

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Estudo do Processamento de Suco de Laranja**  
**através da Tecnologia de Homogeneização a**  
**Ultra Alta Pressão**

**FLÁVIO PECKOLT CAMPOS**  
Engenheiro de Alimentos

**PROF. DR. MARCELO CRISTIANINI**  
Orientador

**PARECER**

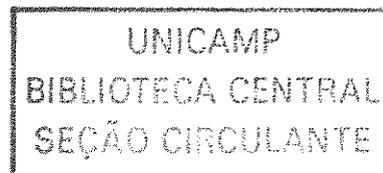
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Flávio Peckolt Campos**, aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de fevereiro de 2004.

Campinas, 27 de fevereiro de 2004.

  
Prof. Dr. Marcelo Cristianini  
Presidente da Banca

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE**  
**MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.**

**CAMPINAS – S.P., 2004**



2004908925

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP C157e
V	EX
TOMBO BC/	58724
PROC.	16-117-04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	29.08.04
Nº CPD	

CM00198323-5

BIB ID 317421

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C157e Campos, Flávio Peckolt  
Estudo do processamento de suco de laranja através da tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão / Flávio Peckolt Campos. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Marcelo Cristianini  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

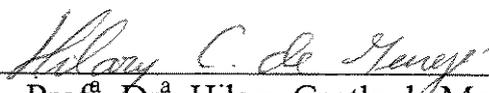
1.Pectina. 2.Suco de laranja. 3.*Saccharomyces cerevisiae*. 4.*Lactobacillus plantarum*. I.Cristianini, Marcelo. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

## BANCA EXAMINADORA



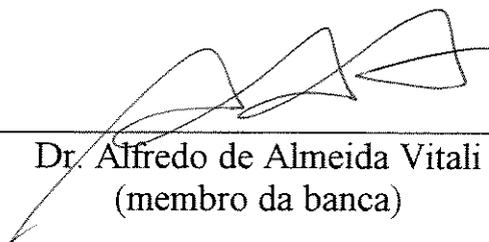
---

Prof. Dr. Marcelo Cristianini  
(orientador)



---

Prof.ª Dr.ª Hilary Castle de Menezes  
(membro da banca)



---

Dr. Alfredo de Almeida Vitali  
(membro da banca)

---

Prof.ª Dr.ª Pilar Rodriguez de Massaguer  
(membro da banca)



"Faça apenas uma vez o que os outros  
disseram que nunca poderia ser feito,  
e você nunca mais irá prestar  
atenção às limitações deles"

James Cook (1728-1779), explorador britânico



Dedico este trabalho  
à minha mãe Célia e  
ao meu pai Guacir,  
falecido antes do  
término desta pesquisa



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me apoiaram incondicionalmente em toda minha vida;

À minha família pelo incentivo e apoio, e em especial aos meus avós, sempre carinhosos e preocupados;

Ao Prof. Dr. Marcelo Cristianini, pela orientação, estímulo e comprometimento;

Aos amigos Marcelo, Levy e Mark, por toda a ajuda desde a elaboração do projeto até a conclusão da pesquisa;

A todos os amigos que incentivaram essa realização e estiveram dispostos a jogar conversa fora a qualquer hora;

À minha namorada Janayna, pelo amor, compreensão e paciência, e a sua família, pelo carinho;

Aos funcionários do Departamento de tecnologia de Alimentos, em especial à Ana Lourdes, José Roberto e Ana Koon, pela atenção e ajuda;

À Intercitrus Agroindustrial LTDA, na pessoa dos senhores Edson Roberto Moreira e Carlos Mendes Neto, pelo empréstimo da extratora de suco;

À C.I.V. – Companhia Industrial de Vidros, pela doação das embalagens utilizadas nos estudos;

Aos amigos Alencar e Gilmar, pela ajuda na logística da doação das embalagens;

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa acadêmica.



## RESUMO

Preservar os alimentos sempre foi uma necessidade do ser humano. Dessa necessidade, surgiram diversos métodos que prolongam a vida útil dos alimentos, dentre eles, destacam-se os que utilizam o calor para reduzir a carga microbiana e inativar enzimas. Esses processos, como a esterilização e a pasteurização, podem ocasionar danos ao conteúdo nutricional e ao sabor do produto, uma vez que o emprego de calor para inativar microrganismos e enzimas também degrada vitaminas e cataliza reações químicas no alimento que levam à formação de compostos que conferem sabores estranhos ao produto. Nos últimos anos, tem-se evidenciado a preferência do consumidor por produtos que não sofram muitos processos e que se assemelhem ao produto natural, mantendo suas características nutricionais e de sabor. Essa nova necessidade levou a uma busca por processos que apresentem eficiência equivalente à dos processos térmicos, mas que garantam os anseios do consumidor; como exemplo desses processos estão o uso de alta pressão, microondas, pulsos elétricos e irradiação, entre outros. Suco de laranja é um produto que ilustra bem essa tendência, pois os processos térmicos utilizados em sua conservação causam nítidas diferenças sensoriais no produto final, além de diminuir o conteúdo nutricional. O consumo de suco de laranja, assim como de outros sucos de frutas, vem crescendo muito nos últimos anos no Brasil, restando ainda um amplo mercado interno, além de possuir grande importância econômica nas exportações na forma congelada. Dessa forma, o suco de laranja torna-se um candidato ao emprego dessas novas tecnologias. O processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão é um dos processos chamados “não-térmicos” e opera de modo contínuo, o que favorece a aplicação em alimentos líquidos, como o suco de laranja. O processo consiste em bombear o produto, com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados, através de uma válvula de homogeneização na pressão desejada (até 320 MPa), a qual é subitamente reduzida após a passagem pela válvula. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência desse processo para o suco de laranja como uma alternativa aos processos de pasteurização existentes atualmente. Para isso foram avaliadas: as inativações dos microrganismos *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*; a inativação da enzima PectinaMetilEsterase; a influência do pH e da pressão em parâmetros de qualidade do suco de laranja (inativação da PectinaMetilEsterase, destruição de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*,

retenção de Ácido Ascórbico e manutenção da cor no suco de laranja); e ao final, foi avaliada a vida de prateleira do produto processado sob pressão por 45 dias, sendo analisados: Contagem de Bolores e Leveduras, Contagem Total, Atividade de PectinaMetilEsterase, quantidade de Ácido Ascórbico, Acidez, Brix, pH, Cor, Turbidez, e Aceitação Sensorial. Os resultados do estudo das taxas de inativações dos microrganismos indicaram que pressões a partir de 250 MPa foram suficientes para destruir completamente cargas iniciais de  $1,2 \times 10^7$  UFC/mL de *Lactobacillus plantarum* e  $2,9 \times 10^5$  UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* em suco de laranja. Já os estudos da inativação da PectinaMetilEsterase mostraram sua dependência do pH e da pressão do processo. O processamento a pH 4,1 e a 300 MPa foi capaz de inativar 67,6% da atividade inicial da referida enzima. O estudo da influência do pH e da pressão de processo mostrou que as inativações microbiana e enzimática aumentaram com o aumento da pressão e a redução do pH, enquanto que a retenção do Ácido Ascórbico diminuiu com o aumento do pH e da pressão; a diferença total de cor teve seu máximo nos menores valores da pressão e do pH. Na avaliação da vida de prateleira do produto, as amostras (processado sob pressão, termicamente pasteurizado e congelado) foram analisadas até 45 dias de armazenamento, sendo que as análises de pH, Brix, Acidez, Cor e as Contagens Microbilológicas apresentaram pouca variação durante o período de análise. Os resultados de Atividade de PectinaMetilEsterase e de Turbidez também foram relativamente constantes mas diferenciaram-se pelas diferenças entre as amostras, onde a amostra processada termicamente obteve melhores resultados. A quantidade de Ácido Ascórbico apresentou alterações durante o armazenamento nas duas amostras processadas, sendo que a amostra processada sob pressão iniciou uma redução antes da amostra processada termicamente, mas ao final do período possuía uma maior quantidade. Sensorialmente, a amostra congelada se diferenciou das outras claramente durante todo o período de análise, não existindo muitas diferenças entre as outras amostras na maioria dos casos. Com 45 dias de armazenagem, as três amostras apresentaram diferenças significativas somente com relação ao aroma.

## ABSTRACT

Preservation of food has always been a human concern. Several non-thermal processes (High Pressure, Electric Pulse,) have been studied to minimize nutritional and sensory damage that are likely to occur during the traditional thermal processes, aiming at preserving the fresh characteristics of the natural juice. The thermal processes, such as sterilization and pasteurization, can cause damage to the nutritional content and to the flavor of the product. In recent years, the occurrence of quality defects (sensory and nutritional damage) in foodstuffs submitted to the traditional heat preservation processes, and the desire of the consumer for healthy products (minimally processed), suggest the study of new alternatives to avoid these losses and preserve the natural characteristics. Orange juice is a critical product within this concept due to the nutritional and sensory damage that occurs when it is submitted to traditional thermal pasteurization. Orange juice, as well as other fruit juices, is a product whose consumption in Brazil has increased significantly over the last few years, being of great economic importance. The orange juice is thus a suitable candidate for the use of these new technologies, and Ultra High Pressure Homogenization has been shown to be an alternative to the traditional thermal pasteurization of pumpable foods. The process consists of pumping the product, with the use of two synchronized overlapped intensifiers, through a homogenizer valve at the adjusted pressure (up to 320 MPa), which is suddenly reduced after the passage through the valve. The objective of this work was to evaluate the efficiency of the Ultra High Pressure Homogenization process in orange juice as an alternative to the traditional thermal pasteurization process. To reach this objective, the study was carried out in three stages: a study of the inactivation rates of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, and of the enzyme PectinMethylEsterase; a study of the influence of processing pressures and pH on the quality parameters of orange juice (PectinMethylEsterase Inactivation, destruction of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, Ascorbic Acid retention and color maintenance); and The study of the stability of pasteurized orange juice by high pressure homogenization during 45 days, where the samples were evaluated weekly for: Mold and Yeast plate count, Total plate count, PectinMethylEsterase Activity, residual Ascorbic Acid, Acidity, Brix, pH, Color, Cloud Stability, and sensory evaluation. The shelf life of the product was evaluated up to 45 days of storage comparing the samples (pressure

processed, heat pasteurized and frozen). Brix, pH analyses, Acidity, Color and the Microbial Counts presented little variation during the analysis period. The results for PectinMethylEsterase Activity and of Cloud Stability were also relatively constant but they differed among the samples, where the thermal processed sample obtained better results. The amount of vitamin C presented alterations during storage in the two processed samples, the sample processed under pressure showing an earlier reduction than the heat processed sample, but at the end of the period the former showed a higher amount. Concerning the sensory evaluation, the frozen sample showed a better acceptance during the entire period. At the end of the period (45 days) the three samples only presented significant differences with respect to the aroma.

# ÍNDICE

RESUMO .....	XI
ABSTRACT .....	XIII
ÍNDICE .....	XV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIX
ÍNDICE DE TABELAS .....	XX
INTRODUÇÃO .....	XXIII
OBJETIVOS .....	XXV
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	XXVII
O processamento a Alta Pressão .....	xxvii
Método Hidrostático .....	xxviii
Método de Homogeneização .....	xxix
Efeito do processamento a Alta Pressão sobre Microrganismos .....	xxx
<i>Mecanismo de Inativação no Método Hidrostático</i> .....	xxxi
<i>Mecanismo de Inativação no Método de Homogeneização</i> .....	xxxiii
Efeito do Processamento a Alta Pressão sobre Enzimas .....	xxxiv
<i>Efeito do processamento a Alta Pressão sobre a PectinaMetilEsterase</i> .....	xxxvii
Utilização do Processamento a Alta Pressão na Pasteurização de Suco de Laranja .....	xxxviii
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	xxxix
<b>CAPÍTULO 1 – Avaliação da inativação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i> em Suco de Laranja através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão.</b> .....	1
<b>Resumo</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	2
<b>1. Introdução</b> .....	3
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	4
2.1. Matéria-prima .....	4
2.2. Culturas microbiológicas .....	4
2.3. Processamento a Alta Pressão .....	5
2.4. Processamento .....	6
2.5. Análises Físico-Químicas .....	7
2.6. Análises Microbiológicas .....	7
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	7

3.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	7
3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
4. <b>Conclusões</b> .....	11
5. <b>Agradecimentos</b> .....	12
6. <b>Referencias Bibliográficas</b> .....	12
<b>CAPÍTULO 2 - Avaliação da taxa de destruição de PectinaMetilEsterase (PME) em Suco de Laranja através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão</b> .....	15
<b>Resumo</b> .....	15
<b>Summary</b> .....	16
1. <b>Introdução</b> .....	17
2. <b>Materiais e Métodos</b> .....	18
2.1. Matéria-prima .....	18
2.2. Processamento a Alta Pressão.....	18
2.3. Processamento .....	19
2.4. Análises Físico-Químicas e Enzimática.....	20
3. <b>Resultados e Discussão</b> .....	21
4. <b>Conclusões</b> .....	24
5. <b>Agradecimentos</b> .....	24
6. <b>Referencias Bibliográficas</b> .....	24
<b>CAPÍTULO 3 – Efeito do pH e da Pressão sobre parâmetros de Pasteurização de Suco de Laranja no Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão</b> .....	27
<b>Resumo</b> .....	27
<b>Summary</b> .....	28
1. <b>Introdução</b> .....	30
2. <b>Materiais e Métodos</b> .....	31
2.1. Matéria-prima .....	31
2.2. Culturas microbiológicas.....	31
2.3. Processamento a Alta Pressão.....	32
2.4. Processamento .....	33
2.5. Análises Físico-Químicas e Enzimática.....	34
2.6. Análises Microbiológicas .....	36
2.7. Planejamento Experimental .....	36
3. <b>Resultados e Discussão</b> .....	38
3.1. Inativação da PectinaMetilEsterase (PME).....	38

3.1.1.	Análise dos Efeitos.....	38
3.1.2.	Análise do Modelo.....	39
3.1.3.	Teste de Variância.....	41
3.1.4.	Análise do Modelo Não codificado.....	42
3.1.5.	Análise da eficiência das previsões do modelo.....	43
3.1.6.	Discussão.....	44
3.2.	Diferença Total de Cor (DE).....	44
3.2.1.	Análise dos Efeitos.....	44
3.2.2.	Análise do Modelo.....	45
3.2.3.	Teste de Variância.....	46
3.2.4.	Análise do Modelo Não codificado.....	47
3.2.5.	Análise da eficiência das previsões do modelo.....	48
3.2.6.	Discussão.....	48
3.3.	Inativação de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	49
3.3.1.	Análise dos Efeitos.....	49
3.3.2.	Análise do Modelo.....	50
3.3.3.	Teste de Variância.....	51
3.3.4.	Análise do Modelo Não codificado.....	52
3.3.5.	Análise da eficiência das previsões do modelo.....	53
3.3.6.	Discussão.....	54
3.4.	Inativação de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	54
3.4.1.	Análise dos Efeitos.....	54
3.4.2.	Análise do Modelo.....	55
3.4.3.	Teste de Variância.....	56
3.4.4.	Análise do Modelo Não codificado.....	57
3.4.5.	Análise da eficiência das previsões do modelo.....	58
3.4.6.	Discussão.....	58
3.5.	Retenção de Ácido Ascórbico.....	59
3.5.1.	Análise dos Efeitos.....	59
3.5.2.	Análise do Modelo.....	60
3.5.3.	Teste de Variância.....	61
3.5.4.	Análise do Modelo Não codificado.....	62
3.5.5.	Análise da eficiência das previsões do modelo.....	63
3.5.6.	Discussão.....	63
4.	Conclusões.....	64
5.	Agradecimentos.....	65
6.	Referencias Bibliográficas.....	65
<b>CAPÍTULO 4 – Avaliação da Vida de Prateleira do Suco de Laranja Pasteurizado através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão.....</b>		<b>67</b>
<b>Resumo.....</b>		<b>67</b>
<b>Summary.....</b>		<b>69</b>
1.	<b>Introdução.....</b>	<b>71</b>
2.	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>72</b>

2.1. Matéria-prima.....	72
2.2. Processamento a Alta Pressão.....	72
2.3. Processamento.....	73
2.4. Análises Físico-Químicas e Enzimática.....	74
2.5. Análises Microbiológicas.....	76
2.6. Análise Sensorial.....	76
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>77</b>
3.1. Contagens Microbiológicas.....	77
3.2. Análises Físico-Químicas.....	78
3.3. Cor.....	80
3.4. Atividade de PectinaMetilEsterase.....	81
3.5. Turbidez.....	82
3.6. Ácido Ascórbico.....	83
3.7. Análise Sensorial.....	85
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>86</b>
<b>5. Agradecimentos.....</b>	<b>86</b>
<b>6. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO I: FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL.....</b>	<b>93</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO 2 - Avaliação da taxa de destruição de PectinaMetilEsterase (PME) em Suco de Laranja através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão

Figura 1:	Inativação da PectinaMetilEsterase (PME).....	22
-----------	---	----

## CAPÍTULO 3 – Efeito do pH e da Pressão sobre parâmetros de Pasteurização de Suco de Laranja no Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão

Figura 1:	Histograma de Efeitos na Inativação da PectinaMetilEsterase.....	39
Figura 2:	Superfície de Resposta para a Inativação da PectinaMetilEsterase (PME).....	42
Figura 3:	Gráfico de Pareto para a Inativação da PectinaMetilEsterase (PME).....	43
Figura 4:	Histograma de Efeitos na Diferença Total de Cor (DE).....	44
Figura 5:	Superfície de Resposta para a Diferença Total de Cor (DE).....	47
Figura 6:	Gráfico de Pareto para a Diferença Total de Cor (DE).....	48
Figura 7:	Histograma de Efeitos na Inativação de Lactobacillus plantarum.....	49
Figura 8:	Superfície de Resposta para a Inativação de Lactobacillus plantarum.....	52
Figura 9:	Gráfico de Pareto para a Inativação de Lactobacillus plantarum.....	53
Figura 10:	Histograma de Efeitos na Inativação de Sacharomyces cerevisiae.....	54
Figura 11:	Superfície de Resposta para a Inativação de Sacharomyces cerevisiae.....	57
Figura 12:	Gráfico de Pareto para a Inativação de Sacharomyces cerevisiae.....	58
Figura 13:	Histograma de Efeitos na Retenção de Ácido Ascórbico.....	59
Figura 14:	Superfície de Resposta para a Retenção do Ácido Ascórbico.....	62
Figura 15:	Gráfico de Pareto para a Retenção do Ácido Ascórbico.....	63

## CAPÍTULO 4 – Avaliação da Vida de Prateleira do Suco de Laranja Pasteurizado através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão

Figura 1:	Acompanhamento da Atividade de PectinaMetilEsterase das três amostras durante a vida de prateleira.....	82
Figura 2:	Monitoramento da Turbidez das três amostras durante a vida de prateleira.....	83
Figura 3:	Acompanhamento das perdas no teor de Ácido Ascórbico das três amostras durante a vida de prateleira.....	84



# ÍNDICE DE TABELAS

## INTRODUÇÃO

Tabela 1:	Comparativo da resistência à pressão hidrostática entre microrganismos. ....	xxxiii
Tabela 2:	Comparativo da resistência à pressão de homogeneização entre microrganismos. ....	xxxiv
Tabela 3:	Resistência à pressão hidrostática de algumas enzimas. ....	xxxvii

## CAPÍTULO 1 – Avaliação da inativação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum* em Suco de Laranja através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão

Tabela 1:	Número de Reduções Logarítmicas de <i>Lactobacillus plantarum</i> . ....	8
Tabela 2:	Monitoramento das temperaturas durante os ensaios de inativação de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	8
Tabela 3:	Número de Reduções Logarítmicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	10
Tabela 4:	Monitoramento das temperaturas durante os ensaios de inativação de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> . ....	10

## CAPÍTULO 2 - Avaliação da taxa de destruição de PectinaMetilEsterase (PME) em Suco de Laranja através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão

Tabela 1:	Monitoramento das temperaturas durante os ensaios de Inativação da PectinaMetilEsterase. ....	23
-----------	---	----

## CAPÍTULO 3 – Efeito do pH e da Pressão sobre parâmetros de Pasteurização de Suco de Laranja no Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão

Tabela 1:	Intervalos de estudo das variáveis independentes .....	37
Tabela 2:	Condições de ensaios com valores codificados e reais .....	37
Tabela 3:	Resultados obtidos para as variáveis de resposta do Planejamento Experimental .....	38
Tabela 4:	Análise do modelo para Inativação da PectinaMetilEsterase.....	40
Tabela 5:	Coefficientes de regressão para Inativação da PectinaMetilEsterase.....	40
Tabela 6:	Análise de variância do modelo codificado para Inativação da PectinaMetilEsterase.....	41
Tabela 7:	Análise do modelo para a Diferença Total de Cor (DE).....	45
Tabela 8:	Coefficientes de regressão para a Diferença Total de Cor (DE).....	46
Tabela 9:	Análise de variância do modelo codificado para a Diferença Total de Cor (DE).....	46
Tabela 10:	Análise do Modelo para o estudo da Inativação de <i>L. plantarum</i> .....	50
Tabela 11:	Coefficientes de regressão para o estudo da Inativação de <i>L. plantarum</i> .....	51
Tabela 12:	Análise de Variância do modelo codificado para o estudo da Inativação de <i>L. plantarum</i> . ....	51
Tabela 13:	Análise do modelo para Inativação de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	55
Tabela 14:	Coefficientes de regressão para Inativação de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	56
Tabela 15:	Análise de variância do modelo codificado para Inativação de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> . ....	56



Tabela 16:	Análise do modelo para Retenção do Ácido Ascórbico .....	60
Tabela 17:	Coefficientes de regressão para Retenção do Ácido Ascórbico.....	61
Tabela 18:	Análise de variância do modelo codificado para Retenção do Ácido Ascórbico. ....	61
<b>CAPÍTULO 4 – Avaliação da Vida de Prateleira do Suco de Laranja Pasteurizado através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão</b>		
Tabela 1:	Contagem de Bolores e Leveduras nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.....	77
Tabela 2:	Contagem Total nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem. ....	77
Tabela 3:	Variação do pH nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.....	78
Tabela 4:	Variação da Acidez Total Titulável nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem. ....	78
Tabela 5:	Variação do °Brix nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.....	79
Tabela 6:	Variação da Relação Brix/Acidez nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem. ....	79
Tabela 7:	Variação dos parâmetros de Cor nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.....	80
Tabela 8:	Diferenças de Cor nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem. ....	81
Tabela 9:	Resultados do Teste de Preferência utilizado na Análise Sensorial dos produtos dos diferentes processos durante o período de armazenamento .....	85



## INTRODUÇÃO

Atualmente, a preferência do consumidor de sucos de frutas é por produtos livres de aditivos, com sabor e aroma o mais próximo possível dos sucos frescos recém extraídos, e com integridade do conteúdo nutricional.

Os processos atuais que visam o aumento da vida de prateleira de sucos de frutas integrais não são capazes de fornecer um produto com as qualidades almejadas pelo consumidor moderno.

O suco de laranja é, atualmente, o principal produto da indústria de sucos de frutas, sendo sua industrialização e comércio de grande importância para o desenvolvimento do país. O consumo de sucos de frutas pronto para beber em embalagens cartonadas sob refrigeração chegou a 55.712.000 L em 2001.

Os processos de pasteurização térmica existentes para o suco de laranja causam alguns defeitos de qualidade no produto final, como o escurecimento não enzimático, degradação de carotenóides e do sabor fresco (usualmente chamado de “sabor a cozido”) e redução do conteúdo vitamínico (degradação da vitamina C). Tal fato sugere o estudo de novos processos capazes de preservar essas características.

Devido à necessidade da obtenção de produtos com as qualidades almejadas pelo consumidor, surgiram os processos chamados de “não-térmicos” que objetivam evitar danos térmicos ao produto. Como exemplo de tecnologias tem-se: Pulso elétrico, Micro-ondas e Alta Pressão.

Para este estudo foi escolhido o processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão, uma vez que esta é uma tecnologia emergente e promissora, e aplicável em sistemas contínuos; e o suco de laranja, pois este se torna candidato natural a processos não térmicos que previnam os danos ocasionados normalmente na pasteurização térmica tradicional.

Na Revisão Bibliográfica têm-se os esclarecimentos sobre a diferenciação dos processos a Alta Pressão, hidrostático e de homogeneização, seus princípios de funcionamento e de ação sobre microrganismos e enzimas, e dados da literatura sobre a

aplicabilidade desta tecnologia e da resistência dos microrganismos e enzimas aos diferentes métodos de aplicação de alta pressão.

Esta dissertação de mestrado foi escrita na forma de artigos, num total de quatro, cada um em um capítulo. Para isto, foram seguidas as normas de publicação (vigentes em janeiro de 2003) da revista *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, publicada pela *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA*. Tais normas são idênticas às do *Journal of Food Science*, publicado pelo *Institute of Food Technologists – I.F.T.*

Os capítulos número um e dois desta dissertação contém um estudo sobre a inativação de *Lactobacillus plantarum*, *Sacharomyces cerevisiae* e PectinaMetilEsterase, dois microrganismos e uma enzima relevantes no processamento de suco de laranja.

Após a realização dos estudos apresentados nos capítulos um e dois, avaliou-se o estudo dos efeitos da variação simultânea do nível de pressão do processo e do pH do produto na destruição dos microrganismos estudados e na inativação da enzima. Este estudo foi realizado com o uso da metodologia de Planejamento Experimental Fatorial e está contida no capítulo três desta dissertação.

Finalmente, considerando os resultados apresentados no capítulo três, pôde-se determinar uma condição de processo adequada para o processamento do suco de laranja natural. Dessa forma, foi realizado o processamento nestas condições, e acompanhada a vida de prateleira do produto, comparando-o com o produto pasteurizado termicamente e com o produto não processado congelado. Este estudo é apresentado no capítulo quatro.

## OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão de suco de laranja.

Dessa forma foram definidos objetivos secundários, de modo a viabilizar o objetivo principal:

- Estudo da inativação de *Lactobacillus plantarum* e *Sacharomyces cerevisiae* submetidos a diferentes pressões de processamento;
- Estudo da inativação da PectinaMetilEsterase submetida a diferentes pressões de processamento
- Estudo da influência da Pressão e do pH em parâmetros de qualidade (cor, retenção do Ácido Ascórbico, inativação de PectinaMetilEsterase), através de um planejamento fatorial, do suco de laranja processado a ultra alta pressão.
- Estudo da vida de prateleira do suco de laranja processado a alta pressão.



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### O processamento a Alta Pressão

Uma das tecnologias mais inovadoras para processar produtos termosensíveis é o tratamento a alta pressão que utiliza pressões de 100 a 1000 MPa para provocar a destruição microbiológica e para retardar significativamente as taxas de reações enzimáticas (Basak, 1996).

O tratamento a Alta Pressão foi reconhecido como uma técnica potencial de preservação há aproximadamente um século atrás desde os trabalhos de Hite em 1889 (Smelt, 1998). A alta pressão foi aplicada por muitos anos na produção de cerâmicas, materiais compostos, diamante artificial e plásticos. Esses desenvolvimentos tecnológicos aumentaram as possibilidades de aplicação comercial na área alimentícia. Uma grande variedade de produtos tratados por pressão foi elaborada no mercado japonês por vários anos, incluindo preparados de frutas, bolinhos de arroz e lula crua. Na França, sucos de frutas tratados por pressão estão disponíveis no mercado. Recentemente, “guacamole” (pasta de abacate) tratada por pressão foi lançada com sucesso no mercado americano. O tratamento a Altas Pressões causa a inativação de microrganismos e enzimas enquanto deixa intactas moléculas pequenas, como a maioria das vitaminas e os compostos voláteis, que conferem sabor aos alimentos (Smelt, 1998). Com isto, a tecnologia de alta pressão tem a vantagem de causar a degradação mínima do sabor e de nutrientes quando comparada à pasteurização térmica tradicional.

Por serem produtos cujas características de sabor e frescor são degradadas quando submetidos a tratamento térmico, os sucos de frutas tornam-se produtos cuja conservação através do tratamento a alta pressão possa ser de grande vantagem. O produto tratado através de Alta Pressão tende a apresentar características nutritivas, funcionais e sensoriais mais próximas às do produto natural, quando comparado ao produto tratado termicamente.

O tratamento a alta pressão ainda é de alto custo, principalmente devido ao alto capital inicial, o que ainda limita a sua aplicação a produtos de alto valor agregado. Entretanto, pode-se esperar que estes custos venham a se tornar mais acessíveis, como uma consequência do desenvolvimento tecnológico. Com isto, mais produtos submetidos a este tipo de tratamento poderão chegar ao mercado, como é o caso do leite pasteurizado por alta pressão, disponível no mercado inglês (Smelt, 1998).

Na pasteurização por alta pressão o produto é submetido a uma pressão muito alta durante poucos segundos. Este processo leva à destruição de bactérias, leveduras e fungos, e a uma parcial desnaturação de enzimas.

O pH baixo de sucos de fruta faz-lhes bons candidatos para a preservação pelo tratamento por alta pressão, uma vez que a germinação de esporos bacterianos resistentes à pressão é inibida, mesmo que ocorra a sobrevivência dos mesmos (Farr, 1990).

Atualmente, dois métodos de processamento de alimentos a Alta Pressão tem sido investigados: o método hidrostático (U.A.P. – Ultra Alta Pressão) e o método de homogeneização (H.A.P. – Homogeneização a Alta Pressão).

### **Método Hidrostático**

O processamento UAP consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de um vaso pressurizado, utilizando um meio que transfere a pressão ao produto (para alimentos tem-se utilizado água potável como meio).

Este método baseia-se em dois princípios gerais:

- princípio de Le Chatelier: segundo o qual qualquer fenômeno (transição de fase, mudança de conformação molecular ou reação química) acompanhado por uma redução de volume é favorecido pelo aumento de pressão (e vice-versa). No caso de uma reação, a pressão alterará o equilíbrio na direção do sistema de menor volume (Cheftel, 1995);
- princípio isostático: que indica que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea através de uma amostra biológica. O processo de pressurização é,

portanto, independente do volume e da forma da amostra, ao contrário do processo térmico. No processo a alta pressão é utilizado um líquido de baixa compressibilidade como a água (Cheftel, 1995).

A alta pressão causa a ruptura da membrana celular de microrganismos e altera a estrutura de enzimas, ocasionando sua destruição e desnaturação, respectivamente.

Em geral, o processamento de alimentos sob pressões entre 200 e 600 MPa (método hidrostático) inativa leveduras, fungos e a maioria das células vegetativas de bactérias incluindo a maioria dos patógenos infecciosos presentes nos alimentos; esporos de bactérias e fungos não são inativados por pressões de até 1000 MPa (Gould, 1996 e Smelt, 1998).

No processamento hidrostático, o produto é embalado em garrafa ou bolsa plástica e colocado no interior do vaso de pressão para ser processado. O processamento de produtos líquidos pode ser realizado através de um sistema semicontínuo (fora da embalagem) utilizando três vasos de pressão e um sistema de válvulas automáticas de modo que na primeira câmara a pressão do produto é aumentada até a pressão de processo, quando é liberado; na segunda câmara o produto fica sob a pressão e tempo especificados para o processo; e na terceira câmara o produto é descomprimido e encaminhado para envase asséptico.

### **Método de Homogeneização**

O processamento HAP é um processo em base contínua que utiliza fundamentalmente um homogeneizador de alta pressão com o intuito de romper células, princípio largamente utilizado nas aplicações de biotecnologia.

O produto é bombeado por dois intensificadores de pressão, sendo forçado a fluir através de uma válvula de homogeneização. Isto produz uma velocidade muito elevada através do orifício, e a expansão resultante é a responsável pela ruptura de células de microrganismos, causando mínimas alterações nas células do alimento.

O termo “alta pressão” descreve a tensão dada ao produto antes da etapa de homogeneização. O produto então passa através de um orifício concêntrico onde a

velocidade torna-se extremamente alta (podendo alcançar velocidades acima da velocidade do som) e a pressão extremamente baixa, causando a evaporação do fluido, e começando o fenômeno de cavitação (Popper and Knorr, 1990). A pressão de trabalho é atingida entre o intensificador de pressão e a válvula primária de homogeneização (após a qual ocorre a maior despressurização). A pressão é aplicada ao produto por um período de tempo da ordem de alguns milissegundos.

Processamentos utilizando pressões da ordem de 200 MPa podem atingir reduções de 5 ciclos logarítmicos em microrganismos relevantes ao processamento de alimentos, segundo estudo de Romeo Toledo, professor de Ciência de Alimentos na Universidade da Geórgia (Mermelstein, 1999).

### **Efeito do processamento a Alta Pressão sobre Microrganismos**

O efeito do processamento a Alta Pressão sobre microrganismos é influenciado por alguns fatores, a exemplo do que ocorre com relação à temperatura:

- quanto à forma vegetativa/esporeada: as bactérias na forma vegetativa apresentam maior sensibilidade à pressão que na forma esporulada, pois nesta forma a resistência de muitas espécies à pressão é alta, resistindo a tratamentos a 1000 MPa pelo processo UAP. Dessa forma, a aplicação mais comum da tecnologia de alta pressão na preservação de alimentos é naqueles de baixo pH onde a sobrevivência dos esporos não causa maiores problemas pela inabilidade dos mesmos em se desenvolver nestas condições (Gould, 1996). A forma da bactéria influencia na resistência à pressão; em geral, cocos são mais resistentes que bastonetes, pois possuem uma maior resistência mecânica.
- fase de crescimento: bactérias no início da fase log são normalmente mais sensíveis à pressão do que as células nas fases estacionária, lag ou de morte (ZoBell apud Hoover et al., 1989).
- coloração de Gram: segundo Smelt (1998), em geral, as bactérias Gram-positivas são mais resistentes à pressão. Tal fato é explicado devido a sua parede celular ser mais fina (possuem membrana externa) se comparada com a estrutura de uma

Gram-negativa. A rigidez da parede celular confere uma fragilidade à estrutura em função da pouca flexibilidade em virtude da aplicação de pressão.

- atividade de água: quase sempre, baixa atividade de água ( $a_w$ ) proporciona um efeito protetor nas células contra a pressão (Oxen et al., 1993), mas microrganismos injuriados pela pressão são geralmente mais sensíveis em baixas atividades de água. Carboidratos possuem, em geral, um efeito protetivo maior que sais (Smelt, 1998).

Em geral, nos microrganismos, o primeiro local de dano devido à pressão é a parede celular (Hoover et al., 1989).

No processo hidrostático, com pressões superiores a 200 MPa, a taxa de destruição aumenta com o aumento da pressão ou do tempo de processo. (Cheftel, 1995).

Os fenômenos que causam a destruição de microrganismos diferem nos métodos de aplicação da Alta Pressão.

### ***Mecanismo de Inativação no Método Hidrostático***

Bignon (1997) cita como princípio de eliminação dos microrganismos a destruição de membranas das células pela alta pressão. Reduções ao redor de 3 até 6 ciclos logarítmicos podem ser alcançadas utilizando-se 410 MPa por 2 minutos, dependendo da natureza do microrganismo. Leveduras são particularmente sensíveis a esse tratamento. Esses resultados são compatíveis com os objetivos da pasteurização para sucos de frutas (Bignon, 1997).

Segundo Hoover et al. (1989), as causas da inativação microbiana são ainda pouco compreendidas. Várias mudanças morfológicas são observadas com o aumento da pressão: compressão de vacúolos gasosos, alongamento da célula, separação da membrana da parede celular, contração da parede celular com a formação de poros, modificações no citoesqueleto, modificações no núcleo e em organelas intracelulares (acima 400 MPa, no caso de *Sacharomyces*), coagulação de proteínas citoplasmáticas, liberação de constituintes intracelulares (especialmente os de origem nuclear) para fora da célula, entre outros (Shimada et al. apud Cheftel, 1995).

A pressão causa algumas desnaturações proteicas na membrana, modificando a permeabilidade e a seletividade da membrana plasmática, podendo resultar na morte da célula (Hoover et al., 1989).

Parish (1998) utiliza parâmetros de inativação microbiológica relacionados ao tratamento hidrostático análogos àqueles utilizados em termobacteriologia:  $D$  é tempo de tratamento, a uma determinada pressão, necessário para reduzir em um ciclo logarítmico uma população de microrganismos; valor  $z$  é o aumento na pressão de tratamento necessário para reduzir em um ciclo logarítmico o valor de  $D$ .

A Tabela 1 apresenta uma comparação da resistência à pressão hidrostática de alguns microrganismos de interesse em alimentos:

**Tabela 1: Comparativo da resistência à pressão hidrostática entre microrganismos.**

<i>Microrganismo</i>	<i>Pressão (MPa)</i>	<i>D (min)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Substrato</i>	<i>Referência</i>
<i>Clostridium pasteurianum</i>	700	2,4	60°C	n.i.	Maggi et al., 1995
<i>Clostridium pasteurianum</i>	800	3,4	60°C	n.i.	Maggi et al., 1995
<i>Citrobacter freundii</i>	230	14,7	20°C	n.i.	Carlez et al., 1992a
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	414	2,17	25°C	n.i.	Ananth et al., 1998
<i>Salmonella senftenberg</i>	414	1,48	2°C	n.i.	Ananth et al., 1998
<i>Listeria innocua</i> <sup>2</sup>	400	3,12	2°C	n.i.	Gervilla et al., 1997
<i>Listeria innocua</i> <sup>2</sup>	400	4	25°C	n.i.	Gervilla et al., 1997
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	200	211,8	20°C	n.i.	Erkmen et al., 1997
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	250	15	20°C	n.i.	Erkmen et al., 1997
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	300	3,7	20°C	n.i.	Erkmen et al., 1997
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	350	2,6	20°C	n.i.	Erkmen et al., 1997
<i>Listeria innocua</i>	400	7,35	2°C	n.i.	Ponce et al., 1998
<i>Listeria innocua</i>	400	8,23	20°C	n.i.	Ponce et al., 1998
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	150	84,4	4°C	leite cru	Mussa et al., 1999
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	250	46,0	4°C	leite cru	Mussa et al., 1999
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	300	26,6	4°C	leite cru	Mussa et al., 1999
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>1</sup>	350	13,9	4°C	leite cru	Mussa et al., 1999
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	500	0,02*	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	350	0,64*	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> <sup>4</sup>	500	0,07**	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> <sup>4</sup>	350	1,27**	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a

<sup>1</sup> Scott A<sup>2</sup> 910 CECT<sup>3</sup> ATCC 27690<sup>4</sup> ascoporos

\* z = 106 MPa

\*\* z = 123 MPa

n.i.: não informado

<sup>a</sup> apud Tewari et al., 1999

### **Mecanismo de Inativação no Método de Homogeneização**

Segundo Popper e Knorr (1990), microrganismos são destruídos pela repentina queda de pressão, tensão de cisalhamento e torção, e mais provavelmente devido às ondas de choques de cavitação resultantes do colapso das bolhas de gás.

A elevada velocidade alcançada pelo produto ao passar através da válvula de homogeneização é responsável pelo atrito entre as células de microrganismos, o que pode causar o colapso da parede celular devido à sua rigidez. Ao passar pela válvula de homogeneização o produto encontra um ambiente de pressão muito baixa que proporciona a expansão do líquido e conseqüente colapso dos vacúolos de gás das células dos microrganismos (Popper e Knorr, 1990).

A Tabela 2 apresenta uma comparação da resistência à pressão de homogeneização de alguns microrganismos de interesse em alimentos:

**Tabela 2: Comparativo da resistência à pressão de homogeneização entre microrganismos.**

Microrganismo	Pressão (MPa)	n° red. log.*	T (°C)	Substrato	Referência
<i>Escherichia coli</i>	100	2	n.i.	n.i.	Lanciotti et al., 1996
<i>Escherichia coli</i>	150	6	n.i.	n.i.	Lanciotti et al., 1996
<i>Escherichia coli</i>	100	3	n.i.	n.i.	Popper et al., 1990
<i>Streptococcus lactis</i>	100	1	n.i.	n.i.	Popper et al., 1990
<i>Flora natural</i>	200	5	4 °C	suco laranja	Mermelstein, 1999

\*n° de red. Logaritmicas =  $-\log(\text{população final}/\text{população inicial})$       n.i.: não informado

### Efeito do Processamento a Alta Pressão sobre Enzimas

Enzimas são classes especiais de proteínas na qual a atividade biológica surge a partir de um sítio ativo, mantido pela conformação tri-dimensional da molécula. Pequenas mudanças no sítio ativo podem levar a uma perda da atividade da enzima (Tsou apud Hendrickx et al., 1998). Como a desnaturação proteica é associada com mudanças conformacionais, estas podem mudar a funcionalidade da enzima (por exemplo, aumento ou perda da atividade biológica e mudanças na especificidade do substrato) (Hendrickx et al., 1998).

Proteínas são estruturas delicadas, mantidas por interações entre a cadeia proteica (determinada pela seqüência de aminoácidos) e pelas interações com o solvente ao redor.

Mudanças nos fatores externos, como pressão e temperatura, podem perturbar o complexo balanço das interações intramoleculares e entre solvente-proteína, e podem, conseqüentemente, levar ao desdobramento e/ou desnaturação da cadeia de peptídeos (Hendrickx et al., 1998). Os rearranjos estruturais presentes nas proteínas sob pressão são governados pelo princípio de Le Chatelier. A redução do volume acompanhando a desnaturação surgem da formação ou ruptura de ligações não covalentes (mudanças no volume conformacional) e dos rearranjos das moléculas de solvente (mudanças no volume de solvatação) (Hendrickx et al., 1998).

A respeito das mudanças no volume conformacional, ao menos a baixas temperaturas, ligações covalentes são pouco afetadas pela alta pressão, e conseqüentemente a estrutura primária das proteínas permanece intacta durante o tratamento sob pressão (Cheftel, 1995 ; Hayashi apud Hendrickx et al., 1998). Por outro lado, mudanças na estrutura secundária ocorrem em pressões muito altas e estas levam a uma desnaturação irreversível (Balny et al. apud Hendrickx et al., 1998 ; Masson apud Hendrickx et al., 1998). Isto pode ser explicado pelo fato das pontes de hidrogênio, as quais são responsáveis pela manutenção da estrutura helicoidal (secundária) dos peptídeos, serem favorecidas a baixas pressões e serem rompidas em pressões muito altas (Suzuki et al. apud Hendrickx et al., 1998). A ruptura de ligações iônicas também é fortemente afetada pelo aumento de pressão (Heremans et al. apud Hendrickx et al., 1998 ; Gross et al. apud Hendrickx et al., 1998). O efeito da pressão sobre as interações hidrofóbicas é mais complexo. Segundo Heremans apud Hendrickx et al. (1998), as opiniões sobre o efeito da pressão sobre as interações hidrofóbicas são tão divergentes quanto as opiniões sobre a natureza das próprias interações hidrofóbicas. Mudanças significantes na estrutura terciária (mantidas principalmente por interações iônicas e hidrofóbicas) são mais observadas a pressões maiores que 200 MPa (Balny et al. apud Hendrickx et al., 1998). Proteínas multiméricas (de estrutura quaternária), mantidas juntas por ligações não covalentes são dissociadas por uma pressão comparativamente baixa (menor que 150 MPa) (Hendrickx et al., 1998). Ao contrário dos tratamentos térmicos onde tanto ligações covalentes como não-covalentes são afetadas, o processamento a alta pressão em temperatura ambiente apenas rompe ligações químicas relativamente fracas (pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e iônicas) (Hendrickx et al., 1998). Alterações na conformação de proteínas podem ocasionar

mudanças nas propriedades funcionais de proteínas de alimentos e por isso o tratamento a alta pressão de alimentos pode ser usado para criar novos produtos com textura e sabor únicos (Messens et al., 1997).

Em geral, pressões acima de 300 MPa a temperatura ambiente, causam desnaturação proteica irreversível, enquanto que pressões menores resultam em mudanças reversíveis na estrutura da proteína (Cheftel, 1995 ; Heremans apud Hendrickx et al., 1998).

Os efeitos da alta pressão sobre enzimas podem ser divididos em duas classes. Na primeira, pressões relativamente baixas (~100 MPa) têm mostrado ativação de algumas enzimas (Asaka et al., 1994 ; Curl et al. apud Hendrickx et al., 1998; Jolibert et al. apud Hendrickx et al., 1998). Este efeito de estimulação é, entretanto, somente observado em enzimas monoméricas. De outro lado, pressões muito maiores, geralmente induzem a inativação enzimática (Curl et al. apud Hendrickx et al., 1998). Com respeito à inativação por pressão, Miyagawa et al. apud Hendrickx et al. (1998) distinguiu quatro grupos de enzimas, baseando-se na perda e recuperação da atividade: (i) inativação completa e irreversível, (ii) inativação completa e reversível, (iii) inativação incompleta e irreversível, (iv) inativação incompleta e reversível. (Hendrickx et al., 1998).

Tem sido sugerido que a eficiência da inativação enzimática por Alta Pressão é melhorada pela aplicação de ciclos de pressão. Aplicações sucessivas de alta pressão resultaram em alta inativação de muitas enzimas (Hendrickx et al., 1998).

Poucos trabalhos têm sido publicados sobre o efeito do processamento de homogeneização por alta pressão sobre enzimas ou até mesmo sobre microrganismos. A quase totalidade dos trabalhos publicados sobre o efeito da alta pressão sobre as enzimas é referente ao processo hidrostático.

A Tabela 3 faz uma comparação da resistência à pressão hidrostática de algumas enzimas de interesse em alimentos:

**Tabela 3: Resistência à pressão hidrostática de algumas enzimas.**

Enzima	Pressão (MPa)	D (min)	z (MPa)	Substrato	Referência
<i>PectinaMetilEsterase</i> <sup>1</sup>	100	8250	200	suco de laranja	Basak et al., 1996
<i>PectinaMetilEsterase</i> <sup>1</sup>	200	4490	200	suco de laranja	Basak et al., 1996
<i>PectinaMetilEsterase</i> <sup>1</sup>	400	260	200	suco de laranja	Basak et al., 1996
<i>PectinaMetilEsterase</i> <sup>2</sup>	270	264	530	suco de laranja	Basak et al., 1996
<i>PectinaMetilEsterase</i> <sup>2</sup>	300	211	530	suco de laranja	Basak et al., 1996
<i>PectinaMetilEsterase</i> <sup>2</sup>	400	145	530	suco de laranja	Basak et al., 1996
<i>Peroxidase</i>	900	10	n.i.	Vagem	Hendrickx et al., 1998

<sup>1</sup> pH = 3,7 <sup>2</sup> pH = 3,2

### ***Efeito do processamento a Alta Pressão sobre a PectinaMetilEsterase***

A PectinaMetilEsterase (PME; EC 3.1.1.11) é responsável pela desestabilização de sucos de laranja, gelatinização de concentrados e perda de consistência de produtos de tomate. A PME é inativada por calor nos processos convencionais de preservação, os quais levam a efeitos prejudiciais no sabor, cor e qualidade nutricional (Irwe et al. apud Hendrickx et al., 1998). Tem sido reportado que tratamentos sob pressões de aproximadamente 600 MPa podem inativar parcialmente (acima de 90%) a PME da laranja (Irwe et al. apud Hendrickx et al., 1998; Ogawa et al., 1990), a qual não é reativada durante o armazenamento e transporte. A PME de tomate mostra-se mais resistente à pressão que a de laranja e sua inativação parece seguir uma cinética de primeira ordem (Seyderhelm et al., 1998). A PME de tomate é menos estável à pressão na presença de íons de cálcio ou em tampão de ácido cítrico (pH 3,5-4,5) do que em água, e sua estabilidade à pressão diminui com a diminuição do pH (Hendrickx et al., 1998).

A principal consequência da atividade de PME é a perda da turbidez, que é um dos principais defeitos de qualidade em sucos cítricos, e sua inativação é uma das razões principais para a determinação do nível de aquecimento na pasteurização comercial. O processamento UAP foi utilizado para inativar a forma sensível ao calor da PectinaMetilEsterase em sucos da laranja (Goodner et al., 1998). A fim de conseguir uma

vida de prateleira de 90 dias para o suco empacotado em temperaturas refrigeradas, pressões de 700 MPa ou maiores e tempos de processamento de 1 minuto são recomendados (Goodner et al., 1999).

### **Utilização do Processamento a Alta Pressão na Pasteurização de Suco de Laranja**

Segundo Ogawa et al. apud Parish (1998) e Donsi et al. apud Parish (1998) é possível produzir suco de laranja estável microbiologicamente submetendo o produto a um tratamento a 400 MPa, sem a alteração das características de qualidade utilizando-se o processamento hidrostático. Parish (1998) afirma que em pressões hidrostáticas de até 500 MPa pode-se reduzir a microflora nativa do suco de laranja a níveis não detectáveis em menos de 2 minutos.

O tratamento sob pressão hidrostática de suco não pasteurizado de cítricos resultou em um sabor próximo ao do suco fresco com nenhuma perda do Ácido Ascórbico e uma vida útil de até 17 meses. O pH baixo de sucos de fruta faz-lhes bons candidatos para a preservação pelo tratamento a alta pressão, uma vez que o crescimento de esporos bacterianos resistentes à pressão é inibido. (Farr, 1990).

Qualidade sensorial é bastante apreciada em sucos frescos. Segundo estudos feitos por Bignon (1997) com suco de laranja, uma das maiores vantagens da pasteurização por alta pressão é manter o sabor natural de fruta intacto durante toda a vida de prateleira, isto é, por volta de 30 dias sob condições refrigeradas (4°C), principalmente porque o processamento a alta pressão é um processamento a baixa temperatura. Além disso, os sucos processados a alta pressão têm um maior frescor que o suco pasteurizado por aquecimento rápido (ausência de sabor de cozido) e a mesma cor que o suco não tratado, o que está de acordo com a tendência de preferência do consumidor. As observações de Bignon (1997) foram verdadeiras durante cinco semanas de estocagem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTH, V.; DICKSON, J.S.; OLSON, D.G.; MURANO, E.A. Shelf Life Extension, Safety, and Quality of fresh Pork Loin Treated with High Hydrostatic Pressure. **Journal of Food Protection**, **61**(12):1649-1556, 1998.

ASAKA, M.; AOYAMA, Y.; NAKANISHI, R.; HAYASHI, R.; Purification of a Latent Form of Polyphenoloxidase from La France Pear Fruit and its Pressure-activation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, **58**(8):1486-1489, 1994.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S. Ultra High Pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. **Food Research International**, **29**(7):601-607, 1996.

BIGNON, J. Cold Pasteurizers Hiperbar for the Stabilization of Fresh Fruit Juices. **Fruit Processing**, **6**(2):46-48, 1997.

CHEFTEL, J.C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation **Food Science and Technology International**, **1**(2/3):75-90, 1995.

ERKMEN, O.; KARATAS, S. Effect of High Hydrostatic Pressure on *Staphylococcus aureus* in Milk. **Journal of Food Engineering**, **33**(3):257-262, 1997.

FARR, D. High Pressure Technology in the Food Industry. **Trends in Food Science & Technology**, **1**(7):14-16, 1990.

GERVILLA, R.; CAPELLAS, M.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of High Hydrostatic Pressure on *Listeria innocua* 910 CECT Inoculated into Ewe's Milk. **Journal of Food Protection**, **60**(1):33-37.

GOODNER, J.K.; BRADDOCK, R.J.; PARISH, M.E.. Cloud Stabilization of Orange Juice by High Pressure Processing. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, **46**(5):1997-2000, 1998.

GOODNER, J.K.; BRADDOCK, R.J.; PARISH, M.E.; SIMS, C.A. Cloud Stabilization of Orange Juice by High Pressure Processing. **Journal of Food Science**, **64**(4):699-700, 1999.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, **33**(1):51-64, 1996.

HENDRICKX, M.; LUDI KHUYZE, L.; VAN den BROECK, I.; WEEMAES, C. Effects of High pressure on enzymes related to food quality (review) **Trends in Food Science & Technology**, **9**(5):197-203, 1998.

HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; KNORR, D. Biological Effects of High Hydrostatic Pressure on Food Microorganisms. **Food Technology**, **43**(3):99-107, 1989.

LANCIOTTI, R.; GARDINI, F.; SINIGAGLIA, M.; GUERZONI, M.E. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters in Applied Microbiology**, **22**:165-168, 1996.

MAGGI, A.; GOLA, S.; ROVERE, P.; MIGLIOLI, L.; DALL'AGLIO, G.; LONNEBORG, N.G. Effects of combined high pressure-temperature treatments on *Clostridium sporogenes* spores in liquid media. **Industria Conserve**, **71**(1):08-14, 1996.

MERMELSTEIN, N.H. (ed.) High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**, **53**(4):86-90, 1999.

MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, **8**(4):107-112, 1997.

MUSSA, D.M.; RAMASWAMY, H.S.; SMITH, J.P. High Pressure (HP) destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk. **Food Research International**, **31**(5):343-350, 1999.

OXEN, P.; KNORR, D. Baroprotective Effects of High Solute Concentrations Against Inactivation of *Rodotorula rubra*. **Lebensmittel – Wissenschaft und-Technologie**, London, **26**(3):439-442, 1993.

PARISH, M.E. High Pressure Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, **18**(1):57-65, 1998a.

- PARISH, M.E. Orange juice quality after treatment by Thermal pasteurization or Isostatic High Pressure, **Lebensmittel – Wissenschaft und-Technologie**, **31(5)**:439-442, 1998b.
- PONCE, E.; PLA, R.; MOR-MUR, M.; GERVILLA, R.; GUAMIS, B. Inactivation of *Listeria innocua* Inoculated in Liquid Whole Egg by High Hydrostatic Pressure. **Journal of Food Protection**, **61(1)**:119-122, 1998.
- POPPER, L; KNORR, D. Application of High-Pressure Homogenization for Food Preservation **Food Technology**, **43(7)**:86-90, 1990.
- OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H. Pressure Inactivation of Yeasts, Molds, and Pectinesterase in Satsuma Mandarin Juice: Effects of Juice Concentraition, pH, and Organic Acids, and Comparsion with Heat Sanitation **Agricultural and Biological Chemistry**, **54(5)**:1219-1225, 1990.
- SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, **9(4)**:152-158, 1998.
- TEWARI, G.; JAYAS, D.S.; HOLLEY, R.A. High pressure processing of foods: an overview **Sciences des Aliments**, **19(6)**:619-661, 1999.
- WEEMAES, C.; LUDIKHUYZE, L.; BROECK, I. VAN DEN & HENDRICKX, M. High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases **Journal of Food Science**, **63(5)**:873-877, 1998.



## **CAPÍTULO 1 – Avaliação da inativação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum* em Suco de Laranja através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão.**

### **RESUMO**

Leveduras e bactérias lácticas são os contaminantes usuais no suco de laranja, sendo responsáveis pela redução da vida de prateleira desse produto. Nos últimos anos a procura por processos que minimizem a degradação térmica de sucos tem aumentado. O processamento a alta pressão de homogeneização tem se mostrado uma alternativa à pasteurização térmica tradicional para alimentos líquidos. O objetivo deste estudo foi determinar as inativações de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* em suco de laranja da variedade Pêra submetido ao processamento contínuo em diferentes pressões. O produto foi bombeado através de uma válvula de homogeneização a 100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa e 300 MPa com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. A temperatura de entrada do produto foi mantida a 10°C, pH a 4,1, e sólidos solúveis a 10,0°Brix. Após o processo, o produto foi imediatamente resfriado a 4°C e a contagem microbiológica foi determinada. O número de reduções logarítmicas de *Lactobacillus plantarum* foi 0,0, 0,4, 2,1, 7,1 e 7,1, para as pressões de 100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa e 300 MPa, respectivamente; para o *Saccharomyces cerevisiae* o número de reduções logarítmicas foi: 0,6, 1,1, 4,9, 5,6 e 5,6, nas mesmas pressões de processo. Os resultados indicaram que pressões a partir de 250 MPa foram suficientes para destruir completamente cargas iniciais de  $1,2 \times 10^7$  UFC/mL de *Lactobacillus plantarum* e  $2,9 \times 10^5$  UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* em suco de laranja, o que faz desta tecnologia um processo não térmico muito promissor para o suco de laranja.

**Palavras Chave:** alta pressão, homogeneização, suco de laranja, inativação microbiana, *Saccharomyces*, *Lactobacillus*.

## **Inactivation of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in Orange Juice processed by Ultra High Pressure Homogenization**

### **SUMMARY**

Yeasts and lactic acid bacteria are the usual contaminants in orange juice and responsible for decreasing the shelf life of the product. The search for processes that minimize thermal degradation of juices has increased during the last few years. Ultra High Pressure Homogenization has been shown to be an alternative to the traditional thermal pasteurization of pumpable foods. The objective of this study was to evaluate the inactivation of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in orange juice from the Pera variety when submitted to different pressure treatments in a continuous process. The product was pumped through a homogenizer valve at 100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa and 300 MPa using two synchronized overlapped intensifiers at a flow rate of approximately 270 mL/min. The inlet temperature was kept at 10°C, pH at 4.1 and soluble solids at 10.0°Brix. After processing, the product was immediately cooled to 4°C and the microbiological count was determined using the standard plate technique. The number of logarithmic reductions of *Lactobacillus plantarum* was 0.0, 0.4, 2.1, 7.1 and 7.1 for 100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa and 300 MPa operating pressures, respectively; for *Saccharomyces cerevisiae* the number of log reductions found were: 0.6, 1.1, 4.9, 5.6 and 5.6, for the same operating pressures. The results indicated that pressures higher than 250MPa were able to completely destroy initial loads of  $1.2 \times 10^7$  UFC/mL of *Lactobacillus plantarum* and  $2.9 \times 10^5$  UFC/mL of *Saccharomyces cerevisiae* in orange juice, making this technology a promising way to non thermally process orange juices.

**Keywords:** high pressure, homogenization, orange juice, microbial inactivation, *Saccharomyces*, *Lactobacillus*.

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda do consumidor por alimentos minimamente processados, livres de aditivos e estáveis no armazenamento sugere a exploração de outros tratamentos físicos como alternativa potencial aos tradicionais tratamentos térmicos. O processo de pasteurização térmica do suco de laranja pode ocasionar danos térmicos (escurecimento não enzimático e formação de off-flavors), redução do frescor dos sabores do suco (Basak et al., 1996) e redução do conteúdo vitamínico. Em sucos de frutas a tendência do consumidor é na direção de sucos frescos recém extraídos, com gosto fresco e integridade de sabor e vitaminas, o mais próximo possível dos sucos feitos em casa (Bingnon, 1997).

O tratamento a Alta Pressão (pressão hidrostática) foi conhecido como uma técnica potencial de preservação há aproximadamente um século atrás desde os trabalhos de Hite (Hite apud Smelt, 1998) em 1889. O tratamento UAP causa a inativação de microrganismos e enzimas enquanto deixa moléculas pequenas, como compostos voláteis que conferem sabor e a maioria das vitaminas intactos (Smelt, 1998).

Existem dois métodos de aplicação de alta pressão: Método de Alta Pressão Hidrostática, onde o produto é processado em um vaso de pressão dentro da embalagem final; e o Método de Homogeneização a Ultra Alta Pressão, onde o produto é processado de modo contínuo em homogeneizador, sendo pressurizado em pressões de até 320 MPa, a qual é reduzida de repente até a pressão atmosférica através de uma válvula de homogeneização. Isto produz uma velocidade muito elevada através do orifício, e a expansão resultante é a responsável pela ruptura de células de microrganismos, não afetando as células do alimento e de sabor. A seguir o produto é resfriado e depois embalado de forma asséptica (Mermelstein, 1999).

O suco de laranja torna-se um forte candidato à aplicação desta tecnologia desde que se verificou a degradação das características de sabor fresco pelos tratamentos térmicos como a pasteurização tradicional utilizada atualmente nos produtos prontos para o consumo. O mercado de suco de laranja pronto para o consumo (pasteurizado e embalado em cartonados) apresentou um crescimento de 138% entre os anos de 1992 e 2001 (chegando a 55.712.000 L), e possui um potencial de aumento de vendas no mercado

interno que pode ser alavancado por um produto com qualidades sensoriais muito próximas ao suco fresco recentemente extraído, que atualmente não está disponível no mercado. (Datamark, 2003).

Para este estudo foram escolhidos microrganismos representativos da deterioração de sucos os quais se desenvolvem em pH baixo e estão presentes amplamente no meio ambiente. Dessa forma foram escolhidas a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que as leveduras são a causa mais comum de deterioração em sucos de frutas, e a bactéria láctica *Lactobacillus plantarum*, freqüentemente envolvida em problemas de deterioração de produtos vegetais ácidos (Uboldi Eroa, 1989).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria-prima**

Foram utilizadas laranjas (*Citrus sinensis*) da variedade Pêra, obtidas no mercado local (Campinas – S.P.) As frutas foram provenientes da cidade de Fernandópolis – SP, adquiridas no mês de Agosto de 2002 e com o parâmetro Ratio de 20,2.

### **2.2. Culturas microbiológicas**

Foram utilizados *Lactobacillus plantarum* CCT 2552 (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Toselo, Campinas – S.P.) e *Saccharomyces cerevisiae* isolado a partir de uma amostra comercial (suco de laranja pasteurizado – lote 3) pelo Laboratório de Termobacteriologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. O preparo do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* foi feito em Caldo Extrato de Malte a 30°C por 24h, a partir da cultura mantida em rampa de PDA (Potato Dextrose Agar) sob refrigeração. O preparo do inóculo de *Lactobacillus plantarum* foi realizado em caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) a 35°C por 20h, a partir da cultura padronizada e congelada. A padronização do inóculo foi realizada através do crescimento deste em caldo, seguido do repique desta cultura a 10% em um caldo MRS estéril; o inóculo foi acondicionado em frascos de vidro de 50 mL e congelado a -15°C. Desta forma garantiu-se a homogeneidade do inóculo para todos os testes.

### 2.3. Processamento a Alta Pressão

Foi utilizado um homogeneizador contínuo modelo nG7400H:350 produzido por STANSTED Fluid Power LTD (UK).

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar entre água e produto. O processo era iniciado utilizando água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo (válvula de alimentação da água aberta e válvula de alimentação do produto fechada). Alcançado o regime, a válvula de alimentação era aberta iniciando a alimentação do produto (abertura da válvula de entrada do produto e fechamento da entrada de água).

O processo consistiu em bombear o suco através de uma válvula de homogeneização com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados, a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. Após a passagem pela válvula de homogeneização, o produto passava por um trocador de calor, tendo sua temperatura reduzida a aproximadamente 30°C e seguia então para o sistema de envase.

O sistema de envase era composto por uma válvula de três vias localizada dentro de uma câmara de fluxo laminar (esterilizada com o uso de uma lâmpada Ultravioleta). Desta forma era possível efetuar o processo continuamente com a válvula de três vias na posição de descarte ou a retirada de amostra de forma asséptica.

A limpeza de todo o sistema (alimentação, homogeneizador e envase) foi realizada pela eluição do produto com água. A sanificação do sistema foi feita utilizando etanol a 70% (v/v) sendo este bombeado através do sistema até que o mesmo fosse totalmente preenchido, permanecendo inundado por um período não inferior a 24h.

As temperaturas do produto foram medidas na entrada (termômetro de vidro); após a válvula de homogeneização, na entrada e na saída do trocador de calor (termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer).

## 2.4. Processamento

Inicialmente os frutos foram selecionados para eliminar unidades podres e danificadas e resíduos de grande tamanho (principalmente galhos e folhas), em seguida os frutos foram lavados com água clorada 20 ppm de cloro livre (0,02 mg de hipoclorito de sódio/L = 4 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 0,5%/L), secos e armazenados a 8°C.

O suco foi extraído em uma extratora Delijucier modelo 731 Mi fabricada pela Intercitrus Agroindustrial LTDA (Araraquara, S.P.), sendo submetido a acabamento através de peneiras para reduzir o teor de polpa a aproximadamente 10,0% e para que fosse obtido um suco com partículas de tamanho reduzido de modo que fosse possível o processamento no homogeneizador de alta pressão. A menor abertura de peneira utilizada foi 0,297 mm (MESH 48). Em seguida o suco foi acondicionado em garrafas plásticas PET (polietileno tereftalado) e congelado em câmara à -20°C.

No dia anterior a cada processo o suco foi descongelado em água corrente e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, sendo armazenado em geladeira (8°C) até processamento. Neste dia as embalagens para recolhimento das amostras processadas (tubos de ensaio de vidro com capacidade para 60 mL) também foram esterilizadas nas mesmas condições citadas. Cargas de inóculo de aproximadamente  $10^9$  UFC/ mL de *Lactobacillus plantarum* e de  $10^7$  UFC/ mL de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas para inocular o suco estéril de modo a obter uma carga aproximada de  $10^7$  UFC/ mL de *Lactobacillus plantarum* e de  $10^5$  UFC/ mL de *Saccharomyces cerevisiae*

A seguir a amostra foi processada sob pressão no homogeneizador em cada pressão de teste (100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa e 300 MPa), de acordo com a descrição do processo feita no item anterior.

A temperatura de entrada do produto foi mantida a 10°C, o pH em 4,1 e o teor de sólidos solúveis a 10,0°Brix. Após o processo o produto foi imediatamente resfriado a 4°C por imersão em banho de gelo.

## 2.5. Análises Físico-Químicas

- pH (A.O.A.C. n° 42.1.04 Official Method n° 981.12 (1997));
- Sólidos Solúveis (A.O.A.C. n° 37.1.15 Official Method n° 932.12 (1997)).

## 2.6. Análises Microbiológicas

A contagem de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada por plaqueamento em superfície utilizando o meio PDA (Potato Dextrose Agar); a contagem de *Lactobacillus plantarum* foi realizada por plaqueamento em profundidade utilizando o meio MRS Agar (de Man, Rogosa e Sharpe). Em ambas as contagens foram utilizadas as metodologias para Contagem de Bolores e Leveduras e para Contagem de Bactérias Lácteas descritas por Vanderzant et al. (1992). O resultado das análises microbiológicas foi expresso como o número de reduções logarítmicas (-Log (população final/ população inicial)) que cada processo ocasionou.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os ensaios o pH do suco foi mantido em 4,10 através da adição de solução estéril de ácido cítrico 55% (p/v) quando necessário. O teor de sólidos solúveis foi constante sendo monitorado pela medida do Brix, de 10,5°.

### 3.1. *Lactobacillus plantarum*

A Tabela 1 apresenta os resultados do número de reduções logarítmicas em cada nível de pressão (100 MPa até 300 Mpa) em suco de laranja inoculado com uma carga de *Lactobacillus plantarum* de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL

**Tabela 1: Número de Reduções Logarítmicas de *Lactobacillus plantarum*.**

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>Número de Reduções*</b>
100	0,00 ± 0,04
150	0,40 ± 0,03
200	2,10 ± 0,50
250	≥ 7,10 ± 0,10
300	≥ 7,10 ± 0,10

\* - Log (população final/ população inicial)  
População inicial:  $-1,0 \cdot 10^7$  UFC/mL

A Tabela 1 permite a análise do efeito da pressão na destruição de *Lactobacillus plantarum* em suco de laranja. Pressões até 150 MPa apresentaram baixas taxas de destruição, enquanto que a partir de 200 MPa as taxas de destruição foram mais significativas. Em pressões iguais ou superiores a 250 MPa foi observada a destruição total da carga inicial utilizada, o que ocasionou reduções logarítmicas maiores ou iguais a 7,1. A igualdade das taxas de destruição nas pressões de 250 e 300 MPa pode ser explicada devido à quantidade do microrganismo presente na amostra ter sido reduzida a níveis não detectáveis já na pressão de 250 MPa. A Tabela 2 apresenta as temperaturas nos pontos de controle durante o processo:

**Tabela 2: Monitoramento das temperaturas durante os ensaios de inativação de *Lactobacillus plantarum*.**

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>T1 (°C)</b>	<b>T2 (°C)</b>	<b>T3 (°C)</b>	<b>T4 (°C)</b>
100	5,5 ± 1,0	42,7 ± 2,0	44,7 ± 0,1	24,4 ± 1,5
150	5,3 ± 1,0	53,1 ± 0,6	53,6 ± 0,4	26,3 ± 0,1
200	5,0 ± 1,0	64,1	63,7	27,3
250	5,0 ± 1,0	74,0 ± 0,4	72,6 ± 0,2	27,7 ± 0,1
300	5,0 ± 1,0	83,8 ± 0,6	81,4 ± 0,1	27,2 ± 1,0

T1: Temperatura de entrada do produto

T2: Temperatura após a válvula de homogeneização

T3: Temperatura na entrada do trocador de calor

T4: Temperatura na saída do trocador de calor

A temperatura máxima alcançada durante os processos foi de 84°C após a passagem pela válvula de homogeneização na pressão de 300 MPa, a qual baixou para 81,4°C na entrada do resfriamento e para 27°C na saída do trocador de calor. Segundo os cálculos realizados o tempo de residência médio do produto entre a saída da válvula de homogeneização e a entrada no trocador de calor é de aproximadamente 0,7 s.

Wuytack et al. (2002) avaliaram a resistência de *Lactobacillus plantarum*, dentre outras bactérias, quanto aos processos de alta pressão de homogeneização e hidrostático. Os estudos foram realizados utilizando-se tampão fosfato 0,01M pH 7,0 como meio. Os resultados indicaram uma grande resistência do *Lactobacillus plantarum* ao processo de homogeneização, pois a 300 MPa foi obtida uma redução de aproximadamente 0,2 ciclos logarítmicos valores estes inferiores àqueles encontrados na Tabela 1. É importante ressaltar a possível influência do meio no qual o microrganismo foi submetido ao tratamento uma vez que a redução de pH, possivelmente, aumente a sensibilidade do microrganismo ao processo (Smelt, 1998). Os resultados obtidos por Wuytack et al. (2002) no processamento hidrostático de *Lactobacillus plantarum* indicam uma baixa redução do referido microrganismo (1 ciclo logarítmico a 300 MPa por 15 min a pH 7,0), Cheftel (1995) obteve 6,5 reduções logarítmicas para o mesmo microrganismo a 300 MPa por 20 min a pH 7,0. Com relação às outras bactérias testadas por Wuytack et al. (2002), observa-se que as bactérias Gram negativas apresentaram uma maior resistência ao processo de homogeneização a alta pressão em relação às Gram positivas, o que permite listá-las em função do número de reduções logarítmicas, colocado entre parênteses, no processo a 300 MPa: *Staphylococcus aureus*(0), *Lactobacillus plantarum* (0,2), *Listeria innocua* (0,3), *Enterococcus faecalis* (0,5), *Leuconostoc dextranicum* (2,0); Gram positivas: *Yersinia enterocolitica* = *Salmonella typhimurium* (2,5); *Eschirichia coli* (4,5-6,0); *Shigella flexneri* (5,2); *Pseudomonas fluorescens* (6,2).

### 3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

A Tabela 3 apresenta os resultados do número de reduções logarítmicas em cada nível de pressão (100 MPa até 300 MPa) em suco de laranja inoculado com uma carga de *Saccharomyces cerevisiae* de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL.

**Tabela 3: Número de Reduções Logarítmicas de *Saccharomyces cerevisiae*.**

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>Número de Reduções*</b>
100	0,60 ± 0,20
150	1,10 ± 0,40
200	4,90 ± 1,00
250	> 5,60 ± 0,03
300	> 5,60 ± 0,03

\* - Log (população final/ população inicial)  
População inicial: ~ 4,0 .10<sup>5</sup>UFC/mL

Analisando-se a Tabela 3 é possível observar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão do suco de laranja na destruição de *Saccharomyces cerevisiae*. Processos que utilizaram pressões até 100 MPa apresentaram taxas de destruição baixas, ao contrário daqueles em que foram utilizadas pressões superiores a 150 MPa, cujos resultados são mais significantes, tendo os melhores resultados nas pressões de 250 e 300 MPa, onde foram obtidas, no mínimo, 5,6 reduções logarítmicas, ou seja, destruição total da carga inicial do produto. A exemplo do ocorrido com o *Lactobacillus plantarum*, a igualdade das taxas de destruição nas pressões de 250 e 300 MPa também pode ser explicada devido à quantidade do microrganismo presente na amostra ter sido reduzida a níveis não detectáveis já na pressão de 250 MPa. A Tabela 4 apresenta as temperaturas nos pontos de controle durante o processo:

**Tabela 4: Monitoramento das temperaturas durante os ensaios de inativação de *Sacharomyces cerevisiae*.**

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>T1 (°C)</b>	<b>T2 (°C)</b>	<b>T3 (°C)</b>	<b>T4 (°C)</b>
100	13,0 ± 1,1	44,7 ± 2,4	44,6 ± 4,0	26,5 ± 0,7
150	12,8 ± 1,1	53,3 ± 3,2	52,4 ± 4,3	27,2 ± 0,9
200	12,8 ± 1,1	62,6 ± 2,6	61,1 ± 4,5	28,0 ± 0,5
250	12,8 ± 1,1	71,7 ± 3,0	68,8 ± 4,9	28,4 ± 0,1
300	12,8 ± 0,4	75,4 ± 4,3	73,7 ± 5,5	28,4 ± 0,4

T1: Temperatura de entrada do produto

T2: Temperatura após a válvula de homogeneização

T3: Temperatura na entrada do trocador de calor

T4: Temperatura na saída do trocador de calor

Durante os ensaios utilizando *Sacharomyces cerevisiae*, a máxima temperatura alcançada nos processos foi de 84°C após a passagem pela válvula de homogeneização na pressão de 300 MPa, a qual baixou para 28,8°C na saída do resfriamento no trocador de calor. De acordo com os cálculos realizados, o tempo de residência médio do produto entre a saída da válvula de homogeneização e a entrada no trocador de calor é de aproximadamente 0,7s.

A resistência de *Sacharomyces cerevisiae* ao processamento hidrostático tem sido estudada por vários autores. Papineau et al. apud Hoover et al. (1989) avaliaram a destruição dessa levedura em suco de laranja em processos hidrostáticos de 15 min, obtendo aproximadamente 6,0 reduções logarítmicas a 279MPa, 3,0 a 211MPa e 1,5 a 143MPa. Hashizume et al. (1995) estudaram a destruição desse microrganismo em solução 0,85% de NaCl e obtiveram, aproximadamente, os seguintes resultados no processo por 40 minutos: 6 reduções logarítmicas a 270 MPa, 5 a 250 MPa e 1 a 240 MPa. Cheftel (1995) cita uma redução de 7 a 8 ciclos logarítmicos de *Sacharomyces cerevisiae* em um processamento a 300 MPa por 20 min a pH 7,0. Nesse mesmo estudo, foi determinado o número de reduções logarítmicas para outros microrganismos nas mesmas condições de processo: *Vibrio parahaemolyticus*, (aproximadamente >8 reduções logarítmicas); *Escherichia coli* (aproximadamente 5-8); *Pseudomonas aeruginosa* (aproximadamente 5) ; *Lactobacillus acidophilus* (aproximadamente >8); *Lactobacillus plantarum* (aproximadamente >6,5) ; *Streptococcus lactis* (aproximadamente 7) e *Staphilococcus aureus* (aproximadamente 5).

#### 4. CONCLUSÕES

Os microrganismos *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* mostraram grande sensibilidade ao tratamento de homogeneização a ultra alta pressão, uma vez que foram obtidas taxas de destruição superiores a 5 ciclos logarítmicos a uma pressão de 250 MPa para os dois microrganismos. Comparativamente, pôde-se observar uma maior sensibilidade do *Saccharomyces cerevisiae* ao tratamento a ultra alta pressão de homogeneização, pois nos tratamentos até 200 MPa o microrganismo apresentou taxas de destruição superiores às do *Lactobacillus plantarum*.

Dessa forma o processo de homogeneização a ultra alta pressão torna-se interessante para a pasteurização de suco de laranja, tipo de processo no qual é esperada uma redução mínima de 4 ciclos logarítmicos dos contaminantes usuais, tendo em vista a resistência ao tratamento proposto de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismos normalmente associados à contaminação microbiológica de sucos ácidos.

## 5. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, contou com apoio da UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas e da Intercitrus Agroindustrial Ltda.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg , 1997.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S. Ultra High Pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. **Food Research International**, Essex, v. 29, n.7, p. 601-607, Oct., 1996.

BIGNON, J. Cold Pasteurizers Hiperbar for the Stabilization of Fresh Fruit Juices. **Fruit Processing**, Schonborn, v. 6, n. 2, p. 46-48, Feb., 1997.

CHEFTEL, J.C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation **Food Science and Technology International**, 1(2/3):75-90, 1995.

DATAMARK Mercado de suco pronto para o consumo. Disponível em: <<http://www.datamark.com>>. Acesso em: 08 jan. 2003

HASHIZUME, C.; KIMURA, K.; HAYASHI, R. Kinetic Analysis of Yeast Inactivation by High Pressure Treatment at Low Temperatures. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 59(8):1455-1458,1995.

HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; KNORR, D. Biological Effects of High Hydrostatic Pressure on Food Microorganisms. **Food Technology**, 43(3):99-107, 1989.

MERMELSTEIN, N.H. (ed.) High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 4, p. 86-90, Apr, 1999.

SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 9, n: 4, p. 152-158, Apr., 1998.

UBOLDI EROA, M.N. Microrganismos Deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n: 3/4, p. 141-160, jul./dez., 1989.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSE, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

WUYTACK, E.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high pressure homogenization and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, 77(2002):205-212, 2002.



## **CAPÍTULO 2 - Avaliação da taxa de destruição de PectinaMetilEsterase (PME) em Suco de Laranja através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão.**

### **RESUMO**

PectinaMetilEsterase é normalmente responsabilizada por perdas de qualidade em suco de laranja. Sua inativação é usualmente considerada como parâmetro de controle no processamento térmico deste suco. Vários processos não térmicos (Alta Pressão, Pulso Elétrico, e Micro-ondas) têm sido estudados de modo a minimizar danos sensoriais e nutricionais que normalmente ocorrem durante os processos térmicos tradicionais, visando preservar as características de frescor do suco natural. O processamento de Homogeneização a Ultra Alta Pressão tem mostrado ser uma alternativa à pasteurização térmica de alimentos fluidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a inativação da PectinaMetilEsterase no suco de laranja da variedade Pêra quando submetido ao processamento contínuo em diferentes pressões. O produto foi bombeado através de uma válvula de homogeneização a 100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa e 300 MPa com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. A temperatura de entrada do produto foi mantida a 10°C e sólidos solúveis a 10,0°Brix. Foram estudados dois valores de pH 3,6 e 4,1. Após o processo, o produto foi imediatamente resfriado a 4°C e a atividade da PectinaMetilEsterase foi determinada através de um método espectrofotométrico. Os resultados obtidos para a inativação da PectinaMetilEsterase a pH 4,1 foram 12,6%, 15,7%, 20,7%, 35,9% e 66,7%, nos processos a 100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa e 300 MPa, respectivamente; no pH 3,6 os resultados foram 7,4%, 44,6%, 62,9% e 67,6%, nos processos a 100 MPa, 200 MPa, 250 MPa e 300 MPa, respectivamente. Os resultados indicaram que a inativação da PectinaMetilEsterase depende do pH e da pressão do processo. O processamento a pH 4,1 e a 300 MPa foi capaz de inativar 67,6% da atividade inicial da referida enzima.

**Palavras Chave:** alta pressão, homogeneização, suco de laranja, inativação enzimática, PectinaMetilEsterase.

## **Inactivation of PectinMethylEsterase (PME) in Orange Juice processed by Ultra High Pressure Homogenization**

### **SUMMARY**

PectinMethylEsterase is usually responsible for quality loss in orange juice. Its inactivation is generally considered as a control parameter for the thermal processing of this juice. Several non-thermal processes (High Pressure, Electric Pulse, Microwaves) have been studied to minimize nutritional and sensory damage that are likely to occur during the traditional thermal processes, aiming at preserving the fresh characteristics of the natural juice. Ultra High Pressure Homogenization has been shown to be an alternative for the traditional thermal pasteurization of pumpable foods. The objective of this study was to evaluate the inactivation of PectinMethylEsterase in orange juice from Pera variety when submitted to different pressure treatments in a continuous process. The juice was pumped through a homogenizer valve at the pressures of 100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa and 300 MPa using two synchronized overlapped intensifiers at a flow rate of approximately 270 mL/min. The inlet temperature was kept at 10°C. Two pH values were studied: 3.6 and 4.1. After processing, the product was immediately cooled to 4°C and PectinMethylEsterase activity was determined by a spectrophotometric method. The results obtained for the inactivation of PectinMethylEsterase at pH 4.1 were 12.6%, 15.7%, 20.7%, 35.9% and 66.7% for 100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa and 300 MPa operating pressures, respectively; at pH 3.6, the results were 7.4%, 44.6%, 62.9% and 67.6%, for 100 MPa, 200 MPa, 250 MPa and 300 MPa operating pressures, respectively. The results indicated that the inactivation of PectinMethylEsterase is pH and pressure dependent. Processing at pH 4.1 with a pressure of 300 MPa was capable of inactivating 67.6% of the initial enzyme activity.

**Keywords:** high pressure, homogenization, orange juice, enzyme inactivation, PectinMethylEsterase.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a preferência do consumidor por alimentos frescos ou minimamente processados, livres de aditivos e estáveis durante a vida de prateleira sugere o estudo de outros processos físicos que representem uma alternativa potencial aos tradicionais processos térmicos. A pasteurização térmica do suco de laranja pode causar danos originados pelo aquecimento (escurecimento não enzimático e formação de off-flavors), a diminuição do sabor “fresco” do suco (Reynolds apud Basak et al., 1996) e redução do conteúdo vitamínico. Com relação aos sucos de frutas, o consumidor tende a preferir os sucos frescos recém extraídos, com gosto fresco e integridade de sabor e vitaminas, ficando o mais similar possível aos sucos feitos em casa (Bingnon, 1997).

Há aproximadamente um século atrás, através das pesquisas de Hite (Hite apud Smelt, 1998) em 1889, o tratamento a Alta Pressão foi conhecido como uma técnica potencial de preservação. A vantagem do processo UAP é permitir que a maioria das vitaminas e as moléculas pequenas que conferem sabor, como compostos voláteis, sejam mantidos intactos enquanto possibilita a inativação de microrganismos e enzimas (Smelt, 1998).

Atualmente, é possível utilizar dois processos distintos a Alta Pressão: O processo Hidrostático a Alta Pressão, onde o produto é envasado na embalagem final e assim processado no interior de um recipiente, chamado vaso de pressão, por um tempo e pressão específicos; o segundo método é o processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão, no qual o processamento é realizado em uma base contínua em um homogeneizador de alta pressão. Este processo consiste na pressurização do produto a até 320 MPa, que é reduzida à pressão atmosférica pela passagem pela válvula de homogeneização. A expansão resultante e a alta velocidade decorrentes da passagem através do pequeno orifício são responsáveis pela ruptura das células de microrganismos e por mudanças estruturais em enzimas, não afetando as células do alimento e de sabor. Em seguida o produto é resfriado e embalado assepticamente (Mermelstein, 1999).

A degradação das características de sabor fresco, no suco de laranja, pelos processos térmicos como a pasteurização utilizada atualmente nos produtos prontos para o consumo,

candidata esse produto ao uso desta tecnologia. O mercado de suco de laranja pronto para o consumo (pasteurizado e embalado em cartonados) apresentou um crescimento de 138% entre os anos de 1992 e 2001, chegando a 55.712.000L, (Datamark, 2003) e possui um potencial de aumento de vendas no mercado interno que pode ser alavancado por um produto com qualidades sensoriais muito próximas ao suco fresco recentemente extraído, que atualmente não está disponível no mercado.

A PectinaMetilEsterase é a enzima predominante no suco de laranja e é normalmente associada às perdas de qualidade neste suco. Atualmente, é usual considerar a sua inativação como parâmetro de controle no processamento térmico deste suco, como a pasteurização.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria-prima**

Foram utilizadas laranjas (*Citrus sinensis*) da variedade Pêra, obtidas no mercado local (Campinas – S.P.) As frutas foram provenientes da cidade de Fernandópolis – SP, adquiridas no mês de Agosto de 2002 e com o parâmetro Ratio de 20,2.

### **2.2. Processamento a Alta Pressão**

Foi utilizado um homogeneizador contínuo modelo nG7400H:350 produzido por STANSTED Fluid Power LTD (UK).

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar entre água e produto. O processo era iniciado utilizando água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo (válvula de alimentação da água aberta e válvula de alimentação do produto fechada). Alcançado o regime, a válvula de alimentação era aberta iniciando a alimentação do produto (abertura da válvula de entrada do produto e fechamento da entrada de água).

O processo consistiu em bombear o suco através de uma válvula de homogeneização com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados, a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. Após a passagem pela válvula de homogeneização, o produto passava por um trocador de calor, tendo sua temperatura reduzida a aproximadamente 30°C e seguia então para o sistema de envase.

O sistema de envase é composto por uma válvula de três vias localizada dentro de uma câmara de fluxo laminar (esterilizada com o uso de uma lâmpada Ultravioleta). Desta forma era possível efetuar o processo continuamente com a válvula de três vias na posição de descarte ou de retirada de amostra de forma asséptica.

A limpeza de todo o sistema (alimentação, homogeneizador e envase) era realizada pela eluição do produto com água. A sanitização do sistema foi feita utilizando etanol a 70% (v/v) sendo este bombeado através do sistema até que o mesmo fosse totalmente preenchido, permanecendo inundado por um período não inferior a 24h.

As temperaturas do produto foram medidas na entrada (termômetro de vidro), após a válvula de homogeneização, na entrada e na saída do trocador de calor (termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer).

### **2.3. Processamento**

Inicialmente os frutos foram selecionados para eliminar unidades podres e danificadas e resíduos de grande tamanho (principalmente folhas e galhos), em seguida os frutos foram lavados com água clorada 20 ppm de cloro livre (0,02 mg de hipoclorito de sódio/L = 4 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 0,5%/L), secos e armazenados a 8°C.

O suco foi extraído em uma extratora Delijicer modelo 731 Mi fabricada pela Intercitrus Agroindustrial LTDA (Araraquara, S.P.), sendo submetido a acabamento através de peneiras para reduzir o teor de polpa a aproximadamente 10,0% e para que fosse obtido um suco com partículas de tamanho reduzido de modo que fosse possível o processamento no homogeneizador de alta pressão. A menor abertura de peneira utilizada foi 0,297 mm

(MESH 48). Em seguida o suco foi acondicionado em garrafas plásticas PET (polietileno tereftalado) e congelado em câmara à  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia do processo o suco foi descongelado em água corrente e processado imediatamente.

As amostras foram processadas sob pressão no homogeneizador em cada pressão de teste (100 MPa, 150 MPa, 200 MPa, 250 MPa e 300 MPa), de acordo com a descrição do processo feita no item anterior.

A temperatura de entrada do produto foi mantida a  $10^{\circ}\text{C}$  e o teor de sólidos solúveis a  $10,0^{\circ}\text{Brix}$ . Após o processo o produto foi imediatamente resfriado a  $4^{\circ}\text{C}$  por imersão em banho de gelo.

#### 2.4. Análises Físico-Químicas e Enzimática

- pH (A.O.A.C. n° 42.1.04 Official Method n° 981.12 (1997));
- Sólidos Solúveis (A.O.A.C. n° 37.1.15 Official Method n° 932.12 (1997));
- Atividade de Pectina Metil Esterase (PME) (Hagerman and Austin, 1986). O método consiste em preparar um extrato enzimático (2,4 mL da amostra com 7,2 mL de NaCl 2M), o qual é mantido em banho de gelo para manter inalterada a atividade enzimática residual. Separadamente, prepara-se uma solução contendo 2,0 mL de solução 0,5% de pectina cítrica, 0,15 mL de uma solução 0,01% de Azul de Bromotimol em tampão fosfato 0,003M pH 7,5, e 0,75 mL de água destilada. O pH de todas as soluções e também o do extrato enzimático deve ser ajustado para 7,5 com NaOH 0,1 e 0,01N. Adiciona-se 2,9 mL da solução à cubeta e esta é colocada dentro do espectrofotômetro, em seguida adiciona-se 0,3 mL do extrato enzimático e inicia-se a medição à 620 nm em intervalos de 10 segundos durante 2 minutos. A interpolação dos dados obtidos (cálculo da regressão linear entre tempo e absorbância) fornece uma reta de inclinação negativa, com a qual se calcula a atividade dessa enzima. Quanto maior essa inclinação (em valor modular), maior é a atividade da enzima, a qual é calculada da seguinte forma:
  - “m” é a inclinação da reta do gráfico Absorbância x Tempo (min);

- A alíquota de extrato enzimático utilizada (0,3 mL) contém 0,075 mL da amostra;
- Segundo Stauffler (1989), uma variação de 0,0328 na absorbância (a 620 nm) representa a produção de 0,1 µmol de ácido galacturônico;
- Segundo Segel (1979), uma unidade internacional da enzima é a quantidade que catalisa a formação de 1 µmol do produto da reação em condições definidas;

- Dessa forma:

$$PMEu = \frac{m}{0,328 \times 0,075} = m \times 40,6504$$

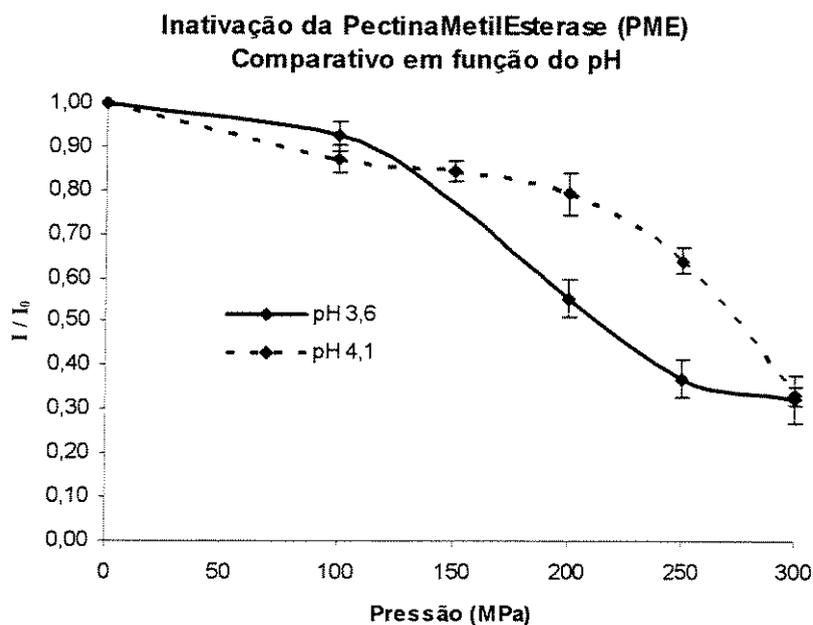
*PMEu = quantidade da enzima que catalisa a formação de 0,1 µmol de ácido galacturônico/ min × mL de suco*

Este método é capaz de detectar atividades de até 0,020 µmol de ácido galacturônico produzido por minuto (Hagerman & Austin, 1986).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH do suco foi ajustado em 4,1 ou 3,6 através da adição de solução de ácido cítrico 55% (p/v) quando necessário. O teor de sólidos solúveis foi constante sendo monitorado pela medida do Brix, de 10,5°.

No estudo em pH 4,1 o suco resfriado foi processado em cinco diferentes níveis de pressão a partir de 100 MPa até 300 MPa, sendo o ensaio realizado em duplicata. Já no estudo em pH 3,6 o processamento foi realizado em quatro diferentes níveis de pressão, 100, 200, 250 e 300 MPa, também sendo realizado em duplicata. A relação da taxa da inativação da PectinaMetilEsterase (PME) no suco de laranja com a pressão de processo está ilustrada na Figura 1, abaixo:



$I/I_0$  = atividade enzimática da amostra / atividade enzimática inicial

**Figura 1:** *Inativação da PectinaMetilEsterase (PME)*

A Figura 1 permite a análise do efeito da pressão na inativação da PectinaMetilEsterase (PME) em suco de laranja. No estudo a pH 4,1, pressões entre 100 e 200 MPa apresentaram uma baixa taxa de inativação, enquanto que a partir de 250 MPa as taxas de destruição foram mais significativas, alcançando o máximo de 67% de inativação a 300 MPa. Analisando o estudo realizado a pH 3,6 pôde-se verificar que o tratamento a 100 MPa apresentou baixa taxa inativação, porém, a partir de 200 MPa as taxas de destruição foram mais expressivas, chegando ao máximo de 68% de inativação a 300 MPa.

A Figura 1 também permite a observação da influência do pH na inativação da PectinaMetilEsterase. Somente acima de 150 MPa esta influência é mais clara, uma vez que em tratamentos a pressões inferiores, esta pode estar mascarada pelos erros experimentais. A influência do pH já foi verificada anteriormente, como nos trabalhos de Basak et al. (1996), que estudou a cinética da inativação da PectinaMetilEsterase. Neste trabalho foram verificados aumentos na inativação de 27,0% a pH 3,7 para 84,2% a pH 3,2 a 300 MPa por 100 min e de 68,4% a pH 3,7 para 97,2% a pH 3,2 a 400 MPa por 100 min. Cano et al.

(1997) estudaram a influencia de pressão (processo hidrostático) e temperatura na inativação da PME. Segundo seus resultados, apenas o uso combinado de baixas pressões e temperaturas médias possibilitou a inativação da enzima, que teve sua atividade inicial reduzida em 25% em um tratamento a 200 MPa e 20°C por 15 min. Goodner et al. (1998), também estudaram a inativação da PME em suco de laranja, a pH 3,45, determinando dois valores de “D<sub>p</sub>” (tempo necessário, a uma determinada pressão, para reduzir a atividade da enzima a um décimo da atividade inicial): D<sub>500 MPa</sub> = 83 min e D<sub>600 MPa</sub> = 2,4 min. O valor “z<sub>p</sub>” (aumento de pressão necessário para diminuir o valor de D<sub>p</sub> a um décimo de seu valor inicial) também foi determinado: z<sub>p</sub> = 65 MPa. Nos estudos de Basak et al. (1996) foram determinados os seguintes valores a pH 3,7 e 10% de sólidos solúveis: D<sub>200 MPa</sub> = 455 min, D<sub>300 MPa</sub> = 91 min e z<sub>p</sub> = 200 MPa. As diferenças entre os resultados podem ser explicadas pelas diferenças de pH e no processamento, pois enquanto no estudo de Goodner et al. (1998) o tempo para atingir a pressão de estudo foi de 12 a 15 segundos, no estudo de Basak et al. (1996) foi de 1 a 3 minutos.

A Tabela 1 apresenta as temperaturas nos pontos de controle durante o processo:

**Tabela 1: Monitoramento das temperaturas durante os ensaios de Inativação da PectinaMetilEsterase.**

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>T1 (°C)</b>	<b>T2 (°C)</b>	<b>T3 (°C)</b>	<b>T4 (°C)</b>
100	11,2 ± 1,1	43,0 ± 0,9	41,2 ± 1,5	25,8 ± 0,4
150	11,2 ± 1,0	52,4 ± 1,7	50,0 ± 0,8	26,7 ± 0,6
200	11,3 ± 1,2	62,2 ± 0,8	59,6 ± 0,3	27,8 ± 0,5
250	11,4 ± 1,2	71,4 ± 0,6	66,9 ± 0,8	28,5 ± 0,6
300	11,6 ± 1,3	80,6 ± 1,7	74,8 ± 0,5	29,1 ± 0,8

T1: Temperatura de entrada do produto

T2: Temperatura após a válvula de homogeneização

T3: Temperatura na entrada do trocador de calor

T4: Temperatura na saída do trocador de calor

Pode-se observar na Tabela 1 que a máxima temperatura durante os processos foi de 81°C após a passagem pela válvula de homogeneização na pressão de 300 MPa. De acordo

com os cálculos realizados, o tempo de residência do produto entre a saída da válvula de homogeneização e a entrada no trocador de calor é de aproximadamente 0,7 s.

#### 4. CONCLUSÕES

A enzima PectinaMetilEsterase apresentou sensibilidade ao processo de homogeneização a ultra alta pressão, visto que foram obtidas taxas de inativação de 67% e 68% nos valores de pH 4,1 e 3,6, respectivamente. Também foi observada uma influência do pH na inativação da enzima nos processos a pressões de 150 MPa a 250 MPa.

É muito provável que a inativação da PectinaMetilEsterase aumente com o uso de pressões de processo acima de 300 MPa, chegando a valores mais próximos daqueles obtidos nos processos térmicos de pasteurização (aproximadamente 99%), o que não nos foi possível verificar devido às limitações do equipamento.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, contou com apoio da UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas e da Intercitrus Agroindustrial Ltda.

#### 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg , 1997.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S. Ultra High Pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. **Food Research International**, 29(7):601-607,1996.

BIGNON, J. Cold Pasteurizers Hiperbar for the Stabilization of Fresh Fruit Juices. **Fruit Processing**, 6(2):46-48,1997.

CANO, M.P.; HERNANDEZ, A.; ANCOS, B. High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products. **Journal of Food Science**, 62(1):85-88, 1997.

DATAMARK Mercado de suco pronto para o consumo. Disponível em: <<http://www.datamark.com>>. Acesso em: 08 abr. 2003

GOODNER, J.K.; BRADDOCK, R.J.; PARISH, M.E.. Cloud Stabilization of Orange Juice by High Pressure Processing. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, **46(5)**:1997-2000, 1998.

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

MERMELSTEIN, N.H. (ed.) High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 4, p. 86-90, Apr, 1999.

SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, **9(4)**:152-158, 1998.



### **CAPÍTULO 3 – Efeito do pH e da Pressão sobre parâmetros de Pasteurização de Suco de Laranja no Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão.**

#### **RESUMO**

Atualmente, a tendência no gosto do consumidor para sucos de frutas é cada vez mais na direção de produtos recém extraídos com sabor fresco e aroma natural. O suco de laranja é um produto crítico com respeito a este aspecto devido aos danos sensoriais e nutricionais que ocorrem quando submetido à pasteurização térmica tradicional. O processamento a alta pressão de homogeneização pode ser uma boa alternativa à pasteurização térmica tradicional, em especial para alimentos bombeáveis. O objetivo deste estudo foi determinar a influência das pressões de processo e do pH na taxa de inativação de PectinaMetilEsterase, da destruição de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*, na retenção do Ácido Ascórbico e na manutenção da cor no suco de laranja. Suco de laranja da variedade Pêra foi obtido através de uma extratora comercial e congelado em garrafas plásticas; no dia do processo o suco foi descongelado em água corrente e processado imediatamente. O produto foi bombeado através de uma válvula de homogeneização a diferentes pressões com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. A temperatura de entrada do produto foi mantida a 10°C e sólidos solúveis a 10,0°Brix. Após o processo, o produto foi imediatamente resfriado a 4°C com o uso de uma serpentina de aço inox em um banho de gelo. Foi utilizado um planejamento experimental fatorial completo 2<sup>2</sup> para avaliar o efeito do pH (de 3,7 até 4,5) e da pressão (de 100 até 300 MPa). As respostas analisadas foram à inativação da PectinaMetilEsterase, a manutenção da cor, a retenção do Ácido Ascórbico e a destruição de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*. As inativações microbiana e enzimática aumentaram com o aumento da pressão e a redução do pH, enquanto que a retenção do Ácido Ascórbico diminuiu com o aumento do pH e da pressão. A diferença total de cor teve seu máximo nos menores valores da pressão e do pH.

**Palavras-chave:** alta pressão, homogeneização, suco de laranja, inativação enzimática, PectinaMetilEsterase, superfície de resposta, cor, *Lactobacillus*, *Sacharomyces*, Ácido Ascórbico.

## Effects of Pressure and pH on the Pasteurization factors of Orange Juice processed by High Pressure Homogenization

### SUMMARY

Nowadays, the trend in consumer taste for fruit juices is towards freshly squeezed products with fresh taste and preserved natural flavor. Orange juice is a critical product within this concept due to nutritional and sensory damage that occurs when it is submitted to traditional thermal pasteurization. High Pressure Homogenization could be a good alternative to the traditional thermal processes, especially for pumpable foods. The objective of this study was to evaluate the influence of processing pressures and pH on the destruction rates of PectinMethylEsterase, *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, ascorbic acid and color in orange juice. Orange juice from the Pera variety was obtained using a commercial extractor and frozen in plastic bottles. For the microbial assays the juice was sterilized (121°C/15min), inoculated with *Lactobacillus plantarum* ( $1.2 \times 10^7$  UFC/mL) or *Saccharomyces cerevisiae* ( $2.9 \times 10^5$  UFC/mL) and processed immediately. The juice was pumped through a homogenizer valve at different pressures using two synchronized overlapped intensifiers at a flow rate of approximately 270 mL/min. The inlet temperature was kept at 10°C and soluble solids at 10.0°Brix. After processing, the product was immediately cooled to 4°C using a stainless steel coil in an ice bath. A complete 2<sup>2</sup> experimental design was used to evaluate the effect of pH (from 3.7 to 4.5) and pressure (from 100 to 300 MPa). The quality parameters analyzed were PectinMethylEsterase inactivation, destruction rates of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, ascorbic acid and total color difference (L, a, b color system). Two-second order polynomial equations were successfully obtained for PectinMethylEsterase inactivation and total color difference ( $R^2=0.95$  and 0.94, respectively). Pressure had a bigger effect than pH on PectinMethylEsterase inactivation and on the color difference. Microbial inactivation increased with pressure increase and pH decrease, while ascorbic acid retention decreased with increase in pressure and pH. The inactivation rate of PectinMethylEsterase reached its maximum at the higher pressure and lower pH, while the total color difference reached its maximum at the lower pressure and pH.

**Keywords:** high-pressure, homogenization, orange juice, enzyme inactivation, PectinMethylEsterase, Response Surface, Color, *Lactobacillus*, *Sacharomyces*, Ascorbic Acid.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o consumidor tem aumentado a rejeição por alimentos industrializados, que utilizam um largo espectro de aditivos com o objetivo de torna-los estáveis durante o armazenamento. Essa tendência induz o estudo de novas tecnologias que representem alternativas viáveis aos processos tradicionais de conservação, como os tratamentos térmicos. Alguns danos térmicos, como escurecimento não enzimático, a formação de off-flavours, e a redução do frescor do sabor e do conteúdo vitamínico, são ocasionados normalmente na pasteurização de suco de laranja (Basak, 1996). Essas conseqüências são contrárias aos desejos do consumidor moderno de sucos de frutas, que busca um produto semelhante à aquele recém extraído, com gosto a fresco e com integridade nutricional, muito semelhante ao suco feito em casa (Bingnon, 1997).

Em 1889, Hite (Hite apud Smelt, 1998) iniciou os trabalhos com o tratamento a Alta Pressão (pressão hidrostática) como uma técnica potencial de preservação. O tratamento Hidrostático a Alta Pressão permite a inativação de enzimas e microrganismos, deixando os compostos voláteis que conferem sabor, a maioria das vitaminas e outras moléculas pequenas, intactos (Smelt, 1998).

Atualmente, dois métodos de Processamento a Alta Pressão estão disponíveis: o Processo Hidrostático, que utiliza um vaso de pressão onde o produto é processado dentro da embalagem final; este processo submete o produto à alta pressão (até 700 Mpa) por um tempo determinado com o objetivo de inativar enzimas e microrganismos; e o Processo de Homogeneização, que utiliza um homogeneizador, sendo o produto pressurizado a até 320-350 MPa, a qual é instantaneamente reduzida à pressão ambiente com o uso de uma válvula de homogeneização. A passagem através do orifício dessa válvula causa uma grande aceleração no produto, e juntamente com a expansão resultante são responsáveis pela mudança na conformação de enzimas e pela ruptura das células dos microrganismos, ocasionando poucos ou nenhum dano às células dos alimentos e aos compostos responsáveis pelo sabor. O resfriamento e o envase asséptico completam o processo (Mermelstein, 1999).

Uma vez que os processos térmicos tradicionalmente utilizados na pasteurização de sucos são responsáveis pela degradação das características de sabor fresco, estes produtos tornam-se fortes candidatos à aplicação da tecnologia a altas pressões. O mercado de suco de laranja pronto para o consumo (pasteurizado e embalado em cartonados) apresentou um crescimento de 138% entre os anos de 1992 e 2001 (chegando a 55.712.000 L), e possui um potencial de aumento de vendas no mercado interno que pode ser alavancado por um produto com qualidades sensoriais muito próximas ao suco fresco recentemente extraído, atualmente não disponível no mercado (Datamark, 2003).

A PectinaMetilEsterase é a enzima presente em maior proporção no suco de laranja e é usualmente responsabilizada pelas perdas de qualidade neste produto. Atualmente, sua inativação é corriqueiramente utilizada como parâmetro de controle nos processos de conservação desse suco, como a pasteurização.

Para este estudo foram escolhidos microrganismos representativos da deterioração de sucos, os quais se desenvolvem em pH baixo e estão presentes amplamente no meio ambiente. Dessa forma foi escolhida a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que as leveduras são a causa mais comum de deterioração em sucos de frutas, e a bactéria láctica *Lactobacillus plantarum*, freqüentemente envolvida em problemas de deterioração de produtos vegetais ácidos (Uboldi Eroa, 1989).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria-prima**

Foram utilizadas laranjas (*Citrus sinensis*) da variedade Pêra, obtidas no mercado local (Campinas – S.P.) As frutas foram provenientes da cidade de Fernandópolis – SP, adquiridas no mês de Agosto de 2002 e com o parâmetro Ratio de 20,2.

### **2.2. Culturas microbiológicas**

Foram utilizados *Lactobacillus plantarum* CCT 2552 (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Toselo, Campinas – S.P.) e *Saccharomyces cerevisiae* isolado a partir de uma amostra comercial (suco de laranja pasteurizado – lote 3) pelo

Laboratório de Termobacteriologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. O preparo do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* foi feito em Caldo Extrato de Malte a 30°C por 24h, a partir da cultura mantida em rampa de PDA (Potato Dextrose Agar) sob refrigeração. O preparo do inóculo de *Lactobacillus plantarum* foi realizado em caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) a 35°C por 20h, a partir da cultura padronizada e congelada. A padronização do inóculo foi realizada através do crescimento deste em caldo, seguido do repique desta cultura a 10% em um caldo MRS estéril; o inóculo foi acondicionado em frascos de vidro de 50 mL e congelado a -15°C. Desta forma garantiu-se a homogeneidade do inóculo para todos os testes.

### **2.3. Processamento a Alta Pressão**

Foi utilizado um homogeneizador contínuo modelo nG7400H:350 produzido por STANSTED Fluid Power LTD (UK).

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar entre água e produto. O processo era iniciado utilizando água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo (válvula de alimentação da água aberta e válvula de alimentação do produto fechada). Alcançado o regime, a válvula de alimentação era aberta iniciando a alimentação do produto (abertura da válvula de entrada do produto e fechamento da entrada de água).

O processo consistiu em bombear o suco através de uma válvula de homogeneização com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados, a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. Após a passagem pela válvula de homogeneização, o produto passava por um trocador de calor, tendo sua temperatura reduzida a aproximadamente 30°C e seguia então para o sistema de envase.

O sistema de envase é composto por uma válvula de três vias localizada dentro de uma câmara de fluxo laminar (esterilizada com o uso de uma lâmpada Ultravioleta). Desta forma era possível efetuar o processo continuamente com a válvula de três vias na posição de descarte ou de retirada de amostra de forma asséptica.

A limpeza de todo o sistema (alimentação, homogeneizador e envase) era realizada pela eluição do produto com água. A sanificação do sistema foi feita utilizando etanol a 70% (v/v) sendo este bombeado através do sistema até que o mesmo fosse totalmente preenchido, permanecendo inundado por um período não inferior a 24h.

As temperaturas do produto foram medidas na entrada (termômetro de vidro), após a válvula de homogeneização, na entrada e na saída do trocador de calor (termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer).

#### **2.4. Processamento**

Inicialmente os frutos foram selecionados para eliminar unidades podres e danificadas e resíduos de grande tamanho (principalmente folhas e galhos), em seguida os frutos foram lavados com água clorada 20 ppm de cloro livre (0,02 mg de hipoclorito de sódio/L = 4 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 0,5%/L), secos e armazenados a 8°C.

O suco foi extraído em uma extratora Delijuicer modelo 731 Mi fabricada pela Intercitrus Agroindustrial LTDA (Araraquara, S.P.), sendo submetido a acabamento através de peneiras para reduzir o teor de polpa a aproximadamente 10,0% e para que fosse obtido um suco com partículas de tamanho reduzido de modo que fosse possível o processamento no homogeneizador de alta pressão. A menor abertura de peneira utilizada foi 0,297 mm (MESH 48). Em seguida o suco foi acondicionado em garrafas plásticas PET (polietileno tereftalado) e congelado em câmara à -20°C.

O estudo da otimização foi realizado separadamente, consistindo em três etapas do planejamento experimental, onde a primeira visou otimizar a taxa de destruição de *Lactobacillus plantarum*, a segunda a taxa de destruição de *Saccharomyces cerevisiae*, e a terceira a inativação da PectinaMetilEsterase, retenção de Ácido Ascórbico e minimizar as diferenças de cor provenientes do processo.

No dia anterior às etapas um e dois, o suco foi descongelado em água corrente e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, sendo armazenado em geladeira (8°C) até processamento. Neste dia as embalagens para recolhimento das amostras processadas (tubos de ensaio de vidro com capacidade para 60 mL) também foram esterilizadas nas mesmas condições citadas. Uma carga de inóculo de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ mL do microorganismo em estudo foi utilizada para inocular o suco estéril de modo a obter uma carga aproximada de 10<sup>6</sup> UFC/ mL. Nos processos que não envolveram culturas microbiológicas o suco foi descongelado em água corrente e processado imediatamente.

O processamento foi realizado em um homogeneizador contínuo modelo nG7400H.350 produzido por STANSTED Fluid Power LTD (UK).

A temperatura de entrada do produto foi mantida a 10°C e sólidos solúveis a 10,0°Brix para todos os processos do planejamento fatorial. Após cada processamento, o produto foi imediatamente resfriado a 4°C com o uso de uma serpentina de aço inox em um banho de gelo.

Para a realização deste estudo foram estabelecidos os intervalos de pH de 3,7 a 4,5 e de pressão de 100 a 300 MPa. O intervalo de pH foi escolhido levando-se em conta as variações decorrentes do período e local da safra, bem como uma faixa de aceitação para o consumidor. Já para a pressão, o limite inferior foi o menor nível de pressão que apresentou significância na destruição microbiana, de acordo com o capítulo 1 desta dissertação, e o limite superior foi a pressão máxima de trabalho permitida pelo equipamento.

## **2.5. Análises Físico-Químicas e Enzimática**

- pH (A.O.A.C. n° 42.1.04 Official Method n° 981.12 (1997))
- Sólidos Solúveis (A.O.A.C. n° 37.1.15 Official Method n° 932.12 (1997))
- Ácido Ascórbico (A.O.A.C. n° 45.1.14 Official Method n° 967.21 (1997) modificado). A metodologia foi alterada pela substituição do volume da amostra de suco usada na diluição de 10 mL para 20 mL, e da alíquota da amostra de suco usada na análise de 5 mL para 20 mL.

- Cor (foi utilizado o espectrofotômetro de cor modelo COLORQUEST II da HunterLab. Para o suco de laranja (reações de escurecimento), utilizou-se o sistema de cor HunterLab (Lab), o iluminante D<sub>65</sub>, um ângulo de observação de 10<sup>0</sup> e uma área de observação de uma polegada quadrada. A cubeta utilizada foi de vidro opticamente limpo, sendo determinado nos testes preliminares de leitura de cor o caminho óptico de 2 cm)
- Atividade de Pectina Metil Esterase (PME) (Hagerman and Austin, 1986). O método consiste em preparar um extrato enzimático (2,4 mL da amostra com 7,2 mL de NaCl 2M), o qual é mantido em banho de gelo para manter inalterada a atividade enzimática residual. Separadamente, prepara-se uma solução contendo 2,0 mL de solução 0,5% de pectina cítrica, 0,15 mL de uma solução 0,01% de Azul de Bromotimol em tampão fosfato 0,003M pH 7,5, e 0,75 mL de água destilada. O pH de todas as soluções e também o do extrato enzimático deve ser ajustado para 7,5 com NaOH 0,1 e 0,01N. Adiciona-se 2,9 mL da solução à cubeta e esta é colocada dentro do espectrofotômetro, em seguida adiciona-se 0,3 mL do extrato enzimático e inicia-se a medição à 620 nm em intervalos de 10 segundos durante 2 minutos. A interpolação dos dados obtidos (cálculo da regressão linear entre tempo e absorbância) fornece uma reta de inclinação negativa, com a qual se calcula a atividade dessa enzima. Quanto maior essa inclinação (em valor modular), maior é a atividade da enzima, a qual é calculada da seguinte forma:
  - “m” é a inclinação da reta do gráfico Absorbância x Tempo (min);
  - A alíquota de extrato enzimático utilizada (0,3 mL) contém 0,075 mL da amostra;
  - Segundo Stauffer (1989), uma variação de 0,0328 na absorbância (a 620 nm) representa a produção de 0,1 μmol de ácido galacturônico;
  - Segundo Segel (1979), uma unidade internacional da enzima é a quantidade que catalisa a formação de 1 μmol do produto da reação em condições definidas;

- Dessa forma:

$$PMEu = \frac{m}{0,328 \times 0,075} = m \times 40,6504$$

$PMEu = \text{quantidade da enzima que catalisa a formação de } 0,1 \mu\text{mol de ácido galacturônico/ min} \times \text{mL de suco}$

Este método é capaz de detectar atividades de até 0,020  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico produzido por minuto (Hagerman & Austin, 1986).

## 2.6. Análises Microbiológicas

A contagem de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada por plaqueamento em superfície utilizando o meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*); a contagem de *Lactobacillus plantarum* foi realizada por plaqueamento em profundidade utilizando o meio de cultura MRS Agar (de *Man, Rogosa e Sharpe*). Em ambas as contagens foram utilizadas as metodologias para Contagem de Bolores e Leveduras e para Contagem de Bactérias Lácteas descritas por Vanderzant et al. (1992). O resultado das análises microbiológicas foi expresso como o número de reduções logarítmicas (-Log (população final/ população inicial)) que cada processo ocasionou.

## 2.7. Planejamento Experimental

Foi elaborado um planejamento fatorial completo  $2^2$  para avaliar a interação entre pressão de operação e pH, sendo utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta para a análise dos resultados. (Bruns, 1995). Dessa forma temos as seguintes variáveis:

Variáveis independentes: Pressão e pH.

Variáveis dependentes: Número de reduções decimais de *Lactobacillus plantarum*, Número de reduções decimais de *Sacharomyces cerevisiae*, Inativação de PectinaMetilEsterase, retenção do Ácido Ascórbico, Diferença de Cor.

De forma a permitir a elaboração de uma planejamento fatorial completo foram escolhidos os intervalos de estudo das variáveis independentes levando em conta as projeções para os valores nos pontos axiais, sendo que  $\alpha = \sqrt[4]{2^n}$ , onde n é o número de variáveis independentes, sendo assim:

$$\alpha = \sqrt[4]{2^2} = \sqrt[2]{2} = 1,4142$$

Com o valor de  $\alpha$ , pode-se calcular os intervalos de estudo, o que é observado na Tabela 1:

**Tabela 1: Intervalos de estudo das variáveis independentes**

<i>Variáveis</i>	$-\alpha$	$-1$	$0$	$+1$	$+\alpha$
<i>Pressão (MPa)</i>	100	129	200	271	300
<i>pH</i>	3,70	3,82	4,10	4,38	4,50

Determinados os valores dos intervalos de estudo, pode-se determinar as condições dos ensaios, de acordo com o exemplificado na Tabela 2:

**Tabela 2: Condições de ensaios com valores codificados e reais**

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Pressão</i>	<i>pH</i>	<i>Pressão (MPa)</i>
1	-1	-1	3,82	129
2	-1	+1	3,82	271
3	+1	-1	4,38	129
4	+1	+1	4,38	271
5	0	0	4,10	200
6	0	0	4,10	200
7	0	0	4,10	200
8	0	-1,4142	4,10	100
9	0	+1,4142	4,10	300
10	-1,4142	0	3,70	200
11	+1,4142	0	4,50	200

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 apresenta os resultados experimentais das variáveis respostas (dependentes) do planejamento experimental.

**Tabela 3:** Resultados obtidos para as variáveis de resposta do Planejamento Experimental

Ensaio	pH	Pressão (MPa)	Retenção Vit. C (%)	Inativação PME (%)	Diferença de Cor (DE)*	Número de reduções de <i>L. plantarum</i> **	Número de reduções de <i>S. cerevisiae</i> **
1	3,82	129	100,00	4,16	5,21	0,09	2,25
2	3,82	271	96,58	59,21	4,16	7,23	5,42
3	4,38	129	100,00	1,21	4,67	0,12	1,21
4	4,38	271	92,66	39,34	3,31	4,96	5,07
5	4,10	200	95,09	13,80	4,81	2,51	5,62
6	4,10	200	94,20	15,06	3,57	1,78	5,10
7	4,10	200	94,72	18,09	4,77	1,78	5,54
8	4,10	100	99,10	6,02	4,89	0,00	0,74
9	4,10	300	93,34	76,26	3,53	7,33	5,54
10	3,70	200	99,01	35,51	5,20	6,27	5,54
11	4,50	200	96,68	18,19	4,66	1,10	5,34

$$* DE = \sqrt{(a_{\text{processado}} - a_{\text{não processado}})^2 + (b_{\text{processado}} - b_{\text{não processado}})^2 + (L_{\text{processado}} - L_{\text{não processado}})^2}$$

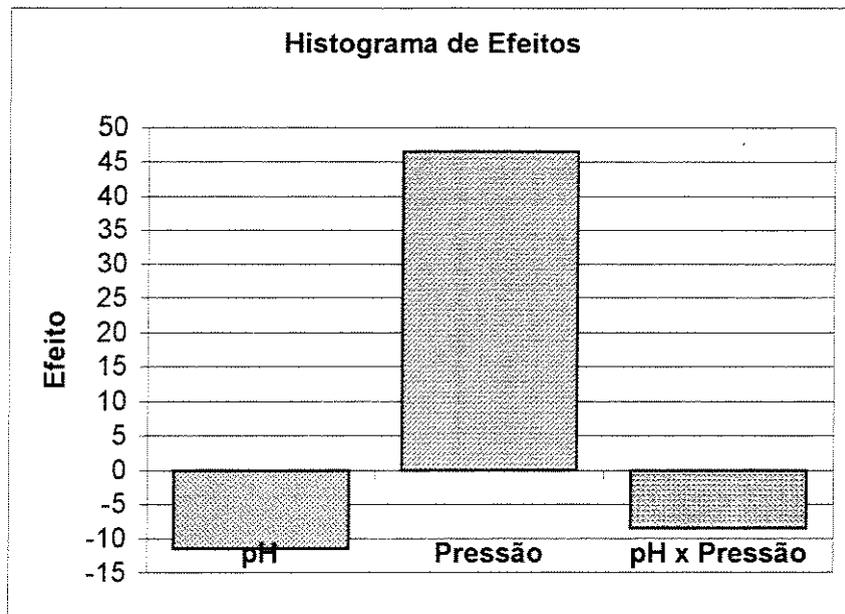
\*\* Número de reduções = - Log (carga final/carga inicial)

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3, foi realizada a análise destes, o que é apresentado a seguir:

#### 3.1. Inativação da PectinaMetilEsterase (PME)

##### 3.1.1. Análise dos Efeitos

Através dos resultados dos ensaios 1 a 4 e dos pontos centrais (ensaios 5 a 7), realizou-se a análise dos efeitos, que são apresentados na Figura 1.



**Figura 1:** *Histograma de Efeitos na Inativação da PectinaMetilEsterase*

Através da análise dos efeitos, notamos que a pressão é a variável de maior influência na inativação da PME, tendo um efeito positivo na resposta (o aumento da pressão causa um aumento na inativação da PME). O efeito do pH e da sua interação com a pressão são relevantes e negativos.

### **3.1.2. Análise do Modelo**

A análise do modelo foi realizada após a análise dos efeitos e utiliza todos os ensaios realizados. Inicialmente, é feita a análise do modelo utilizando os valores codificados das variáveis independentes. Desta forma, foram obtidos os coeficientes apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4: Análise do modelo para Inativação da PectinaMetilEsterase**

Variável	Efeito	Desvio Padrão (erro puro)	t (2)	p	Limite de Confiança Inferior (-95%)	Limite de Confiança Superior (+95%)
<b>Principal</b>	<b>15,6527</b>	<b>1,271595</b>	<b>12,3095</b>	<b>0,006535</b>	<b>10,1814719</b>	<b>21,12393</b>
<b>PH (L)</b>	<b>-11,8265</b>	<b>1,557387</b>	<b>-7,59382</b>	<b>0,016903</b>	<b>-18,527402</b>	<b>-5,12561</b>
pH (Q)	7,189208	1,853676	3,878352	0,060511	-0,7865166	15,16493
<b>Pressão (L)</b>	<b>48,13155</b>	<b>1,557387</b>	<b>30,90533</b>	<b>0,001045</b>	<b>41,4306565</b>	<b>54,83245</b>
<b>Pressão (Q)</b>	<b>21,48135</b>	<b>1,853676</b>	<b>11,58851</b>	<b>0,007364</b>	<b>13,505628</b>	<b>29,45708</b>
<b>pH x Pressão</b>	<b>-8,45746</b>	<b>2,202467</b>	<b>-3,83999</b>	<b>0,061616</b>	<b>-17,933906</b>	<b>1,018994</b>

L = Parâmetro Linear

Q = Parâmetro Quadrático

Obs.: Em **negrito** estão os parâmetros significativos no nível de significância estudado

Podemos observar pela Tabela 4 que apenas as variáveis pH (Q) e pH x Pressão apresentaram nível de significância inferior a 95% ( $p > 0,05$ ). Porém, como estes valores estão bastante próximos ao limite os mesmos foram mantidos para a análise do modelo para evitarmos a perda de informações relevantes. Os coeficientes de regressão para a equação do modelo estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5: Coeficientes de regressão para Inativação da PectinaMetilEsterase**

Variável	Efeito	Desvio Padrão (erro puro)	T (2)	p	Limite de Confiança Inferior (-95%)	Limite de Confiança Superior (+95%)
<b>Principal</b>	<b>15,6527</b>	<b>1,271595</b>	<b>12,3095</b>	<b>0,006535</b>	<b>10,1814719</b>	<b>21,12393</b>
<b>PH (L)</b>	<b>-5,91325</b>	<b>0,778693</b>	<b>-7,59382</b>	<b>0,016903</b>	<b>-9,2637009</b>	<b>-2,56281</b>
<b>PH (Q)</b>	<b>3,594604</b>	<b>0,926838</b>	<b>3,878352</b>	<b>0,060511</b>	<b>-0,3932583</b>	<b>7,582467</b>
<b>Pressão (L)</b>	<b>24,06578</b>	<b>0,778693</b>	<b>30,90533</b>	<b>0,001045</b>	<b>20,7153283</b>	<b>27,41622</b>
<b>Pressão (Q)</b>	<b>10,74068</b>	<b>0,926838</b>	<b>11,58851</b>	<b>0,007364</b>	<b>6,75281398</b>	<b>14,72854</b>
<b>pH x Pressão</b>	<b>-4,22873</b>	<b>1,101233</b>	<b>-3,83999</b>	<b>0,061616</b>	<b>-8,9669532</b>	<b>0,509497</b>

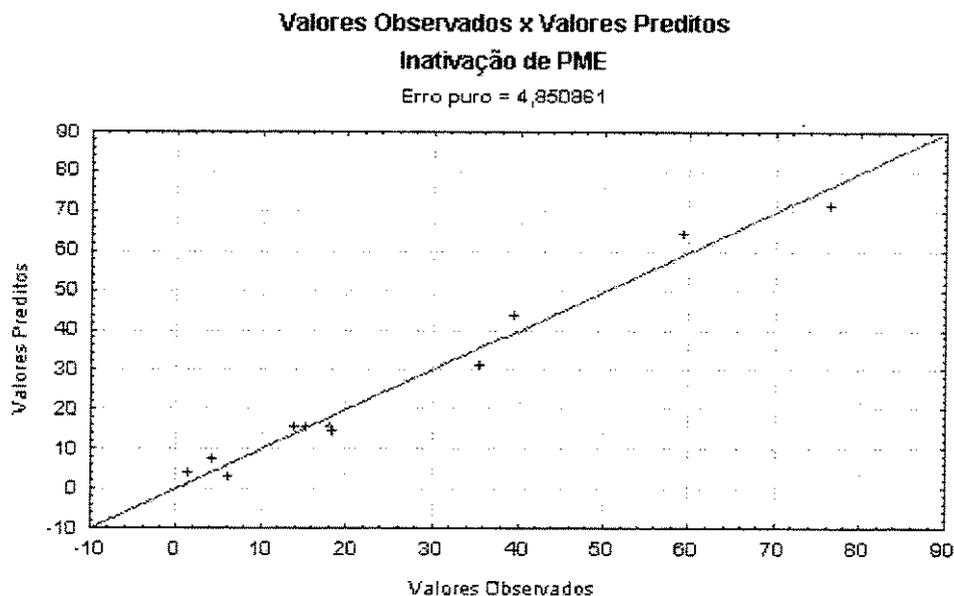
L = Parâmetro Linear

Q = Parâmetro Quadrático

Os coeficientes de regressão (efeitos) são os coeficientes do modelo, o qual está apresentado abaixo:

### 3.1.5. Análise da eficiência das previsões do modelo

É possível comparar os resultados obtidos experimentalmente com o resultado previsto pelo modelo matemático através do uso do Gráfico de Pareto, apresentado na Figura 3:



**Figura 3:** Gráfico de Pareto para a Inativação da PectinaMetilEsterase (PME)

A Figura 3 apresenta uma comparação gráfica entre os resultados previstos pelo modelo codificado e o resultado experimental, onde se observa que as previsões do modelo se aproximam dos resultados experimentais. Esta representação gráfica ilustra a boa qualidade do modelo obtido, pois os valores obtidos são muito próximos aos valores preditos.

Comparando a previsão do modelo com os resultados do capítulo 2 desta dissertação, verifica-se a eficiência do modelo na região de estudo, uma vez que, em pH 3,6, foram obtidas inativações de 44,6 e 62,9 nas pressões de 200 e 250 MPa, respectivamente; as previsões do modelo para as respectivas pressões foram 37,24 e 64,80. A pH 4,1, foram obtidas inativações de 35,91 e 66,74 nas pressões de 250 e 300 MPa, respectivamente; as previsões do modelo para as respectivas pressões foram 37,96 e 70,94.

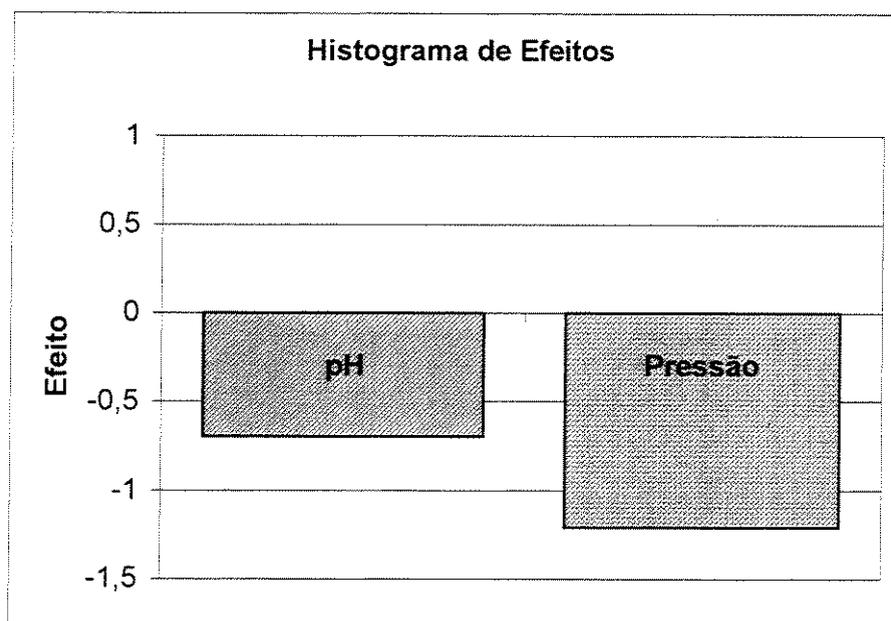
### 3.1.6. Discussão

De acordo com nossas expectativas, e a exemplo do que ocorre no processo hidrostático, onde a redução do pH aumenta a inativação da PME (Basak et al., 1996), o aumento da pressão e a redução do pH incrementaram a inativação da PectinaMetilEsterase. Sendo assim, dentro das faixas de pressão e pH estudadas, as melhores combinações para máxima inativação enzimática estão nos extremos inferiores para pH e superiores para pressão

## 3.2. Diferença Total de Cor (DE)

### 3.2.1. Análise dos Efeitos

Através dos resultados dos ensaios 1 a 4 e dos pontos centrais (ensaios 5 a 7), realizou-se a análise dos efeitos, que são apresentados na Figura 4:



**Figura 4:** *Histograma de Efeitos na Diferença Total de Cor (DE)*

Através da análise dos efeitos, notamos que a pressão tem o dobro da influência do pH na Diferença de Cor, ambos possuindo um efeito negativo na resposta (o aumento da pressão ou do pH causa a redução da diferença de cor).

### 3.2.2. Análise do Modelo

A análise do modelo foi realizada após a análise dos efeitos e utiliza todos os ensaios realizados. Inicialmente, é feita a análise do modelo utilizando os valores codificados das variáveis independentes. Desta forma, foram obtidos os coeficientes apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7: Análise do modelo para a Diferença Total de Cor (DE)**

<i>Variável</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio Padrão (erro puro)</i>	<i>t (1)</i>	<i>p</i>	<i>Limite de Confiança Inferior (-95%)</i>	<i>Limite de Confiança Superior (+95%)</i>
<b>Principal</b>	<b>4,788084</b>	<b>0,017063</b>	<b>280,6087</b>	<b>0,002269</b>	<b>4,5712757</b>	<b>5,004893</b>
<b>pH (L)</b>	<b>-0,535456</b>	<b>0,017063</b>	<b>-31,3806</b>	<b>0,02028</b>	<b>-0,752266</b>	<b>-0,318647</b>
<b>pH (Q)</b>	<b>0,026178</b>	<b>0,022573</b>	<b>1,159716</b>	<b>0,453006</b>	<b>-0,2606363</b>	<b>0,312992</b>
<b>Pressão (L)</b>	<b>-1,086154</b>	<b>0,017063</b>	<b>-63,65444</b>	<b>0,01</b>	<b>-1,3029638</b>	<b>-0,869345</b>
<b>Pressão (Q)</b>	<b>-0,693791</b>	<b>0,022573</b>	<b>-30,73575</b>	<b>0,020705</b>	<b>-0,9806057</b>	<b>-0,406977</b>
<b>pH x Pressão</b>	<b>-0,154426</b>	<b>0,024131</b>	<b>-6,399492</b>	<b>0,098682</b>	<b>-0,4610399</b>	<b>0,152187</b>

*L = Parâmetro Linear*

*Q = Parâmetro Quadrático*

*Obs.: Em **negrito** estão os parâmetros significativos no nível de significância estudado*

A Tabela 8 abaixo apresenta os coeficientes de regressão obtidos para o modelo utilizando-se somente as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8: Coeficientes de regressão para a Diferença Total de Cor (DE)**

<i>Variável</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio Padrão (erro puro)</i>	<i>t (1)</i>	<i>p</i>	<i>Limite de Confiança Inferior (-95%)</i>	<i>Limite de Confiança Superior (+95%)</i>
<i>Principal</i>	4,803043	0,011171	429,9744	0,001481	4,66110788	4,944978
<i>pH (L)</i>	-0,26773	0,008532	-31,3806	0,02028	-0,376133	-0,15932
<i>Pressão (L)</i>	-0,54308	0,008532	-63,6544	0,01	-0,6514819	-0,43467
<i>Pressão (Q)</i>	-0,35251	0,010197	-34,5682	0,018411	-0,4820752	-0,22294

*L = Parâmetro Linear*

*Q = Parâmetro Quadrático*

Os coeficientes de regressão (efeitos) são os coeficientes do modelo, o qual está apresentado abaixo:

$$\text{Diferença Total de Cor (DE)} = 4,803043 - 0,26773 * \text{pH} - 0,54308 * \text{Pressão} - 0,35251 * \text{Pressão}^2$$

### 3.2.3. Teste de Variância

O modelo foi submetido a um teste de variância para que fosse avaliada a validade do mesmo. A Tabela 9 apresenta o resultado desse teste.

**Tabela 9: Análise de variância do modelo codificado para a Diferença Total de Cor (DE).**

<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>MQ</i>	<i>F<sub>calculado</sub></i>
<i>Regressão</i>	3,628693	3	1,209564	34,4
<i>Resíduos</i>	0,210942	6	0,035157	
<i>Falta de Ajuste</i>	0,210359	5	0,042072	72,3
<i>Erro Puro</i>	0,000582	1	0,000582	
<i>Total</i>	3,839635	9		

*SQ = Soma Quadrática dos desvios*

*GL = Graus de Liberdade*

*MQ = SQ/GL = Média Quadrática*

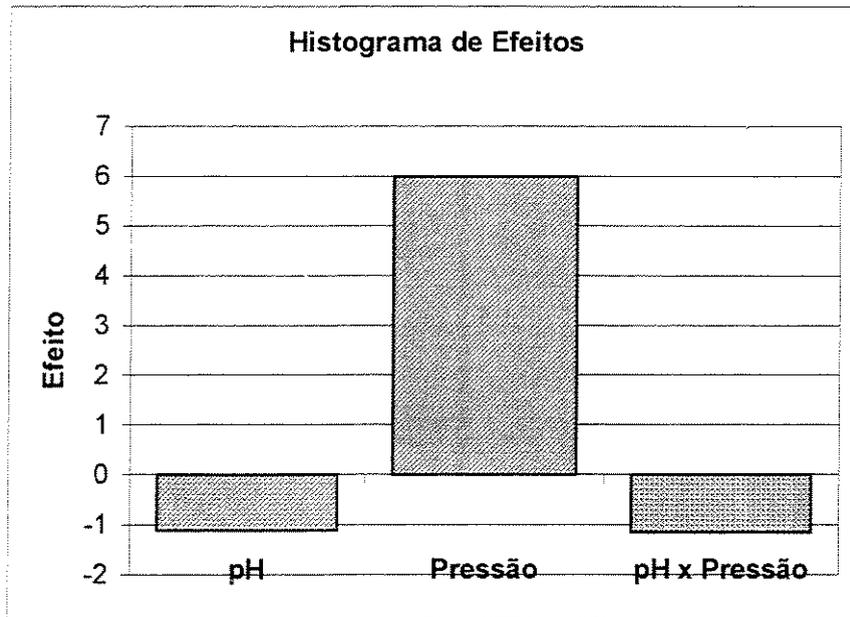
*F = MQ<sub>Regressão</sub>/MQ<sub>Resíduo</sub>*

Como o valor do parâmetro  $F_{calculado}$  para a regressão é 7,2 vezes maior do que o valor tabelado (95%, 3, 6) de 4,75. O coeficiente de correlação “ $R^2$ ” é de 0,945. Dessa

### 3.3. Inativação de *Lactobacillus plantarum*

#### 3.3.1. Análise dos Efeitos

A utilização dos resultados dos ensaios 1 a 7, permitiu a realização da análise dos efeitos das variáveis independentes na Inativação de *Lactobacillus plantarum*, a qual é apresentada na Figura 7.



**Figura 7:** Histograma de Efeitos na Inativação de *Lactobacillus plantarum*

Um análise da Figura 7 permite estabelecer que o aumento da pressão é mais significativo que a redução do pH ou a interação do aumento da pressão com a redução do pH, estes últimos apresentando efeito semelhante. Os valores negativos dos efeitos indicam que a redução da variável independente, pH, aumenta o valor da variável dependente, a inativação de *Lactobacillus plantarum*. Embora o nível de significância utilizado tenha sido de 10% ( $p < 0,10$ ), decidiu-se pela manutenção dos parâmetros pH, e pH x Pressão, pois seus valores de “p” são muito próximos ( $p = 0,11$ ) ao valor utilizado.

### 3.3.2. Análise do Modelo

A Análise do Modelo é realizada com o objetivo de avaliar quais parâmetros serão significativos para a determinação do modelo matemático. Ela foi realizada através da utilização de todos os ensaios, aqueles utilizados na Análise dos Efeitos adicionados dos ensaios dos pontos axiais (ensaios 8 a 11). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10: Análise do Modelo para o estudo da Inativação de *L. plantarum***

<i>Variável</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio Padrão (erro puro)</i>	<i>t (2)</i>	<i>P</i>	<i>Limite de Confiança Inferior (-90%)</i>	<i>Limite de Confiança Superior (+90%)</i>
<b><i>Principal</i></b>	<b>2,02491</b>	<b>0,2432</b>	<b>8,32611</b>	<b>0,01412</b>	<b>1,314767</b>	<b>2,735045</b>
<b><i>pH (L)</i></b>	<b>-2,3881</b>	<b>0,29786</b>	<b>-8,0175</b>	<b>0,0152</b>	<b>-3,25783</b>	<b>-1,51834</b>
<b><i>pH (Q)</i></b>	<b>1,37256</b>	<b>0,35453</b>	<b>3,87154</b>	<b>0,0607</b>	<b>0,337349</b>	<b>2,407769</b>
<b><i>Pressão (L)</i></b>	<b>5,58784</b>	<b>0,29786</b>	<b>18,76</b>	<b>0,00283</b>	<b>4,718097</b>	<b>6,457583</b>
<b><i>Pressão (Q)</i></b>	<b>1,35098</b>	<b>0,35453</b>	<b>3,81066</b>	<b>0,06248</b>	<b>0,315769</b>	<b>2,386188</b>
<b><i>pH x Pressão</i></b>	<b>-1,1491</b>	<b>0,42123</b>	<b>-2,7279</b>	<b>0,11221</b>	<b>-2,37907</b>	<b>0,080923</b>

*L = Parâmetro Linear*

*Q = Parâmetro Quadrático*

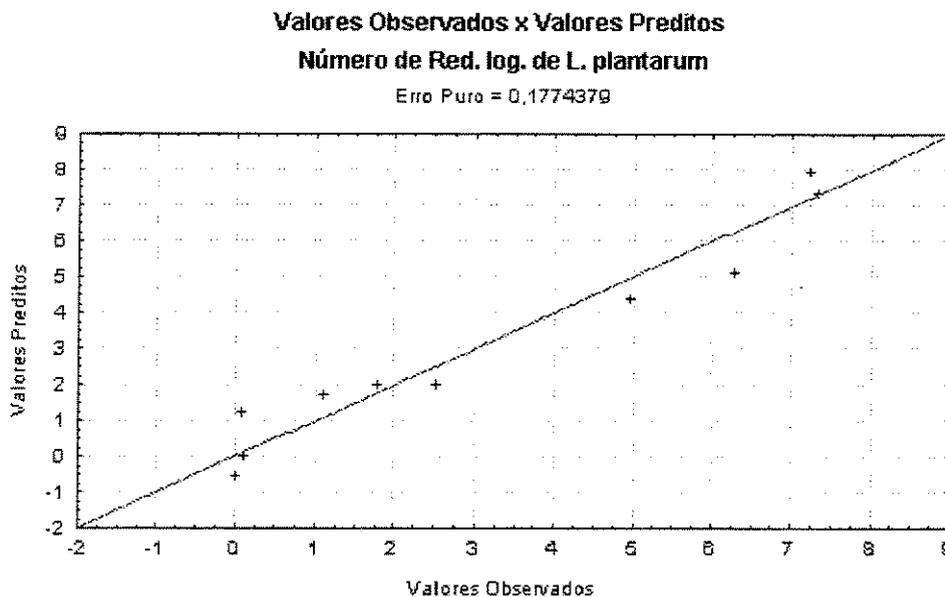
*Obs.: Em **negrito** estão os parâmetros significativos no nível de significância estudado*

O único parâmetro que não foi estatisticamente válido no nível de significância estudado ( $p < 0,10$ ) foi a interação entre pH e Pressão, mas este foi mantido pois o valor de “*p*” obtido (0,11) é muito próximo ao utilizado na análise. Dessa forma, foram obtidos os coeficientes de regressão para a equação do modelo, que são apresentados na Tabela 11:

$$\text{Inativação de } Lactobacillus \text{ plantarum} = 128,5094 - 64,4479 * \text{pH} + 8,035352 * \text{pH}^2 + 0,099473 * \text{Pressão} + 0,000131 * \text{Pressão}^2 - 0,027360 * \text{pH} * \text{Pressão}$$

### 3.3.5. Análise da eficiência das previsões do modelo

De modo a avaliar a eficiência das previsões do modelo foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos experimentalmente e a previsão do modelo. Com o uso do Gráfico de Pareto é possível realizar essa comparação, apresentada através da Figura 9:



**Figura 9:** Gráfico de Pareto para a Inativação de *Lactobacillus plantarum*

Segundo a Figura 9, observa-se que os valores obtidos são muito próximos aos valores preditos pelo modelo, o que atesta a boa qualidade do modelo.

Como exemplo, nos experimentos realizados no Capítulo 1 desta dissertação, foram obtidos os seguintes resultados: 2,1 e >7,1 reduções logarítmicas nas pressões de 200 e 300 MPa, respectivamente. Para essas mesmas pressões o modelo fornece as seguintes reduções logarítmicas 2,02 e 7,31. Esses resultados ilustram a eficiência das previsões do modelo.

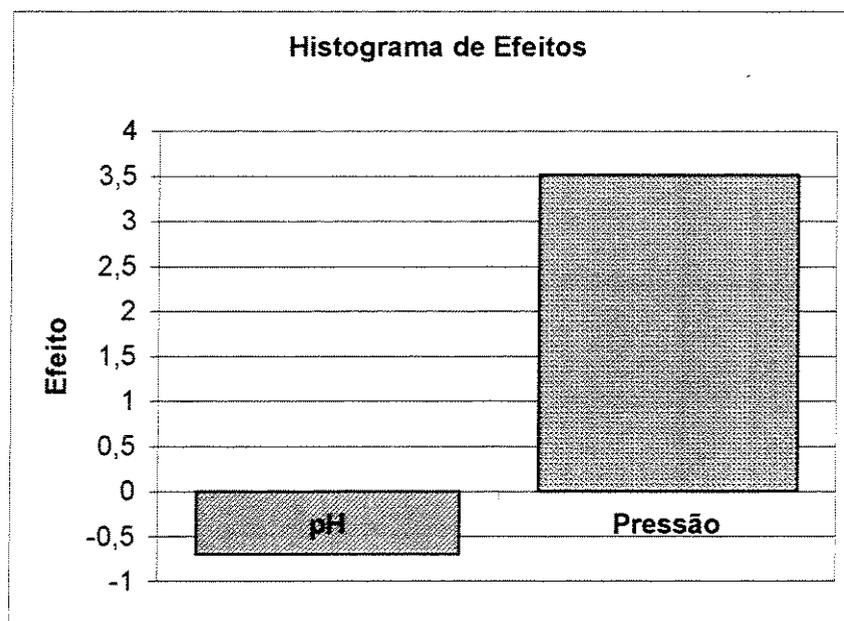
### 3.3.6. Discussão

De acordo com os resultados, a tendência observada é o aumento da inativação com o aumento da pressão de processo, o que não viabiliza a obtenção de uma região de máximo na Superfície de Resposta obtida para a região estudada, pois a tendência da curva indica que toda redução de pH e aumento de Pressão sempre potencializarão a inativação microbiológica.

## 3.4. Inativação de *Sacharomyces cerevisiae*

### 3.4.1. Análise dos Efeitos

Com o objetivo de quantificar o efeito das variáveis independentes foi realizada a Análise dos Efeitos utilizando-se os resultados dos ensaios 1 a 7, a qual é apresentada na Figura 10.



**Figura 10:** Histograma de Efeitos na Inativação de *Sacharomyces cerevisiae*

Através da análise dos efeitos das variáveis independentes na resposta, foi verificado que a interação entre pH e Pressão não foi estatisticamente significativa

( $p < 0,20$ ), dessa forma, a essa interação foi excluída e os valores dos efeitos recalculados; a Figura 10 apresenta os valores dos efeitos, após a eliminação da interação. Nota-se a menor influência da variação do pH, se comparada com a influência da pressão, na inativação de *Sacharomyces cerevisiae*. O valor positivo do efeito da Pressão indica que seu aumento acarreta o acréscimo da referida taxa de inativação; do mesmo modo, o sinal negativo do efeito do pH indica que seu decréscimo incrementa a taxa de inativação citada.

### 3.4.2. Análise do Modelo

Para que seja possível determinar os parâmetros significativos na determinação do modelo, foi realizada a Análise do Modelo, que utiliza todos os ensaios realizados. A referida análise apresentou os resultados contidos na Tabela 13:

**Tabela 13: Análise do modelo para Inativação de *Sacharomyces cerevisiae***

<i>Variável</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio Padrão (erro puro)</i>	<i>t (2)</i>	<i>P</i>	<i>Limite de Confiança Inferior (-80%)</i>	<i>Limite de Confiança Superior (+80%)</i>
<i>Principal</i>	<i>5,421419</i>	<i>0,163852</i>	<i>33,08735</i>	<i>0,000912</i>	<i>5,11245763</i>	<i>5,7303812</i>
<i>pH (L)</i>	<i>-0,419252</i>	<i>0,200678</i>	<i>-2,089181</i>	<i>0,17189</i>	<i>-0,7976529</i>	<i>-0,0408506</i>
<i>pH (Q)</i>	<i>-0,38103</i>	<i>0,238856</i>	<i>-1,595229</i>	<i>0,251714</i>	<i>-0,8314212</i>	<i>0,0693611</i>
<i>Pressão (L)</i>	<i>3,455906</i>	<i>0,200678</i>	<i>17,22119</i>	<i>0,003355</i>	<i>3,07750473</i>	<i>3,8343071</i>
<i>Pressão (Q)</i>	<i>-2,681638</i>	<i>0,238856</i>	<i>-11,22701</i>	<i>0,00784</i>	<i>-3,1320295</i>	<i>-2,2312472</i>
<i>pH x Pressão</i>	<i>0,339613</i>	<i>0,2838</i>	<i>1,196665</i>	<i>0,354051</i>	<i>-0,1955245</i>	<i>0,8747505</i>

*L = Parâmetro Linear*

*Q = Parâmetro Quadrático*

*Obs.: Em **negrito** estão os parâmetros significativos no nível de significância estudado*

Os parâmetros pH quadrático e a interação do pH com a Pressão não foram estatisticamente significativos no nível de significância estudado ( $p < 0,20$ ). Dessa forma, esses parâmetros foram retirados para que fossem obtidos os coeficientes de regressão para a equação do modelo, os quais estão contidos na Tabela 14:

**Tabela 14: Coeficientes de regressão para Inativação de *Sacharomyces cerevisiae***

<i>Variável</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio Padrão (erro puro)</i>	<i>t (2)</i>	<i>p</i>	<i>Limite de Confiança Inferior (-80%)</i>	<i>Limite de Confiança Superior (+80%)</i>
<i>Principal</i>	5,242114	0,11922	43,97009	0,000517	5,01731069	5,4669175
<i>PH (L)</i>	-0,209626	0,100339	-2,089181	0,17189	-0,3988265	-0,0204253
<i>Pressão (L)</i>	1,727953	0,100339	17,22119	0,003355	1,53875237	1,9171535
<i>Pressão (Q)</i>	-1,284787	0,114146	-11,25565	0,007801	-1,5000226	-1,0695514

*L = Parâmetro Linear*

*Q = Parâmetro Quadrático*

Os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 14 são os coeficientes do modelo, apresentado abaixo:

$$\text{Inativação de } \textit{Sacharomyces cerevisiae} = 5,242114 - 0,209626 * \text{pH} + 1,727953 * \text{Pressão} - 1,284787 * \text{Pressão}^2$$

### 3.4.3. Teste de Variância

O modelo obtido foi avaliado com relação a sua validade com a utilização de um Teste de Variância, cujos resultados estão expressos na Tabela 15, a seguir:

**Tabela 15: Análise de variância do modelo codificado para Inativação de *Sacharomyces cerevisiae*.**

<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>MQ</i>	<i>F<sub>calculado</sub></i>
<i>Regressão</i>	34,44175	3	11,48058	41,4
<i>Resíduos</i>	1,939888	7	0,277127	
<i>Falta de Ajuste</i>	1,778804	5	0,355761	4,4
<i>Erro Puro</i>	0,161084	2	0,080542	
<i>Total</i>	36,38164	10		

*SQ = Soma Quadrática dos desvios*

*MQ = SQ/GL = Média Quadrática*

*GL = Graus de Liberdade*

*F = MQ<sub>Regressão</sub>/MQ<sub>Resíduo</sub>*

O modelo avaliado foi classificado como estatisticamente preditivo e válido, pois o parâmetro  $F_{calculado}$  para a regressão é 20 vezes maior do que o valor tabelado (80%, 3, 7) de

detectáveis em pressões acima de 200 MPa, o que fornece resultados de inativação muito próximos para todos os valores de pressão acima de 200 MPa, criando esse patamar. É importante ressaltar que os valores obtidos na região de máximo, são a mínima inativação nessa condição, pois ocorreu a inativação total da carga microbiana.

Ogawa et al. (1990) estudou a inativação de bolores e leveduras em função da pressão (hidrostática de 100 a 600 MPa) e do pH (de 2,5 a 4,5), dentre outros fatores, no suco de “Satsuma mandarim” (*Citrus unshiu*), e não verificou dependência da inativação em relação ao pH para os microrganismos *Sacharomyces bayanus*, *Mucor plumbeus*, *Schizosacharomyces pombe*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Hansenula anômala*, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia membranaefaciens* e *Aspergillus awamori*.

### 3.5. Retenção de Ácido Ascórbico

#### 3.5.1. Análise dos Efeitos

Com o objetivo de verificar a influência das variáveis na resposta, foi realizada a Análise dos Efeitos, que utiliza os resultados dos ensaios 1 a 7. Os resultados dessa análise são apresentados na Figura 13:

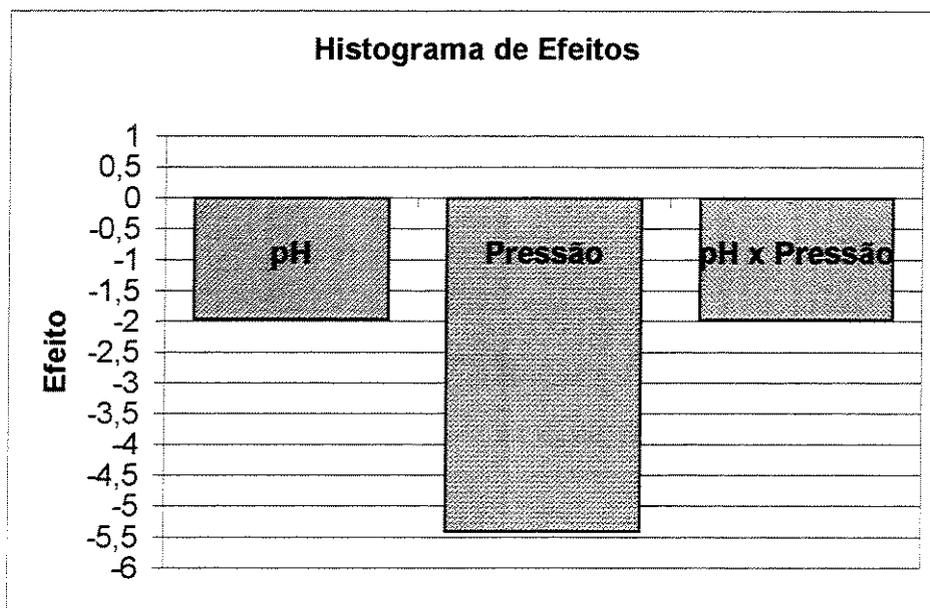


Figura 13: Histograma de Efeitos na Retenção de Ácido Ascórbico

A análise dos efeitos permite observar que a pressão influencia a Retenção do Ácido Ascórbico duas vezes mais que o pH, cujo efeito é muito próximo ao da interação entre pH e pressão. Também é possível observar que todos os efeitos são negativos, o que significa a redução da Retenção do Ácido Ascórbico com o aumento dos valores das variáveis (pH e Pressão).

### 3.5.2. Análise do Modelo

Com a utilização dos resultados de todos os ensaios e após a análise dos efeitos, foi realizada a Análise do Modelo. Esta análise permite avaliar quais parâmetros são significativos e devem ser utilizados no cálculo dos Coeficientes de Regressão (coeficientes do Modelo). O resultado obtido é apresentado na Tabela 16.

**Tabela 16: Análise do modelo para Retenção do Ácido Ascórbico**

<i>Variável</i>	<i>Efeito</i>	<i>Desvio Padrão (erro puro)</i>	<i>t (2)</i>	<i>P</i>	<i>Limite de Confiança Inferior (-95%)</i>	<i>Limite de Confiança Superior (+95%)</i>
<b>Principal</b>	<b>94,66853</b>	<b>0,257785</b>	<b>367,238</b>	<b>0,00000741</b>	<b>93,55937</b>	<b>95,77769</b>
<b>pH (L)</b>	<b>-1,800816</b>	<b>0,315723</b>	<b>-5,703792</b>	<b>0,02938947</b>	<b>-3,159261</b>	<b>-0,442371</b>
<b>pH (Q)</b>	<b>3,322174</b>	<b>0,375788</b>	<b>8,840549</b>	<b>0,01255459</b>	<b>1,705288</b>	<b>4,93906</b>
<b>Pressão (L)</b>	<b>-4,740713</b>	<b>0,315723</b>	<b>-15,01544</b>	<b>0,00440602</b>	<b>-6,099158</b>	<b>-3,382268</b>
<b>Pressão (Q)</b>	<b>1,695161</b>	<b>0,375788</b>	<b>4,510948</b>	<b>0,04579396</b>	<b>0,078275</b>	<b>3,312047</b>
<b>pH x Pressão</b>	<b>-1,967305</b>	<b>0,446497</b>	<b>-4,406087</b>	<b>0,04784381</b>	<b>-3,888427</b>	<b>-0,046183</b>

*L = Parâmetro Linear*

*Q = Parâmetro Quadrático*

*Obs.: Em **negrito** estão os parâmetros significativos no nível de significância estudado*

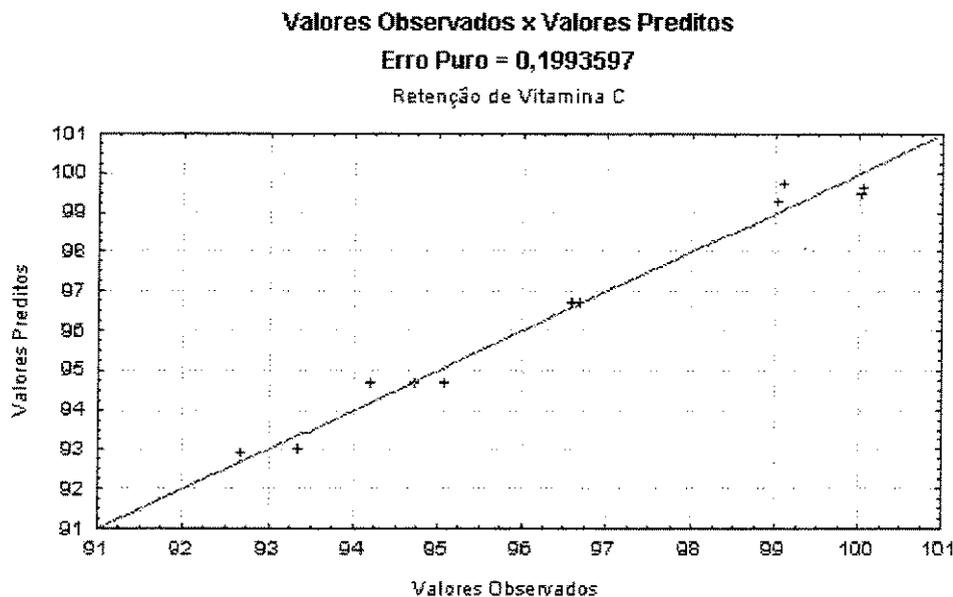
Como todos os parâmetros apresentados na Tabela 16 foram significativos ( $p < 0,05$ ), não foram necessárias exclusões, sendo possível obter os Coeficientes de Regressão para a equação do modelo, os quais estão apresentados na Tabela 17:

maior do que o valor tabelado (95%, 5, 5) que é de 5,05 e que o coeficiente de correlação “R<sup>2</sup>” foi de 0,981.

$$\text{Retenção do Ácido Ascórbico} = 422,2731 - 0,900408 * \text{pH} + 20,23694352 * \text{pH}^2 + 0,1 * \text{Pressão} + 0,00016 * \text{Pressão}^2 - 0,046841 * \text{pH} * \text{Pressão}$$

### 3.5.5. Análise da eficiência das previsões do modelo

Os resultados previstos no modelo codificado e obtidos experimentalmente podem ser avaliados graficamente, o que permite a análise da eficiência das previsões do modelo com o resultados experimentais. Essa análise está ilustrada na Figura 15:



**Figura 15:** Gráfico de Pareto para a Retenção do Ácido Ascórbico

A boa qualidade do modelo foi verificada através do Gráfico de Pareto, pois se observa a proximidade dos valores obtidos aos valores preditos.

### 3.5.6. Discussão

Os resultados de Retenção do Ácido Ascórbico são muito interessantes, pois se verificou que o aumento da Pressão de processo causou a diminuição da retenção do Ácido Ascórbico, assim como o aumento do pH. A análise da Superfície de Resposta permite

determinar uma região ótima onde as condições de processo prejudicam a Retenção do Ácido Ascórbico: pressões acima de 250 MPa e pH acima de 4,10. Uma possível explicação para a redução da Retenção do Ácido Ascórbico com o aumento da Pressão é o aquecimento existente, diretamente relacionado com a pressão utilizada (quanto maior a pressão, maior o aquecimento), que ocorre no equipamento utilizado, ficando clara a necessidade de alterações que minimizem esse problema. Sancho et al. (1999) estudaram o efeito da pressão hidrostática sobre vitaminas hidrosolúveis em um sistema multivitamínico e em alimentos. Comparativamente, a vitamina C (ascorbato) apresentou-se mais sensível que as vitaminas B1 (tiamina) e B6 (piridoxina), pois teve perdas entre 10 e 13%, enquanto que as outras vitaminas tiveram uma variação máxima de 2,4%, nos processos de 200 a 600 MPa por 30 min. O processo a 400 MPa por 30 minutos resultou em uma retenção de 88,68% da quantidade de vitamina C em "Strawberry coulis". Os resultados de Ogawa et al. apud Sancho et al. (1999) indicaram que não há alteração na concentração de ácido ascórbico após o processamento a alta pressão hidrostática de sucos cítricos.

#### **4. CONCLUSÕES**

A influência do pH e da Pressão sobre todas as variáveis pôde ser avaliada e foi possível definir modelos estatisticamente válidos e preditivos, além de serem obtidas superfícies de resposta para todas as variáveis dependentes.

Os resultados obtidos indicam que não foi possível delimitar uma condição ótima para o processo, pois os mesmos apontam para possíveis melhoras dos parâmetros analisados com o aumento da pressão de processo. Sendo assim, a condição de processo mais adequada é a que utiliza a maior pressão, neste estudo o limite de uso do equipamento, 300 MPa, que pode ser favorecida com o processamento de sucos de baixos valores de pH. Não é sugerida uma condição ótima de processo para o pH pois o processamento em estudo visa a utilização de suco de laranja natural, sem ajustes de pH, o qual sofre variações decorrentes de safra, clima e outras.

## 5. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, contou com apoio da UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas e da Intercitrus Agroindustrial Ltda.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg , 1997.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S. Ultra High Pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. **Food Research International**, **29(7)**:601-607,1996.

BIGNON, J. Cold Pasteurizers Hiperbar for the Stabilization of Fresh Fruit Juices. **Fruit Processing**, **6(2)**:46-48,1997.

BRUNS, R.E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299 p.

DATAMARK Mercado de suco pronto para o consumo. Disponível em: <<http://www.datamark.com>>. Acesso em: 08 abr. 2003

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

MERMELSTEIN, N.H. (ed.) High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 4, p. 86-90, Apr, 1999.

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H. Pressure Inactivation of Yeasts, Molds, and Pectinesterase in Satsuma Mandarin Juice: Effects of Juice Concentration, pH, and Organic Acids, and Comparison with Heat Sanitation **Agricultural and Biological Chemistry**, **54(5)**:1219-1225, 1990.

SANCHO, F.; LAMBERT, Y.; DEMAIZEAU, G.; LARGETEAU, A.; BOUVIER, J.; NARBONNR, J. Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. **Journal of Food Engineering**, **39**(1999):247-253, 1999.

SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, **9**(4):152-158, 1998.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSE, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.

## **CAPÍTULO 4 – Avaliação da Vida de Prateleira do Suco de Laranja Pasteurizado através do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão.**

### **RESUMO**

A ocorrência de defeitos de qualidade (perdas sensoriais e nutricionais) em produtos alimentícios submetidos a processos de conservação que utilizam calor, e os anseios do consumidor por produtos saudáveis (minimamente processados), sugerem o estudo de outras alternativas a estes processos que evitem essas perdas e mantenham as características naturais do produto, os chamados processos não térmicos. Para suco de frutas, a tendência no gosto do consumidor é cada vez mais na direção de produtos recém extraídos com sabor fresco e aroma natural. Sob este aspecto, pode-se afirmar que o suco de laranja é um produto crítico devido aos danos decorrentes da pasteurização térmica tradicional. Dessa forma, o processamento a Alta Pressão de Homogeneização é uma alternativa potencial à pasteurização térmica tradicional, mais especificamente para alimentos líquidos. Este estudo foi realizado objetivando avaliar a estabilidade do suco de laranja pasteurizado sob pressão durante o período de armazenagem. Para efeito comparativo, foram produzidas amostras tratadas termicamente e congelada. Suco de laranja da variedade Pêra foi obtido através de uma extratora comercial, dividido em três lotes e processado. Um lote foi submetido ao processamento sob pressão, outro ao processo de pasteurização térmica, e o último foi congelado para que servisse de comparativo. No processamento sob pressão o produto foi bombeado através de uma válvula de homogeneização na pressão de processo com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. Após o processo, o produto foi imediatamente resfriado a 4°C com o uso de uma serpentina de aço inox em um banho de gelo. A pasteurização térmica foi realizada com o uso de uma unidade piloto de esterilização contínua, onde o produto recebe o tratamento térmico através de trocadores de calor tubulares (95°C/ 30s). O congelamento das amostras controle foi realizado em câmara fria à -20°C. A temperatura de entrada do produto foi mantida a 10°C e sólidos solúveis a 10,0°Brix. As amostras foram armazenadas sob refrigeração à 10°C e avaliadas semanalmente quanto a: Contagem de Bolores e Leveduras, Contagem Total, Atividade de PectinaMetilEsterase, quantidade do Ácido Ascórbico, Acidez, Brix, pH, Cor, Turbidez, e quanto à aceitação sensorial. Os

produtos foram analisados até 45 dias de armazenamento, sendo que as análises de pH, Brix, Acidez, Cor e as Contagens Microbiológicas apresentaram pouca variação durante o período de análise. Os resultados de Atividade de PectinaMetilEsterase e de Turbidez também foram relativamente constantes mas diferenciaram-se pelas diferenças entre as amostras, onde a amostra processada termicamente obteve melhores resultados. A quantidade do Ácido Ascórbico apresentou alterações durante o armazenamento nas duas amostras processadas, sendo que a amostra processada sob pressão iniciou uma redução antes da amostra processada termicamente, mas ao final do período possuía uma maior quantidade. Sensorialmente, a amostra congelada se diferenciou das outras claramente durante todo o período de análise, não existindo muitas diferenças entre as outras amostras na maioria dos casos. Com 45 dias de armazenagem, as três amostras apresentaram diferenças significativas somente com relação ao aroma.

**Palavras-chave:** alta pressão, homogeneização, suco de laranja, pasteurização, Vida de Prateleira, PectinaMetilEsterase, Ácido Ascórbico.

## SUMMARY

The occurrence of quality defects (sensory and nutritional damage) in foodstuffs submitted to traditional heat preservation processes, and the desire of the consumer for healthy products (minimally processed), suggests the need to study new alternatives to avoid these losses and preserve the natural characteristics. For fruit juices, the trend in consumer taste is towards freshly squeezed products with fresh taste and preserved natural flavor. Considering this point of view, orange juice is a critical product due to the nutritional and sensory damage that occurs when it is submitted to traditional thermal pasteurization. Thus, High Pressure Homogenization has been shown to be an alternative to the traditional thermal pasteurization, mainly for pumpable foods. The objective of this work was to evaluate the stability of pasteurized orange juice by high pressure homogenization during the storage period. For comparative purposes, a heat treated and a frozen sample were produced. Orange juice from the Pera variety was obtained using a commercial extractor, divided into three batches and processed. The first batch was submitted to processing under pressure, the second to thermal pasteurization, and the third was frozen. The pressurized product was pumped through a homogenizer valve using two synchronized overlapped intensifiers at a flow rate of approximately 270 mL/min. After processing, the product was immediately cooled to 4°C using a stainless steel coil in an ice bath. Thermal pasteurization was accomplished using of a continuous sterilization pilot unit, where the product receives the thermal treatment through tubular heat exchangers (95°C/30s). The freezing of the control samples was done in a freezing tunnel at -20°C. The samples were stored under refrigeration at 10°C and evaluated weekly for: Mold and Yeast plate count, Total plate count, PectinMethylEsterase Activity, residual Ascorbic Acid, Acidity, Brix, pH, Color, Cloud Stability, and a sensory evaluation. The products were analyzed for up to 45 days of storage. The values for pH, Brix, Acidity, Color and the Microbial Counts presented little variation during the analysis period. The results for PectinMethylEsterase Activity and Cloud Stability were also relatively constant but they differed among the samples, where the thermal processed sample obtained better results. The amount of ascorbic acid presented alterations during storage in the two samples processed, and the sample processed under pressure presented a reduction earlier than the

heat processed sample, but at the end of the period it showed a higher value. Concerning the sensory evaluation, the frozen sample showed a better acceptance during the entire period. At the end of the period (45 days) the three samples only presented significant differences with respect to aroma.

**Keywords:** high-pressure, homogenization, orange juice, PectinMethylEsterase, Shelf-life, pasteurization, Ascorbic Acid.

## 1. INTRODUÇÃO

Na maioria das vezes, os processos tradicionais de conservação de alimentos causam perdas nutricionais e organolépticas no produto, a exemplo do que ocorre no suco de laranja pasteurizado termicamente (escurecimento não enzimático, formação de off-flavours, redução do sabor fresco e do conteúdo vitamínico do suco).

Atualmente, essas conseqüências não são compartilhadas pelo consumidor que busca alimentos livres de aditivos, estáveis durante a vida de prateleira e que tenha sofrido o processo mais brando possível.

No que se refere a sucos de frutas, esse anseio do consumidor é traduzido como um produto recém extraído, com gosto fresco e integridade de sabor e vitaminas, o mais parecido possível com os sucos feitos em casa (Bingnon, 1997).

Desde os trabalhos de Hite em 1889, o tratamento a Alta Pressão é conhecido como técnica potencial de preservação pois causa a inativação de microrganismos e enzimas deixando moléculas pequenas como compostos voláteis que conferem sabor e a maioria das vitaminas intactas (Smelt, 1998).

Existem dois métodos para o processamento a alta pressão. O mais conhecido e estudado é o Método de Alta Pressão Hidrostática, onde o produto é processado dentro da embalagem final no interior de um vaso de pressão; o outro é o Método de Homogeneização de Alta Pressão que utiliza um homogeneizador de alta pressão, onde dois intensificadores impulsionam o produto através de uma válvula de homogeneização em pressões de até 320 MPa. A passagem pelo orifício dessa válvula ocorre a uma velocidade muito elevada, o que provoca a inativação de microrganismos e enzimas, mantendo intactos as células do alimento e de sabor; no final do processo o produto é resfriado em um trocador de calor (Mermenstein, 1999).

O suco de laranja é um candidato natural ao uso dessa tecnologia haja visto que a maioria desses produtos prontos para o consumo existentes do mercado apresentam perdas de qualidade com relação a sabor e ao conteúdo vitamínico. O mercado de suco de laranja

pronto para o consumo (pasteurizado e embalado em cartonados) apresentou um crescimento de 138% entre os anos de 1992 e 2001 (chegando a 55.712.000 L), e possui um potencial de aumento de vendas no mercado interno que pode ser alavancado por um produto com qualidades sensoriais muito próximas ao suco fresco recentemente extraído, que atualmente não está disponível no mercado (Datamark, 2003).

Este estudo visa avaliar a estabilidade do suco de laranja processado através do Método de Homogeneização a Ultra Alta Pressão durante seu armazenamento sob refrigeração, em comparação com o produto pasteurizado termicamente e um congelado.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria-prima**

Foram utilizadas laranjas (*Citrus sinensis*) da variedade Pêra, obtidas no mercado local (Campinas – S.P.) As frutas foram provenientes da cidade de Fernandópolis – SP, adquiridas no mês de Fevereiro de 2003 e com o parâmetro Ratio de 23,0.

### **2.2. Processamento a Alta Pressão**

Foi utilizado um homogeneizador contínuo modelo nG7400H:350 produzido por STANSTED Fluid Power LTD (UK).

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar entre água e produto. O processo era iniciado utilizando água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo (válvula de alimentação da água aberta e válvula de alimentação do produto fechada). Alcançado o regime, a válvula de alimentação era aberta iniciando a alimentação do produto (abertura da válvula de entrada do produto e fechamento da entrada de água).

O processo consiste em bombear o suco através de uma válvula de homogeneização com o uso de dois intensificadores de pressão sincronizados, a uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. Após a passagem pela válvula de homogeneização, o

produto passava por um trocador de calor, tendo sua temperatura reduzida a aproximadamente 30°C, seguindo para uma serpentina de aço inox em banho de gelo, o que resfriava o produto a aproximadamente 4°C, para finalmente seguir para o sistema de envase.

O sistema de envase era composto por uma válvula de três vias localizada dentro de uma câmara de fluxo laminar (esterilizada com o uso de uma lâmpada Ultravioleta). Desta forma era possível efetuar o processo continuamente com a válvula de três vias na posição de descarte ou de retirada de amostra de forma asséptica.

A limpeza de todo o sistema (alimentação, homogeneizador e envase) foi realizada pela eluição do produto com água. A sanificação do sistema foi feita utilizando etanol a 70% (v/v) sendo este bombeado através do sistema até que o mesmo fosse totalmente preenchido, permanecendo inundado por um período não menor que 24h.

As temperaturas do produto foram medidas na entrada (termômetro de vidro) e após a válvula de homogeneização, na entrada e na saída do trocador de calor com termopares tipo T acoplados a um aquisitor de dados (Barnat Company – 12 Channel Scanning Thermocouple Thermometer).

### **2.3. Processamento**

Inicialmente os frutos foram selecionados para eliminar unidades podres e danificadas e resíduos de grande tamanho (principalmente folhas e galhos), em seguida os frutos foram lavados com água clorada 20 ppm de cloro livre (0,02 mg de hipoclorito de sódio/L = 4 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 0,5%/L), secos e armazenados a 8°C.

O suco foi extraído em uma extratora Delijuicer modelo 731 Mi fabricada pela Intercitrus Agroindustrial LTDA (Araraquara, S.P.), sendo submetido a acabamento através de peneiras para reduzir o teor de polpa a aproximadamente 10,0% e para que fosse obtido um suco com partículas de tamanho reduzido de modo que fosse possível o processamento no homogeneizador de alta pressão. A menor abertura de peneira utilizada foi 0,297 mm (MESH 48).

Com o objetivo de avaliar comparativamente o processamento a Alta Pressão do suco de laranja, o lote de suco foi dividido em três, sendo um pasteurizado termicamente (95°C por 30 segundos), outro congelado (em câmara a -18°C) e o último processado sob pressão. As amostras processadas sobre pressão e pasteurizadas termicamente foram armazenadas durante o período de estudo a 10°C.

Para a realização desse estudo foram utilizadas como embalagens garrafas de vidro de 500 mL, com tampa metálica de rosca, as quais foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos.

O processo a alta pressão foi realizado à 300 MPa utilizando o homogeneizador contínuo modelo nG7400H:350 produzido por STANSTED Fluid Power LTD (UK). Este nível de pressão para o estudo foi escolhido com base nos estudos realizados anteriormente (capítulo 1, 2 e 3 desta dissertação), tendo em vista que o principal desafio tecnológico para o processo era a inativação da PectinaMetilEsterase, cujo melhor resultado obtido anteriormente foi nesse valor de pressão.

O processo térmico de pasteurização foi feito com a utilização de uma unidade piloto de esterilização modelo *UHT-HTST Lab-25-DH*, fabricado por *Microtermics, USA*. Nesta simulação do processo industrial de pasteurização de suco de laranja foi utilizado o binômio 95°C por 30 segundos, pois este tratamento é reconhecido industrialmente como mais adequado para esse produto.

A temperatura de entrada do produto foi mantida a 10°C e sólidos solúveis a 10,0°Brix.

#### **2.4. Análises Físico-Químicas e Enzimática**

- pH (A.O.A.C. n° 42.1.04 Official Method n° 981.12 (1997))
- Acidez Total Titulável (A.O.A.C. n° 37.1.37 Official Method n° 942.15 (1997))
- Sólidos Solúveis (A.O.A.C. n° 37.1.15 Official Method n° 932.12 (1997))

- Relação Sólidos Solúveis/ Acidez (relação direta entre os resultados para sólidos solúveis e Acidez Total Titulável)
- Ácido Ascórbico (A.O.A.C. n° 45.1.14 Official Method n° 967.21 (1997) modificado). A metodologia foi alterada pela substituição do volume da amostra de suco usada na diluição de 10 mL para 20 mL, e da alíquota da amostra de suco usada na análise de 5 mL para 20 mL.
- Turbidez (Cameron et alii, 1997).
- Cor (Foi utilizado o espectrofotômetro de cor modelo COLORQUEST II da HunterLab. Para o suco de laranja (reações de escurecimento), utilizou-se o sistema de cor HunterLab (Lab), o iluminante D<sub>65</sub>, um ângulo de observação de 10° e uma área de observação de uma polegada quadrada. A cubeta utilizada é de vidro opticamente limpo, sendo determinado nos testes preliminares de leitura de cor o caminho óptico de 2 cm)
- Atividade de Pectina Metil Esterase (PME) (Hagerman and Austin, 1986). O método consiste em preparar um extrato enzimático (2,4 mL da amostra com 7,2 mL de NaCl 2M), o qual é mantido em banho de gelo para manter inalterada a atividade enzimática residual. Separadamente, prepara-se uma solução contendo 2,0 mL de solução 0,5% de pectina cítrica, 0,15 mL de uma solução 0,01% de Azul de Bromotimol em tampão fosfato 0,003M pH 7,5, e 0,75 mL de água destilada. O pH de todas as soluções e também o do extrato enzimático deve ser ajustado para 7,5 com NaOH 0,1 e 0,01N. Adiciona-se 2,9 mL da solução à cubeta e esta é colocada dentro do espectrofotômetro, em seguida adiciona-se 0,3 mL do extrato enzimático e inicia-se a medição à 620 nm em intervalos de 10 segundos durante 2 minutos. A interpolação dos dados obtidos (cálculo da regressão linear entre tempo e absorbância) fornece uma reta de inclinação negativa, com a qual se calcula a atividade dessa enzima. Quanto maior essa inclinação (em valor modular), maior é a atividade da enzima, a qual é calculada da seguinte forma:
  - “m” é a inclinação da reta do gráfico Absorbância x Tempo (min);

- A alíquota de extrato enzimático utilizada (0,3 mL) contém 0,075 mL da amostra;
- Segundo Stauffer (1989), uma variação de 0,0328 na absorbância (a 620 nm) representa a produção de 0,1 µmol de ácido galacturônico;
- Segundo Segel (1979), uma unidade internacional da enzima é a quantidade que catalisa a formação de 1 µmol do produto da reação em condições definidas;
- Dessa forma:
 
$$PMEu = \frac{m}{0,328 \times 0,075} = m \times 40,6504$$

*PMEu = quantidade da enzima que catalisa a formação de 0,1 µmol de ácido galacturônico /  $m \times mL$  de suco*

Este método é capaz de detectar atividades de até 0,020 µmol de ácido galacturônico produzido por minuto (Hagerman & Austin, 1986).

## 2.5. Análises Microbiológicas

A contagem de Bolores e Leveduras foi realizada por plaqueamento em superfície utilizando o meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) acidificado com 0,1% de cloranfenicol; a contagem de Bactérias Totais foi realizada por plaqueamento em profundidade utilizando o meio PCA (*Plate Count Agar*). Em ambas as contagens foram utilizadas as metodologias para Contagem de Bolores e Leveduras e para Contagem de Bactérias Totais descritas por Vanderzant et al. (1992).

## 2.6. Análise Sensorial

Foram elaborados testes de preferência usando escalas estruturadas. Para verificar as diferenças entre os processos, as amostras foram avaliadas nos seguintes aspectos: modo geral, sabor, aroma, cor e intenção de compra. Somente a escala para intenção de compra apresentava valores variando de 1 a 5 (certamente não compraria até certamente compraria), as restantes seguem a escala de 1 a 9 (desgostei muitíssimo a gostei muitíssimo) (Stone et al., 1985).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já mencionado anteriormente, as amostras foram armazenadas a 10°C e analisadas a cada semana até completar 45 dias de estudo.

#### 3.1. Contagens Microbiológicas

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados da Contagem de Bolores e Leveduras e da Contagem Total nas amostras em estudo.

**Tabela 1:** Contagem de Bolores e Leveduras nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.

Tempo (dias)	Contagem por Amostra (UFC/mL)*		
	Alta Pressão	Trat. Térmico	Congelada
0	< 1	< 1	$3,80 \cdot 10^3$ **
7	< 1	< 1	$1,40 \cdot 10^3$
14	< 1	< 1	$1,08 \cdot 10^3$
21	< 1	< 1	$1,16 \cdot 10^3$
35	< 1	< 1	$1,59 \cdot 10^3$
45	< 1	< 1	$7,65 \cdot 10^2$

\*UFC = Unidades Formadoras de Colônias

\*\* Contagem inicial de todas as amostras

**Tabela 2:** Contagem Total nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.

Tempo (dias)	Contagem por Amostra (UFC/mL)*		
	Alta Pressão	Trat. Térmico	Congelada
0	< 1	< 1	$5,70 \cdot 10^5$ **
7	< 1	< 1	$1,15 \cdot 10^4$
14	< 1	< 1	$4,20 \cdot 10^3$
21	< 1	< 1	$2,95 \cdot 10^3$
35	< 1	< 1	$3,85 \cdot 10^3$
45	< 1	< 1	$4,95 \cdot 10^2$

\*UFC = Unidades Formadoras de Colônias

\*\* Contagem inicial de todas as amostras

Nas duas contagens, as amostras provenientes dos processos térmico e sob pressão não apresentaram contagem em nenhuma análise, sendo o resultado expresso de acordo com a metodologia (<1 UFC por mL de suco). Também nas duas contagens, a amostra congelada apresentou uma redução significativa na primeira semana, o que pode ser explicado pelo efeito do congelamento na destruição dos microrganismos. A contagem inicial de todas as amostras é igual à contagem no tempo zero da amostra congelada.

### 3.2. Análises Físico-Químicas

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados do monitoramento do pH, °Brix e Acidez, respectivamente, das amostras durante o armazenamento.

**Tabela 3:** *Variação do pH nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.*

<i>Tempo (dias)</i>	<i>pH</i>		
	<i>Alta Pressão</i>	<i>Trat. Térmico</i>	<i>Congelada</i>
0	4,24 ± 0,01	4,24 ± 0,02	4,23 ± 0,01
7	4,26 ± 0,01	4,27 ± 0,01	4,26 ± 0,01
14	4,16 ± 0,01	4,15 ± 0,01	4,25 ± 0,00
21	4,18 ± 0,02	4,23 ± 0,02	4,24 ± 0,01
35	4,18 ± 0,01	4,22 ± 0,01	4,25 ± 0,01
45	4,22 ± 0,01	4,20 ± 0,01	4,27 ± 0,01

**Tabela 4:** *Variação da Acidez Total Titulável nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.*

<i>Tempo (dias)</i>	<i>Acidez (g ácido cítrico anidro/100g)</i>		
	<i>Alta Pressão</i>	<i>Trat. Térmico</i>	<i>Congelada</i>
0	0,445 ± 0,001	0,444 ± 0,005	0,441 ± 0,002
7	0,465 ± 0,004	0,459 ± 0,005	0,464 ± 0,003
14	0,446 ± 0,005	0,449 ± 0,002	0,446 ± 0,004
21	0,446 ± 0,003	0,444 ± 0,003	0,430 ± 0,003
35	0,460 ± 0,002	0,455 ± 0,003	0,444 ± 0,004
45	0,458 ± 0,003	0,457 ± 0,002	0,437 ± 0,004

**Tabela 5: Variação do °Brix nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem..**

<i>Tempo (dias)</i>	<i>°Brix (20°C)</i>		
	<i>Alta Pressão</i>	<i>Trat. Térmico</i>	<i>Congelada</i>
0	10,23 ± 0,06	10,10 ± 0,10	10,17 ± 0,06
7	10,74 ± 0,29	10,79 ± 0,13	10,71 ± 0,17
14	11,07 ± 0,06	10,64 ± 0,00	10,61 ± 0,06
21	10,68 ± 0,00	10,68 ± 0,00	10,24 ± 0,06
35	10,67 ± 0,06	10,60 ± 0,10	10,37 ± 0,06
45	10,62 ± 0,12	10,55 ± 0,06	10,52 ± 0,06

Os resultados apresentados para pH, Acidez e °Brix são praticamente constantes ao longo do tempo em cada processo nas análises citadas. Essa ausência de variações ao longo do período de estudo fornece indícios de que não ocorreram reações químicas ou crescimento microbiano que levassem a alterações relevantes nos produtos analisados. A partir dos dados das Tabelas 4 e 5 é possível calcular o parâmetro “Ratio” que avalia a maturação da fruta através da estimativa da quantidade de açúcar formado em relação à quantidade de ácido existente; a Tabela 6 apresenta esse resultado:

**Tabela 6: Variação da Relação Brix/Acidez nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.**

<i>Tempo (dias)</i>	<i>Ratio (Brix/ Acidez)</i>		
	<i>Alta Pressão</i>	<i>Trat. Térmico</i>	<i>Congelada</i>
0	23,00	22,75	23,07
7	23,10	23,53	23,08
14	24,83	23,68	23,78
21	23,96	24,06	23,80
35	23,20	23,32	23,34
45	23,19	23,10	24,09

É possível observar que as amostras apresentaram altos valores para o Ratio. Esses valores mais altos são explicados pelo fato das laranjas utilizadas serem de fim de safra, sendo esse fenômeno esperado nesse período, e pela origem desses frutos (Região de São José do Rio Preto), cujo clima favorece a ocorrência desse fenômeno no final de safra.

### 3.3. Cor

Durante o período de armazenagem também foi medida a cor das amostras de suco, cujos resultados são apresentados na Tabela 7:

**Tabela 7: Variação dos parâmetros de Cor nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.**

<i>Tempo (dias)</i>	<i>Cor</i>								
	<i>Alta Pressão</i>			<i>Tratamento Térmico</i>			<i>Congelada</i>		
	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
0	43,29	-2,42	13,89	42,87	-1,09	14,49	39,64	-1,04	12,77
7	42,55	-2,39	13,40	41,79	-1,09	13,92	38,73	-0,84	12,55
14	42,59	-2,39	13,68	41,95	-1,12	14,05	38,63	-0,92	13,68
21	42,77	-2,49	13,59	43,79	-0,88	15,38	38,71	-1,04	12,43
35	42,31	-2,39	13,44	42,65	-1,10	14,49	38,90	-0,92	12,67
45	41,88	-2,34	12,82	42,25	-1,24	13,92	39,23	-1,00	12,82

*Desvio Padrão: ±0,01*

Os parâmetros de cor avaliados também apresentaram baixa variação durante o tempo de monitoramento. É possível verificar diferenças entre as amostras, que são mais facilmente mensuradas através do cálculo das diferenças de cor Total e no Cromo, entre as amostras processadas e a amostra sem processo no tempo zero, listadas na Tabela 8:

**Tabela 8: Diferenças de Cor nas amostras dos diferentes processos durante a estocagem.**

Tempo (dias)	Diferenças de Cor			
	Alta Pressão		Tratamento Térmico	
	Total	Croma	Total	Croma
0	4,06	1,78	3,66	1,72
7	4,21	1,77	3,37	1,40
14	4,22	1,47	3,35	0,42
21	4,46	1,86	5,88	2,95
35	3,79	1,66	4,17	1,83
45	2,97	1,34	3,23	1,12

$$Total = \sqrt{(a_{processado} - a_{congelado\ tempo\ 0})^2 + (b_{processado} - b_{congelado\ tempo\ 0})^2 + (L_{processado} - L_{congelado\ tempo\ 0})^2}$$

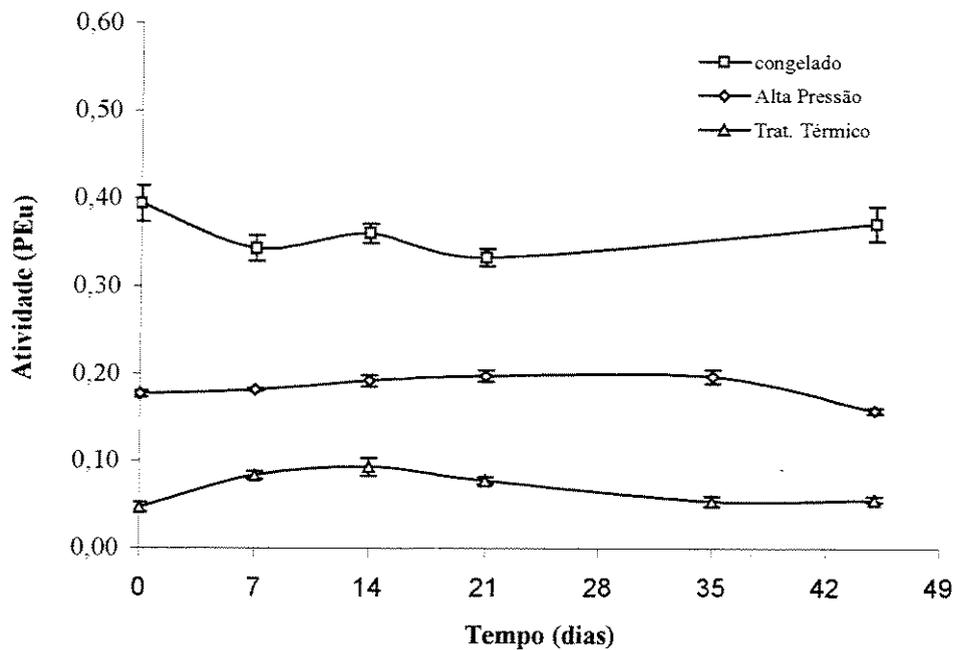
$$Croma = \sqrt{(a_{processado} - a_{congelado\ tempo\ 0})^2 + (b_{processado} - b_{congelado\ tempo\ 0})^2}$$

De acordo com a Tabela 8, a amostra processada sob pressão apresenta uma maior diferença de cor com relação àquela tratada termicamente quando comparadas com a amostra não processada no tempo zero.

### 3.4. Atividade de PectinaMetilEsterase

A Figura 1 apresenta os resultados da análise da Atividade de PectinaMetilEsterase durante o período em análise:

### Atividade de PectinaMetilEsterase

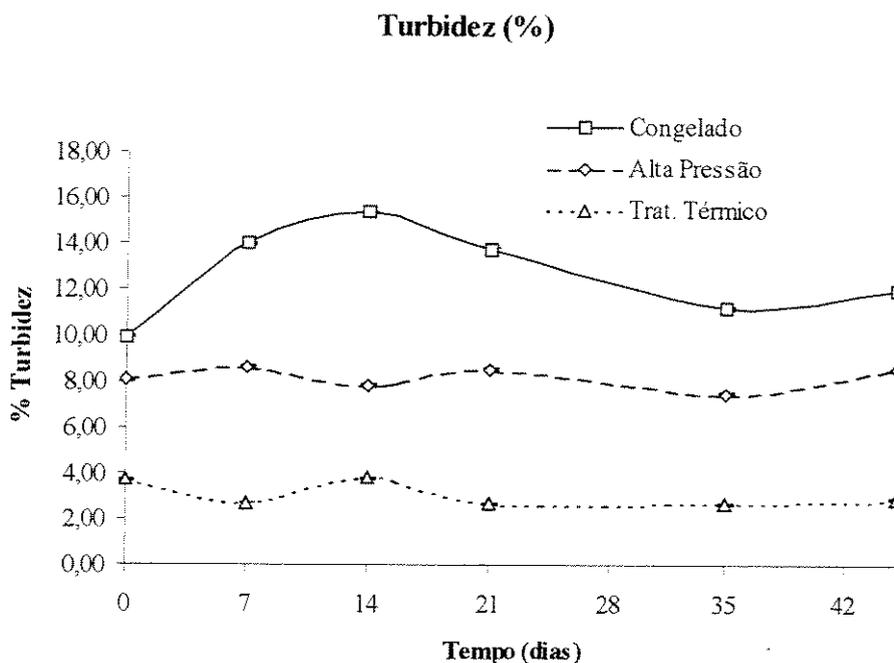


**Figura 1:** Acompanhamento da Atividade de PectinaMetilEsterase das três amostras durante a vida de prateleira

Nota-se claramente a maior inativação da enzima no processo de tratamento térmico, o que teoricamente seria decisivo na determinação da vida de prateleira do produto. O suco processado sob pressão apresentou uma inativação de aproximadamente 57% e o que sofreu o tratamento térmico aproximadamente 88%. Durante o período de análise as variações não foram muito grandes. A atividade enzimática da amostra congelada no “tempo zero” é a atividade das amostras antes do processamento.

### 3.5. Turbidez

A medida da turbidez é largamente utilizada como parâmetro de qualidade para bebidas cítricas, onde sua manutenção é almejada. Quanto maior seu valor, maior é a quantidade de luz que passa através da amostra, e mais degradada a amostra está. A Figura 2 apresenta o monitoramento no período estudado:

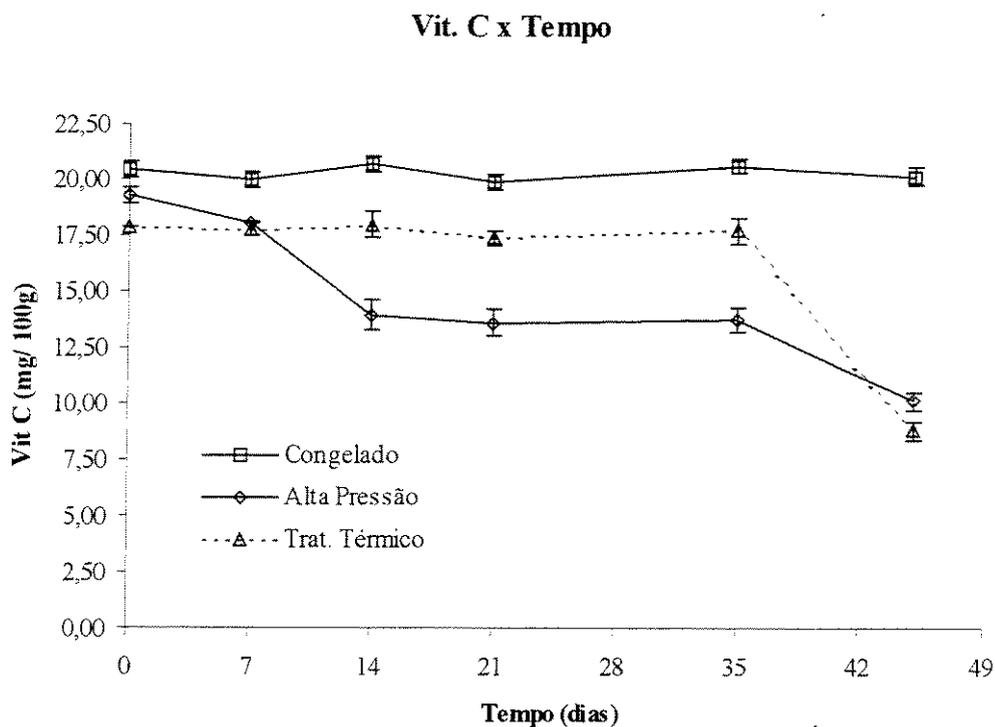


**Figura 2:** *Monitoramento da Turbidez das três amostras durante a vida de prateleira*

A amostra mais estável, com relação à turbidez, foi a submetida a tratamento térmico, ou seja é a amostra que possui maior quantidade de substância em suspensão, ou não degradada. É usual estabelecer uma relação entre a atividade da PectinaMtilEsterase e a Turbidez, quanto maior a inativação da enzima, menor será a passagem de luz (menor a Turbidez). Os resultados são condizentes com aqueles da atividade da PectinaMtilEsterase, uma vez que era esperado que uma menor quantidade de enzima causasse uma menor degradação no produto

### 3.6. Ácido Ascórbico

A estabilidade do Ácido Ascórbico durante o período de estocagem está ilustrada através da Figura 4:



**Figura 3:** Acompanhamento das perdas no teor de Ácido Ascórbico das três amostras durante a vida de prateleira

É interessante observar uma maior redução do teor de Ácido Ascórbico na amostra sob pressão, no início das análises, e a redução na amostra tratada termicamente ao final do período de análise. Ao final do período as amostras tratada sob pressão e processada termicamente apresentaram praticamente a mesma quantidade de ácido ascórbico. Esses resultados vão contra aos obtidos com o processo hidrostático uma vez que o processo a 500 MPa por 10 min a 20°C reteve 99,6% da vitamina (Ogawa et al., 1992). A perda ocorrida no processo de homogeneização pode ser explicada pelo efeito do aquecimento do produto após a passagem pela válvula de homogeneização até o resfriamento no trocador de calor, e por uma possível incorporação de ar durante a passagem do produto pela válvula de homogeneização.

### 3.7. Análise Sensorial

Durante todo o período de análise, as amostras dos diferentes tratamentos foram avaliadas sensorialmente através de um teste de preferência, cujos resultados estão apresentados na Tabela 9:

**Tabela 9: Resultados do Teste de Preferência utilizado na Análise Sensorial dos produtos dos diferentes processos durante o período de armazenamento**

Atributo	0 dias			7 dias		
	Alta Pressão	Tratamento Térmico	Congelada	Alta Pressão	Tratamento Térmico	Congelada
Modo Geral	6,4 <sup>a</sup>	6,5 <sup>ab</sup>	7,1 <sup>b</sup>	5,9 <sup>a</sup>	6,1 <sup>ab</sup>	6,7 <sup>b</sup>
Sabor	5,9 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	7,0 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	5,1 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>
Aroma	7,0 <sup>b</sup>	6,3 <sup>a</sup>	7,0 <sup>b</sup>	6,1 <sup>ac</sup>	5,8 <sup>a</sup>	6,6 <sup>bc</sup>
Intenção de compra	3,2 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>	4,0 <sup>b</sup>	2,6 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup>	3,3 <sup>b</sup>
Atributo	14 dias			21 dias		
	Alta Pressão	Tratamento Térmico	Congelada	Alta Pressão	Tratamento Térmico	Congelada
Modo Geral	5,8 <sup>ba</sup>	6,4 <sup>ba</sup>	6,5 <sup>ab</sup>	5,7 <sup>b</sup>	6,1 <sup>ab</sup>	6,6 <sup>a</sup>
Sabor	5,4 <sup>ba</sup>	5,8 <sup>ba</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	5,5 <sup>ba</sup>	5,9 <sup>ab</sup>	6,4 <sup>ab</sup>
Aroma	6,7 <sup>ba</sup>	6,7 <sup>ba</sup>	7,0 <sup>ab</sup>	5,6 <sup>c</sup>	6,2 <sup>ac</sup>	7,3 <sup>b</sup>
Intenção de compra	2,9 <sup>ba</sup>	3,2 <sup>ba</sup>	3,6 <sup>ab</sup>	2,8 <sup>b</sup>	3,2 <sup>ab</sup>	3,6 <sup>a</sup>
Atributo	35 dias			45 dias		
	Alta Pressão	Tratamento Térmico	Congelada	Alta Pressão	Tratamento Térmico	Congelada
Modo Geral	5,7 <sup>a</sup>	5,8 <sup>b</sup>	6,6 <sup>b</sup>	6,2 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>
Sabor	4,9 <sup>ac</sup>	5,7 <sup>bc</sup>	6,4 <sup>b</sup>	5,6 <sup>a</sup>	6,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>
Aroma	5,8 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>	7,0 <sup>b</sup>	6,2 <sup>ac</sup>	6,1 <sup>a</sup>	6,9 <sup>bc</sup>
Intenção de compra	2,6 <sup>ac</sup>	2,8 <sup>bc</sup>	3,4 <sup>b</sup>	3,2 <sup>a</sup>	2,9 <sup>a</sup>	3,1 <sup>a</sup>
Cor	na	na	na	7,1 <sup>a</sup>	7,4 <sup>a</sup>	7,7 <sup>a</sup>

Obs.: Os números apresentados são as notas médias dos provadores.

Índices com letras iguais em amostras diferentes no mesmo atributo significa que as amostras não apresentaram diferença significativa no nível de significância estudado ( $p < 0,05$ )

na: não avaliado

A amostra congelada apresentou o melhor resultado sensorial entre as amostras testadas, sendo a mais aceita e diferenciada na maioria dos testes. De forma geral as

amostras dos dois processamentos apresentaram um comportamento de aceitação semelhante com notas acima do valor médio das respostas (nem gostei/ nem desgostei e talvez comprasse/ talvez não comprasse), e próximas entre si, apesar de estatisticamente diferentes. É importante ressaltar que ao final do período de análise, somente no atributo Aroma existiu diferença significativa entre as amostras. Também é possível destacar que na análise de cor realizada ao final do período não foi detectada diferença significativa entre as amostras, apesar da análise instrumental de cor verificar essa diferença.

#### 4. CONCLUSÕES

Conforme o observado através dos resultados verificou-se que as amostras não apresentaram variações significativas quanto às análises realizadas durante o período de estudo. A exceção foi a análise de Ácido Ascórbico, onde os produtos processados apresentaram reduções marcantes. A análise sensorial do produto apresentou resultados satisfatórios uma vez que as diferenças entre os produtos processados não são marcantes.

É possível afirmar que o processamento de Homogeneização a Alta Pressão conferiu uma estabilidade ao suco de laranja durante os 45 dias em que suas características de qualidade e segurança foram analisadas. Tais resultados legitimam sua proposta como método de pasteurização para o suco de laranja.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, contou com apoio da UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas e da Intercitrus Agroindustrial Ltda.

#### 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 16.ed. Gaithersburg , 1997.

BIGNON, J. Cold Pasteurizers Hiperbar for the Stabilization of Fresh Fruit Juices. **Fruit Processing**, 6(2):46-48,1997.

CAMERON, R.; BAKER, R.A. and GROHMANN, K. Citrus tissue extracts affect juice cloud stability **Journal of Food Science** 62 (2): 203-207, 1997.

DATAMARK Mercado de suco pronto para o consumo. Disponível em: <<http://www.datamark.com>>. Acesso em: 08 abr. 2003

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

MERMELSTEIN, N.H. (ed.) High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 4, p. 86-90, Apr, 1999.

SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, 9(4):152-158, 1998.

STONE, S. M.; SIDEL, J. **Sensory Evaluation Practices**. London: Academy Press, 1985. 311p.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSE, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.



## CONCLUSÃO GERAL

Os microrganismos *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* mostraram grande sensibilidade ao tratamento de homogeneização a ultra alta pressão, uma vez que foram obtidas taxas de destruição superiores a 5 ciclos logarítmicos a uma pressão de 250 MPa para os dois microrganismos. Comparativamente, pôde-se observar uma maior sensibilidade do *Saccharomyces cerevisiae* ao tratamento a ultra alta pressão de homogeneização, pois nos tratamentos até 200 MPa o microrganismo apresentou taxas de destruição superiores às do *Lactobacillus plantarum*.

Dessa forma o processo de homogeneização a ultra alta pressão torna-se interessante para a pasteurização de suco de laranja, tipo de processo no qual é esperada uma redução mínima de 4 ciclos logarítmicos dos contaminantes usuais, tendo em vista a resistência ao tratamento proposto de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismos normalmente associados à contaminação microbiológica de sucos ácidos.

A enzima PectinaMetilEsterase apresentou sensibilidade ao processo de homogeneização a ultra alta pressão, visto que foram obtidas taxas de inativação de 67% e 68% nos valores de pH 4,1 e 3,6, respectivamente. Também foi observada uma influência do pH na inativação nos processos a pressões de 150 MPa a 250 MPa.

É muito provável que a inativação da PectinaMetilEsterase aumente com o uso de pressões de processo acima de 300 MPa, chegando a valores mais próximos daqueles obtidos nos processos térmicos de pasteurização (aproximadamente 99%), o que não nos foi possível verificar devido às limitações do equipamento.

A influência do pH e da Pressão sobre todas as variáveis pôde ser avaliada e foi possível definir modelos estatisticamente válidos e preditivos, além de obter-se superfícies de resposta para todas as variáveis dependentes.

Os resultados obtidos indicaram que não foi possível delimitar uma condição ótima para o processo, pois os mesmos apontam para possíveis melhoras dos parâmetros analisados com o aumento da pressão de processo. Sendo assim, a condição de processo mais adequada é a que utiliza a maior pressão, neste estudo o limite de uso do equipamento,

300 MPa, que pode ser favorecida com o processamento de sucos de baixos valores de pH. Não é sugerida uma condição ótima de processo para o pH, pois o processamento em estudo visa a utilização de suco de laranja natural, sem ajustes de pH, o qual sofre variações decorrentes de safra, clima e outras.

Segundo os resultados observados durante o estudo da vida de prateleira do produto processado a ultra alta pressão verificou-se que as amostras não apresentaram variações significativas quanto às análises realizadas durante o período de estudo. A exceção foi a análise do Ácido Ascórbico, onde os produtos processados apresentaram reduções marcantes. A análise sensorial do produto apresentou resultados satisfatórios uma vez que as diferenças entre os produtos processados não são marcantes.

É possível afirmar que o processamento de Homogeneização a Ultra Alta Pressão conferiu estabilidade ao suco de laranja durante os 45 dias com relação às suas características de qualidade estudadas e estabilidade microbiológica (presença de organismos deteriorantes) foram analisadas. Tais resultados legitimam sua proposta como método de pasteurização para o suco de laranja.

Segundo as constatações expostas, pode-se afirmar que o Processamento de Homogeneização a Alta Pressão para o Suco de Laranja é uma tecnologia eficiente como método de conservação e com alto potencial de aplicação comercial.

# ANEXOS



# ANEXO 1: FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 03

Você está recebendo três amostras codificadas de SUCO DE LARANJA. Por favor avalie cada amostra quanto às características mencionadas utilizando a escala abaixo.

- 9 – Gostei Extremamente
- 8 – Gostei Muito
- 7 – Gostei Moderadamente
- 6 – Gostei Ligeiramente
- 5 – Nem gostei/ nem desgostei
- 4 – Desgostei Ligeiramente
- 3 – Desgostei Moderadamente
- 2 – Desgostei Muito
- 1 – Desgostei Extremamente

Por favor, avalie o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra **DE MODO GERAL**

AMOSTRA	RESPOSTA
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Por favor, avalie o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra com relação à **COR**

AMOSTRA	RESPOSTA
_____	_____
_____	_____
_____	_____

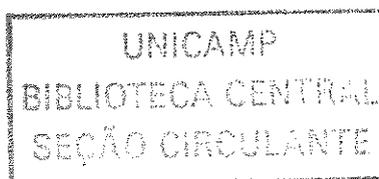
Por favor, avalie o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra com relação ao **AROMA**

AMOSTRA	RESPOSTA
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Por favor, avalie o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra com relação ao **SABOR**

AMOSTRA	RESPOSTA
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Continua no verso



Por favor, agora comente o que você **MAIS GOSTOU** e **MENOS GOSTOU** em cada amostra.

AMOSTRA	MAIS GOSTOU
_____	_____
_____	_____
_____	_____

AMOSTRA	MENOS GOSTOU
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Com base na sua opinião sobre cada amostra, indique, utilizando a escala abaixo, sua atitude caso você encontrasse cada uma à venda. **Se eu encontrasse este SUCO DE LARANJA à venda, eu:**

- 5 – Certamente compraria
- 4 – Possivelmente compraria
- 3 – Talvez comprasse/ Talvez não comprasse
- 2 – Possivelmente não compraria
- 1 – Certamente não compraria

AMOSTRA	RESPOSTA
_____	_____
_____	_____
_____	_____

**Obrigado pela sua colaboração!**



