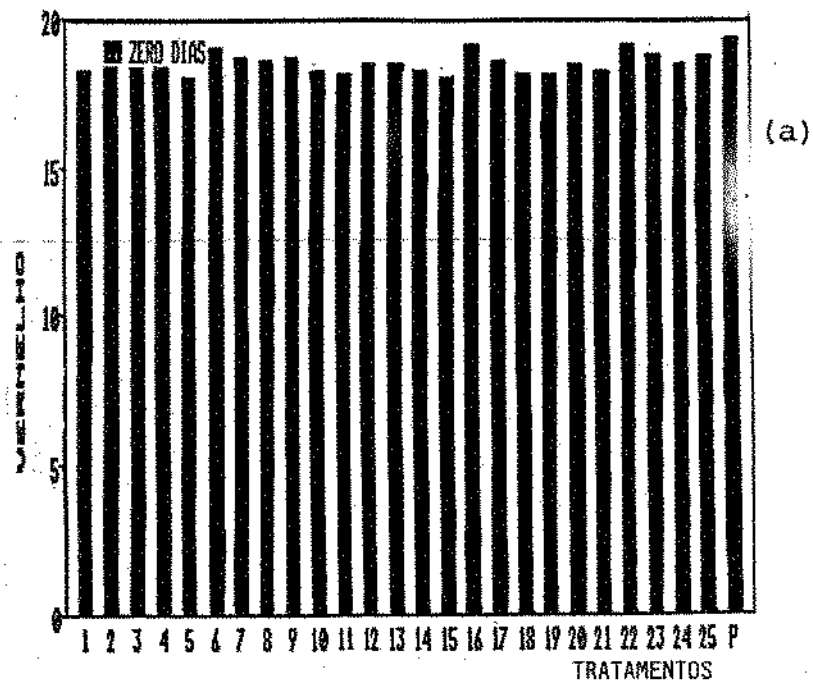


Figura IV.13 - Valores a Hunter dos extrato de tomate combinados com zero dias (gráfico a) e com 32 semanas de armazenamento (gráfico b), por avaliação física.

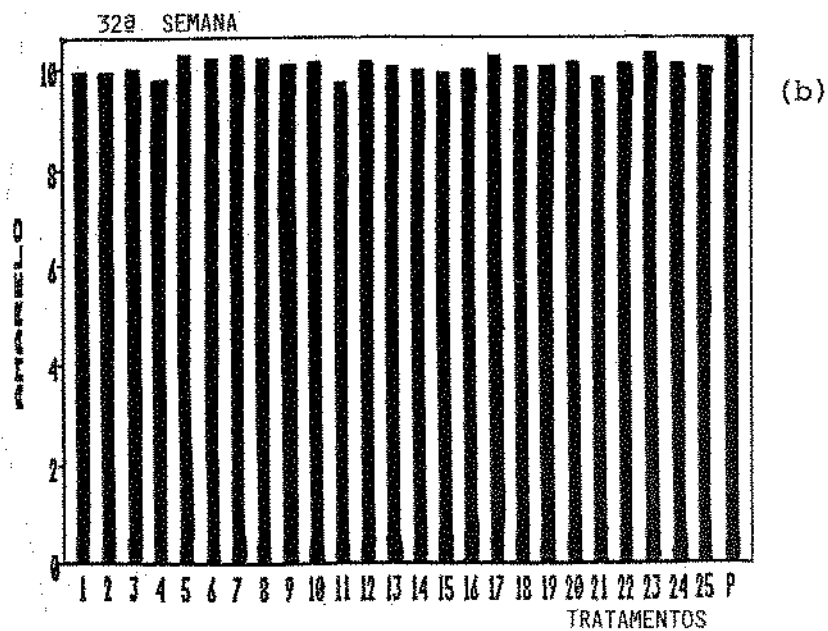
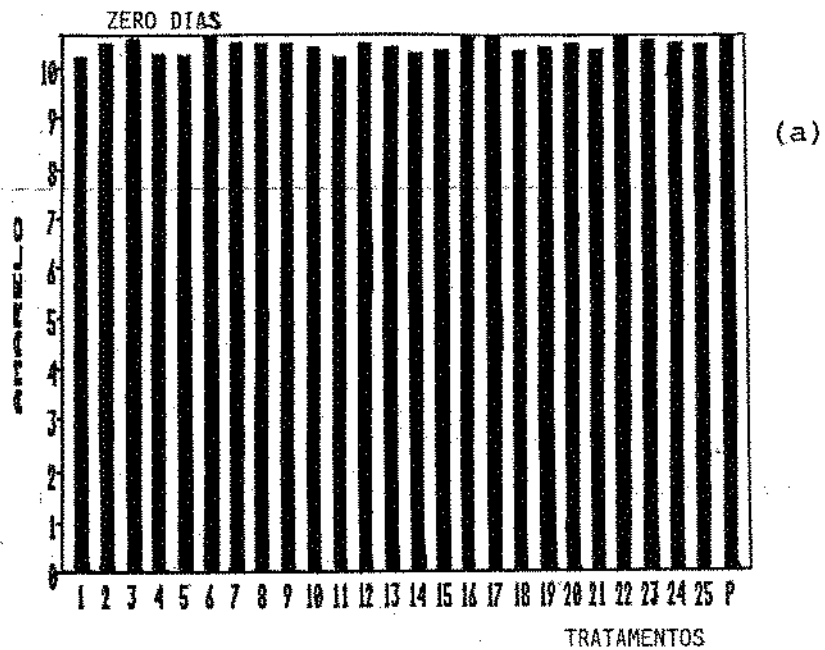


Figura IV.14 - Valores bruto dos extratos de tomate combinados com zero dias (gráfico a) e com 32 semanas de armazenamento (gráfico b), por avaliação física.

Na Figura IV. 15 estão locados os valores da diferença total de cor (ΔE) das amostras com 32 semanas de armazenamento em relação a zero dias. Embora se observe diferenças entre as amostras, a amplitude dos valores de ΔE , não teve importância na aparência das amostras, quando comparadas com a avaliação visual da cor .

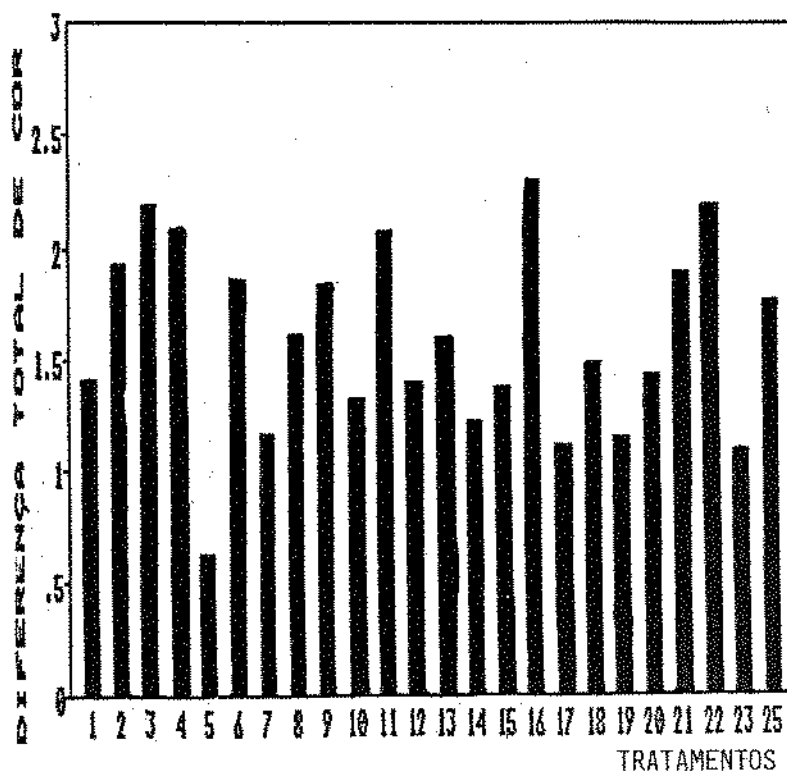


Figura IV. 15 - Diferença total de cor dos extratos de tomate formulados após zero dias e 32 semanas de armazenamento, por avaliação física.

Pelas observações visuais das amostras, notou-se o aparecimento de uma cor amarronzada na camada superficial de todas as amostras contidas em recipientes que apresentavam espaço livre.

Constatou-se dessa maneira que a amostra que mais escureceu na superfície foi a do tratamento 18 (com o maior teor de sal adicionado), e a que menos escureceu foi a do tratamento 17 (com o menor teor de sal adicionado). Essas camadas escurecidas, alcançaram um máximo de 1,0 a 2,5 cm de espessura durante todo o período de armazenamento. O resultado mais importante foi que as amostras dos recipientes sem espaço livre não apresentaram escurecimento superficial.

Esse escurecimento foi mais pronunciado nos recipientes reservados para amostragem. Para as análises tinha-se o cuidado de retirar o extrato abaixo da região amarronzada.

A avaliação visual das amostras após 32 semanas de armazenamento feita em câmara especial de observação da cor, confirmou que elas praticamente não diferiram entre si e mostravam-se bastante próximas da cor de uma amostra pura.

De uma forma geral, desconsiderando o fenômeno na superfície, pode-se afirmar que a cor durante o armazenamento praticamente não se alterou. Pequenas mudanças ocorrem também com os extratos processados pelos métodos tradicionais, hermeticamente fechados.

A avaliação da consistência também foi feita periodicamente, e os valores mantinham-se aproximadamente os mesmos.

O padrão para consistência do concentrado de tomate exigido pelos Estados Unidos e Canadá é 5,0 a 7,0 cm, sendo aceito no máximo 8,0 cm. Para o mercado brasileiro não há ainda um padrão, e os limites dependem do estabelecido em cada indústria.

Na Figura IV.16, estão apresentados os valores médios de cinco repetições da medida de consistência para cada tratamento. Observa-se que com exceção do tratamento 17 (menor teor de sal-2% todos os valores foram superiores ou iguais a 6,0cm. Aceitando-se os resultados de consistência entre 5,0 a 7,0 cm têm-se que acima de 7,0 estão as amostras 1,8,10,11,15 e 18 que possuem teores de sal acima de 6,0%. As amostras com 6,0% de sal apresentaram consistência próximas a 7,0 cm e as com 4,0% de sal valores entre 6,0 e 6,5 cm.

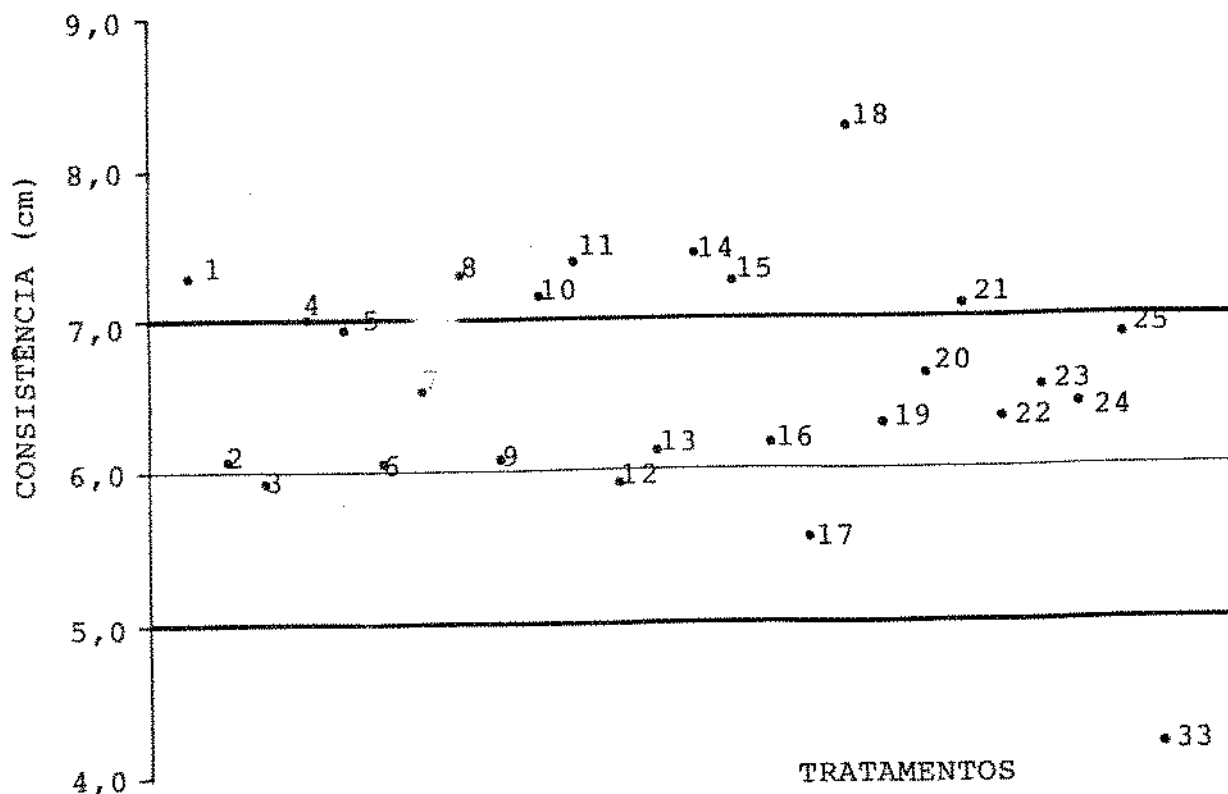


Figura IV.16 - Valores da consistência (Bostwick) dos tratamentos. Linhas marcadas são os limites de aceitação.

a.3. SELEÇÃO DOS TRATAMENTOS

Os resultados do primeiro delineamento experimental demonstram claramente que as condições escolhidas levaram a um super processamento, isto é, em todos os tratamentos houve a conservação do produto, sem prejuízo apreciável de seus atributos, por um período muito além do necessário.

A análise sensorial das amostras poderia fornecer um elemento definitivo para a seleção final, mas ela só é praticável com um número reduzido de variáveis.

O fato de não haver um resultado diferenciado dificulta a seleção das condições ótimas de processamento. Mesmo assim, tentou-se racionalizar critérios, afim de garantir uma definição das formulações mais adequadas e/ou prever valores limites para pesquisas futuras, com a mesma finalidade.

Para selecionar os tratamentos viáveis para a industrialização é necessário uma discussão do ponto de vista tecnológico e econômico.

Para melhor visualização, construiu-se a Tabela IV.6 onde estão indicados os tratamentos de 1 a 32. Foram assinalados com (+) os tratamentos que se mostraram menos vantajosos em relação aos demais para cada atributo.

Para consistência, assinalou-se as amostras acima de 7,0 cm e abaixo de 5,0 cm. Para cor, assinalou-se os tratamentos que apresentaram ΔE maiores que 1,5. Foram assinalados os tratamentos com teores de sal maiores ou iguais a 8,0%, com teores de ácido maiores que 1,55% e com teores de benzoato de sódio e sorbato de potássio maiores que 750ppm. Apesar de todos os tratamentos apresentarem estabilidade microbiológica, assinalou-se aqueles que alcançaram sua estabilidade somente após 30 dias de armazenamento.

Tratamentos que não receberam nenhum destaque são 7,12,19 e 23 além do 25 ao 32 (repetições). Na Tabela IV.7 estão rerepresentadas as formulações desses tratamentos.

Realizando-se uma nova seleção entre os tratamentos 7 e 12, elegeu-se o 12 pela menor porcentagem de C1 apresentada.

Entre o 23 e as repetições, elegeu-se o 23 por não ter adição de C2.

Entre o 12 e o 23, elegeu-se o 12 pelas menores porcentagens de S, A e C1, apesar de ter maior C2.

Fez-se uma análise sensorial dos tratamentos 12 e 19, para avaliar o mais aceitável quanto ao sabor. As amostras estavam com dez meses de armazenamento.

Os tratamentos 12 e 19 foram aceitáveis como molhos, que para uso seriam elaborados com adição de outros condimentos. Entretanto, há uma maior tendência, por parte dos provadores de aceitação do sabor salgado ao sabor ácido.

Sugere-se portanto, que a escolha final entre os tratamentos fique a cargo do usuário, porque dependerá do destino a ser dado ao concentrado de tomate industrial (seja catchup ou molho "já pronto"), ou seja, da conveniência de já se ter sal ou ácido no concentrado.

Tabela IV.6 - Demonstrativo dos atributos em que os tratamentos se mostraram mais desvantajosos.

TRATAMENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32		
CONSISTÊNCIA	+							+	+	+				+	+																		
COR		+	+	+			+	+	+		+	+				+															+	+	
% SAL	+				+	+			+	+	+				+	+																+	
% ÁCIDO		+			+			+	+		+				+																	+	
MICROORGANISMOS														+		+	+															+	
% BENZOATO DE SÓDIO							+																									+	+
% SORBATO DE POTÁSSIO																																	

Tabela IV.7 - Formulações dos tratamentos pré-selecionados do 1^o experimento.

TRATAMENTOS	S (%)	A (%)	C1 (%)	C2 (%)
7	4	0,825	0,1125	0,1125
12	4	0,825	0,0375	0,1125
19	6	0,100	0,0750	0,0750
23	6	1,550	0,0750	0
25 a 32	6	1,550	0,0750	0,0750

A Tabela IV.8 apresenta uma caracterização dos tratamentos 12 e 19.

Tabela IV. 8 - Caracterização das amostras selecionadas no 1º experimento.

CARACTERÍSTICAS	TRATAMENTO 12	TRATAMENTO 19
aw	0,935	0,927
Consistência Bostwick (cm)	5,95	6,30
pH	4,15	4,29
Acidez (%)	2,32	1,57
Açúcares redutores (%)	11,07	11,42
Graus Brix	32,90	34,00
L	30,31	30,28
COR* a	17,31	17,02
b	10,13	10,06

* Valores obtidos na 32ª semana de armazenamento.

O uso das "ferramentas" do Método de Superfície de Respostas para discussão dos resultados experimentais do 1º ficou prejudicado pela estabilidade química e microbiológica de todos os tratamentos, fato não previsto.

b. Segundo delineamento experimental

Os resultados obtidos no 1^o delineamento experimental induziram a realização de um 2^o experimento, sem adição de benzoato de sódio e de sorbato de potássio.

A Tabela IV.9 apresenta os valores escolhidos para os níveis codificados das variáveis e a Tabela IV.10 os valores reais das variáveis utilizadas no delineamento experimental.

Tabela IV.9 - Valores das variáveis em código e em suas unidades originais do 2^o experimento.

Variável	Código				
	-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
	Unidades Originais (%)				
Clorato de sódio (S)	2,0	2,9	5,0	7,1	8,0
Ácido acético (A)	0,10	0,45	1,30	2,12	2,50

Tabela IV.10 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do 2º-experimento.

Tratamento	S (%)	A (%)
1	2,9	0,45
2	7,1	0,45
3	2,9	2,12
4	7,1	2,12
5	2,0	1,30
6	8,0	1,30
7	5,0	0,10
8	5,0	2,50
9 a 13	5,0	1,30

Além dessas combinações, também foi preparada uma amostra "teste" apenas com a adição de inóculo, para observação do comportamento sem qualquer obstáculo.

Neste experimento, para cada ensaio a mistura final pesava 1.500 gramas entre concentrado de tomate (29°Brix), cloreto de sódio comercial e ácido acético P.A..

A amostra formulada de cada tratamento, foi repartida em dois recipientes de vidro transparente, com tampa rosqueável não hermeticamente fechados, que foram armazenados sob a incidência normal da luz do dia, em uma sala com temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

b.1. ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

A taxa de deterioração ou morte dos microrganismos inoculados no concentrado de tomate formulado estão representadas pela Figuras IV.17 e 18. Houve uma redução acentuada da carga microbiana dos

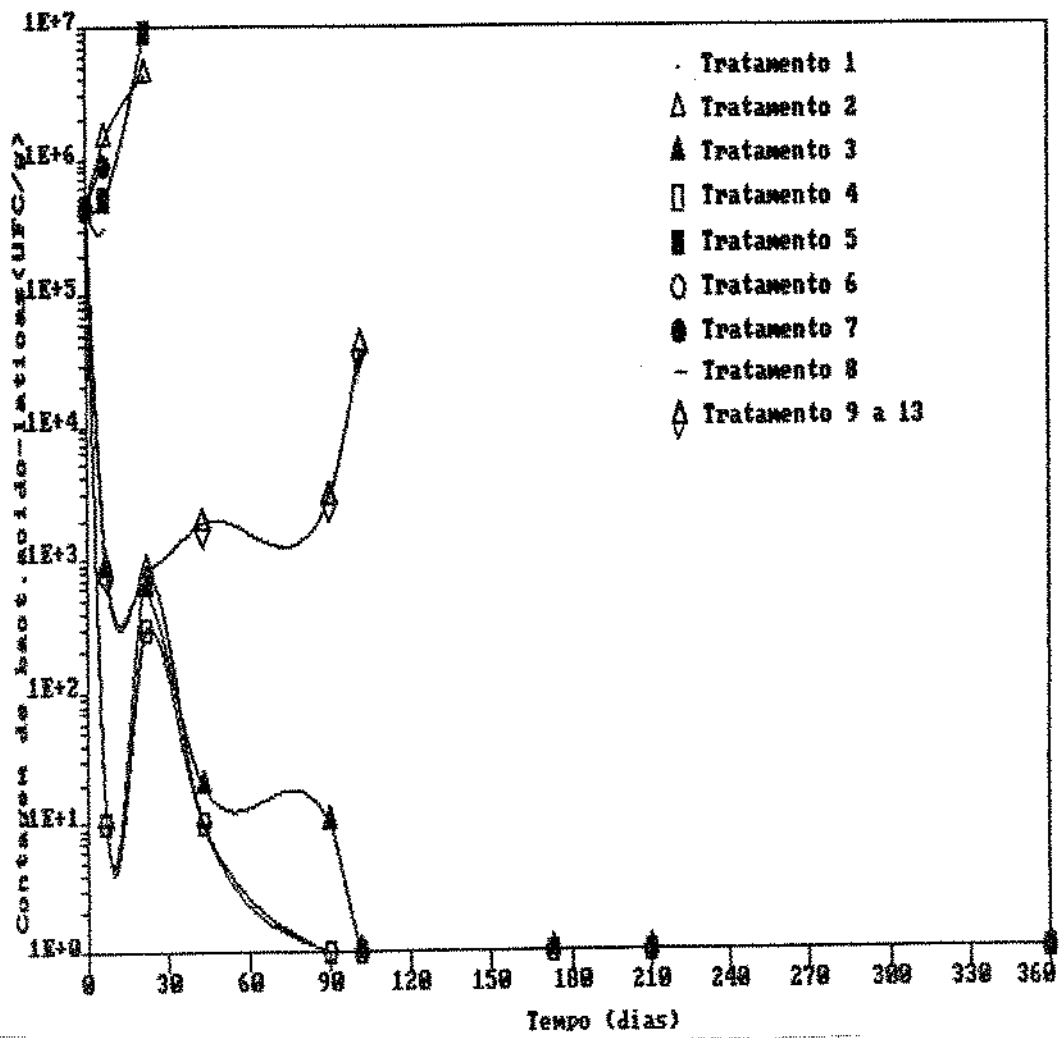


Figura IV. 17 - Evolução da população de bactérias lácticas inoculada em amostras com diferentes tratamentos durante o armazenamento em temperatura ambiente (2º experimento).

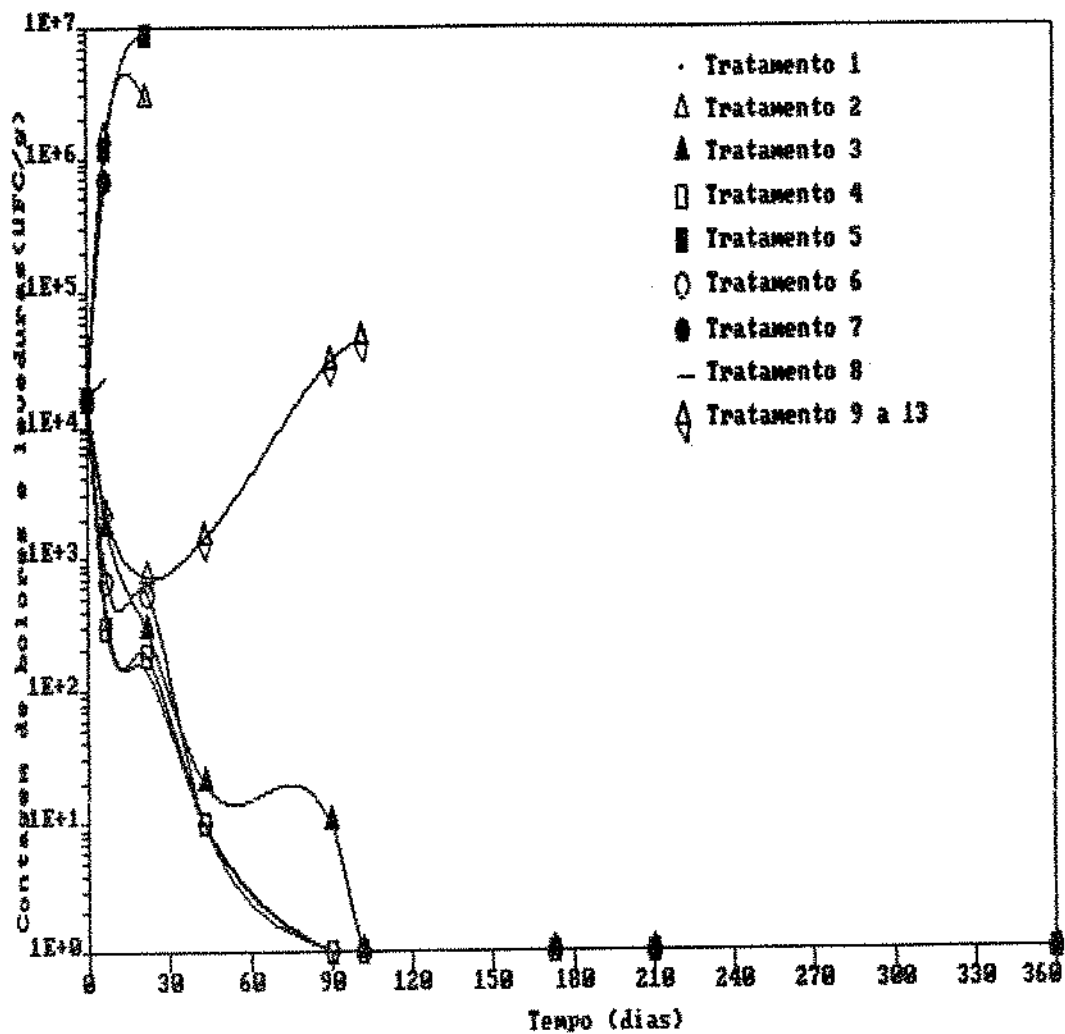


Figura IV. 18 - Evolução da população de bolores e leveduras inoculada em amostras com diferentes tratamentos durante o armazenamento em temperatura ambiente (2º experimento).

tratamentos 3,4,6 e 8 com aproximadamente 30 dias de armazenamento. Logo após as primeiras avaliações apresentaram ausência total de bactérias, fungos e leveduras, permanecendo estáveis até a última avaliação que ocorreu com 1 ano de armazenamento.

Das cinco repetições do ponto central, tres foram estáveis microbiologicamente por um ano. Por uma questão de segurança, preferiu-se considerar aqui, como resultado geral para os tratamentos 9 a 13, o comportamento das duas, que se deterioraram aos 120 dias de armazenamento. Após redução da carga microbiana inicial, os tratamentos 9 a 13 apresentaram novo aumento da população dos microrganismos viáveis.

Os tratamentos 1 e 7 deterioraram no sétimo dia de armazenamento e os tratamentos 2 e 5 no vigésimo segundo dia de armazenamento.

As amostras deterioradas foram descartadas.

A amostra "teste" deteriorou-se no segundo dia de armazenamento.

Na Figura IV.19 estão indicados os tratamentos que deterioraram em função das percentagens de cloreto de sódio e ácido acético.

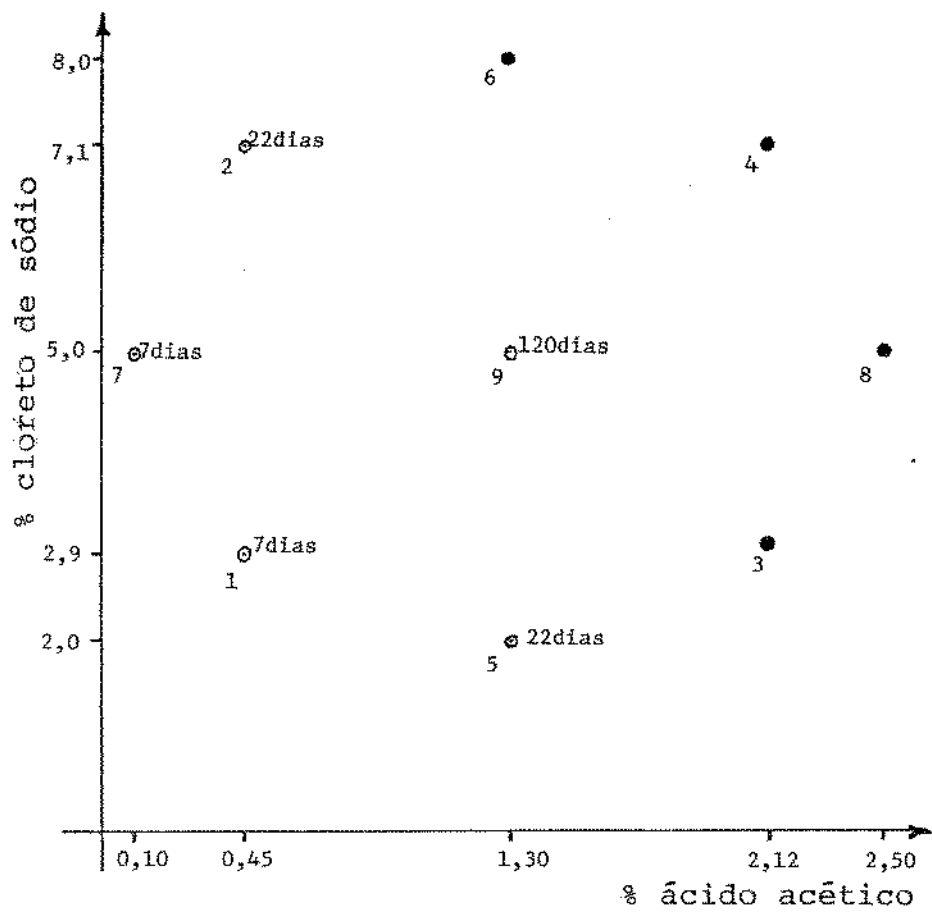


Figura IV.19 - Distribuição dos tratamentos do 2º experimento. Tratamentos que não deterioraram o produto (●) e tratamentos que não deterioraram (○) o produto e suas respectivas vidas-de-prateleira.

Embora o número limitado de tratamentos não permita conclusões definitivas, há indícios de que existe uma tendência de distribuição dos "iso-dias" de vida-de-prateleira (VP), isto é, combinações de cloreto de sódio (concl) e ácido acético (concae) que garantem o mesmo tempo de armazenamento sem deterioração, em maneira simétrica em torno da bissetriz, na Figura IV.19.

Simplificadamente pode-se dizer que:

$$VP = 2,5 + K \text{ concae} \times \text{concl} \quad (\text{IV.1})$$

onde 2,5 representa dias de conservação sem qualquer aditivo, calculado pela média entre os valores observados no primeiro e no segundo delineamento experimental, e K é uma constante, provavelmente função da carga inicial de microrganismos, da temperatura de armazenamento e atividade de água.

A Tabela IV.11 apresenta os valores do produto: (concae x concl) de cada tratamento. Observa-se que, com exceção do tratamento 3, e da considerável diferença entre os valores dos tratamentos 1 e 7, existe uma tendência em se enquadrar em um modelo baseado no produto de concentrações, conforme a equação (IV.1). O tratamento 3 tem o produto das concentrações inferior ao do tratamento 9, embora tenha permanecido estável durante todo o experimento.

Um modelo mais adequado que corrigiria esta discrepância teria de dar importância diferente à cada aditivo, isto é:

$$VP = 2,5 + K (\text{concae})^m \times (\text{concl})^n \quad (\text{IV.2})$$

Tabela IV.11 - Vida-de-prateleira (VP) dos tratamentos em função do produto dos teores de cloreto de sódio e ácido acético.

tratamento	conc ac x conc NaCl	VP (dias)
0	0	2
7	0,5	7
1	1,3	7
5	2,6	22
2	3,2	22
9 a 13	6,5	120
3	6,1	estável
6	10,4	estável
8	12,5	estável
4	15,0	estável

Como o tratamento 3 tem uma concentração mais alta em ácido acético de que os tratamentos 9 a 13, ter-se-ia que $m > n$, para haver compensação no produto. Neste caso entretanto, os produtos de concentrações dos tratamentos 1 e 7 ficariam ainda mais diferenciados.

Como última tentativa de aproveitar os resultados obtidos para sugerir modelos matemáticos, para estimar a vida-de-prateleira, utilizou-se os pontos da Figura IV.19 como base para um ajuste visual de curvas de "iso-dias" conforme indicado na Figura IV.20. Uma reta ligando a origem ao ponto correspondente ao tratamento 9 a 13 oferece os seguintes tempos versus produto de concentrações:

conc ac x conc NaCl	VP(dias)
0	2,5
1,5	7
3,0	22
6,5	120

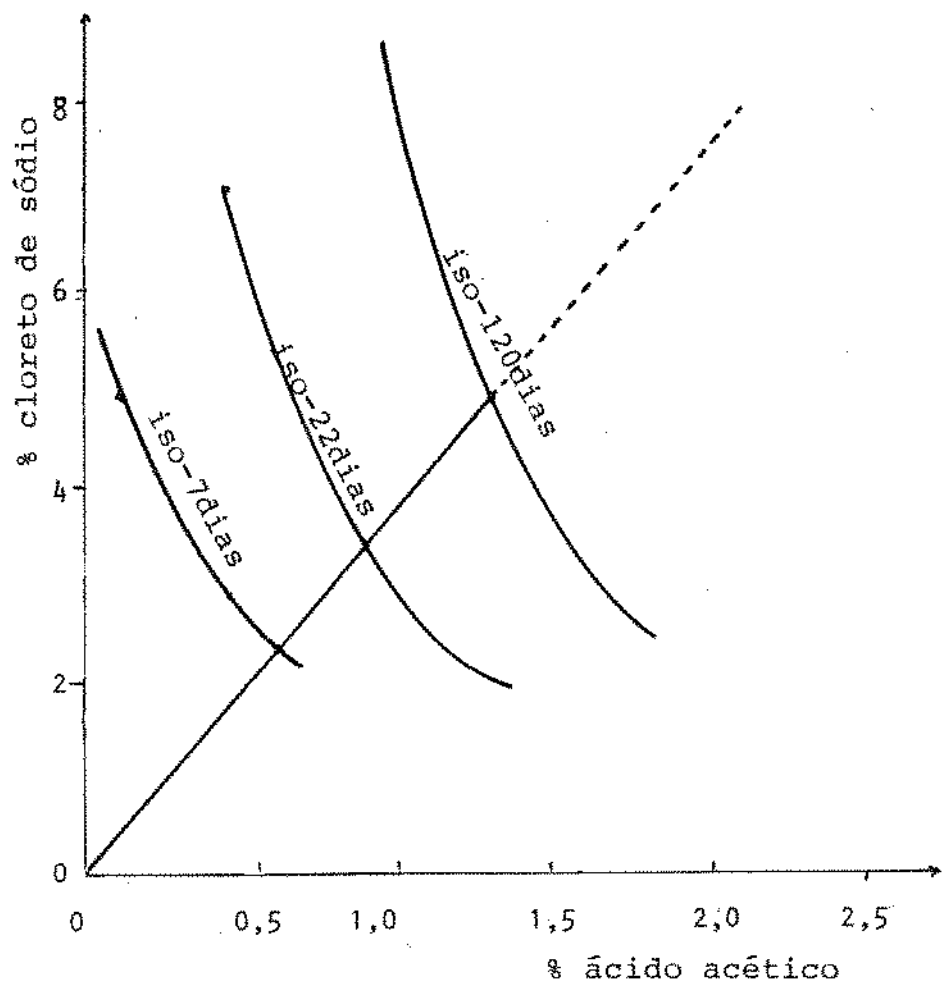


Figura IV.20 - Curvas iso-dias de vida-de-prateleira de concentrado de tomate.

Uma equação exponencial, do tipo :

$$VP = 2,5 + K (concae \times concNaCl)^r \quad (IV.3)$$

foi então ajustada a esses pontos, fornecendo valores de $k = 1,73$ e $r = 2,25$; e, os parâmetros estatísticos Coeficiente de Determinação (R^2) e Soma dos Quadrados dos Resíduos (S) valores 0,9936 e 58,52 respectivamente. As constantes (K e r) e os parâmetros estatísticos (R^2 e S) foram determinados usando o programa de computador STATIGRAPHICS (1987).

A equação assim obtida, juntamente com os pontos experimentais está lançada na Figura IV.21. Observa-se novamente, que com a exceção do tratamento 3, existe uma concordância aceitável entre o modelo matemático e o resultado experimental. A concordância também acontece com os outros tratamentos que não deterioram (4, 6 e 8), pois a vida-de-prateleira calculada (curva) indica tempos da ordem de grandeza do tempo total do ensaio, ou superiores.

O modelo proposto, apesar de ser baseado em limitado número de tratamentos, poderá servir como guia para trabalhos futuros e como estimativa para prever a vida-de-prateleira do concentrado de tomate armazenado nas mesmas condições.

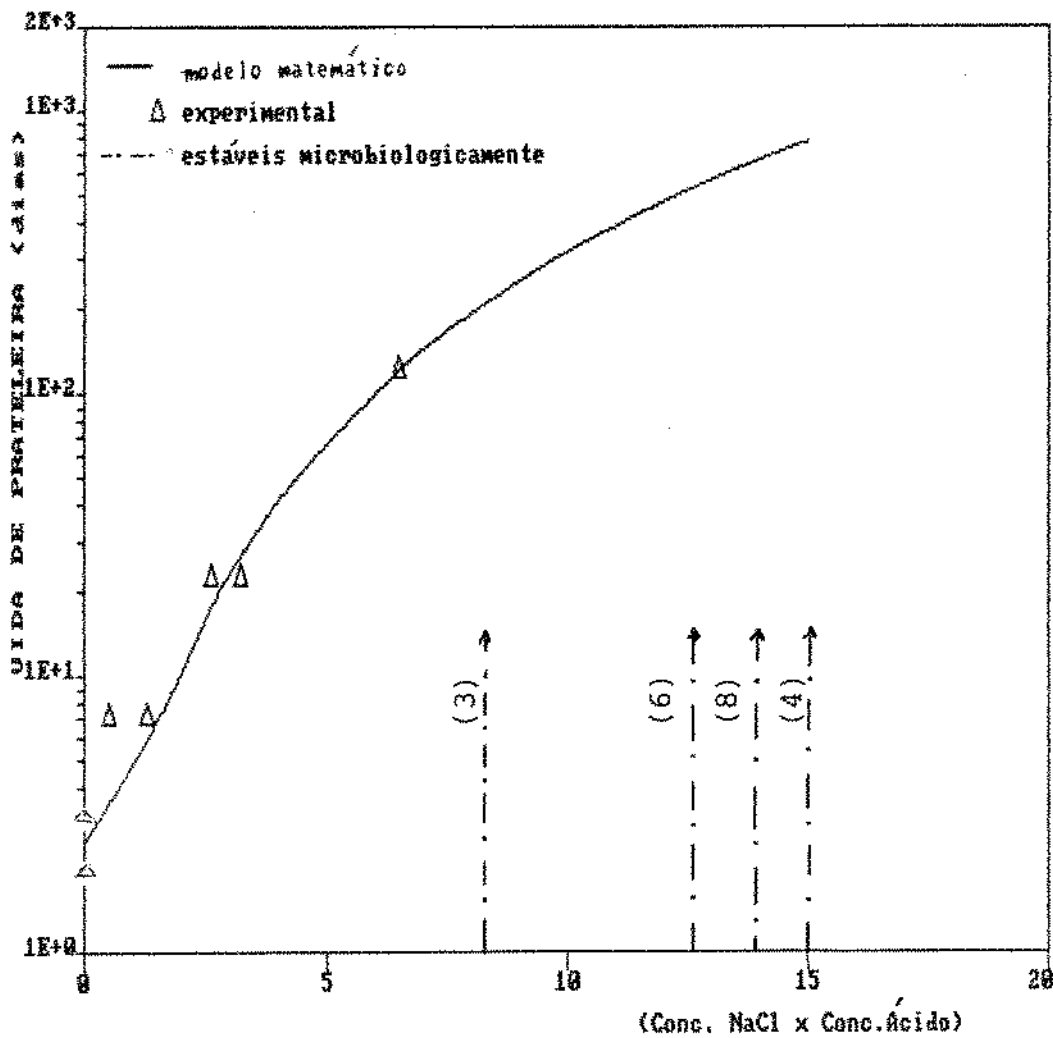


Figura IV.21 - Correlação entre valores experimentais e modelo matemático proposto (Equação IV.3).

A Tabela IV.12 apresenta os resultados de atividade de água experimental e calculada em função da quantidade de cloreto de sódio adicionada. Observa-se que os valores medidos são sempre mais baixos que os calculados.

Tabela IV.12 - Atividade de água experimental e calculada em função do conteúdo de cloreto de sódio e ácido acético.

Tratamentos	Cloreto de sódio (%)	Ácido acético (%)	av	
			Experimental	Calculada
1	2,9	0,45	0,922	0,926
2	7,1	0,45	0,896	0,899
3	2,9	2,12	0,905	0,926
4	7,1	2,12	0,879	0,899
5	2,0	1,30	0,916	0,931
6	8,0	1,30	0,877	0,894
7	5,0	0,10	0,907	0,912
8	5,0	2,50	0,888	0,912
9 a 13	5,0	1,30	0,903	0,912

Conclui-se que a atividade de água sózinha não explica a estabilidade microbiológica do produto e muito menos justifica o excelente desempenho do tratamento 3 em relação ao modelo da Equação (IV.3) pois sua atividade de água é relativamente alta. Observa-se que o tratamento 2, que deteriorou após 22 dias, possuía uma atividade de água mais baixa que o tratamento 3. O tratamento 3 tinha um teor de sal mais baixo e um teor de ácido mais alto que o tratamento 2, indicando um efeito marcado do ácido acético juntamente com a atividade de água na conservação deste produto.

O efeito proporcionado pela adição do ácido acético e cloreto de sódio já foi comentado por KURITA & KOIKE, 1982. Eles observaram que 0,1% de ácido acético com 5% de cloreto de sódio, ou seja,

baixa concentração do ácido e média do sal apresenta um efeito sinérgico antifúngico ou antimicrobiano maior do que os dois aditivos sózinhos.

Deve haver uma concentração crítica de ácido acético, ao redor de 1,3%, que combinando com 5% de cloreto de sódio dê estabilidade microbiológica ao concentrado de tomate.

As concentrações da região representada pelo tratamento 3 neste 2º delineamento experimental deverão servir de base para futuras investigações sobre um possível papel mais pronunciado do ácido acético sobre o cloreto de sódio neste sinergismo de tais conservantes. Entretanto, a esses níveis de concentração, deve-se ter cuidado com o efeito do ácido acético na aceitação sensorial do produto (ver Seção IV.2.3.).

b.2. CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DOS TRATAMENTOS ESTÁVEIS

Neste 2º experimento as características físicas e químicas foram determinadas só para controle, em vista da conclusão do 1º experimento que indicam que as amostras de concentrado de tomate, estáveis microbiologicamente, apresentam muito pouca ou quase nenhuma alteração.

A Tabela IV.13 apresenta os valores de acidez, pH, consistência, atividade de água e graus Brix dos tratamentos estáveis.

Pelos valores de consistência das amostras, os tratamentos 4, 6 e 8 são aceitáveis de acordo com as exigências do mercado externo. O tratamento 3 também é aceitável apesar de ter um valor de consistência um pouco baixo.

Observa-se que os valores do pH das amostras são pouco alterados, mesmo com adições significativas de ácido, enquanto a variação da acidez é mais acentuada. É importante salientar que não se pode avaliar a estabilidade microbiológica de um produto, apenas pelos valores de pH.

A atividade de água controlada do produto confere proteção quanto ao desenvolvimento da maioria das bactérias, inclusive as patogênicas e também ao desenvolvimento de alguns fungos.

A escolha das combinações de sal e ácido que conferem estabilidade ao concentrado de tomate irá depender da avaliação sensorial e do subproduto final (catchup, molho pronto ou outro).

Tabela IV.13 - Características químicas e físicas dos tratamentos estáveis do 2^o experimento.

Tratamento	Acidez(%)	pH	av exper.	Consist.(cm)	Brix
3	3,67	4,00	0,905	5,4	31,2
4	3,69	3,99	0,879	7,2	35,0
6	2,80	4,07	0,877	7,2	35,3
8	3,99	3,96	0,888	6,4	34,0

b.3. AVALIAÇÃO SENSORIAL

Para complementar o estudo, foi feita uma avaliação sensorial para os tratamentos, utilizando-se um teste de ordenação, conduzido segundo o delineamento de blocos completos casualizados, com 24 provadores acostumados com o produto servido (MORAES, 1978).

A preparação das amostras seguiu o mesmo procedimento do 1º experimento.

Foi feita uma análise de variância não-paramétrica dos resultados (SHIROSE, 1985), com as seguintes conclusões: os tratamentos 6 e 8 diferiram significativamente ao nível de 5% de significância; os tratamentos 3 e 4 não diferiram significativamente ao nível de 5% e, que o tratamento 6 foi o mais preferido.

Relacionando estes resultados com a Figura IV.19 observa-se a preferência a produtos com menor conteúdo de ácido do de sal; demonstrando a sensibilidade dos provadores ao sabor ácido. Este fato tem sido comentado pelas indústrias processadoras de produtos de tomate.

V-CONCLUSÕES

Os resultados demonstram um bom potencial de uso da tecnologia dos métodos combinados, na conservação de concentrado de tomate à granel. Isto é sobretudo válido para concentrados que serão transformados em preparados tais como: catchup, purê ou molhos; que terão formulações contendo cloreto de sódio e ácido. O uso desta tecnologia facilitará a conservação dos produtos, diminuindo os problemas com manuseio e com recontaminação.

As seguintes conclusões podem ser extraídas desse trabalho:

1. Os extratos de tomate comerciais, que são o produto da concentração de várias variedades de tomates de diferentes regiões geográficas, apresentam comportamentos semelhantes. Com adição de ácido demonstraram semelhantes alterações na cor, nos valores de acidez e de pH; com adição de solutos (cloreto de sódio, sorbitol e glicerol) apresentaram valores aproximadamente iguais de a_w e, o mesmo comportamento ao relacionar os valores de graus Brix com teores de sólidos totais.

2. O ácido tartárico provoca uma alteração apreciável na cor de extratos de tomate, com o surgimento de pequenas substâncias brancas no extrato diluído- aparentemente uma descoloração das substâncias fibrosas-, que foi constatada pelas análises físicas.

3. Os valores calculados da a_w dos concentrados de tomate com adição de solutos são mais altos que os obtidos experimentalmente para as amostras formuladas do 1º e 2º experimento nas mesmas concentrações de solutos.

4. Quando um ácido fraco é adicionado a um produto como agente antimicrobiano, o efeito protetor do mesmo é medido melhor em termos de acidez do produto do que pelo pH. Apesar do grande poder de inibição ao crescimento microbiano os ácidos fracos, não dissociados, tendem a produzir pequenas reduções no pH do alimento (concentrado de tomate).

5. É possível conservar extrato de tomate triplo concentrado (28-30° Brix), por um período superior a 1 ano, apenas com a adição de cloreto de sódio e ácido acético.

6. Durante o armazenamento ocorre um escurecimento da cor original dos concentrados de tomate na camada superficial, ou seja, naquela em que há contato com o oxigênio do ar. Nos recipientes utilizados no 1º experimento (3,5 Kg) esta camada, diferenciada por amostra, não excedeu 2cm de espessura.

7. Pode-se concluir que existe um efeito sinérgico do NaCl e ácido acético na inibição do crescimento de microrganismos. É possível derivar equação simples para a estimativa da vida-de-prateleira (VP, dias) do produto em função da concentração destes aditivos (%):

$$VP = 2,5 + 1,73 (\text{conca} \times \text{conNaCl})^{2,25}$$

8. O Ácido acético parece ter um papel mais importante no mecanismo sinérgico do que o NaCl. O conteúdo de ácido acético entretanto é limitado pela sensibilidade do consumidor ao sabor ácido, enquanto que o conteúdo de NaCl influi na consistência do produto.

9. A adição de conservantes (benzoato de sódio, sorbato de potássio), junto com o ácido acético e sal demonstrou ser desnecessária para o controle microbiológico de amostras inoculadas com 10^5 UFC/g de microrganismos.

10. Quando um experimento planejado pelo Método de Superfície de Resposta dá resultados pouco diferenciados das análises físicas e químicas ou apresenta respostas de morte de microrganismos (contagem zero) juntamente com respostas de crescimento de microrganismos (amostras deterioradas e descartadas) o uso das diversas "ferramentas" deste Método fica prejudicado.

VI-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZAMORA, S. M. ; GERSCHENSON, L. N. ; CERRUTTI, P. ; ROJAS, A. M. Shelf-stable pineapple for long-term non refrigerated storage. Facultad de Ciências Exactas y Naturales, Universidade de Buenos Aires, Argentina, 1983. 21p.

ANGELUCCI, E. . Conservadores e acidulantes em alimentos. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1989, 86p.

———; ARIMA, H. K. ; MANTOVANI, D. M. B. ; FIGUEIREDO, I. B. Análise química de café. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1982. 85p.

———; CARVALHO, C. R. L. ; CARVALHO, P. R. N. ; FIGUEIREDO, I. ; MANTOVANI, D. M. B; MORAES, R. M. Análises Químicas de alimentos. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. 123p.

ANTUNES, A. J. & CANHOS, W. P. Aditivos em alimentos. São Paulo, Secretaria da Industria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo, 1983. 178p.

BOX, G. E. P. ; HUNTER, W. G. ; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building. U. S. A. , John Wiley & Sons, Inc. , 1978. 657p.

BRAVERMAN, J. B. S. Introduction to the biochemistry of foods. New York, Elsevier Publishing Co. , 1963. 336p.

- BROWN, M. H. & EMBERGER, O. Oxidation-reduction. In: *Microbial Ecology of Foods*. I. C. M. S. F. New York, Academic Press, 1980. v.1, p.112-125
- CHEN, C. S. Water activity concentration models for solutions of sugar-salts and acids. *Journal of Food Science*. U.S.A., 54(5): 1318-1321, 1989.
- & KARMAS, E. Solute activity effect on water activity. *Lebensm. - Wiss. u. - Technol. Suiça*, 13(2): 101-104, 1980.
- CHIRIFE, J. Prediccion de la actividad de água en alimentos. In: I SEMINARIO SOBRE ATIVIDADE DE ÁGUA EM ALIMENTOS. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. p. 116-155.
- & FERRO FONTAN, C. Water activity of fresh foods. *Journal of Food Science*. U.S.A., 47(2):661-663, 1982.
- ; ———; BENMERGUI, E. A. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. IV. aw predictions in aqueous non electrolyte solutions. *Journal of Food Technology*. U.S.A, 15(1):59-70, 1980.
- CORLETT, D. A. Jr & BROWN, M. H. pH and acidity. In: *Microbial Ecology of Foods*. I. C. M. S. F. New York, Academic Press, 1980. v..1, p.92-110.
- DANIEL, C. Applications of statistic to industrial experimentation. U.S.A., John Wiley & Sons, 1976. 294p.

DAVIDSON, P. M. & PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food technology. U.S.A., 43(1):148-155, 1989.

DUCKWORTH, R. B. ; ALLISON, J. Y. ; CLAPPERTON, H. A. The aqueous environment for chemical change in intermediate moisture foods. In: Intermediate moisture foods. Inglaterra, Applied Science Publishers, Ltd. 1986, p. 89-99.

DZIEZAK, J. D. Acidulants: ingredients that do more than meet acid test. Food technology. U.S.A., 44(1): 76-83, 1990.

FAVETTO, G. ; CHIRIFE, J. ; BARTHOLOMAI, G. B. A study of water activity lowering in meat during immersion - cooking in sodium chloride-glycerol solutions. I-Equilibrium considerations and diffusional analysis of solute uptake. Journal of Food Technology. U.S.A., 16(6): 609-619, 1981.

FERRO FONTAN, C. ; BENMERGUI, E. A. ; CHIRIFE, J. The prediction of water activity of aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. III. a_w prediction in multicomponent strong electrolyte aqueous solutions. Journal of Food Technology. U.S.A., 15(1): 47-58, 1980.

FRANCIS, J. F. & CLYDESDALE, F. M. Food colorimetry: theory and applications. U.S.A., The AVI Publishing Co., Inc., 1975. 477p.

GOULD, G. W. Present state of knowledge of a_w effects on microorganisms. In: Properties of water in foods. Netherlands,

Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.229-245.

HARTER, F.L. & FISHER, H.J. Modern food analysis. U.S.A., Spring -
Verlag. New York Inc., 1971. 519p.

HORTWITZ, W. (Ed.). Official methods of analysis of the Association
of official analytical chemists. Association of official
analytical chemists. Washington D.C., 13th ed. 1980. 1018p.

INFORMAÇÕES ECONÔMICAS. Instituto de Economia Agrícola do Estado de
São Paulo, São Paulo, 21(1): 103p. 1991.

ITAL. Alimentos Enlatados. Princípios do controle do processamento
térmico, acidificação e avaliação do fechamento de recipientes.
Campinas, 1990, 4^a edição. 23p.

JARDIM, D. C. P. Medidas de atividade de água. In: I SEMINÁRIO SOBRE
ATIVIDADE DE ÁGUA EM ALIMENTOS. Campinas, Instituto de Tecnologia
de Alimentos, 1987. p.74-100.

———. Estudo da redução da atividade de água (av) do extrato de
tomate concentrado com a adição de solutos. Rio de Janeiro, Anais
do XII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.
1989.

JAYARAMAN, K. S. ; RAMANUJA, M. N. ; VENUGOPAL, M. K. ; LEELA, R. K. ; BHATIA, B. S.
Studies on the preparation of intermediate moisture pineapple.
Journal of Food Science and Technology. India, 12(6):309-312, 1975.

JONES, A. H. A study of organisms causing gaseous spoilage of canned tomato products. *Canadian Canner and Food Manufacturer*. Canadá, 7: 9-12, 1936.

KANTEREWICZ, R. J.; CHIRIFE, J.; DE LAGARDE, E. A. Preservation of concentrated cheese whey by combined factors. *Journal of Food Science*. U. S. A., 50(6):1629-1632, 1985.

KAPLOW, M. Commercial development of intermediate moisture foods. *Food Technology*. U. S. A., 24(8):889-893; 1970.

KAREL, M. Water activity and food preservation. In: *Physical principles of food preservation*. U. S. A. Marcel Dekker, Inc. 1975, p. 237-263.

KITIC, D.; FAVETTO, G. J.; CHIRIFE, J.; RESNIK, S. Measurement of water activity in the intermediate moisture range with the novasina thermoconstanter humidity meter. *Lebensm. Wiss u-Technol*. Suíça, 19 (4):297-301, 1986.

KROGSTAD, D. J. & MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations. In: *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, Md., William & Wilkins, 2nd ed., 1986. 537p.

KURITA, N. & KOIKE, Sh. Sinergistic antimicrobial effect of acetic acid, sodium chloride and essential oil components. *Agriculture Biology Chemits*. Japão, 46(6):1655-1660, 1982.

LABUZA, T.P. Properties of water as related to the science quality of foods. Proc. INTERNATIONAL CONGRESS FOOD SCIENCE TECHNOLOGY. Chicago, Institute Food Technology, 1970. p.618-635.

———; Oxidative changes in food at low intermediate moisture levels. In: Water relations of foods. New York, Academic Press, 1975. p.455-474.

———. The properties of water in relationship to water binding in foods: a review. Journal Food Processing and Preservation, U.S.A., 1(2): 167-190, 1977.

———. The effect of water activity on reaction kinetics of foods deterioration. Food Technology. U.S.A., 34(4): 36-41, 1980.

LARA, A. B. W. ; NAZÁRIO, G. ; ALMEIDA, M. E. W. ; PREGNOLATTO, W. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. São Paulo, 2^a ed. 1976. v.1.

LEISTNER, L. Teoria dos obstáculos aplicada à produção de embutidos cárneos. APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA EM PRODUTOS CÁRNEOS. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1990. p.11-26.

——— & ROEDEL, W. The stability of intermediate moisture foods with respect to micro-organisms. Intermediate moisture foods. Inglaterra, Applied Science Publisher, Ltd., 1976. p.120-137.

——— & —— Microbiology of intermediate moisture foods.

INTERNATIONAL MEETING ON FOOD MICROBIOLOGY AND TECHNOLOGY.
Itália, april, 1978.

LEONARD, S. ; MARSH, G. L. ; BUHLERT, J. E. ; HEIL, J. R. ; WOLCOTT, T. K. ; BIRNBAUM, D. G. Microbial stability and remanufacturing characteristics of high solids tomato concentrates. Journal of Food Processing and Preservation. U.S.A., 1(3):191-206, 1977.

LEITÃO, M. F. F. Conservadores em alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microorganismos. Coletânea do ITAL. Campinas, 20(2):116-127, 1990.

L. M. F. C. P. Analysis of tomato products. In: Laboratory manual for foods canners and processors. U.S.A., The AVI Publishing Company, Inc. 3th ed. 1968, v.2. chapter 21. 444p.

LONCIN, M. & MEARSON, R. L. Equilibrium between phases. In: Food engineering - principles and selected applications. U.S.A. Academic Press, Inc., 1979. p.175-202.

LUH, B. S. & DAOUD, H. N. Effect of break temperature and holding time on pectin and pectinic enzymes in tomato pulp. Journal of Food Science. U.S.A., 36(7):1039-1043, 1971.

———; LEONARD, S. L. ; MARSH, G. L. Storage changes in tomato juice. Food Technology. U.S.A., 12(7):380-384, 1958.

———; ———; ——— Objective criteria for storage in tomato paste

Food Technology. U.S.A., 12(7):347-351, 1958a.

MEASURES, J. C. & GOULD, G. W. Interactions of microorganisms with the environment of intermediate moisture foods. In: Intermediate moisture foods. Inglaterra, Applied Science Publishers Ltd., 1986. p. 281-297.

MEYER, R. S. ; GRANT, M. A. ; LUEDECKE, L. O. ; LEUNG, H. K. Effects of pH and water activity on microbiological stability of salad dressing. Journal of Food Protection. U.S.A., 52(7):477-479, 1989.

MIERS, J. C. ; SANSHUCK, D. W. ; NUTTING, M. D. ; WAGNER, J. R.. Consistency of tomato products: effect of holding temperature and pH. Food Technology. U.S.A., 24(12): 81-85, 1970.

MINANI, K. & FONSECA, H. Tomate-Produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. Série extensão agroindustrial 8. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. São Paulo, 1983. 92p.

MISHIMA, A. Informações. Abia Informa. São Paulo, n.228, maio 1990.

MONTVILLE, T. J. Metabolic effect of *Bacillus licheniformis* on *Clostridium botulinum*: implications for home-canned tomatoes. Applied of Environmental Microbiology. U.S.A., august:334-338, 1982.

MOORE, W. J. Termodinâmica e equilíbrio químico. In: Fisico-Química. Rio de Janeiro, Editora da Universidade de São Paulo, 1968.

p.195-241.

MORAES, M. A. Ch. Métodos para avaliação sensorial de alimentos. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. UNICAMP, 1978. 87p.

MOSSEL, D. A. A. Water and microorganisms in foods - A synthesis. In: Water relations of foods. Inglaterra, Academic Press, In., 1975. p. 347-361.

MUDAHAR, G. S. ; SIDHU, J. S. ; MINHAS, K. S. Technical note: effect of low pH preservation on the colour and consistency of tomato juice. Journal of Food Technology. U.S.A., 21(2):233-238, 1986.

N.C.A. Investigating spoilage problems. In: Laboratory manual for food canners and processors. 3rd ed. U.S.A., The AVI Publishing Co., 3rd ed. 1968. v.1. p. 44-87.

NORRISH, R. S. An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionary syrups. Journal of Food Technology. U.S.A., 1(1):25-39, 1966.

OGLE, W. L. & KRAMER, A. Puts brake on browning of ketchup in bottle necks. Food Engineering. U.S.A., 26:67-68, 1954.

PEARSON, D. The chemical analysis of foods. London, J & A Churchill, 6th ed., 1970. 604p.

PITZER, K.S. Thermodynamics of electrolytes I. Theoretical basis and general equations. The Journal of Phys. Chem. U.S.A., 77:268-277, 1973.

—— & MAYORGA, G. Thermodynamics of electrolytes II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. The Journal of Phys. Chem. U.S.A., 77:2300-2308, 1973.

ROBERTS, T.S. Combinations of antimicrobials and processing methods. Food Technology, U.S.A., 43(1):156-163, 1989.

—— & SMART, J.L. Control of clostridia by water activity and related factors. In: Intermediate moisture foods. Inglaterra, Applied Science Publishers, 1976. p.203-214.

ROSS, K.D. Estimation of water activity in intermediate moisture foods. Food Technology, U.S.A., 29(3):26-34, 1975.

SAPERS, G.M.; PHILLIPS, J.G.; TALLEY, F.B.; PANASTIUK, O.; CARRE, J. Acidulation of home canned tomatoes. Journal of Food Science, U.S.A., 43(4):1049-1052, 1978.

SHIROSE, I. Estatística aplicada à experimentação organoléptica. Campinas, Instituto de Tecnologia de alimentos, dezembro, 1985. 157p.

SIDHU, J.S.; BHUMBLA, U.K.; JOSHI, B.C. Preservation of tomato juice under acid conditions. Journal Science Food Agriculture. Reino

Unido, 35(3):345-352, 1984.

SINSKEY, A.J. New developments in intermediate moisture foods: humectants. In: Intermediate moisture foods. Inglaterra, Applied Science Publishers Ltd., 1976. p. 260-280.

SLOAN, A.E. & LABUZA, T.P. Investigating alternative humectants for use in foods. Food Product Development. U.S.A., 9(7):75-88, 1975.

SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. A.P.H.A. U.S.A., American Public Health Association, 1984. 904p.

STATIGRAPHICS. Manual do "software" estatístico statgraphics versão 2.6 STSC, Inc. U.S.A. v.1.1987

TEIXEIRA NETO, R. O. ; VITALI, A. A. ; GONÇALVES, J. R. ; MORI, E. E. M. ; BORDON, E. A. O. Resfriamento de polpas concentradas em tambores de 200 litros. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas. 1(1): 1- 22, jan/jun 1981.

TILBURY, R.H. The microbial stability of intermediate moisture foods with respect to yeasts. In: Intermediate moisture foods. Inglaterra, Applied Science Publishers Ltd., 1976. p. 138-165.

TROLLER, J.A. Statistical analysis of av measurements obtained with the sina scope. Journal of Food Science. U.S.A., 42(1):86-90, 1977.

TROLLER, J. A. Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Technology*, U.S.A., 34(5):76-80, 1980.

——— Effects of aw and pH on growth and survival of *Staphylococcus aureus*. In: *Properties of water in foods*. Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.247-257.

VICINI, E.; PIRONE, G.; MANNINO, S.; PREVIDL, M. P. Capacità di sviluppo in derivati del pomodoro a diversa concentrazione di un ceppo di *Bacillus coagulans* isolato da un caso di flat sour. Nota 2. Pomodoro concentrato a residuo ottico 12, 18, 28%. *Industria Conserve*. Italia, 65(1):20-23, 1990.

WHITE, L. S. Spoilage bacteria in tomato products. *Food Research*, U.S.A., 16(5):422-428, 1951.

WILLIAMS, J. C. Chemical and non-enzymic changes in intermediate moisture foods. In: *Intermediate moisture foods*. Inghilterra. Applied Science Publishers Ltd., 1976. p.100-119.

WOLCOTT, T.; BUHLERT, J.; MARSH, G. L.; LEONARD, S.; HELL, J. R. Objective tomato color measurement color scoring tomato products objectively. University of California. U.S.A., 1980. 5p.