

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRESERVAÇÃO DE POLPA DE GOIABA POR MÉTODOS COMBINADOS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por RENATA TORREZAN e aprovada pela Comissão Julgadora em 26.12.96. Campinas, 26 de dezembro de 1996

Renata Torrezan
Eng^a de Alimentos

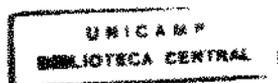
Prof.  **Dr. JOSÉ GILBERTO JARDINE**
Presidente da Banca

PROF. Dr. José Gilberto Jardine
Orientador

Prof. Dr. Alfredo de Almeida Vitali
Co-Orientador

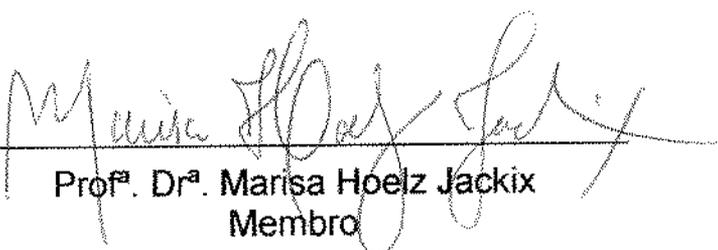
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de MESTRE em Tecnologia de Alimentos.

Campinas, SP.
1996



BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Gilberto Jardine
Orientador


Prof.ª Dr.ª Marisa Hoelz Jackix
Membro


Prof. Dr. Mauro de Freitas Leitão
Membro


Prof.ª Dr.ª Hilary Castle de Menezes
Membro

" Falou Daniel, e disse: Seja bendito o nome de Deus para todo o sempre, porque dele é a sabedoria e a força. E ele muda os tempos e as horas; ele remove os reis e estabelece os reis; ele dá sabedoria aos sábios e ciência aos entendidos. Ele revela o profundo e o escondido; conhece o que está em trevas, e com ele mora a luz."

Daniel 2:20-22

Dedico:

A Deus, digno de honra e glória, Deus soberano sobre todas as coisas, força minha e amigo de todos os momentos.

Aos meus amados pais Décio (em memória) e Antonieta, por terem me ensinado a amar a verdade, a honestidade e o trabalho.

Aos meus queridos mestres Dr. Alfredo e Dra. Mirtha com carinho e profunda gratidão.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e aos seus centros de pesquisa CTAA (Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos) e CNPTIA (Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura) agradeço todo o suporte financeiro, facilidades concedidas e apoio para a realização deste trabalho.

Ao ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos) pela viabilização deste trabalho e por todo o suporte concedido.

À Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" pela concessão de suporte técnico na área de Micologia e doação de cepa de levedura.

Ao Dr. José Gilberto Jardine pela orientação, suporte, estímulo e amizade durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Alfredo de Almeida Vitali pelo valioso acompanhamento diário, orientação constante e segura, inspiração e viabilização deste trabalho.

À Dra. Mirtha N. Uboldi Eiroa pela enriquecedora orientação, carinho, estímulo constante e por todo o desprendimento e disposição em ajudar-me em todos os momentos.

Ao Dr. Ludwig Pfenning pela valiosa cooperação técnica e pronta disposição em compartilhar o seu conhecimento na identificação dos bolores isolados neste trabalho.

Aos pesquisadores do ITAL, Dra. Neura Bragagnolo, Dra. Vera Pupo Ferreira, Dra. Emília E. Miya Mori, Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho, Dra. Neusely da Silva, Dra. Margarida K. Barbieri e Dr. Rodrigo Teixeira Neto que tão prontamente contribuíram de maneira enriquecedora para o êxito deste trabalho.

À Prof. Dra. Heloísa Mascia Cecchi, do Laboratório de Análises de Alimentos da FEA, que gentilmente forneceu todo o suporte técnico e material necessários para a realização das análises do residual de sorbato.

Às empresas Cia. Industrial de Conservas Alimentícias - CICA pela doação das amostras de polpa de goiaba e De Marchi Indústria e Comércio de Frutas Ltda pelas facilidades concedidas.

À Dedini S/A Agro Indústria, Companhia União dos Refinadores e Refinações de Milho, Brasil Ltda pelas amostras fornecidas.

A todos que valiosamente colaboraram durante a realização dos experimentos: Encarnação, Luciara, Adelaíde, Lizandra, Karla e Sandro.

Aos técnicos Giovani, Enieluce e Adriana (ITAL), Regina Furlani (UNICAMP) e Ana Paula (Fundação Tropical) pela preciosa colaboração na realização de algumas análises específicas.

Aos queridos amigos do ITAL e estagiários, principalmente dos laboratórios de Microbiologia e Lafise e dos centros Fruthotec e de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada que tão hospitaleiramente me receberam e por toda a amizade, paciência e colaboração.

Às minhas amadas irmãs Denise, Bernadete e Fernanda, cunhados Vergílio e Davi e sobrinhos Virgínia, Jônatas, Tiago e Daniel agradeço imensamente todo o amor, orações, interesse, compreensão e estímulo.

Aos meus queridos e inumeráveis amigos de fé, CTAA e UNICAMP, imprescindíveis na minha vida, agradeço todas as orações, amizade, força e carinho.

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

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

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMO	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. GOIABA E DERIVADOS	3
2.2. TEORIA DOS OBSTÁCULOS OU MÉTODOS COMBINADOS	13
2.2.1. Histórico	18
2.2.2. Influência na América Latina e no Brasil	19
2.2.3. Obstáculos utilizados	22
2.2.4. Efeito dos obstáculos	23
2.2.5. Benefícios e limitações do uso de métodos combinados	26
2.2.6. Exemplos de utilização	28
2.3. ATIVIDADE DE ÁGUA (Aa)	31
2.3.1. Conceito de Aa	31
2.3.2. Estimativa teórica da Aa em alimentos	32
2.3.3. Aa e as reações químicas e enzimáticas	34
2.3.4. Aa e a estabilidade microbiológica	36
2.3.5. Depressores de Aa	43

2.4. ACIDEZ E POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH).....	46
2.5. CONSERVADORES.....	51
2.5.1. Ácido sórbico e seus sais.....	56
2.6. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.....	59
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.1. MATERIAL.....	62
3.1.1. Matéria-prima.....	62
3.1.2. Outros materiais.....	62
3.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	63
3.2.1. Isolamento e identificação dos microrganismos inoculados.....	63
3.2.2. Ensaio com polpa de goiaba.....	68
a) Ensaio Preliminares.....	68
b) Ensaio Definitivos.....	68
3.2.3. Preparo do inóculo, formulação das amostras e inoculação dos microrganismos.....	75
3.2.4. Determinações.....	77
a) Acidez total e curvas de acidez.....	78
b) Atividade de água (Aa) teórica, experimental e curvas de calibração do higrômetro.....	78
c) Sólidos Solúveis (°Brix).....	79
d) pH.....	79

e) Umidade.....	79
f) Açúcares redutores e totais	79
g) Cinzas	79
h) Proteína bruta	80
i) Lipídios totais	80
j) Pectina	80
k) Fibra	80
l) Vitamina C.....	80
m) Residual de sorbato de potássio.....	80
n) Cor	82
o) Sensorial	83
p) Microbiológica	84
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.1. POLPA DE GOIABA - CARACTERIZAÇÃO.....	85
4.2. SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DETERIORANTE.....	86
4.3. ENSAIOS PRELIMINARES.....	93
4.3.1. Efeito da adição de ácidos no pH e acidez da polpa de goiaba.....	93
4.3.2. Efeito da adição do ácido cítrico no teor de sólidos solúveis (°Brix) e na Aa da polpa de goiaba.....	95
4.3.3. Efeito da adição de solutos na Aa (teórica e experimental) da polpa de goiaba.....	96

4.4. ENSAIOS DEFINITIVOS	100
4.4.1. Experimentos I, II e III.....	100
4.4.2. Experimento IV.....	108
4.4.3. Experimento V.....	112
4.4.4. Análise dos delineamentos pela metodologia de superfície de resposta e modelamento matemático	116
4.5. ANÁLISES FINAIS DAS AMOSTRAS ESTÁVEIS DO EXPERIMENTOS IV e V	122
4.5.1. Residual de sorbato.....	122
4.5.2. Análise de vitamina C.....	124
4.5.3. Análise de cor.....	125
4.5.4. Análise de açúcares redutores e totais.....	130
4.5.5. Avaliação sensorial.....	131
5. CONCLUSÕES	133
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	137
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
APÊNDICE A	159
APÊNDICE B	188
APÊNDICE C	200
APÊNDICE D	204
APÊNDICE E	208

ÍNDICE DE TABELAS

Página

TABELA 2.1 - Algumas limitações dos métodos combinados tradicionais de preservação dos alimentos baseados em um tipo de obstáculo.....	15
TABELA 2.2 - Valores de Aa em alguns alimentos de umidade intermediária tradicionais	17
TABELA 2.3 - Principais fatores utilizados na Iberoamérica para a conservação dos alimentos tradicionais pela tecnologia dos métodos combinados, por categoria de produtos	21
TABELA 2.4 - Alguns estudos recentes realizados com aplicação de métodos combinados para produtos alimentícios.....	29
TABELA 2.5 - Valores da constante de interação (k) para açúcares e polióis.....	33
TABELA 2.6 - Valores mínimos de Aa para o desenvolvimento de alguns microrganismos patogênicos (nas condições ideais de pH e temperatura)	38
TABELA 2.7 - Aa mínima para a multiplicação de microrganismos associados com alimentos.....	39
TABELA 2.8 - Influência do pH no grau de dissociação dos conservadores	48
TABELA 2.9 - Valores limites de pH para o desenvolvimento de microrganismos em meios de laboratório ajustados com ácidos fortes ou álcalis	49
TABELA 2.10 - Espectro de atividade antimicrobiana de alguns ácidos orgânicos utilizados em alimentos.....	54
TABELA 2.11 - Concentração mínima de conservadores capaz de prevenir o crescimento anaeróbico de leveduras, pH=3,5, 25°C, dentro de 1000 horas.....	54

TABELA 2.12 - Concentração máxima de sorbato de potássio (ppm) que permite o crescimento de alguns bolores à 25 e 4 °C	58
TABELA 3.1 - Valores das variáveis em código e em suas unidades originais dos experimentos delineados pela metodologia de superfície de resposta	70
TABELA 3.2 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do primeiro delineamento experimental (Experimento I).....	71
TABELA 3.3 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do segundo delineamento experimental (Experimento II).....	72
TABELA 3.4 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do terceiro delineamento experimental (Experimento III).....	73
TABELA 3.5 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do quarto delineamento experimental (Experimento IV)	74
TABELA 3.6 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do quinto delineamento experimental (Experimento V)	75
TABELA 4.1 - Caracterização físico química da polpa de goiaba utilizada nos experimentos.....	85
TABELA 4.2 - Número de cepas de bactérias lácticas, bolores e leveduras isoladas do ambiente industrial (ar) em diferentes meios de cultura	87
TABELA 4.3 - Número de cepas de bactérias lácticas, bolores e leveduras isoladas do ambiente industrial (superfícies dos equipamentos, mesas e balde) em diferentes meios de cultura	87
TABELA 4.4 - Número de cepas de bactérias lácticas, bolores e leveduras isoladas das amostras de frutas (polpa de maracujá, morango congelado, morango natural, morango e sementes de morango congeladas e morango congelado adicionado de açúcar) em diferentes meios de cultura	88
TABELA 4.5 - Bactérias lácticas isoladas do ambiente industrial e de frutas	89

TABELA 4.6 - Leveduras isoladas do ambiente industrial e de frutas e seus produtos .	90
TABELA 4.7 - Bolores isolados do ambiente industrial e de frutas e seus produtos	91
TABELA 4.8 - Contagem de bolores, leveduras e bactérias lácticas em frutas e seus produtos	93
TABELA 4.9 - Variação de sólidos solúveis (°Brix) e Aa em relação a adição de ácido cítrico.....	96
TABELA 4.10 - Equações obtidas nos delineamentos experimentais que utilizavam a metodologia de superfície de resposta para estimativa do tempo de preservação (t) e os respectivos valores do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente de variação (C.V.).....	119
TABELA 4.11 - Análise de residual de sorbato nos tratamentos estáveis de polpa de goiaba dos Experimentos IV e V.....	123
TABELA 4.12 - Resultados da análise de vitamina C nos tratamentos estáveis dos Experimentos IV e V.....	125
TABELA 4.13 - Soma das ordenações visuais da luminosidade com a aplicação do Teste de Friedman (Tabela de Newell e MacFarlane) das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.....	128
TABELA 4.14 - Soma das ordenações visuais do vermelho com a aplicação do Teste de Friedman (Tabela de Newell e MacFarlane) das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.....	129
TABELA 4.15 - Soma das ordenações visuais do amarelo com a aplicação do Teste de Friedman (Tabela de Newell e MacFarlane) das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.....	129
TABELA 4. 16 - Coeficientes de correlação linear e múltipla entre os dados das medições objetivas e subjetivas da cor das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V	130

TABELA 4.17 - Análise de açúcares totais e redutores nas amostras estáveis de polpa de goiaba dos Experimentos IV e V.....	131
TABELA 4.18 - Resultados da avaliação sensorial de alguns tratamentos de polpa de goiaba com relação ao sabor de sorbato de potássio, utilizando o Método do Duo-Trio.....	132
TABELA A.1 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento I.....	161
TABELA A.2 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento I.....	163
TABELA A.3 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento II.....	165
TABELA A.4 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento II.....	167
TABELA A.5 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento III.....	169
TABELA A.6 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento III.....	173
TABELA A.7 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento IV.....	176
TABELA A.8 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento IV.....	179
TABELA A.9 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento V.....	181
TABELA A.10 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento V.....	185
TABELA B.1 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 19/01/95.....	190
TABELA B.2 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 19/07/95.....	191
TABELA B.3 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 02/10/95.....	193
TABELA B.4 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 29/12/95.....	194

TABELA B.5 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 17/01/96	196
TABELA B.6 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 13/05/96	197
TABELA B.7 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 04/07/96	199

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 2.1 - Fluxograma do processamento de polpa de goiaba concentrada pelo processo de enchimento à quente	8
FIGURA 2.2 - Custo de produção de polpa de goiaba para unidade industrial com capacidade de 1 tonelada de goiaba/hora, Brasil	10
FIGURA 2.3 - Influência dos constituintes básicos de uma geléia na sua consistência.	12
FIGURA 2.4 - Comparação de preços de dois fornecedores de alguns solutos em agosto de 1996	13
FIGURA 2.5 - Ilustração do efeito dos obstáculos usando oito exemplos.	25
FIGURA 2.6 - Velocidade relativa de reações e de crescimento de microrganismos em função da atividade de água.....	35
FIGURA 2.7 - Duas interpretações das interações de água-soluto	36
FIGURA 2.8 - Concentração de alguns depressores necessária para abaixar a Aa à 25°C	45
FIGURA 2.9 - Diagrama esquemático da influência combinada do pH e Aa no crescimento microbiano	51
FIGURA 2.10 - Planejamento em estrela para duas variáveis.....	61
FIGURA 4.1 - Efeito da adição de ácidos no pH da polpa de goiaba.....	94
FIGURA 4.2 - Efeito da adição de ácidos na acidez da polpa de goiaba	95
FIGURA 4.3 - Efeito da adição de sacarose na Aa teórica, experimental e calculada da polpa de goiaba.....	97

FIGURA 4.4 - Efeito da adição de glicose na Aa teórica, experimental e calculada da polpa de goiaba.....	97
FIGURA 4.5 - Efeito da adição de glicerol na Aa teórica, experimental e calculada da polpa de goiaba.....	98
FIGURA 4.6 - Efeito da adição de açúcar invertido na Aa teórica, experimental e calculada da polpa de goiaba.....	98
FIGURA 4.7 - Efeito da adição de solutos na Aa da polpa de goiaba	99
FIGURA 4.8 - Distribuição dos tratamentos dos Experimentos I, II e III e suas respectivas vidas-de-prateleira em dias.....	101
FIGURA 4.9 - Comportamento físico-químico dos tratamentos 2 (54,95% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 4 (54,95% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico) e 6 (57% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico) do Experimento II que apresentaram mais longa vida-de-prateleira em função do tempo de armazenamento a 25°C, de acordo com os parâmetros: (a) Aa, (b) pH, (c) Sólidos Solúveis (°Brix, 20°C) e (d) Acidez Cítrica.	103
FIGURA 4.10 - Evolução da contagem microbiana dos tratamentos 2 (54,95% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 3 (45,05% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 4 (54,95% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 6 (57% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico), 7 (50% de sacarose), 8 (50% de sacarose e 1,5% de ácido cítrico) e 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 (50% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico) no decorrer do Experimento II	104
FIGURA 4.11 - Evolução da contagem de leveduras e bolores no decorrer do Experimento III para os tratamentos 1 (52,93% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 2 (67,07% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 3 (52,93% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 4 (67,07% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 5 (50% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico), 6 (70% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico), 7 (60% de sacarose), 8 (60% de sacarose e 1,5% de ácido cítrico) e 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 (60% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico).....	105

- FIGURA 4.12** - Alterações físico-químicas dos tratamentos 2 (67,07% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 3 (52,93% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 4 (67,07% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 6 (70% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico), 7 (60% de sacarose), 8 (60% de sacarose e 1,50% de ácido cítrico) e 9 (60% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico) do Experimento III, sendo : (a) Aa, (b) pH, (c) Sólidos Solúveis (°Brix, 20°C) e (d) Acidez Cítrica. 106
- FIGURA 4.13** - Evidências da deterioração encontradas nos Experimentos I, II e III, sendo (a) expansão de volume, (b) bolhas de ar e (c) sinérese..... 107
- FIGURA 4.14** - Vidas-de-prateleira obtidas no Experimento IV em função da concentração de sorbato de potássio e sacarose. 109
- FIGURA 4.15** - Comportamento físico-químico dos tratamentos que apresentaram mais longa vida-de-prateleira do Experimento IV: 5.5 (0,75% de ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio), 6.4 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio) e 6.5 (50% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio) em função do tempo de armazenamento a 25°C, de acordo com os parâmetros: (a) Aa, (b) pH, (c) Sólidos Solúveis (°Brix, 20°C) e (d) Acidez Cítrica. 110
- FIGURA 4.16** - Comportamento microbiológico dos tratamentos que apresentaram mais longa vida-de-prateleira do Experimento IV, 5.5 (0,75% de ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio), 6.4 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio) e 6.5 (50% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio) em função do tempo de armazenamento a 25°C..... 111
- FIGURA 4.17** - Delineamento utilizado no Experimento V e suas respectivas vidas-de-prateleira 112

FIGURA 4.18 - Comportamento físico-químico dos tratamentos de mais longa vida-de-prateleira do Experimento V: 2 (46,09% de sacarose, 0,22% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio), 6 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio), 18 (54% de sacarose e 0,06% de sorbato de potássio), e 20 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,05% de sorbato de potássio) em função do tempo de armazenamento a 25°C, de acordo com os parâmetros: (a) Aa, (b) pH, (c) Sólidos Solúveis (°Brix, 20°C) e (d) Acidez Cítrica..... 113

FIGURA 4.19- Comportamento microbiológico dos tratamentos de mais longa vida-de-prateleira do Experimento V: 2 (46,09% de sacarose, 0,22% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio), 6 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio), 18 (54% de sacarose e 0,06% de sorbato de potássio), e 20 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,05% de sorbato de potássio) em função do tempo de armazenamento (dias) a 25°C..... 114

FIGURA 4.20 - Superfície de resposta dos tratamentos do Experimento I em relação a vida-de-prateleira (tempo em dias), sendo X=concentração de sacarose (%p/p em relação à mistura) e Y=concentração de ácido cítrico (% p/p em relação à polpa). 117

FIGURA 4.21 - Superfície de resposta dos tratamentos do Experimento II em relação a vida-de-prateleira (tempo em dias), sendo X=concentração de sacarose (%p/p em relação à mistura) e Y=concentração de ácido cítrico (% p/p em relação à polpa). 117

FIGURA 4.22 - Superfície de resposta dos tratamentos do Experimento III em relação a vida-de-prateleira (tempo em dias), sendo X=concentração de sacarose (%p/p em relação à mistura) e Y=concentração de ácido cítrico (% p/p em relação à polpa). 118

FIGURA 4.23 - Superfície de resposta dos tratamentos do Experimento V em relação a vida-de-prateleira (tempo em dias), sendo X=concentração de sacarose (%p/p em relação à mistura) e Y=concentração de ácido cítrico (% p/p em relação à polpa)	118
FIGURA 4.24 - Curva de nível mostrando a vida-de-prateleira em função da concentração de sacarose e ácido cítrico, para o Experimento I. ...	120
FIGURA 4.25 - Curva de nível mostrando a vida-de-prateleira em função da concentração de sacarose e ácido cítrico, para o Experimento II. ...	121
FIGURA 4.26 - Curva de nível mostrando a vida-de-prateleira em função da concentração de sacarose e ácido cítrico, para o Experimento III. ...	121
FIGURA 4.27 - Curva de nível mostrando a vida-de-prateleira em função da concentração de sacarose e ácido cítrico, para o Experimento V. ...	122
FIGURA 4.28 - Exemplo de leitura de absorvância de sorbato, por espectrofotometria, para uma das amostras do tratamento 20.....	124
FIGURA 4.29 - Dados de cor no sistema L*a*b* CIE, diferença de cor (ΔE) e croma (C) das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.	127
FIGURA B.1 - Curva de calibração do Aqua-lab de 19/01/95.....	191
FIGURA B.2 - Curva de calibração do Aqua-lab de 19/07/95.....	191
FIGURA B.3 - Curva de calibração do Aqua-lab de 02/10/95.....	194
FIGURA B.4 - Curva de calibração do Aqua-lab de 29/12/95.....	195
FIGURA B.5 - Curva de calibração do Aqua-lab de 17/01/96.....	197
FIGURA B.6 - Curva de calibração do Aqua-lab de 13/05/96.....	198
FIGURA B.7 - Curva de calibração do Aqua-lab de 04/07/96.....	200

RESUMO

O uso da tecnologia de métodos combinados foi avaliada na preservação de polpa de goiaba com 15°Brix. Foram realizados cinco experimentos. Nos três primeiros experimentos foram alteradas apenas a atividade de água e pH do produto através da adição de sacarose (0 a 70%) e ácido cítrico (0 a 3%). O Experimento IV definiu a quantidade mínima de sorbato de potássio que deveria ser adicionada para permitir a preservação do produto fixando-se a concentração de ácido cítrico em 0,75% (p/p) e testando-se a adição de 0 e 50% de sacarose. O Experimento V avaliou as interações entre o sorbato de potássio, pH e sacarose. Os Experimentos I, II, III e V foram delineados estatisticamente pela metodologia de superfície de resposta do tipo central rotacional completo de segunda ordem e a análise destes dados permitiu propor equações para a estimativa do tempo de vida-de-prateleira em função do percentual (p/p) de sacarose e ácido cítrico adicionados e no caso do Experimento V fixando-se a adição de sorbato de potássio em 0,06%. Foram inoculados microrganismos deterioradores deste tipo de produto (leveduras, bolores e bactérias lácticas), isolados do ambiente industrial (ar, equipamentos, superfícies e de frutas e seus produtos) e a levedura *Zygosaccharomyces baillii*. Estes microrganismos isolados e purificados foram, em sua maioria, identificados por gênero e espécie. A população microbiana inoculada foi da ordem de 10^4 UFC/g para os dois primeiros experimentos e 10^3 UFC/g para os demais. As leveduras foram os microrganismos deteriorantes mais importantes, porém foram controladas pela adição de sorbato de potássio. O tempo de preservação da polpa de goiaba atingido nos três primeiros experimentos não foi satisfatório. Foi possível conservar polpa de goiaba por, no mínimo, 120 dias a 25°C, em pelo menos seis formulações diferentes dos Experimentos IV e V.

SUMMARY

Hurdle technology was evaluated in the preservation of guava pulp (15°Brix). Five experiments were realized. In Experiments I, II and III the water activity and pH were altered by adding sucrose (0 to 70%) and citric acid (0 to 3%). Experiment IV defined the minimum quantity of sorbate that must be added to preserve the product, fixing the citric acid concentration at 0.75% and testing the sucrose concentration from 0 to 50%. Experiment V evaluated the sorbate, pH and sucrose interactions. Surface Response Methodology of central composite full factorial design for two factors was used in Experiments I, II, III and V and the data analysis permitted the suggestion of an equation for the prediction of the shelf-life as a function of sucrose and citric acid content (%w/w) and in Experiment V, fixing the sorbate concentration at 0.06%. All these samples were artificially contaminated with suspensions of pure cultures of selected groups of microorganisms (yeasts, molds and lactic acid bacteria) known to be spoilage agents of this kind of product, isolated from a factory environment (air, equipment, surfaces and fruits and their products) and also the yeast *Zygosaccharomyces baillii*. The microorganisms were identified by genus and species. The concentrations of inoculum used were about 10^4 UFC/g for Experiments I and II and 10^3 for Experiments III, IV and V. The main spoilage group was the yeasts so it was necessary to add an effective additive to avoid their multiplication: potassium sorbate. The shelf-life period in Experiments I, II and III was not good. It was possible to preserve guava pulp for at least 120 days at 25°C in six different formulations of Experiments IV and V.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil situa-se entre os principais produtores mundiais de goiaba, sendo que a maior parte da produção destina-se à industrialização, geralmente na forma de polpa ou purê e doces. No estado de São Paulo, um dos maiores produtores nacionais de goiaba, a industrialização corresponde a importante segmento de mercado, com possibilidades de expansão, devido aos acordos recentemente firmados pelo Brasil através do MERCOSUL (Mercado Comum do Cone Sul).

A polpa ou purê obtidos a partir desta fruta são utilizados na elaboração de produtos bastante populares no país como a goiabada. O processamento mais largamente utilizado para produção de polpa concentrada de goiaba (15ºBrix) envolve o despulpamento, desaeração, concentração, pasteurização e embalagem (geralmente a quente). Há uma diferenciação no tipo de embalagem e conseqüentemente no sistema de resfriamento adotados entre as grandes e pequenas empresas. As grandes indústrias concentram a polpa utilizando as instalações para produtos de tomate, isto possibilita que a concentração seja a vácuo obtendo-se um produto de melhores características organolépticas. O produto é embalado a quente em tambores de 200 litros e resfriado com agitação por cerca de uma hora. As pequenas empresas concentram o produto e o embalam também a quente porém, em latas de 20 litros e resfriam nas condições ambientais ou estaticamente em água corrente o que acarreta mudanças indesejáveis na qualidade do produto final. Geralmente, as empresas que atuam neste mercado processam a goiaba durante a safra na forma de polpa concentrada e reprocessam esta polpa na forma de doces durante o ano.

Os principais problemas de deterioração observados em polpa de goiaba se relacionam com a embalagem. Estas embalagens são recicladas muitas vezes e nem sempre são tomados todos os cuidados necessários no manuseio, manutenção e higienização das mesmas. Os tambores de 200 litros são difíceis de manusear após o enchimento e há gastos consideráveis de energia para o seu resfriamento pelo sistema rotativo, que é o mais adequado. Neste tipo de embalagem, desde que aberta, seu conteúdo deve ser totalmente processado pois não permite a utilização posterior do produto.

Para os que estudam a conservação dos alimentos o importante é alcançar a preservação sem prejudicar negativamente a sua qualidade. Por esta razão há uma incessante busca por novos métodos físicos e químicos de preservação que confirmem a estabilidade, segurança e qualidade desejadas para cada produto em particular.

A preservação de frutas e seus produtos por métodos combinados tem sido bastante estudada principalmente na América Latina, no entanto, nenhum trabalho tinha sido realizado até então para polpa de goiaba.

O uso da tecnologia de métodos combinados oferece uma opção viável, simples e de baixo custo tanto para pequenas como grandes empresas pela possibilidade da eliminação das atuais embalagens de polpa de goiaba e conseqüentemente do sistema de resfriamento, possibilitando a estocagem deste produto nas condições ambientais (não envolvendo gastos com estrutura de frio, precária em países como o Brasil), permitindo o transporte a granel (em tanques de grande capacidade) e possibilitando o escoamento nas quantidades desejadas além de, economizar energia e mão de obra (pelo menor número de operações).

A adição de ingredientes amplamente conhecidos e mundialmente reconhecidos como GRAS (Generally Recognized As Safe) como a sacarose, ácido cítrico e sorbato de potássio à polpa de goiaba, oferece uma possibilidade a mais de serem avaliados neste trabalho, visto que a tendência do mercado é oferecer ao consumidor os produtos já elaborados como por exemplo: goiabada, geléia, néctar, etc. e isto implicaria apenas em ajustes para as dosagens normalmente empregadas nestes produtos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a preservação de polpa de goiaba 15°Brix pasteurizada, através de métodos combinados tendo como obstáculos principais a atividade de água e o pH, de modo a garantir uma vida-de-prateleira do produto de, no mínimo, 120 dias a 25°C. Como o período de safra da goiaba é de janeiro a março, este tempo mínimo de 120 dias seria suficiente para abastecer as indústrias nos meses de maior consumo do produto que é, geralmente, no período de inverno.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GOIABA E DERIVADOS

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é originária da América tropical, pertencente a família Myrtaceae e encontra-se hoje, pela sua fácil adaptação a diferentes tipos de solos e climas, amplamente espalhada nas regiões tropicais e subtropicais.

O Brasil situa-se entre os maiores produtores mundiais tanto da fruta "in natura" como de seus derivados industrializados juntamente com o México, Paquistão, Colômbia, Egito, África do Sul, Índia, Venezuela, República Dominicana, Porto Rico, Jamaica, Kênia, Austrália e Estados Unidos (Havai) (JAGLIANI et alii, 1988).

No Brasil, como em outros países produtores, a goiaba silvestre passou a ser suplantada, gradativamente, por goiabeiras cultivadas, a fim de atender às exigências das indústrias. Estas culturas organizadas trouxeram como conseqüência de sua implantação, frutas melhores do ponto de vista da industrialização, ou seja, frutas de menor número de sementes e de células pétreas, mais ácidas, coloração de um vermelho mais intenso, sabor agradável e um alto teor de ácido ascórbico (DE MARTIN & KATO, 1991).

Os estados maiores produtores de goiaba do Brasil são São Paulo, Pernambuco e Paraíba, produzindo juntos no período de 1988-92 mais de 90% do total da produção nacional. A produção brasileira de goiaba alcançou 1,4 bilhão de frutos em 1992, apresentando crescimento de 20% em relação 1988 que foi de 1,16 bilhão de frutos. O estado de São Paulo destaca-se na produção nacional, representando cerca de 44% do total produzido em 1992 (VEGRO & MIRANDA, 1994). A produção de goiaba para processamento industrial tem se mantido estável nos últimos 15 anos, estando concentrada na região de Ribeirão Preto, destacando-se os municípios de Itápolis, Monte Alto, Taquaritinga, São Carlos e cidades circunvizinhas. Para o Ano Agrícola 1995/96 a produção de goiaba no estado de São Paulo, está estimada em 49,55 mil toneladas para indústria e em 39,55 mil toneladas para mesa (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 1996).

VEGRO & MIRANDA (1994) analisando a estrutura de produção de goiaba no estado de São Paulo verificaram que os pequenos estabelecimentos de área total menor

que 50 hectares são responsáveis por praticamente metade da produção (49%), sendo que os de área maior que 500 hectares participam com apenas 11% dos 51% restantes. Estes dados não diferenciam goiaba para consumo "in natura" da produzida para o processamento industrial, diferentes quanto às características do fruto e do sistema de cultivo.

A goiaba, além de ser consumida crua ou ao natural, é a fruta tropical que mais se destaca na fabricação de doces. MAIA et alii (1991) comparando dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) relatam que em 1980 a produção de doce de goiaba em pasta (goiabada) atingiu 75 mil toneladas, enquanto que o doce de banana em pasta chegou a 23 mil toneladas e o doce de coco a 4 mil toneladas. AMARO (1986) afirmou que a goiabada é destacadamente o principal produto derivado da goiaba, absorvendo na sua elaboração cerca de 80% de toda a quantidade de goiaba destinada à industrialização.

Segundo VEGRO & MIRANDA (1994), os principais itens da pauta de exportações brasileiras de goiaba e derivados são o doce, purê e pasta de goiaba (principalmente goiabada) que participam de dois terços a três quartos do valor exportado. Em 1992, por exemplo, de um total exportado pelo setor de goiaba e derivados de US\$ 3,5 milhões, US\$ 2,6 milhões referiram-se a "doce, purê e pasta", US\$ 600 mil ao suco, US\$ 146 mil à compota e apenas US\$ 138 mil à goiaba "in natura". As exportações de doce, purê e pasta de goiaba, constituídas principalmente por goiabada, têm demonstrado significativo crescimento nos últimos dez a quinze anos. A taxa de crescimento anual da quantidade exportada foi de 4,97%, no período de 1980 a 1992. A assinatura do acordo do Mercado Comum do Cone Sul (MERCOSUL) foi acompanhada de um crescimento muito acentuado das importações de goiabada brasileira pelos países membros, que passaram de 70,80 toneladas em 1991 para 302,53 toneladas em 1992.

A goiaba pode ser rica em vitamina C (ácido ascórbico). JAGLIANI et alii (1988) citam variações do conteúdo de vitamina C para diferentes variedades e regiões de produção da ordem de 23 a 490 mg de ácido ascórbico/100 g de goiaba, sendo também boa fonte de vitaminas A, B₁ e B₂. Segundo TEIXEIRA NETO (1996) a vitamina C (ácido ascórbico) é provavelmente a mais sensível de todas as vitaminas contidas nos alimentos. As perdas durante o processo de preparação dos alimentos variam de 10 a 50%, de acordo com as condições utilizadas. PANADÉS et alii (1993) obtiveram perdas

de 50% da vitamina C em polpa de goiaba processada assepticamente e armazenadas em tanques de 24 m³, por 6 meses; as maiores perdas foram observadas no primeiro mês de armazenamento. BREKKE et alii (1970) que trabalharam com polpa de goiaba preservada por aditivos químicos, observaram perdas de vitamina C quase na sua totalidade após o primeiro mês de armazenamento. MOKADY et alii (1984) também registraram que a vitamina C tem rápida oxidação em purê de goiaba. Segundo SINGH & LUND (1986), esta degradação depende de vários fatores, os quais incluem oxigênio, metais, pH, luz, temperatura e atividade de água. A taxa de destruição de ácido ascórbico é específica para cada alimento. Para o caso dos alimentos embalados e armazenados, os fatores que mais afetam as reações degradativas são a temperatura de armazenamento e a atividade de água. LEE & LABUZA (1975) e SINGH & LUND (1986), demonstraram que as taxas de perda de vitamina C são grandemente afetadas pelas mudanças na atividade de água. Aumentando-se a atividade de água, aumenta-se a taxa de perda de vitamina C.

Para quase todo o país, os períodos de safra da goiaba ocorrem de janeiro a abril, com exceções do estado do Pará, onde a safra da goiaba vai de maio a meados de agosto, e do estado do Paraná, onde a safra se estende de setembro a março (MAIA et alii, 1991).

O período de safra da goiaba coincide, vantajosamente para as indústrias processadoras de tomate, com o de entressafra do tomate, fazendo com que estas grandes indústrias utilizem as suas instalações para a produção de polpa ou purê de goiaba.

Segundo a Legislação Brasileira de Alimentos (Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos 12/78, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992), a polpa ou purê é por definição "o produto obtido por esmagamento das partes comestíveis de frutas carnosas por processos tecnológicos adequados". É permitida a adição de sacarose na proporção declarada no rótulo. A Portaria nº 7/89 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos/Ministério da Saúde, de 06/06/89 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992) permite a adição de ácido cítrico em polpa de frutas em quantidade suficiente para o efeito desejado. A escolha do processo de preservação fica a critério do processador. Isto implica que não há restrições quanto ao

tipo de método físico ou químico a ser adotado, o interesse na preservação maior ou menor do produto passa a ser restrita ao próprio processador e ao seu mercado consumidor. A Portaria nº01/87 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos / Ministério da Saúde, de 28/01/87 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992) estabelece como padrões microbiológicos para purês e doces em pasta ou massa: ausência de *Salmonelas* em 25 g, Coliformes Fecais máximo 1/g (NMP-número mais provável) e Bolores e Leveduras (máximo) 10^3 UFC/g (unidades formadoras de colônias por grama). No caso dos produtos serem submetidos a tratamento térmico e envasados é recomendada a observação das embalagens após 10 dias de incubação a 35°C, nas quais não devem existir sinais de alteração, nem quaisquer modificações físicas, químicas ou organolépticas do produto e quando necessário será verificada a esterilidade comercial.

WOODROOF (1990) citou que há mais de trezentos e cinquenta produtos comerciais de frutas elaborados a base de cerca de cinquenta e oito frutas diferentes que são cultivadas nas Américas do Sul, Central e do Norte, utilizando as mais diversas técnicas de preservação ou a combinação destas para a confecção de cada produto em particular. Este autor relaciona dez técnicas, em ordem de importância, como as mais utilizadas no processamento comercial de frutas, a saber: enlatamento a altas temperaturas; congelamento; secagem; adição de alta concentração de açúcares; concentração pela alta remoção de água; emprego de aditivos como o dióxido de enxofre, ácido sórbico, benzoato de sódio, ácido acético, ácido cítrico e álcool; fermentação com leveduras e bactérias; uso de especiarias e vinagre; redução de oxidação por vácuo, antioxidantes e outros agentes redutores e redução da luz visível pelo uso de embalagens opacas e estocagem ao abrigo da luz.

Para a polpa ou purê de goiaba existem vários processos que podem ser utilizados na sua preservação que são: pasteurização seguida por enchimento a quente ("hot fill"), conservação por aditivo químico, congelamento e processo asséptico.

O uso do congelamento rápido e processo asséptico para a produção de purê ou polpa de goiaba resultam, evidentemente, em um produto final de excelentes características quanto à cor, aroma e sabor. No primeiro caso, as limitações para a adoção destes tipos de processos se encontram, no alto custo de instalação de infraestrutura de frio, incluindo o transporte e distribuição; e no segundo caso, no alto

custo da própria instalação e de toda a assepsia envolvida. Estes processos são utilizados no Brasil, porém em número bastante reduzidos.

A conservação de polpa de goiaba por aditivo químico apresenta boa perspectiva de uso no mercado interno, embora haja uma tendência mundial à utilização de produtos mais naturais, livres de conservadores químicos. Os conservadores químicos legalmente permitidos para polpa de frutas são os ácidos sórbico e benzóico e seus derivados de sódio e potássio (Resolução 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992).

O processo mais tradicional de conservação da polpa concentrada é o de pasteurização seguida por enchimento a quente ("hot fill"). Neste processo, após a obtenção da polpa, esta é tratada termicamente a temperaturas de 93-94°C, geralmente por meio de trocador de calor (tubular ou de superfície raspada), por 45-60 segundos. A polpa é imediatamente embalada após a saída do trocador de calor. A temperatura de enchimento não deve ser inferior a 90°C e a recravação deve ser feita logo após o enchimento (SOLER et alii, 1991). SAVITCI et alii (1994) estudaram o potencial agroindustrial na sub região de Campinas e constataram que 100% das indústrias de polpa de frutas utilizam o processo de enchimento a quente, geralmente realizado em latas de 20 Kg. Foi constatado que estas indústrias apresentam "layouts" mal projetados e falta de higiene.

Sendo a polpa de goiaba ácida (pH próximo de 4,0) é viável o uso da técnica de enchimento a quente que possibilita que a polpa pasteurizada seja embalada imediatamente a esta mesma temperatura e as embalagens fechadas hermeticamente. Este processo segue o fluxograma mostrado na Figura 2.1. No caso do uso de embalagens metálicas, certos cuidados são importantes como o fato das mesmas serem envernizadas internamente com verniz apropriado para alimento ácido (epoxi ou óleo resinoso) para evitar a eventual descoloração dos pigmentos (DE MARTIN & KATO, 1991).

TEIXEIRA NETO et alii (1981) desenvolveram um processo de resfriamento de polpas semi-concentradas em tambores de 200 litros, sob agitação, promovendo a substituição quase total das latas retangulares de 20 litros, principalmente pelas grandes indústrias de polpa de tomate e goiaba. Foram testados dois tipos de resfriador

axial e biaxial, constatando-se que a faixa de velocidade de rotação dos tambores mais conveniente era de 36 a 43 r.p.m. e o espaço livre mais eficiente em termos de resfriamento foi o de 10 cm. O tempo de resfriamento da polpa de goiaba (17°Brix) nestas condições foi de cerca de 60 minutos. No caso das latas de 20 litros, estas são resfriadas lentamente ao ar livre ou em água fria, sem agitação, acarretando mudanças indesejáveis na qualidade do produto final.

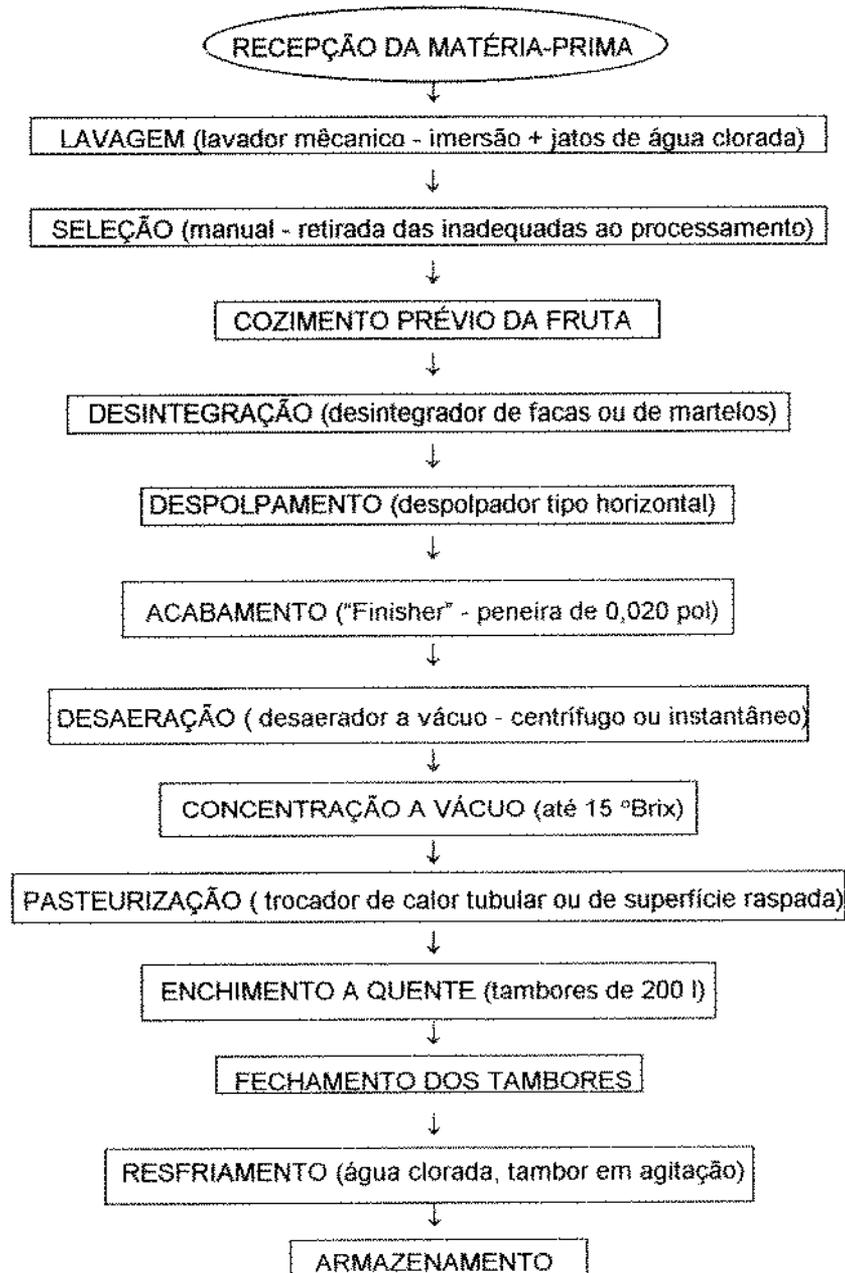


FIGURA 2.1 - Fluxograma do processamento de polpa de goiaba concentrada pelo processo de enchimento a quente.

Normalmente as embalagens utilizadas para polpas de goiaba e tomate são reutilizadas. Esta reutilização causa certos problemas de ordem microbiológica, principalmente se a higienização destas embalagens não for bem conduzida, tornando-se a embalagem um agente de contaminação do produto a ser acondicionado. TEIXEIRA NETO et alii (1981), citam dados obtidos junto às indústrias que utilizam embalagem de 20 litros onde as perdas chegam a 2% da polpa por problemas microbiológicos, quando a lata é utilizada pela primeira vez, e a 10% quando esta lata é reutilizada, verificando-se aumento desta porcentagem com as reutilizações subsequentes. Segundo informações das indústrias processadoras, os tambores de 200 litros custam cerca de US\$ 50,00/tambor e permitem a sua reutilização por cerca de 4 a 5 vezes, dependendo das suas condições. GRAJALES (1996) cita que estes tambores são reutilizados por um período de até dez anos e comprovou que o concentrado de tomate embalado em tambores com menor tempo de uso, apresentavam vida-de-prateleira mais longa do que o contido em tambores com maior tempo de uso. A utilização dos tambores por longo tempo, provoca deformações no bocal e necessidade de recondicionamento constante, influenciando diretamente na qualidade da recravação. GRAJALES (1996) cita também que há falhas na limpeza e sanificação dos tambores reutilizados e na cloração da água de resfriamento dos tambores, favorecendo a recontaminação do produto final durante o resfriamento.

O custo da embalagem tem influência no preço do produto final. No caso da polpa de goiaba, o preço desta embalagem em relação ao produto embalado é de cerca de 1,5 vezes, não considerando a reutilização dos tambores. SENA (1988) citado por VEGRO & MIRANDA (1994) analisando os custos de produção de polpa de goiaba verificou que o principal item de custo é a matéria-prima, seguida pelos outros insumos (mão-de-obra, energia, etc) e embalagens. Os percentuais de participação destes custos estão evidenciados na Figura 2.2. Observa-se que os custos que podem ser reduzidos com mudanças no processo são os de energia e de embalagem.

A polpa ou purê de goiaba é também conhecida como semi industrializado de goiaba, pois é utilizada basicamente na elaboração de outros produtos tais como: néctar, suco, doce em massa, geleados, iogurte, sorvetes, alimentos infantis, ingrediente de produtos de laticínios e panificação, etc.

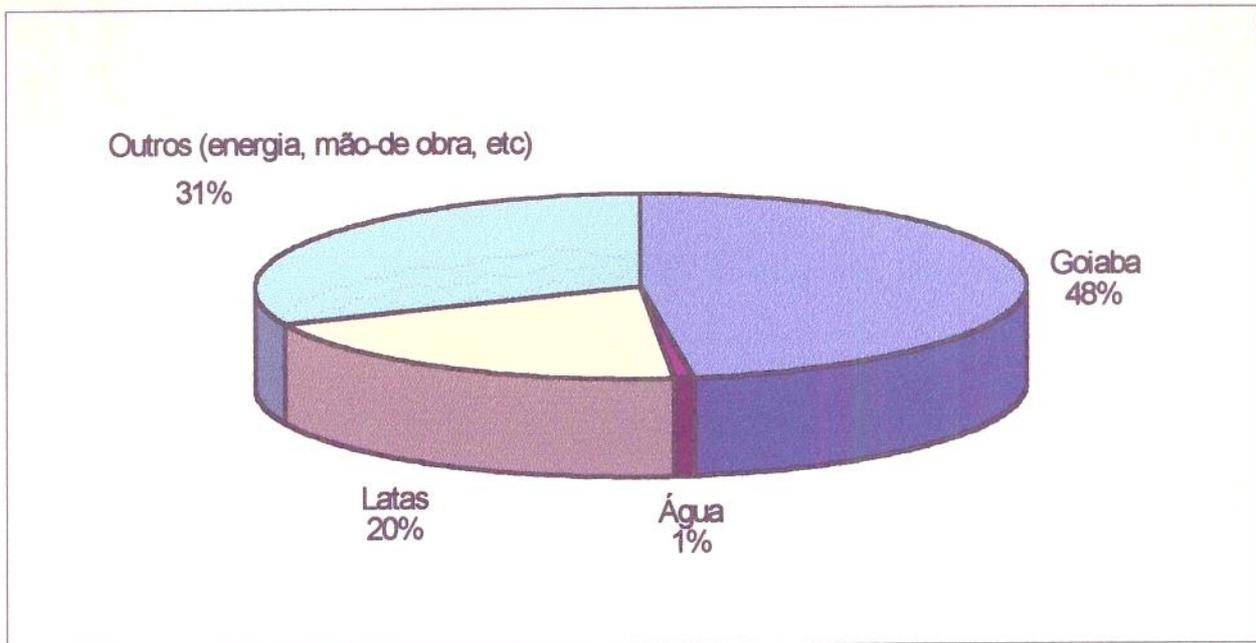


FIGURA 2.2 - Custo de produção de polpa de goiaba para unidade industrial com capacidade de 1 tonelada de goiaba/hora, Brasil, 1988.

Fonte: (SENA, 1988), citado por VEGRO & MIRANDA (1994).

Os principais produtos elaborados a partir da polpa de goiaba são as geléias e os doces em pasta (goiabada) que, quanto à consistência, podem ser cremosos ou em massa. A Legislação Brasileira (Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos nº 12/78 - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992) define as geléias de frutas como o produto obtido pela cocção de frutas, inteiras ou em pedaços, polpa ou suco de frutas, com açúcar e água e concentrado até a consistência gelatinosa. As geléias são classificadas em comum quando preparadas na proporção de quarenta partes de frutas frescas, ou seu equivalente, para sessenta partes de açúcar e extra quando preparadas na proporção de cinquenta partes de frutas frescas, ou seu equivalente, para cinquenta partes de açúcar. É tolerada a adição de acidulantes e de pectina para compensar qualquer deficiência no conteúdo natural das frutas. O teor de sólidos solúveis totais mínimos para geléia comum e extra (%p/p) devem ser de respectivamente 62 e 65%. A Resolução nº4/88, de 24/11/88, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992) estabelece, através das Tabelas de Aditivos Intencionais, os limites de adição de conservadores fixado em 0,10% em peso para ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio e

como acidulantes (%p/p) os ácidos cítrico e láctico (quantidade suficiente para o efeito desejado), fumárico (0,20%), tartárico (0,20%) e fosfórico (0,10%).

O doce em pasta é definido como o produto resultante do processamento adequado das partes comestíveis desintegradas de vegetais com açúcares, com ou sem adição de água, pectina, ajustador de pH e outros ingredientes e aditivos permitidos por esses padrões até à consistência apropriada, acondicionado de forma a assegurar sua perfeita conservação (Resolução Normativa nº 9/78, Câmara Técnica de Alimentos, Conselho Nacional de Saúde - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992). O doce em pasta deve ser elaborado a partir de uma mistura que contenha não menos que 50 partes dos ingredientes vegetais para cada 50 partes em peso dos açúcares utilizados. É permitida a adição (em %p/p) dos conservadores ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio até 0,20% e ácido benzóico e seus sais de sódio, potássio e cálcio até 0,10% e como acidulantes, o ácido cítrico e láctico, em quantidade suficiente para o efeito desejado, fosfórico 0,10% e tartárico 0,20% (Resolução nº4/88, de 24/11/88, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, Tabelas de Aditivos Intencionais ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992).

Os elementos básicos para a elaboração das geléias, geleadas e doces em massa são a polpa de fruta, pectina, ácido, açúcar e água. A combinação adequada destes elementos irá definir a qualidade do produto final. A goiaba (cultivar vermelha) é uma fruta naturalmente rica em pectina (0,75- 0,92%) e média em acidez (pH 3,6-4,1) (DE MARTIN & KATO, 1991). A Figura 2.3 mostra a influência dos componentes básicos de uma geléia no grau de geleificação. Em meio ácido, a pectina está carregada negativamente. A adição de açúcar afeta o equilíbrio pectina/água, desestabilizando conglomerados de pectina e formando uma rede de fibras, que compõe o gel, cuja estrutura é capaz de suportar líquidos. A densidade e a continuidade dessa rede é afetada pelo teor de pectina. A rigidez da estrutura é afetada pela concentração do açúcar e acidez. A concentração ótima de açúcar está ao redor de 67,5%. O ácido enrijece as fibras da rede, mas a alta acidez afeta a elasticidade, devido a hidrólise da pectina. O gel se forma ao redor do pH 3, além de pH 3,4 não ocorre geleificação. A acidez total da geléia deve estar ao redor de 0,5-0,8, pois acima de 1% ocorre sinérese, ou seja, exsudação do líquido da geléia (JACKIX, 1988).

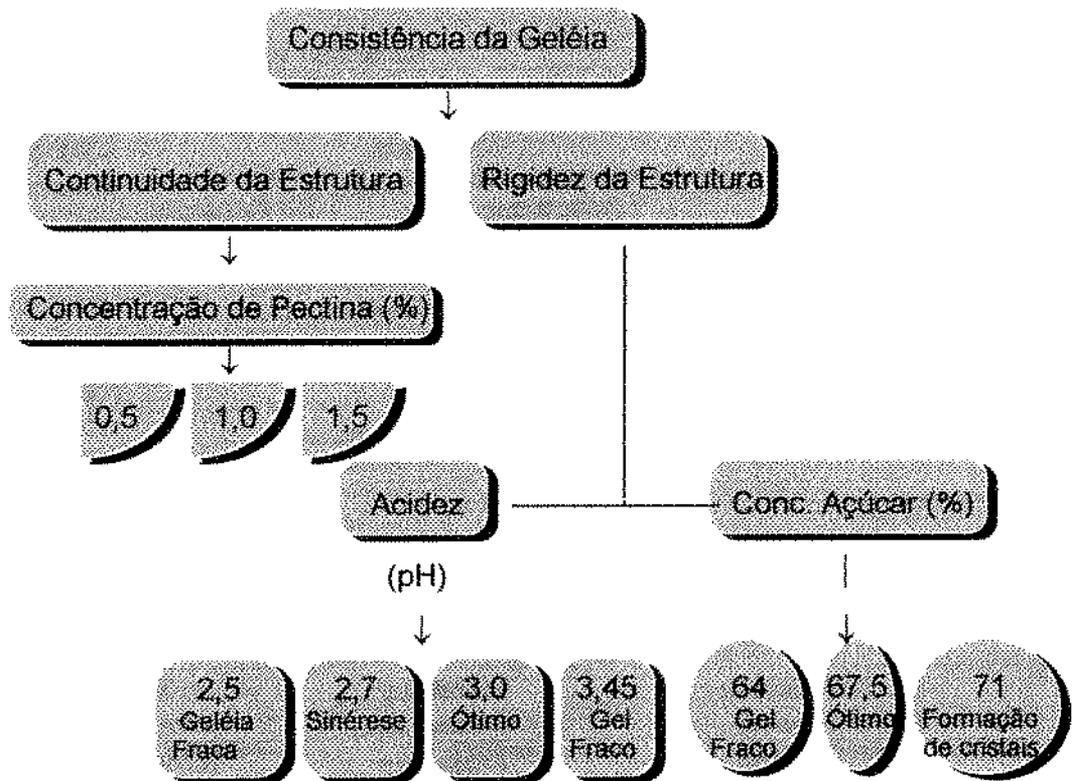


FIGURA 2.3 - Influência dos constituintes básicos de uma geléia na sua consistência.

Fonte: RAUCH (1965).

O açúcar empregado com maior frequência na fabricação de geléias e doces em massa é a sacarose de cana ou de beterraba. Durante a cocção, a sacarose sofre, em meio ácido, um processo de hidrólise, com a formação de açúcar invertido, pelo desdobramento parcial da sacarose em glicose e frutose, tendo esta nova mistura de açúcares maior solubilidade, evitando-se assim a cristalização que pode ocorrer em determinadas ocasiões durante o armazenamento. Quando se faz uma concentração acima de 65% de sólidos solúveis totais, é necessário substituir parte da sacarose para evitar a cristalização, usando glicose de milho ou açúcar invertido (SOLER, 1991). Outros substitutos do açúcar podem ser utilizados como o sorbitol e o glicerol. Os preços comparativos de alguns solutos estão colocados na Figura 2.4.

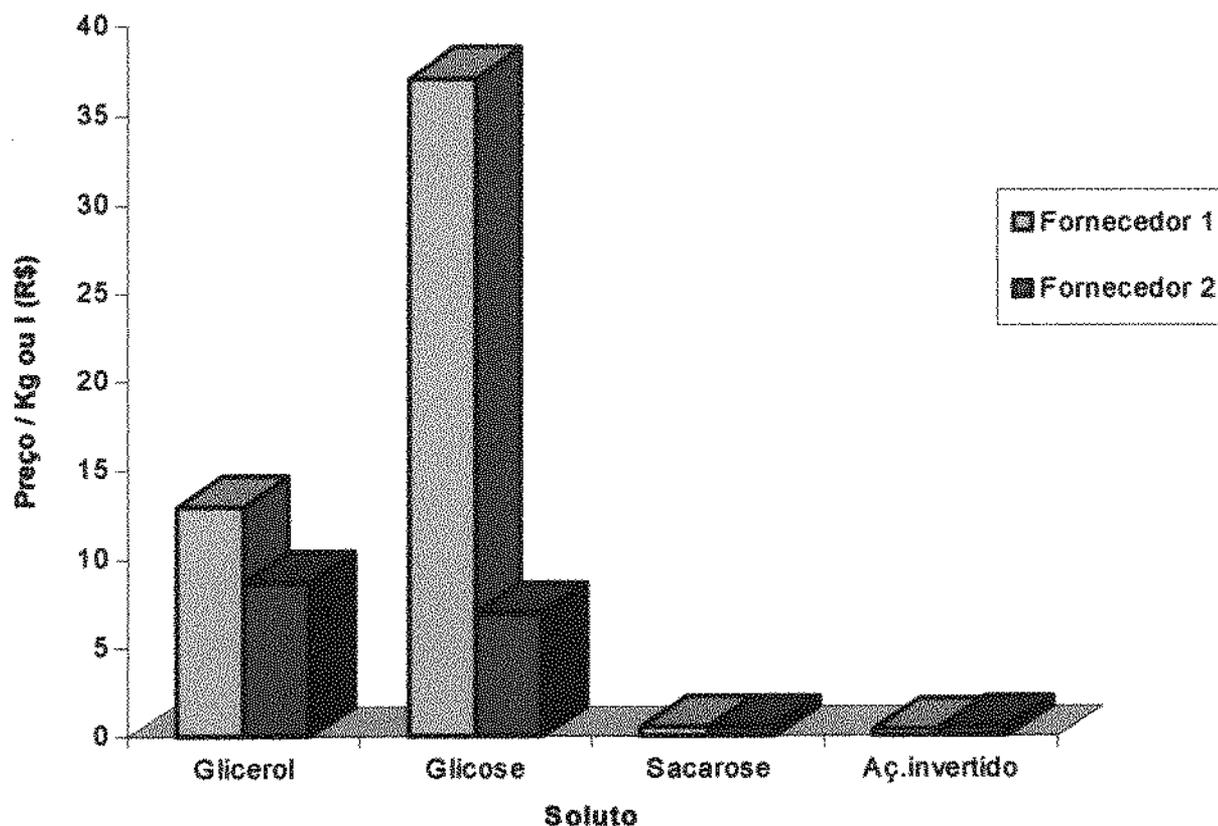


FIGURA 2.4 - Comparação de preços de dois fornecedores de alguns solutos em agosto de 1996.

Para se conseguir uma adequada gelificação, o pH final deve estar entre 3,0 a 3,2. Geralmente, este pH não é alcançado com o pH natural das frutas, assim é necessário proceder uma acidificação utilizando-se, preferencialmente, os ácidos orgânicos, que são constituintes naturais das frutas, tais como o cítrico, tartárico e málico. O ácido mais comumente empregado é o cítrico, pelo seu sabor agradável (SOLER, 1991). Cada ácido, no entanto, tem o seu próprio caráter fraco ou forte que influenciará no poder de abaixamento do pH. Para a mesma queda de pH alguns ácidos conferem sabor mais ou menos intenso. Um exemplo deste fato é o ácido fosfórico que é aproximadamente quatro vezes mais forte que o cítrico, no que diz respeito ao poder de abaixamento de pH, e apenas 10% mais ácido ao paladar. (JACKIX, 1988).

2.2. TEORIA DOS OBSTÁCULOS OU MÉTODOS COMBINADOS

A preservação dos alimentos pelo uso dos métodos combinados se resume na aplicação de parâmetros combinados (ou obstáculos) que podem agir sinergicamente

para inibir ou retardar o crescimento microbiano resultando em produtos estáveis à temperatura ambiente (FOX & LONCIN, 1982; CHIRIFE & FAVETO, 1992).

Cada alimento seguro e estável requer um certo tipo de obstáculos, que diferem em qualidade e intensidade de acordo com cada produto em particular, de modo a manter a população natural de microrganismos sob controle (LEISTNER, 1995).

A Teoria dos Obstáculos, que é também conhecida como Métodos Combinados ou Processos Combinados, Preservação Combinada, Técnicas de Combinação ou Hürden-Technologie em alemão, Technologie des Barrières em francês, Tecnologia degli Ostacoli em italiano, e Hurdle Technology em inglês, tem sido utilizada com sucesso em diversos países, não se restringindo apenas aos economicamente mais pobres. GRIJSPAARDT-VINK, 1994) cita que foi desenvolvido na Europa um programa de pesquisa de quatro anos (1990-1994) em processos combinados, que envolvia quatorze cientistas de laboratórios de onze diferentes países europeus (Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Irlanda, Itália, Eslovênia, Espanha, Suécia, Holanda e Inglaterra) e indústrias com o objetivo de melhorar a segurança e a qualidade dos produtos elaborados, promover a eficiência e competitividade das indústrias relacionadas a estes produtos e reforçar a infraestrutura técnica e científica.

A preservação dos alimentos baseada em métodos combinados pode ser aplicada para melhorar os produtos tradicionais assim como para desenvolver novos produtos. Métodos combinados asseguram estabilidade e segurança apesar de tratamento brando e resulta em produtos com altas propriedades sensoriais e nutricionais (LEISTNER, 1992).

Segundo CHIRIFE (1993), uma boa parte dos alimentos tradicionais, preservados pelo abaixamento de atividade de água utilizam, muitas vezes, condições austeras (como alto teor de açúcar, sal, alta temperatura, alta acidez e secagem exagerada) e encontram-se, por vezes, em faixa de atividade de água (Aa) relativamente baixa. Em alguns casos o uso destas condições, induz mudanças drásticas irreversíveis nos constituintes e estrutura do material, o que resulta em um alimento cujas características físicas e sensoriais não são muito aceitáveis após o preparo pelo consumidor. A Tabela 2.1 mostra algumas limitações dos métodos convencionais de preservação dos alimentos.

Para minimizar estas mudanças, tem sido desenvolvidos processos de tratamento mais brandos que produzem alimentos com atividade de água mais elevada e implicam na combinação de outros fatores para a prevenção do desenvolvimento microbológico. Temos assim, dois tipos tradicionais de produtos desenvolvidos baseados na aplicação de métodos combinados: os Alimentos de Umidade Intermediária (A.U.I) e os Alimentos Auto Estáveis (A.A.E) ou prontos para o consumo.

TABELA 2.1 - Algumas limitações dos métodos tradicionais de preservação dos alimentos baseados em um tipo de obstáculo.

Método	Obstáculo	Limitações
Secagem	Aa	perda de sabor, formato e cor textura pobre vagarosa / incompleta reidratação
Liofilização	Aa	custos
Enlatamento	inativação térmica	perda de qualidade custo da embalagem e energia
Salga	Aa	alto conteúdo de sal textura pobre (carnes)
Acidificação (natural/artificial)	pH	mudanças de sabor devido a alta acidez
Conservadores	ação anti microbiana	problemas de origem legal e de saúde pública
Refrigeração/Congelamento	baixa temperatura (congelamento + Aa)	custo de energia, ausência de cadeia de frio

Fonte: CHIRIFE (1993)

Há várias definições citadas na literatura para os A.U.I., porém uma bastante compreensiva é dada por MULTON, 1981 (citado por TAOKIS et alii, 1988) que define os A.U.I. como sendo os "produtos alimentícios de textura suave, submetidos a um ou mais tratamentos tecnológicos, consumidos diretamente, com vida-de-prateleira de

vários meses, sem necessidade de utilizar esterilização, congelamento ou refrigeração, mas sim pelo ajuste adequado de sua formulação em termos de composição, pH, aditivos, etc. e mantendo Aa entre 0,6 - 0,84 a 25°C." A fixação da faixa de atividade de água para estes produtos apresenta variações na literatura e foram discutidas por ERICKSON (1982). Estes valores geralmente estão na faixa de 0,60 a 0,90. Já o conteúdo de umidade é acordado entre 10 e 40%.

Dentre os A.U.I. tradicionais, ROBSON (1976) cita: produtos desidratados, sem adição de solutos (ameixas, pêssegos, figos, passas, etc.), produtos com adição de açúcar (frutas glaceadas, caramelos brandos, mel de abelhas, doce de leite, etc), produtos salgados e secos (carne seca, pescado, salame, etc), produtos de panificação e preparações a base de frutas. A Tabela 2.2, mostra alguns A.U.I., compilados por CIFUENTES (1987) e determinados por QUAST & TEIXEIRA NETO (1975).

O desenvolvimento de A.U.I. para consumo humano tem sido limitado pela dificuldade em se encontrar novos agentes depressores de Aa que sejam seguros, economicamente viáveis, efetivos e relativamente sem sabor e cor (VALLEJO-CORDOBA et alii, 1986).

Os Alimentos Auto Estáveis (A.A.E.) são basicamente uma extensão dos A.U.I., porém com níveis de atividade de água mais altos. LEISTNER (1994) cita como vantagem destes produtos o tratamento térmico brando (70-110°C), que melhora as propriedades sensoriais e nutricionais destes alimentos, a não necessidade de refrigeração, que simplifica a distribuição e economiza energia durante a estocagem, e como estes produtos são processados em embalagens seladas, não há riscos de recontaminação. Estes alimentos recebem apenas um tratamento térmico brando e podem conter esporos viáveis de bacilos e clostrídios, que são inibidos pelo ajuste de Aa, pH, potencial redox (Eh), e no caso dos embutidos autoclavados, para injúria subletal dos esporos. Este autor divide os A.A.E. em quatro tipos de acordo com o seu obstáculo principal, já que os outros obstáculos necessariamente estarão presentes para garantir a segurança e estabilidade destes produtos. Um primeiro tipo são os F-A.A.E. em que a injúria subletal é o obstáculo principal. Um exemplo destes produtos são os embutidos autoclavados encontrados no comércio alemão, podendo ser estocados várias semanas sem refrigeração. Tem-se também os Aa-A.A.E. cuja estabilidade é garantida principalmente pela redução da Aa a valores abaixo de 0,95 e

um exemplo destes produtos é a tradicional mortadela italiana. Um terceiro tipo são os pH-A.A.E. onde o aumento da intensidade da acidez é o obstáculo principal; embutidos holandeses se utilizam desta técnica cujo pH é ajustado para 5,4-5,6, não necessitando de refrigeração. Finalmente, o quarto tipo o Combi-A.A.E. em que todos os obstáculos combinados atuam na preservação dos produtos, o que pode ser visto em muitos embutidos alemães, e também em um produto lácteo indiano ("Paneer").

TABELA 2.2 - Valores de Aa em alguns alimentos de umidade intermediária tradicionais.

PRODUTOS	Aa
Geléia	0,82-0,85
Marmelada	0,75-0,86
Goiabada	0,63-0,80
Doce de Leite	0,73-0,84
Mel de Abelhas	0,53-0,69
Leite Condensado	0,84
Uva Passa	0,58-0,63
Ameixa Desidratada	0,70-0,82
Banana Passa	0,84-0,86
Suco Concentrado de Laranja	0,78
Chá Mate Queimado	0,65-0,80
Caldo Concentrado de Carne	0,50
Queijo Curado	0,92
Queijo Parmesão Ralado	0,66-0,69
Salsicha	0,94
Salame	0,84-0,89
Presunto Gordo	0,92-0,95
Presunto (seco)	0,83

Fonte: CIFUENTES (1987), QUAST & TEIXEIRA NETO (1975)

2.2.1. Histórico

O uso dos métodos combinados não significa um novo processo como apontado por CHIRIFE et alii (1991) em seu estudo da mumificação no antigo Egito. Segundo estes autores, a técnica de fazer múmia embalsamada, utilizava pelo menos três tipos de obstáculos: redução de Aa (0,72), aumento de pH (10,6) e o uso de conservadores (especiarias e plantas aromáticas). Assim sendo, a aplicação dos métodos combinados usados para a preservação tem longa história.

O princípio básico de redução de Aa para prolongar a vida-de-prateleira dos alimentos tem sido praticado há milhares de anos. Referências podem ser encontradas na Bíblia e nos antigos registros ao longo da história. As primeiras técnicas envolveram a secagem ao sol ou aquecimento das carnes sobre o fogo, de modo a reduzir o conteúdo de água como praticado pelos homens pré-históricos. Os Incas, da América do Sul, desenvolveram um produto chamado chuño que era uma batata desidratada por um processo que envolvia o congelamento, prensagem e secagem ao sol. As civilizações do antigo Mediterrâneo usavam o sal para preservar carnes e peixes, como mostrado nos hieróglifos egípcios. Este é o primeiro caso de redução de Aa pela adição de soluto ao invés da remoção de água. Este mesmo princípio foi utilizado na adição de açúcar para preservar frutas na forma de geléias ou geleadas, embora neste caso em particular, uma parte da água é removida pela evaporação (TAOUKIS et alii, 1988).

Nas mais diversas regiões do mundo e nos mais distintos períodos da história vamos encontrar exemplos de alimentos preservados pelo uso de métodos combinados. No entanto, as guerras, expedições militares, viagens de longa duração ou espaciais, etc., contribuíram efetivamente para o avanço desta técnica. Isto pode ser comprovado pelos inúmeros tipos de produtos comercializados atualmente baseados nesta técnica de preservação e pela renovada atenção dos pesquisadores e principalmente dos laboratórios de desenvolvimento de produtos das próprias indústrias de alimentos e de ração animal que tem patenteado diferentes formulações.

O primeiro passo para o avanço da tecnologia dos alimentos de umidade intermediária nos Estados Unidos foi dado pela formulação de rações especiais para cães e gatos ("pet food") que impulsionou o desenvolvimento de vários tipos de produtos aquecendo este mercado (HOLLAND, 1986).

Muitos alimentos de umidade intermediária (A.U.I.) foram utilizados nos vôos espaciais - Programa Gemini e Apollo. O primeiro alimento sólido consumido na Lua foi um A.U.I.. Era uma barra gelatina-fruta-açúcar que podia ser consumida diretamente dentro da vestimenta espacial sem a necessidade de manipulação pelas mãos. Este item supria a necessidade de energia sem aumentar a sede. Outros produtos como bolo de frutas, geléias, frutas desidratadas, porções de bacon, frutas cristalizadas e petiscos todos de umidade intermediária, faziam parte da alimentação de bordo do módulo lunar (KAREL, 1976).

Mais recentemente, o brasileiro Amyr Klink cruzou o Atlântico em cem dias em um barco a remo especialmente projetado para tal evento. A sua alimentação foi cuidadosamente planejada para evitar distúrbios intestinais e fornecer todo o aporte nutricional para a manutenção do navegador. A grande maioria dos cardápios eram de produtos desidratados, embalados em condições adequadas para que pudessem manter a qualidade do produto, mesmo em condições adversas. Os produtos foram projetados para serem cozidos em água do mar, com o objetivo de minimizar o consumo de água potável (VITALI, 1987).

2.2.2. Influência na América Latina e no Brasil

Durante um período de quatro anos foi desenvolvido nos países Iberoamericanos (Argentina, Brasil, Costa Rica, Chile, Cuba, México, Porto Rico, Nicaragua, Uruguai e Venezuela) e Espanha, dentro programa CYTED-D (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo, V Centenário) o projeto de alimentos de umidade intermediária e tecnologia de métodos combinados que envolveu a participação de sessenta centros de pesquisa destes países (AGUILERA & PARADA-ARIAS, 1992; AGUILERA et alii, 1993; PARADA-ARIAS, 1994).

Segundo PARADA-ARIAS (1992), do ponto de vista técnico o programa compreendeu a realização de atividades que permitiram avançar na identificação e caracterização físico-química dos alimentos de umidade intermediária, no desenvolvimento de conhecimento básico (predição e determinação da atividade de água, normalização de estudos de referência, eficiência dos equipamentos, modelos de predição, reações de deterioração e inibição de crescimento microbiano) e desenvolvimento de processos e produtos (caracterização de materiais, formulação,

operações de conservação e complementares, envase, armazenamento, métodos de controle, mudança de escala de laboratório para planta piloto, desenho de equipamento e transferência de tecnologia).

Foram registrados duzentos e sessenta alimentos de umidade intermediária agrupados nas seguintes categorias: carnes, frutas e vegetais, pescado, produtos de panificação, leites e derivados e miscelânea. Os alimentos foram mencionados pela representatividade e não incluem todos os existentes na Iberoamérica. WELTI et alii (1994) cita estes produtos por categoria, alguns dos quais estão colocados a seguir:

- Carnes: presunto cru, presunto cozido, lingüiça, salsicha, charque, mortadela, salame, bacon, carne de porco salgada seca e patê de fígado;
- Pescado: anchovas na salmoura, anchovas em óleo, salmão defumado, truta defumada, enguia defumada, camarão desidratado, bacalhau e peixe salgado seco;
- Frutas e vegetais: picles, ketchup, molho de tomate, extrato de tomate, molho de pimenta, pasta de alho, melaço de cana, geléias de frutas (várias), frutas em pasta (várias), frutas desidratadas (várias), frutas em calda (várias) e frutas cristalizadas (várias);
- Produtos de panificação: pudim, pão francês, pão doce, pão de centeio, tortilha, bolos, bolo de chocolate e pão cilindrado;
- Leites e derivados: doce de leite (vários), leite condensado, queijo fresco, queijo defumado, queijo de cabra, queijo fundido e queijo curados;
- Miscelânea: margarina; maionese; molho de soja; molho para carnes, mel de abelhas, xarope de chocolate e xarope de cola.

A vida-de-prateleira e a estabilidade destes produtos são, de fato, o resultado da combinação de vários fatores, como sumarizado na Tabela 2.3, que apresenta as diferentes categorias de produtos e os fatores utilizados de forma mais relevantes na sua preservação.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos na Universidade Estadual de Campinas com a aplicação de métodos combinados. DOMINGUES (1977) desidratou salsicha tipo Frankfurt em salmoura (25% de solução saturada de NaCl) e manteve este produto 111 dias, à temperatura ambiente, utilizando embalagem a vácuo. O produto reidratado apresentou características organolépticas próximas a dos produtos tradicionais.

TABELA 2.3 - Principais fatores utilizados na Iberoamérica para a conservação dos alimentos tradicionais pela tecnologia dos métodos combinados, por categoria de produtos.

Produtos	Fatores						
	Aa	pH	F	t	def.	conserv.	flora C
Frutas e veg.	x	x	x	-	-	x	x
Carnes	x	x	x	-	x	x	x
Pescado	x	x	x	x	x	-	-
Leite e deriv.	x	x	x	x	-	x	x
Panificação	x	-	x	-	-	x	-
Miscelânea	x	x	x	-	-	x	-

Sendo: F= tratamento térmico brando; t= refrigeração branda; def= defumação; conserv=conservadores e Flora C= flora competitiva.

Fonte: AGUILERA & CHIRIFE (1994).

MORETTO (1981) trabalhou com músculo bovino semitendinosus em pedaços, fazendo a dessorção em soluções de sacarose, glicerol e glicose comercial. O produto foi estocado por 3 meses a 37°C e analisado a cada 15 dias. Durante a estocagem ocorreram certas mudanças indesejáveis que comprometeram as características organolépticas dos produtos como cor, sabor, suculência. A textura foi menos afetada e os produtos apresentaram estabilidade microbiológica. Este estudo concluiu também que a glicose de milho não é um umectante adequado para carne.

CIFUENTES (1987) desenvolveu salsicha com boas características sensoriais utilizando solução aquosa contendo glicerol (50%), cloreto de sódio (10%) e sorbato de potássio (Aa=0,83). O produto foi estável química e microbiologicamente por 105 dias, à temperatura ambiente, em embalagem a vácuo. Pela avaliação sensorial ficou evidenciada a necessidade da reidratação da salsicha em água pura durante 10 horas antes do consumo.

JARDIM (1991) mostrou ser possível conservar concentrado de tomate 29°Brix por um período superior a um ano, apenas com adição de ácido acético (0,1-2,5%) e cloreto de sódio (2,0-8,0%), ingredientes estes que certamente estarão presentes nos produtos a serem elaborados a partir deste extrato e que não afetarão o sabor dos produtos finais. O produto foi mantido à temperatura ambiente, em recipientes de vidro, não hermeticamente fechados. Durante o armazenamento houve um escurecimento na superfície do produto em relação a cor original dos concentrados de tomate que não excedeu a 2 cm de espessura.

AGUILERA & CHIRIFE (1994) citam, como orientação para futuros trabalhos com o uso da tecnologia de métodos combinados na América Latina, a pesquisa básica em produtos regionais, controle do crescimento microbiano a altas Aa e da estabilidade a temperaturas locais de estocagem (20-30°C), uso de maior número de obstáculos, utilização de depressores de Aa alternativos, a exploração dos efeitos antimicrobianos das especiarias, maior uso dos tratamentos térmicos brandos, embalagens alternativas (a vácuo, atmosfera modificada) e utilização dos modelos preditivos.

2.2.3. Obstáculos utilizados

A estabilidade e a segurança de muitos alimentos não é somente baseada na atividade de água, mas na combinação dos efeitos de vários fatores.

LEISTNER & GORRIS (1995) classificaram estes obstáculos em físicos, físico-químicos e microbiológicos, como exposto a seguir:

Obstáculos físicos: alta temperatura (esterilização, pasteurização e branqueamento), baixa temperatura (resfriamento e congelamento), radiação ultravioleta, radiação ionizante, energia eletromagnética (energia microondas, energia radiofrequência, pulsos de campos oscilatórios magnéticos e elétricos), inativação fotodinâmica, altas pressões, ultra-sonoterapia, filmes de embalagens (plásticos, multi-laminados e biofilmes), acondicionamento em atmosfera modificada (gás inerte, vácuo, vácuo moderado) e acondicionamento asséptico.

Obstáculos físico-químicos: baixa atividade de água, baixo pH, baixo potencial redox, sais, nitrito, nitrato, dióxido de carbono, oxigênio, ozônio, ácidos orgânicos, lactato, acetato, ácido ascórbico, sulfitos, defumação, glucano- α -lactona,

fosfatos, fenóis, agentes de tratamentos de superfície, etanol, propilenoglicol, produtos da reação de Maillard, condimentos e especiarias, enzimas e outros.

Obstáculos microbiológicos: flora competitiva, culturas protetivas, bacteriocinas e antibióticos.

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

2.2.4. Efeito dos obstáculos

Para cada tipo de alimento há certos obstáculos específicos que diferem em quantidade e intensidade que permitem a sua estabilidade e segurança. Estes obstáculos agem como barreiras de modo a impedir que os microrganismos encontrem condições favoráveis ao seu desenvolvimento e/ ou produção de toxinas. LEISTNER (1992 e 1994) explica de forma clara os efeitos dos obstáculos utilizando oito exemplos como mostrado na Figura 2.5.

O exemplo 1 ilustra o caso teórico em que todos os obstáculos tem a mesma intensidade, o que é muito raro de acontecer na prática. Este alimento contém seis obstáculos: alta temperatura de processamento (F), baixa temperatura durante a estocagem (t), atividade de água (Aa), acidez (pH), potencial redox (Eh) e conservadores (C). Os microrganismos presentes não podem saltar todos estes obstáculos, assim, o alimento é microbiologicamente estável e seguro.

O exemplo 2 é mais realista, pois os obstáculos apresentam diferentes intensidades. Os principais fatores para a estabilidade do produto são a Aa e os conservadores, enquanto que os outros fatores são menos importantes (pH, potencial redox e temperatura de estocagem). Estes cinco obstáculos são suficientes para inibir os tipos usuais de microrganismos e a carga microbiana de proporção mediana.

O exemplo 3, mostra uma situação de baixa contaminação inicial de microrganismos. Neste caso, há a possibilidade de limitar os obstáculos a Aa e t que agem mesmo quando utilizados de maneira não intensa e a estabilidade microbiológica

do produto fica assegurada. A embalagem asséptica de alimentos perecíveis é baseada neste princípio.

Por outro lado, no exemplo 4, temos uma situação de má condição de higiene na qual a contagem inicial de microrganismos indesejáveis é elevada. Esses microrganismos ultrapassam qualquer obstáculo existente estabelecendo-se um processo de deterioração ou possibilitando que este produto cause envenenamento alimentar.

O exemplo 5 mostra o "efeito trampolim", no qual o alto teor de nutrientes e vitaminas no alimento possibilita o desenvolvimento de microrganismos, obrigando os obstáculos a agirem mais intensamente para evitar esse crescimento.

A injúria subletal dos microrganismos através do cozimento que prejudica o seu desenvolvimento é ilustrada no exemplo 6. Mesmo que os esporos se tornem células vegetativas, os obstáculos promovem a estabilidade do produto sem a necessidade de serem utilizados intensamente.

Em alguns alimentos, como os embutidos fermentados, presuntos crus, e provavelmente nos queijos maturados, a estabilidade microbiológica é adquirida durante o processamento pela sequência dos obstáculos, como pode ser visto no exemplo 7. Uma importante etapa da confecção de salame é a adição de nitrito juntamente com os sais de cura. O nitrito inibe o crescimento de salmonela e de outras bactérias, enquanto permite a multiplicação de outras, que fazem com que o potencial redox diminua, aumentando assim o efeito do obstáculo Eh, que inibe microrganismos aeróbicos, favorecendo a seleção de flora competitiva, principalmente bactérias lácticas. Seu crescimento e atividade metabólica causa acidificação do produto e então aumenta o obstáculo pH. Isto é de particular importância para a estabilidade microbiana de salames de cura rápida que não são propriamente secos. Os obstáculos nitrito, Eh, flora competitiva e pH diminuem com o tempo, pois em salames curados o teor de nitrito e a contagem de bactérias lácticas diminuem, enquanto que o Eh e o pH aumentam novamente. Somente a Aa se mantém inalterada com o tempo e é este obstáculo o maior responsável pela estabilidade de embutidos fermentados com longo período de cura.

Finalmente, o exemplo 8 ilustra um importante fenômeno que merece uma atenção especial nos alimentos preservados por métodos combinados, que é o efeito sinérgico dos obstáculos além da sua ação aditiva na preservação. Um efeito sinérgico dos obstáculos é obtido se os diferentes fatores (por exemplo pH, Aa, Eh e conservadores) tem diferentes alvos dentro da célula microbiana, causando um distúrbio no equilíbrio interno. Isto pode afetar a esporulação, liberação de toxinas e a multiplicação destes microrganismos. Assim, o emprego de diferentes obstáculos na preservação pode ser vantajoso, pois em condições mais brandas de cada obstáculo a estabilidade microbiana pode ser assegurada.

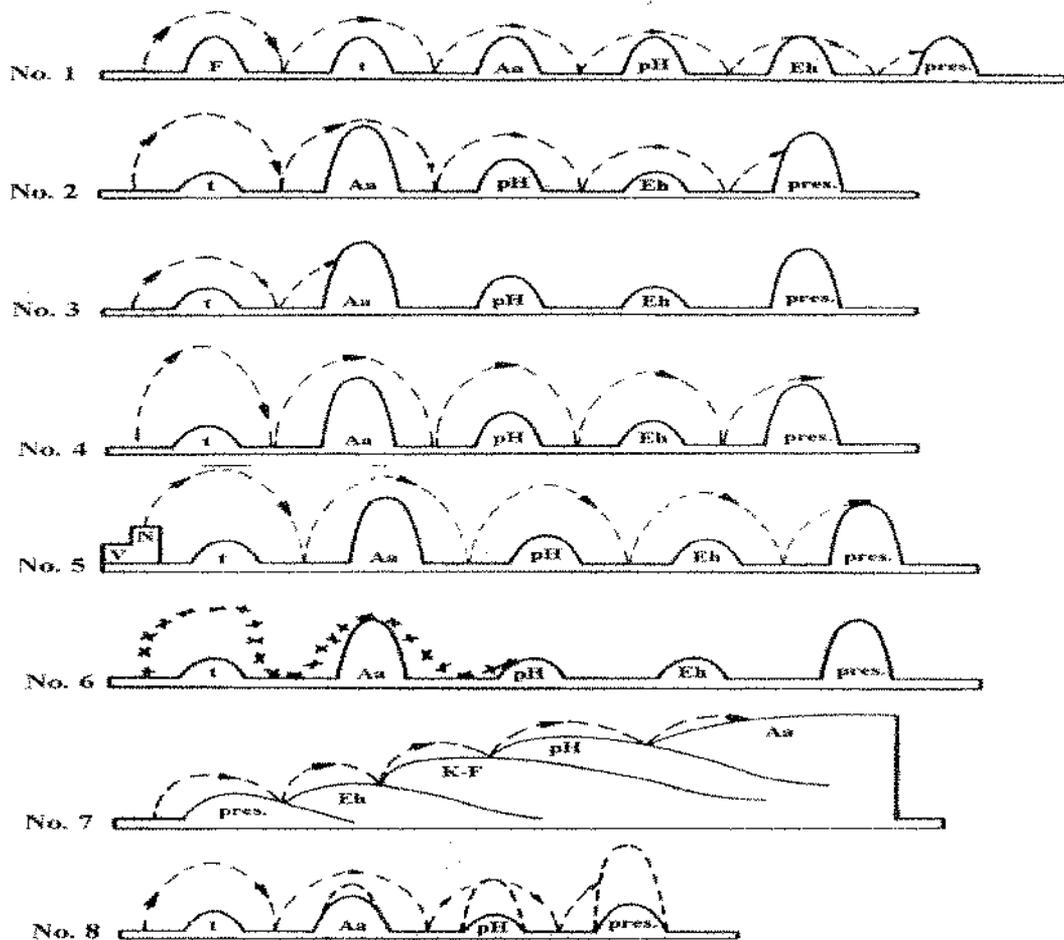


FIGURA 2.5 - Ilustração do efeito dos obstáculos usando oito exemplos. Sendo: F = tratamento térmico; t = baixa temperatura ou resfriamento; Aa = atividade de água; pH=acidificação; Eh = potencial redox; pres.= conservadores; K-F = flora competitiva; V= vitaminas e N = nutrientes.

Fonte: LEISTNER (1992, 1994).

Segundo LEISTNER (1992) o controle de alimentos pode ser baseado no efeito físico-químico dos obstáculos avaliando os resultados por computador. Esta aproximação poderia dar respostas mais rápidas e algumas vezes mais realistas da estabilidade e segurança de um alimento do que a investigação microbiológica. A teoria dos obstáculos usada para o controle de alimentos pode ser vista como um precursor da microbiologia preditiva.

Alguns obstáculos (por exemplo, produtos da reação de Maillard) influenciam a segurança assim como a qualidade dos alimentos, pois possuem propriedades antimicrobianas que, ao mesmo tempo, melhoram o aroma dos produtos, o que também se aplica ao nitrito utilizado em carnes curadas. Os possíveis obstáculos em alimentos podem influenciar a estabilidade e a segurança tanto quanto as propriedades sensoriais, nutritivas, tecnológicas e econômicas do produto. Dependendo da intensidade de aplicação de um obstáculo, este pode ter um efeito positivo ou negativo para a qualidade global do produto. Por exemplo, o resfriamento a temperaturas inadequadas irá causar danos na qualidade de frutas (injúria pelo frio), enquanto que o resfriamento em temperaturas adequadas é benéfico. Outro exemplo é o pH de embutidos fermentados que devem ser baixos o suficiente para inibir as bactérias patogênicas, mas não tão baixos a ponto de comprometer o sabor. Para assegurar a qualidade total dos alimentos, os obstáculos devem ser mantidos numa faixa ótima de tal forma, que sejam consideradas conjuntamente a segurança e a qualidade do produto (LEISTNER, 1995).

2.2.5. Benefícios e limitações do uso dos métodos combinados

O renovado interesse no uso dos métodos combinados é em parte devido ao interesse do consumidor em alimentos menos severamente processados, com reduzida presença de aditivos, mais naturais, mais saudáveis, mas convenientemente conservados (GOULD & JONES, 1989).

HOLLAND (1986) cita os seguintes benefícios de um alimento de umidade intermediária:

- perda reduzida do produto como um resultado da estabilidade microbiológica e bioquímica;

- aumento da segurança do produto;
- aumento da vida-de-prateleira (estocagem sem o uso de condições especiais de estocagem);
- economicamente competitivo no consumo de energia (em comparação ao processamento térmico tradicional, refrigeração, congelamento, secagem);
- retenção de textura macia e úmida (prontos para o consumo);
- redução do peso do produto e menor compactação;
- qualidade nutricional consistente (permite o fácil ajuste dos nutrientes e fortificação);
- conveniência;
- apelo organoléptico através de novas texturas e sabores.
- econômico, através do uso de novos ingredientes e tradicionais subprodutos.

Além destes benefícios, JARDIM (1996) cita outras vantagens da teoria dos obstáculos como: armazenamento a granel de frutas e hortaliças para uso na entressafra e redução da quantidade de conservadores químicos, como por exemplo, o nitrito em carnes.

Nos anos 60 houve bem sucedidas formulações para rações de animais de estimação ("pet foods"). O segredo deste sucesso foi a segurança, valor nutricional e conveniência alcançadas nestes produtos. No entanto, devido ao alto teor de açúcares e algumas limitações na textura e sabor, esta tecnologia não tem sido sofisticada o suficiente para satisfazer ao paladar humano (HOLLAND, 1986).

A tecnologia de aplicação direta de solutos aos produtos para humanos não tem sido fácil como comenta TAOUKIS et alii (1988), devido principalmente a incompatibilidade entre o sabor dos alimentos e dos depressores de Aa utilizados (a doçura da sacarose, a salgadura do cloreto de sódio e o sabor metálico do glicerol).

Para satisfazer os requerimentos da textura tem sido testada a tecnologia de infusão, que consiste basicamente na imersão dos alimentos secos ou úmidos em uma

solução contendo vários solutos, não implicando na moagem e mistura dos produtos como uma massa, a fim de preservar a textura. Isto foi testado pela Marinha e Aeronáutica americana em alimentos para situações emergenciais como em situações de combate. Nestes testes, os alimentos de infusão úmida foram mais fáceis e mais baratos de se produzir, no entanto, possuem os mesmos problemas em relação ao sabor dos outros moídos e misturados. O método de infusão a seco requer o uso de liofilização para uma textura final satisfatória. Os produtos são inicialmente liofilizados e posteriormente colocados na infusão. Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou uma solução de infusão contendo: 5-10% de glicerol, 5% de gelatina e 3% de sorbitol, tendo o produto seco 7-12% de gordura (TAOUKIS et alii, 1988).

Segundo CAL-VIDAL (1981), a lista de substâncias depressoras de atividade de água já é bastante grande, mas continua o desafio de se encontrarem solutos que cumpram tal finalidade, sem contudo, afetar substancialmente as características organolépticas do alimento.

2.2.6. Exemplos de utilização

Diversos trabalhos usando métodos combinados tem sido realizados nos mais diversos países do mundo, utilizando os mais variados produtos. Há várias citações na literatura sobre a aplicação de métodos combinados para produtos cárneos (LEISTNER, 1994) e produtos lácteos e de pescado (CYTED-D PROGRAM, 1991). A Tabela 2.4, resume alguns trabalhos para tipos diversos de produtos.

Na área de frutas há uma razoável quantidade de trabalhos já efetuados principalmente em países como a Índia (JAYARAMAN, 1988) e nas Américas (CYTED-D PROGRAM, 1991). Estes produtos tem um potencial de mercado muito grande principalmente devido a sua melhor retenção do sabor e textura originais quando comparados aos produtos secos, estabilidade à temperatura ambiente e aos novos requerimentos dos produtos minimamente processados (AHVENAINEN, 1996).

Os principais obstáculos que tem sido largamente utilizados nestes produtos são o controle de Aa, pH e uso de conservadores. ALZAMORA et alii (1993) cita dez produtos de frutas que foram desenvolvidos através do Programa do CYTED (Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento, V Centenário) utilizando a combinação de

tratamento térmico brando (branqueamento), pequena redução de Aa (0,92-0,97), redução de pH e a adição de conservadores (sorbato de potássio, benzoato de sódio e sulfitos). Estes produtos constituíam-se basicamente de frutas em pedaços ou metades (pêssegos, manga, mamão e abacaxi) e purês (manga e banana) e apresentaram estabilidade de 3 a 8 meses, a temperaturas de 25 a 35 °C, de acordo com cada produto.

TABELA 2.4 - Alguns estudos recentes realizados com aplicação de métodos combinados para produtos alimentícios.

Produto	Obstáculo	Referência
Soro de queijo concentrado (50% de sólidos totais) - 3 meses de estocagem sem refrigeração	Aa=0,90, pH=5,0, 0,2% sorbato de potássio ou 0,2% propionato de cálcio (ou 0,1% de cada conservador)	LEIRAS et alii (1991)
Cenoura em cubos (1 cm)	xarope de amido hidrolis. 70°B, 3% NaCl, 3% etanol (1:5, 20°C, 300 h)	SEVERINI et alii (1993)
Maças em fatias (evitar escurecimento) - 32 dias de estocagem à 25°C.	osmose com sol. de sacarose, por 10 horas, contendo 200 ppm de 4-hexilresorcinol e 0,2% de ác. ascórbico	MONSALVE-GONZÁLES et alii (1995)
Snack de peixe (estável)	extrusão, secagem, Aa=0,90, pH 5,2, umidade 30%	KARMAS & LAUBER, (1987)
Molho para salada	ajuste de pH e Aa com vinagre açúcar e sal	MEYER et alii (1989)
Misto de legumes e cereal (A.U.I)	coz, óleos/gord, depres, sal, ác, flav e cons, Aa=0,65-0,87; pH=4,0-6,0, umid 20-45%	LUSAS & GUZMAN (1994)
Sardinhas 15 dias/15°C	6% sal, 0,2% sorbato; pH=5,7; trat. térmico 80°C/10 min	AGUILERA et alii (1992).
Bolo + 6 meses a 23°C	Aa=0,85, atmosfera modificada várias combinações de CO ₂ , N ₂ e O ₂	POTIER et alii (1989)

Os primeiros trabalhos elaborados com frutas com a utilização de métodos combinados utilizaram condições bastante seguras e pouco otimizadas. JAYARAMAN et alii (1975) desenvolveram um produto de abacaxi de umidade intermediária que continha 34,8% de umidade, 24% de sacarose, 38,2% de glicerol, 0,2% de sorbato de potássio e 260 ppm de SO₂, com uma Aa de 0,79, suficiente para prevenir o crescimento de bactérias, enquanto que os bolores e leveduras são inibidos pelo sorbato de potássio. O produto obtido foi estável microbiologicamente por seis meses a 0°C e à temperatura ambiente e por quatro meses a 37°C.

JAYARAMAN et alii (1974) formularam um produto de goiaba em fatias de umidade intermediária contendo 36% de umidade, 38,45% de glicerol, 16,1% sacarose; 0,196% sorbato de potássio e Aa de 0,75. O produto foi enlatado a frio e manteve suas características de aceitabilidade após seis meses de armazenamento a 0°C e à temperatura ambiente (25-30°C). O produto foi estável microbiologicamente e apresentou um ligeiro escurecimento não enzimico nas amostras estocadas à temperatura ambiente.

Em termos práticos, muitos destes produtos utilizavam glicerol e propileno glicol como depressores de Aa que geralmente causam efeitos negativos no sabor (excesso de doçura, amargor e sensação de ardência) como destacado pelo próprio JAYARAMAN (1988) e reduziam drasticamente a Aa. A tendência atual é reduzir ligeiramente a Aa, apenas até os níveis necessários e compensar esta deficiência com a introdução de outros obstáculos.

ALZAMORA et alii (1989) estudaram o armazenamento não refrigerado de abacaxi em pedaços. O produto foi equilibrado com xarope de glicose (concentração de 39,76% de glicose p/p), ácido fosfórico, sorbato de potássio (1.000 ppm), bissulfito de sódio (150 ppm) e tratado brandamente pelo calor. O produto final tinha Aa de 0,97 e pH de 3,1 e foi estável sensorial e microbiologicamente por quatro meses a 27°C.

SILVIA FALCÓ et alii (1993) elaboraram doce em massa (62,5°Brix) a base de resíduos de morangos e sacarose, em embalagens não herméticas que se mostrou estável por 3 meses, química e microbiologicamente usando os seguintes obstáculos: Aa=0,87, pH=3,7 e sorbato de potássio 500 ppm.

LÓPEZ-MALO et alii (1994) conservaram mamão em pedaços por até 5 meses a 5 e 25°C procedendo um tratamento térmico inicial brando (branqueamento), reduzindo a Aa (0,96) com adição de sacarose, decrescendo o pH até 3,5 pela adição de ácido cítrico e adicionando como conservadores o sorbato de potássio (1510 ppm) e bissulfito de sódio (165 ppm). O produto teve boas características químicas, sensoriais e microbiológicas ao final do período de estocagem.

GUERRERO et alii (1994), desenvolveram polpa de banana estável microbiologicamente por 120 dias, à temperatura ambiente pela combinação de Aa (0,97- utilizando glicose), pH=3,4 (ácido orto-fosfórico), adição de 250 ppm ácido ascórbico, 100 ppm de sorbato de potássio e 400 ppm de bissulfito de sódio. O produto obtido foi organolepticamente aceitável.

2.3. ATIVIDADE DE ÁGUA (Aa)

2.3.1. Conceito de Aa

A atividade de água é uma das propriedades mais importantes para o processamento, conservação e armazenamento de alimentos. Ela quantifica o grau de ligação da água contida no produto e conseqüentemente sua disponibilidade para agir como um solvente e participar das transformações químicas, bioquímicas e microbiológicas (LABUZA, 1977).

Termodinamicamente, a atividade está dada pela relação de fugacidade e não pelas relações de pressão de vapor, porém nas pressões normalmente encontradas em alimentos, a fugacidade é essencialmente igual a pressão de vapor e a fugacidade no estado padrão é a pressão de vapor da água pura à temperatura do sistema (ERICKSON, 1982).

A definição dada por LABUZA (1977) é expressa pela seguinte relação:

$$Aa = \frac{P}{P_0} = \frac{\text{Pressão vapor de água em equilíbrio sobre o alimento}}{\text{Pressão de vapor da água pura}}$$

Segundo CHRISTIAN (1980) para uma solução ideal, a Aa pode ser descrita pela Lei de Raoult, isto é, quando um soluto é dissolvido em água, por causa da competição pelas moléculas deste solvente, a pressão relativa de vapor de água é

obtida pela relação entre o número de moles de água e a soma dos moles de água e soluto, ou seja:

$$Aa = \frac{P}{P_0} = \frac{n_{\text{água}}}{n_{\text{água}} + n_{\text{soluto}}}$$

Para as soluções não ideais, BOBBIO & BOBBIO (1984) afirmam que as interações entre as moléculas presentes bem como a dissociação do soluto causam um desvio considerável no valor da atividade de água calculada pela Lei de Raoult. A medida deste valor baseia-se no fato de que a pressão do vapor de água sobre um alimento após atingir o equilíbrio a uma certa temperatura, corresponde à porcentagem de umidade relativa de equilíbrio (URE) do alimento. A atividade de água será, então, igual a URE e, comumente é escrita como:

$$Aa = \frac{URE}{100}$$

O valor máximo da atividade de água é 1, na água pura. Em concordância com este fato, a Aa de uma solução ou de um alimento é sempre inferior a unidade.

2.3.2. Estimativa teórica da Aa em alimentos.

Numerosos processos de preservação de alimentos se baseiam na redução da atividade de água as quais ocorrem devido a transferência de matéria (água) de uma fase de alto potencial químico para uma de menor potencial até que o equilíbrio seja atingido (FRANKS, 1991).

Segundo CHIRIFE (1987), o primeiro passo para prever a Aa de um alimento fresco ou processado consiste em conhecer quais são os seus principais constituintes e suas proporções relativas com respeito a água contida nestes alimentos.

CHIRIFE & FERRO FONTÁN (1982) calcularam a Aa de uma grande quantidade de frutas, vegetais e carnes e verificaram que elas estão na faixa de 0,970-0,996.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de estimar a A_a de soluções simples ou mistura de multicomponentes por modelos matemáticos teóricos ou semi-empíricos. As equações que descrevem as situações binárias de não eletrólitos e a de multicomponentes são os modelos propostos por NORRISH (1966) e ROSS (1975).

NORRISH (1966) propôs uma equação simples para estimar A_a de soluções aquosas com açúcares e polióis, que pode ser escrita da seguinte forma:

$$A_a = x_1 \exp(-k x_2^2)$$

onde x_1 e x_2 são as frações molar da água e do soluto respectivamente e k é a constante de interação. CHIRIFE et alii (1980 e 1982) comprovaram a validade desta equação e a sua aplicabilidade para alimentos de umidade intermediária.

CHIRIFE et alii (1980) determinam os melhores valores para a constante k aplicando a equação de Norrish para vários não eletrólitos. Os valores para alguns polióis e açúcares estão relacionados na Tabela 2. 5. Observa-se que o valor da constante k depende do tamanho da molécula e no caso dos polióis, também do número de grupos -OH.

TABELA 2. 5 - Valores da constante de interação (k) para açúcares e polióis.

Não eletrólito	k
Açúcares:	
. Sacarose	6,47
. Maltose	4,54
. Glicose	2,25
. Xilose	1,54
Polióis	
. Sorbitol	1,65
. Eritritol	1,34
. Glicerol	1,16
. Manitol	0,906

Fonte: CHIRIFE et alii (1980).

ROSS (1975) analisando equações anteriormente propostas e dados experimentais propôs a seguinte equação para descrever as situações em que mais de um componente estão em solução:

$$Aa = (Aa)_1 \cdot (Aa)_2 \cdot (Aa)_3 \dots$$

Esta equação significa que a atividade de água de uma solução complexa pode ser calculada simplesmente pelo produto dos valores de atividade de água das soluções aquosas de cada componente, medidas na mesma concentração utilizada para produzir a solução multicomponente (CHIRIFE, 1987). A validade desta equação foi estudada detalhadamente por CHIRIFE et alii (1980) que concluíram ser possível calcular com razoável exatidão a atividade de água em misturas multicomponentes com solutos de interesse para a preservação de alimentos, tais como sais inorgânicos, açúcares e polióis.

2.3.3. Aa e as reações químicas e enzimáticas

A água é um dos principais componentes da maioria dos alimentos e pode exercer diversas funções importantes para as suas características físicas e químicas, tais como: solvente, componente adsorvido, plastificante e reagente, como descrito por QUAST & TEIXEIRA NETO (1975).

A velocidade de algumas transformações químicas e enzimáticas, como função da Aa do alimento, foram demonstradas esquematicamente por LABUZA (1977) e estão apresentadas na Figura 2.6. Observa-se que para valores baixos de Aa ($Aa < 0,4$) a água está fortemente ligada e geralmente não disponível para as reações deteriorantes, com exceção da oxidação química dos lipídios que é fortemente incrementada em valores de $Aa < 0,2$ (maior exposição dos grupos reativos). Para valores de $Aa > 0,6$ pequenas alterações na Aa correspondem na maioria dos casos a um aumento considerável na velocidade de algumas destas transformações. Com relação ao crescimento de microrganismos, observa-se que em geral os bolores são mais tolerantes a um decréscimo da Aa do que as leveduras e estas mais que as bactérias.

Segundo RUSSO (1994) as alterações alimentares nem sempre são previsíveis apenas mediante o conhecimento do valor da Aa. Podem influir outros

fatores como o tipo do soluto, transição de fase tipo amorfo-cristalino, com conseqüente aumento da atividade de água e a heterogeneidade do substrato. A presença do estado vítreo, que é um estado de altíssima viscosidade e baixíssima mobilidade, pode prevenir o crescimento microbiano mediante a restrição da difusão do produto final e seus nutrientes para dentro da célula microbiana e vice-versa. Tal estado não é descrito pela Aa termodinâmica pois é um processo de natureza cinética. Assim, temos atualmente dois pontos de vista com relação a forma de ligação da água presente nos alimentos, que estão resumidamente descritos na Figura 2.7.

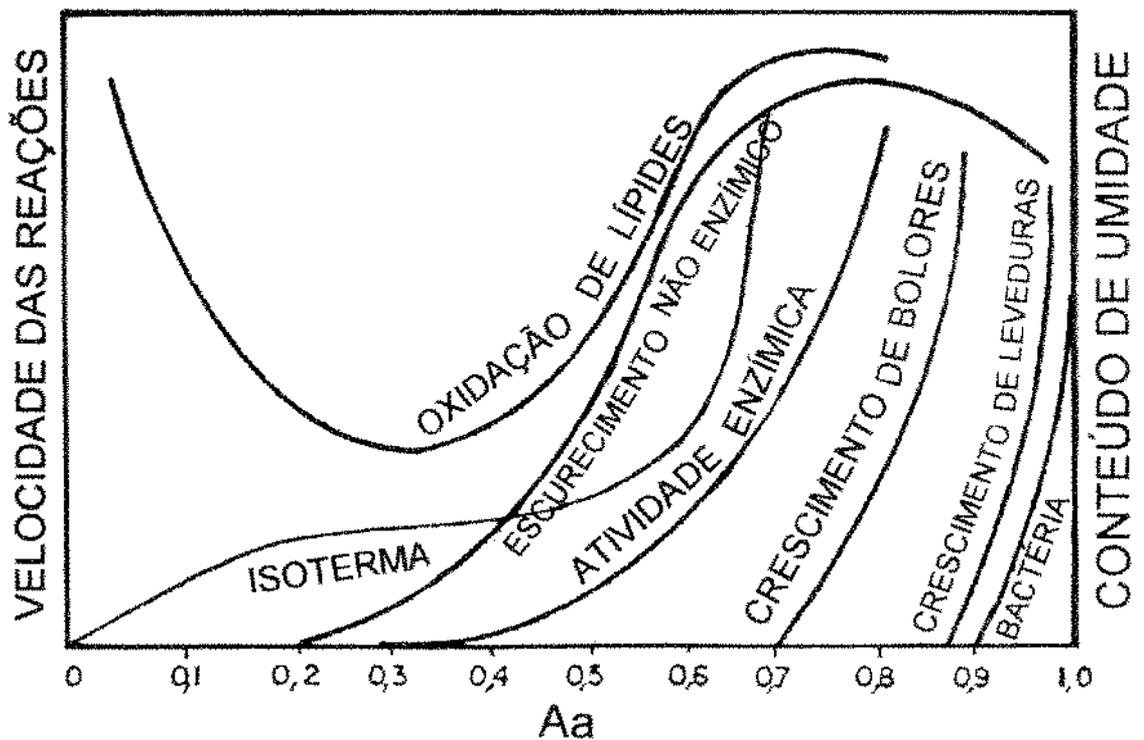


FIGURA 2.6 - Velocidade relativa de reações e de crescimento de microrganismos em função da atividade de água.

Fonte: LABUZA (1977).

Teoria de Aa	Estudos Atuais
a água disponível para as reações degratativas é a não ligada.	a água disponível está relacionada com a mobilidade da água (velocidade de difusão) no sistema alimentar.
ÁGUA FORTEMENTE LIGADA:	A MOLÉCULA DE ÁGUA NÃO É ENERGETICAMENTE LIGADA AO SOLUTO.
<ul style="list-style-type: none"> - constituição (faz parte do soluto) - está ao redor do soluto. Fortemente ligada aos grupos ionizáveis (NH₃⁺, COO⁻). Esfera de hidratação ao redor dos grupos ionizáveis. Associada a proteínas, pectinas e outros. Ligações ion-dipolo; dipolo-dipolo. Esta água não atua como solvente e não é congelável a -40°C. Sua mobilidade não é impedida. 	<ul style="list-style-type: none"> - as ligações são fortes do tipo H₂O-H₂O - a molécula de água é ligada ao sítio polar pelas ligações -H e em via transitória. Interação dinâmica. - mobilidade restrita ao efeito da alta viscosidade. Estado vítreo pode estar presente.
ÁGUA LIGADA:	
<ul style="list-style-type: none"> - ligada com o soluto: água-soluto, água-água, ligações de hidrôgenio. Permite a solubilidade e mobilidade do soluto. Aumento da reatividade. A solubilidade do soluto está baseada na Lei de Raoult. 	<ul style="list-style-type: none"> - a molécula de água em solução não está geometricamente estática, mas em continuo movimento dinâmico.
ÁGUA LIVRE:	
<ul style="list-style-type: none"> - pode formar soluções - interporlar: no gel e nos sistemas celulares 	<ul style="list-style-type: none"> - a temperatura de transição vítrea, T_g, aumenta a fluidez do sistema. A velocidade das reações degratativas aumentam de diversas ordens de grandeza.

FIGURA 2.7 - Duas interpretações das interações de água-soluto.

Fonte: RUSSO (1994).

2.3.4. Aa e a estabilidade microbiológica

O desenvolvimento microbiano nos alimentos é condicionado por diversos fatores ambientais, como temperatura, umidade relativa, denominados extrínsecos e por

fatores intrínsecos, sendo os principais a atividade de água, pH, potencial redox e composição do alimento (LEITÃO, 1987).

Segundo GRIJSPAARDT-VINK (1994) um fenômeno crucial na tecnologia de obstáculos é a homeostase dos microrganismos. Homeostase é a constante tendência dos microrganismos a manterem a estabilidade e o balanço uniforme do seu ambiente interno. Por exemplo, os conservadores funcionam como um obstáculo que podem causar distúrbios em um ou mais mecanismos homeostáticos, fazendo com que o microrganismo não se multiplique, tornando-o inativo e em alguns casos provocando a sua morte. De fato, a preservação dos alimentos é alcançada pelo distúrbio da homeostase dos microrganismos e a melhor maneira para fazer isto é alterando, deliberadamente, vários mecanismos homeostáticos simultaneamente. Esta maneira multidirecionada de causar distúrbios é a essência dos métodos combinados. Utilizar vários fatores menos intensamente e em conjunto pode ser mais efetivo do que a utilização de um só obstáculo, pois estes obstáculos poderão agir não apenas aditivamente mas também de maneira sinérgica, resultando na estabilidade do produto com menores efeitos negativos à sua qualidade.

A combinação dos obstáculos permite o controle microbiológico em valores altos de Aa, com o uso de pequenas quantidade de depressores. A Tabela 2.6 mostra que a redução até o valor de Aa=0,91, inibe a grande maioria dos patógenos com exceção do *Staphylococcus aureus*, aeróbio. Se, por exemplo, é desejado o valor de Aa=0,93 em um produto, tem-se um grande número de patógenos eliminados e os demais podem ser inibidos usando outros obstáculos como pH, conservadores, potencial redox, tratamento térmico brando em embalagem hermética, etc.

Todos os microrganismos tem uma Aa mínima de desenvolvimento. De modo geral, as bactérias são mais exigentes que os bolores e as leveduras, só se desenvolvendo em meios com atividade de água elevada. Muitas bactérias não se desenvolvem em Aa menores que 0,91 e muitos bolores não se multiplicam em Aa inferiores a 0,80. Alguns bolores xerófilos tem sido relatados como se desenvolvendo em Aa de 0,65. Em geral considera-se 0,60 como o limite mínimo para o desenvolvimento de microrganismos (UBOLDI EIROA, 1996). A Tabela 2.7 apresenta valores de Aa mínimos de desenvolvimento de alguns microrganismos em condições

ótimas, estes valores podem ser alterados se forem utilizados outros substratos ou outras cepas específicas mais ou menos resistentes.

Na sua maioria os bolores são aeróbios obrigatórios e mesófilos, apresentam baixa resistência térmica de forma que em produtos pasteurizados sua presença é facilmente evitada. (LEITÃO, 1991). Felizmente como tem sido relatado na literatura, a produção de micotoxinas se dá em valores de Aa sempre mais elevados do que para o crescimento dos bolores, por exemplo, para o caso do *Penicillium viridicatum* que produz as toxinas ocratoxina e citrinina a Aa mínima para o seu crescimento é de 0,81 e para a produção destas toxinas de 0,85 e 0,90 respectivamente (JARVIS, 1976, LEISTNER et alii, 1981).

TABELA 2.6 - Valores mínimos de Aa para o desenvolvimento de alguns microrganismos patogênicos (nas condições ideais de pH e temperatura).

PATÓGENO	Aa
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,990
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,970
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	0,970
<i>Shigella</i> spp	0,960
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,960
<i>Clostridium botulinum</i> tipo G	0,965
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A,B	0,945
<i>Clostridium perfringens</i>	0,950
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	0,940
<i>Salmonella</i> spp	0,940
<i>Escherichia coli</i>	0,935
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,930
<i>Bacillus cereus</i>	0,930
<i>Bacillus subtilis</i>	0,910
<i>Staphylococcus aureus</i> (anaeróbio)	0,910
<i>Staphylococcus aureus</i> (aeróbio)	0,860

Fonte: CHIRIFE & FAVETO (1992)

TABELA 2.7 - Aa mínima para a multiplicação de microrganismos associados com alimentos.

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

^a algumas espécies; (1) *Clostridium botulinum* tipo C; (2) *Clostridium botulinum* tipo E e algumas espécies de *Clostridium perfringens*; (3) *Clostridium botulinum* tipo A e B e *Clostridium perfringens*; (4) anaeróbico; (5) aeróbico.

Fonte: LEISTNER & RÖDEL (1976).

Devido a baixa resistência térmica das leveduras, estas raramente estão associadas com processos de deterioração. Sua presença, no entanto, pode ser constatada em produtos nos quais a conservação se baseia na elevação da acidez ou no abaixamento da atividade de água ao invés do tratamento térmico (LEITÃO, 1991).

BREKKE et alii (1970) afirma que maioria dos microorganismos isolados de purê de goiaba recém preparado se constituem de leveduras, do restante, 25% eram bactérias e 5% bolores. Estes autores comprovaram que o purê concentrado demora mais tempo para se deteriorar do que o não concentrado à mesma temperatura. A análise dos purês deteriorados revelou que as leveduras são as causadoras desta deterioração e o único grupo de microorganismos detectados. Os sinais evidentes desta deterioração foram notados nas concentrações de leveduras da ordem de 10^5 a 10^6 células por ml.

TANDON et alii (1983) afirma que a maioria dos fungos isolados de polpa de goiaba tratada quimicamente se constituíram de *Alternaria sp*, *Helminthosporium sp*, *Candida sp*, *Kloeckera sp* e *Saccharomyces*. Estes autores detectaram contagens na polpa fresca de duas variedades diferentes da ordem de 10^4 UFC/g para as leveduras e 10^2 - 10^3 UFC/g para os bolores.

BEUCHAT & NAIL (1985) comparam alguns meios para enumeração de fungos em polpas de frutas. As contagens das polpas frescas variam de 10^3 - 10^6 UFC/g, dependendo da fruta analisada.

GARZA et alii (1994) estudaram a microflora presente em purês de pêssego durante diferentes fases do processo de produção e detectaram que as espécies predominantes foram os *Bacillus badius*, *Penicillium sp* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que a *S. cerevisiae* foi o mais importante microorganismo deteriorador e que as leveduras estavam presentes em 100% dos purês deteriorados em contagens de 10^7 UFC/g. Os *Bacillus* foram detectados principalmente no purês frescos, nos pasteurizados a incidência de bactérias de maneira geral foi muito baixa. Alguns exemplos dos microorganismos isolados tanto no purê fresco como pasteurizado e deteriorado são: *Bacillus brevis*, *B. megaterium*, *B. badius*, *Micrococcus luteus*, *Leuconostoc*

Cladosporium sp, *Alternaria sp*, *Fusarium sp*, *Candida kefir*, *Candida coliculosa*, *Candida magnoliae* e *Kloeckera apiculata*.

NOTERMANS et alii (1993) sugerem que ao se trabalhar com inoculação de microrganismos para verificar a segurança e estabilidade de um produto o tamanho do inóculo utilizado deve ser realista levando em consideração os efeitos do processamento sobre os microrganismos, a possibilidade da recontaminação do produto após o processamento e as especificações microbiológicas para o produto que se está trabalhando.

O crescimento da maioria das bactérias e fungos está concentrada em valores de Aa acima de 0,90, porém os microrganismos de maior importância na preservação dos alimentos incluem aqueles que podem crescer em valores de baixa Aa ou de alta concentração de solutos que são conhecidos como halófilos, xerófilos e osmófilos. Os halófilos, geralmente bactérias, requerem certas concentrações de cloreto de sódio para o seu crescimento. Os xerófilos, leveduras e fungos, são aqueles que podem crescer mais rapidamente sob condições drásticas, ou seja, de $Aa < 0,85$ e os osmófilos são aqueles capazes de crescer em altas pressões osmóticas, muitas vezes referem-se as leveduras que são tolerantes ao açúcar e é utilizada como sinônimo de xerófila (CHRISTIAN, 1980).

Segundo WARTH (1986) as principais leveduras associadas a deterioração de produtos ácidos são *Zygosaccharomyces rouxii*, *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Torulopsis spp*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida krusei*, *Brettanomyces spp* e *Schizosaccharomyces pombe*. TOKUOKA & ISHITANI (1991) determinaram a Aa mínima de crescimento em quatro tipos diferentes de solutos (glicose, frutose, sacarose e cloreto de sódio) utilizados para reduzir a Aa para 35 espécies de leveduras isoladas de alimentos com altas concentrações de açúcar. Os resultados mostraram que o cloreto de sódio é o mais eficiente para reduzir a Aa pelo seu baixo peso molecular e dissociação e a sacarose é o menos efetivo. As leveduras que apresentaram valores mínimos de crescimento em sacarose ($Aa \leq 0,79$) foram *Z. rouxii*, *Z. bisporus*, *Candida apicola*, *C. bombi*, *C. glucosophila*, *C. lactiscondensii*, *C. mannitofaciens*, *C. nodaensis* e *C. versatilis*. No entanto, outras leveduras de importância em produtos de frutas, no mesmo meio, apresentaram valores de Aa de 0,81 (*Debaryomyces hansenii*), 0,83 (*Candida tropicalis*), 0,84 (*Hansenula anomala*),

0,85 (*Candida guilliermondii*), 0,87 (*Torulaspora globosa*), 0,89 (*Rhodotorula glutinis*), 0,90 (*Candida famata*, *Kloeckera apis* e *Rhodotorula rubra*).

HORNER & ANAGNOSTOPOULOS (1973) analisaram o efeito da Aa, pH e temperatura no crescimento de fungos associados a deterioração de alimentos e concluíram que as interações entre temperatura e Aa são significativas e que a determinados valores de Aa, os fungos são ligeiramente mais tolerantes ao glicerol que a sacarose, mas as leveduras, com exceção da *S. rouxii* são marcadamente mais tolerantes ao glicerol que a sacarose.

UBOLDI EIROA (1983) destaca a *Z. bailii* como a levedura de maior risco para a estabilidade biológica e qualidade de alimentos ácidos ou com elevado teor de açúcar, pela sua elevada tolerância aos conservadores químicos, baixos valores de pH e de Aa, concentrações moderadas de etanol, 70% de glicose e 10% de cloreto de sódio. A sua deterioração é evidenciada pela produção de odores e sabores desagradáveis, formação de película na superfície, produção de gás, alterações na textura, na cor ou formação de limo. A autora salienta que se não houver boas práticas de higiene e sanificação esta levedura pode se instalar em diversos equipamentos da linha de produção.

JERMINI & SCHMIDT-LORENZ (1987) analisaram a resistência de várias cepas de *Z. rouxii* e de *Z. bailii* a redução de Aa (frutose) sendo que nenhuma destas cepas cresceu a Aa=0,71 e 30°C. Seis cepas de *Z. rouxii* cresceram a 0,76 enquanto que a *Z. bailii* não cresceu a Aa<0,858.

DEAK & BEUCHAT (1993) levantaram equações modelos para predizer a deterioração por algumas leveduras isoladas de alimentos estragados e apontaram que no caso da *Z. bailii* os fatores que mais afetam o seu crescimento são a Aa e a concentração de sorbato e que existe um efeito sinérgico entre eles. A *Z. bailii* foi a levedura de maior resistência as condições adversas entre as leveduras analisadas (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *D. hansenii*, *P. membranaefaciens*, *S. cerevisiae* e *Z. bailii*).

COLE et alii (1987) trabalhando com baixos valores de pH (2,50-2,79), observaram que o sinergismo entre Aa e sorbato de potássio no crescimento de *Z. bailii* está ligado ao pH e afirmam que a pH=2,5, 0,04% de sorbato de potássio é suficiente

para inibir o crescimento de *Z. bailii* a Aa de 0,99, 15°Brix em um sistema modelo de bebida de frutas.

MAIMER & BUSSE (1992) relataram que leveduras não podem produzir CO₂ ou crescerem em produtos processados de frutas contendo 0,02% de sorbato de potássio (Aa=0,89; 55°Brix) ou 0,04% de sorbato de potássio (Aa=0,93, 45°Brix).

2.3.5. Depressores de Aa

A utilização de depressores de Aa, constitui o princípio básico dos alimentos que utilizam a Aa como obstáculo principal ou como um dos obstáculos para a sua preservação. A ação destes agentes, baseia-se em que o soluto forma ligações com a água (fundamentalmente, pontes de hidrogênio), tornando-a menos disponível química e biologicamente (CHEN & KARMAS, 1980; GUILBERT et alii, 1981; ERICKSON, 1982).

Três classes gerais de compostos químicos têm sido usados habitualmente como depressores de Aa na produção de alimentos: polióis (propileno glicol, glicerol, sorbitol), açúcares (sacarose, glicose e frutose) e os sais minerais (cloreto de sódio, cloreto de potássio e lactato de sódio). Os polióis apresentam alta afinidade pela água, são solúveis, tem baixo peso molecular, porém são mais caros que os açúcares, conferem sabor (amargo) aos produtos e a adição de altas concentrações acarretam aumento de viscosidade (ANTUNES & CANHOS, 1983). O cloreto de sódio e o cloreto de potássio são os sais de uso mais antigo e bastante utilizados como solutos.

Os agentes depressores de água têm que reunir uma série de qualidades para que sejam utilizados nos alimentos. TAOUKIS et alii (1988) citam as seguintes características de um depressor ideal:

- ser efetivo no abaixamento de Aa em concentrações razoáveis;
- possuir baixo peso molecular (quanto menor o peso molecular maior a sua capacidade de diminuir a Aa);
- ter alta solubilidade em água;
- ser isento de toxicidade;
- possuir atividade bacteriostática e fungistática;

- ter baixa reatividade química;
- ser compatível com as características físico-químicas (pH, estrutura e textura) e organolépticas (não ter sabor ou possuir sabor aceitável) do alimento;
- ser líquido à temperatura ambiente;
- não calórico ou de alto valor nutricional;
- exercer ação sinérgica com outros umectantes;
- ter baixo custo.

O desenvolvimento de alimentos por métodos combinados tem sido limitado pela dificuldade de encontrar agentes depressores de Aa que reúnam todas as características citadas. A possibilidade de ajustar a atividade de água dentro das faixas desejadas muitas vezes é limitada pela necessidade de se utilizar altas quantidades de solutos que podem conferir sabores indesejáveis ao produto (amargor, doçura, etc.) ou podem afetar adversamente suas propriedades físicas. A Figura 2.8 mostra a concentração necessária de alguns dos depressores para reduzir a Aa. Nota-se que para a mesma redução de Aa é necessário utilizar uma concentração de sacarose muito maior do que a de cloreto de sódio, por exemplo.

Com relação à capacidade de reter água e na baixa toxicidade, o glicerol, propileno glicol e o sorbitol são os polióis mais adequados para a utilização nos alimentos, as limitações principais estão no sabor amargo-doce, que no caso de propileno glicol é particularmente destacado, e outras como doçura e sensação picante. O uso de depressores como os açúcares e sorbitol tem emprego restrito às formulações onde a doçura é permissível como em frutas, sobremesas etc., mas são organolepticamente inaceitáveis em produtos como por exemplo os vegetais (SLOAN & LABUZA, 1975; ERICKSON, 1982; JAYARAMAN, 1988).

Um grande número de compostos tem sido estudados quanto à sua propriedade de diminuir a Aa. CHEN & KARMAS (1980), pesquisaram sobre a ação dos monossacarídeos e derivados, dissacarídeos, polióis, aminas e aminoácidos, ácidos orgânicos, sais inorgânicos e isolados proteicos de soja em concentração de 5-15%. Glicina, ácido láctico e cloreto de sódio foram os compostos que permitiram atingir o

nível mais baixo de Aa (0,94, 0,94 e 0,92, respectivamente, à 15% de concentração). Dos polióis o glicerol é o composto mais apropriado para controlar a Aa em A.U.I., mas os valores de Aa são praticamente os mesmos em soluções de 5 e 15%. O glicerol afeta menos o sabor que o cloreto de sódio e a sacarose, é tolerado fisiologicamente e tem baixo peso molecular.

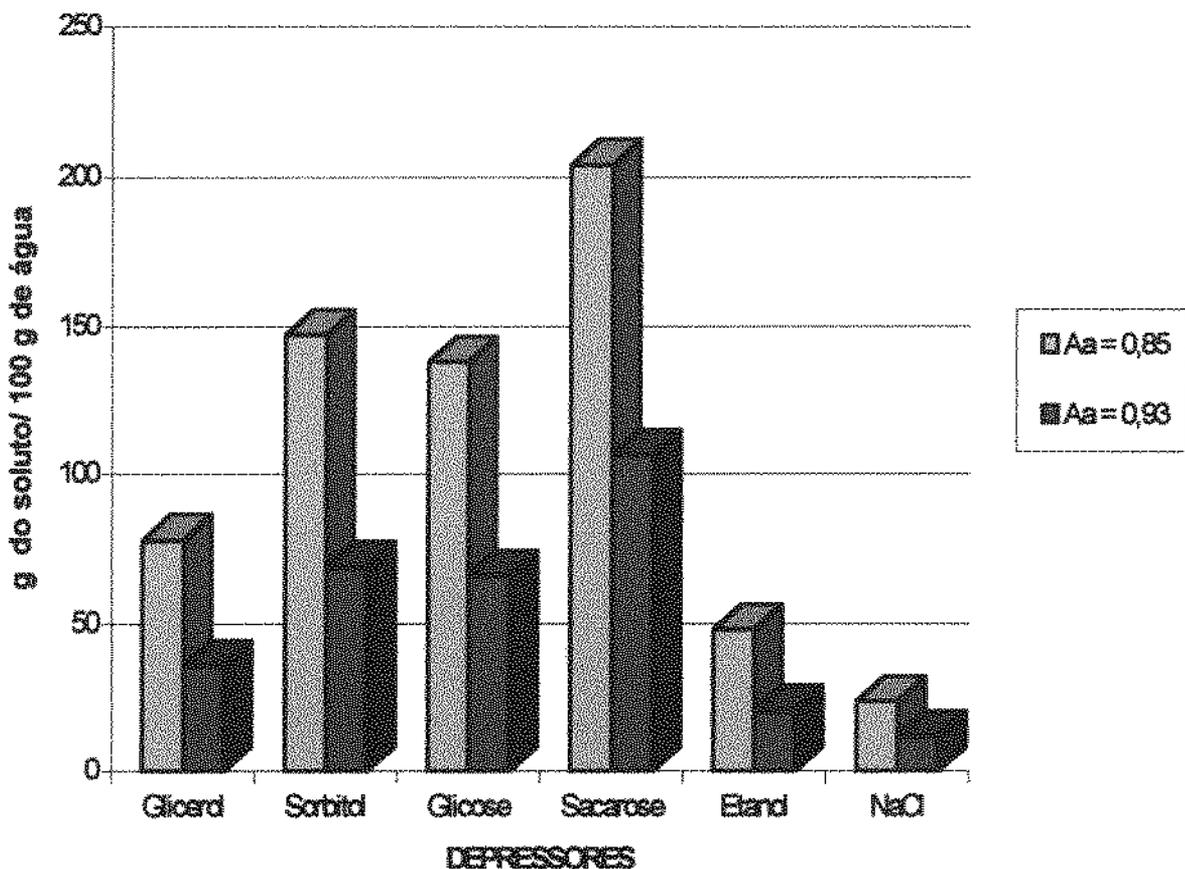


FIGURA 2.8 - Concentração de alguns depressores necessária para abaixar a Aa a 25°C.

Fonte: CHIRIFE & FAVETO (1992).

GUILBERT et alii (1981) analisaram a eficiência relativa de um grande número de depressores de Aa em soluções contendo 5 a 10% (%p/p) destes depressores ou com 15-45% de glicerol, na faixa de Aa de 0,80 a 0,94, encontrando a seguinte ordem decrescente de eficiência: cloreto de sódio e sais de ácidos orgânicos,

amino ácidos e proteínas altamente hidrolisadas, glicerol, sorbitol, sacarose e xaropes de glicose, macromoléculas glicídidas e ovalbumina. A ordem de eficiência é dependente da Aa da solução. Ficou demonstrado, em sistemas modelos, o sinergismo entre o cloreto de sódio e o lactato de sódio, entre a sacarose e o manitol, entre a sacarose e o ácido sórbico; entre a glicose e a prolina e entre o glicerol e a celulose. Efeito antagônico foi observado entre o propileno glicol e o colágeno; entre macromoléculas proteicas e glicídios e entre o cloreto de sódio e a uréia.

TAOUKIS et alii (1988) e CHIRIFE & FAVETO (1992), citam outros agentes depressores de Aa que tem sido estudados com algum sucesso ou com possibilidade futura de utilização: aminoácidos (L-lisina, alanina, arginina, mistura de aminoácidos), glutamato monossódico, proteínas hidrolisadas (enzimaticamente e por ácido), gomas (arábica), amido de mandioca, ácido láctico, babosa (*Aloe vera*), oligoglicerol e poliglicerol e seus ésteres, dióis alifáticos, "neosugar" (obtido pela ação da enzima fungal fructosil-transferase sobre glicose e frutose), leite de coco desidratado desengordurado (testado em água de coco), caseína, proteínas do soro de leite, galactose e citrato de sódio. Estes depressores apresentam ainda algumas limitações como: custo elevado, aumento na viscosidade do produto, toxicidade, sabor amargo, aroma característico, antagonismo, disponibilidade e facilidade de aplicação.

BEUCHAT (1982) estudou a resistência térmica de algumas leveduras em sucos de frutas adicionados de sacarose e conservadores e observou que nos sucos com sacarose (30 e 50%) as leveduras ficaram mais protegidas contra a sua destruição e que os efeitos dos conservadores sorbato de potássio e benzoato de sódio foram reduzidos em altas concentrações de sacarose. Fato este também observado por AGAB & COLLINS (1992) que observaram que nas concentrações de 60% de sacarose a resistência a plasmólise das células é maior.

CERRUTI et alii (1988) comprovaram que a adição de açúcares (glicose e sacarose) utilizados para reduzir Aa até 0,95 diminuem os efeitos letais do sorbato de potássio sobre *Saccharomyces cerevisiae* quando submetida a tratamento térmico. Porém há um efeito sinérgico entre sorbato de potássio e sulfito, na inativação desta levedura, durante o aquecimento, mesmo em presença de glicose.

2.4. ACIDEZ E POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

Segundo JACKIX (1988) quando se fala em acidez é necessário distinguir entre quantidade e intensidade do ácido. A quantidade ou acidez total é medida pelo volume de solução de soda necessária para neutralizá-la. A intensidade do ácido é determinada pela concentração dos íons de hidrogênio em solução, que depende do caráter fraco ou forte do ácido e é medida pelo pH.

O pH é definido como: $\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+]$. Em sistemas alimentares os ácidos de maior interesse são os fracos (HA) que por sua vez se dissociam em (H^+) e (A^-). No equilíbrio, a relação $[\text{H}^+]. [\text{A}^-]/[\text{HA}] = K_a$, onde K_a é a constante de equilíbrio. Esta relação pode ser reescrita como : $[\text{H}^+] = K_a. [\text{HA}]/[\text{A}^-]$. Aplicando log dos dois lados temos: $\log[\text{H}^+] = \log K_a + \log [\text{HA}] - \log [\text{A}^-]$, mudando-se o sinal, $-\log[\text{H}^+] = -\log K_a - \log [\text{HA}] + \log [\text{A}^-]$, ou seja: $\text{pH} = \text{p}K_a + \log [\text{A}^-]/[\text{HA}]$. Quando $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$, isto é, a concentração do ácido dissociado e não dissociado são iguais, temos $\log 1 = 0$ e então, $\text{pH} = \text{p}K_a$. Assim conhecida a concentração do ácido o pH, $\text{p}K_a$ ou K_a , pode ser calculada a quantidade de ácido não dissociado. Os ácidos fortes tem baixo $\text{p}K_a$ e por isso estão quase inteiramente dissociados em solução (UBOLDI-EIROA, 1996).

CORLETT JR. & BROWN (1980), afirmam que o pH de um alimento é um dos fatores que determinam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos durante o processamento, estocagem e distribuição. Os microrganismos são afetados pela presença do íon $[\text{H}^+]$ livre e pela concentração de ácido fraco não dissociado. Os ânions de alguns ácidos fracos (por exemplo ácido acético ou láctico) são metabolizados dentro da célula bacteriana, há a liberação do íons H^+ e a célula é acidificada a níveis inibitórios. Outros ânions não são metabolizados e portanto não acidificam as células.

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos está ligada a molécula não dissociada. Os valores de $\text{p}K_a$ dos ácidos orgânicos usados como conservadores de alimentos estão entre pH 3 e 5. Abaixando-se o pH, aumenta-se a proporção das moléculas não dissociadas e com isto a efetividade do conservador como agente antimicrobiano. O ácido sórbico apresenta um $\text{p}K_a = 4,8$, sendo sua atividade antimicrobiana aumentada com o decréscimo de pH; no entanto, revela alguma atividade contra microrganismos em valores próximos de $\text{pH}=6,0$. Para efeito comparativo o $\text{p}K_a$ dos ácidos acético, cítrico, láctico, benzóico e propiônico são de

respectivamente, 4,75, 3,1, 3,1, 4,2 e 4,9 (BAIRD-PARKER, 1980). A Tabela 2.8 mostra a influência do pH do substrato na dissociação de alguns ácidos orgânicos. Observa-se que o ácido sórbico, benzóico e propiônico apresentam máxima eficiência antimicrobiana em $\text{pH} < 5$, enquanto que o ácido cítrico apresenta moderada ação antimicrobiana em $\text{pH} 3,0$. Já o ácido acético, bastante utilizado em produtos salgados é bastante efetivo como acidulante e conservador, principalmente em $\text{pH} < 5$.

O pH limite para crescimento de microrganismos varia numa faixa ampla que vai de 1 a 11. Muitos microrganismos tem o seu pH ótimo perto da neutralidade e crescem entre pH 5,4 e 6,3. As bactérias acéticas tem pH ótimo entre 5,4 e 6,3 e as lácticas entre 5,5 e 6,0. A Tabela 2.9 lista alguns valores de pH mínimo e máximo para microrganismos. De modo geral, as leveduras e os bolores apresentam pH mínimo de crescimento mais baixos do que as bactérias, enquanto que o pH máximo para crescimento é similar para bactérias, leveduras e bolores.

A principal linha de demarcação em relação ao pH dos alimentos situa-se no valor 4,5. Pesquisas tem demonstrado que abaixo desse valor dificilmente ocorre o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*, a mais resistente bactéria patogênica encontrada em alimentos. Na deterioração de alimentos ácidos, diversos grupos de organismos estão envolvidos, tais como bactérias esporogênicas (*Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus macerans* e *Bacillus polymyxa*), bactérias não esporogênicas (*Lactobacillus* - homofermentativas e heterofermentativas, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus*), bolores e leveduras (LEITÃO, 1991).

TABELA 2.8 - Influência do pH no grau de dissociação dos conservadores.

Conservador	Proporção do ácido não dissociado (%)			
	pH			
	3	4	5	6
Ácido Sórbico	97,40	82,00	30,00	4,10
Ácido Benzóico	93,50	59,30	12,80	1,44
Ácido Propiônico	98,50	87,60	41,70	6,67
Ácido Cítrico	53,00	18,90	0,41	0,006
Ácido Acético	98,50	84,50	34,90	5,10

Fonte: BAIRD-PARKER (1980)

TABELA 2.9 - Valores limites de pH para o desenvolvimento de microrganismos em meios de laboratório ajustados com ácidos fortes ou álcalis.

Microrganismos	pH mínimo	pH máximo
• Bactérias Gram Negativas		
<i>Acetobacter acidophilum</i>	2,8	4,3
<i>Escherichia coli</i>	4,4	9,0
<i>Salmonella paratyphi</i>	4,5	7,8
<i>Salmonella typhi</i>	4,0-4,5	8,0-9,6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8	11,0
• Bactérias Gram Positivas		
<i>Bacillus subtilis</i>	4,5	8,5
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5,2	9,2
<i>Clostridium botulinum</i>	4,7	8,5
<i>Lactobacillus bifidus</i>	3,8	7,2
<i>Lactobacillus spp.</i>	3,8-4,4	7,2
<i>Micrococcus sp.</i>	5,6	8,1
<i>Streptococcus lactis</i>	4,3-4,8	9,2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6,35	9,2
• Leveduras		
<i>Candida pseudotropicalis</i>	2,3	8,8
<i>Hansenula canadensis</i>	2,15	8,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,35	8,6
<i>Saccharomyces fragilis</i>	2,4	9,05
<i>Saccharomyces pastori</i>	2,1	8,8
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	5,45	7,05
<i>Candida krusei</i>	1,5	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,5	-
• Bolores		
<i>Penicillium italicum</i>	1,9	9,3
<i>Penicillium variabile</i>	1,6	11,1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,8	11,1

Fonte: CORLETT JR. & BROWN

Os ácidos orgânicos utilizados em alimentos, estão presentes com frequência em frutas (ácido cítrico nas frutas cítricas, ácido málico em maçãs e ácido tartárico em uvas) ou em carnes (ácido láctico e ácido fumárico). Estes ácidos são comuns em produtos fermentados por microrganismos, especialmente por bactérias lácticas (ANTUNES & CANHOS, 1983).

Dos acidulantes utilizados em alimentos o ácido cítrico é o mais utilizado, seguido pelo ácido fosfórico que é empregado principalmente na produção de bebidas carbonatadas do tipo "cola". O ácido cítrico apresenta alta solubilidade, possui característica tamponante, favorecendo a estabilidade dos produtos finais, tem sabor ácido intenso e marcante, age como sequestrante de íons metálicos, prevenindo reações indesejáveis de oxidação de cor e aromas dos produtos finais, é totalmente inócuo e causa baixa corrosividade para as instalações industriais. Tem sido utilizado em refrigerantes, sucos de frutas, bebidas alcoólicas, balas e confeitos, produtos lácteos, geléias, doces em massa, conservas de frutas e vegetais, óleos e gorduras, carnes, peixes e frutos do mar (NOGUEIRA, 1989).

O ácido fosfórico proporciona o pH mais baixo de todos os acidulantes utilizados em alimentos. O ácido láctico é utilizado para inibir a deterioração de azeitonas curadas e para ajustar a acidez na produção de queijos. O lactato de cálcio, um sal não ácido do ácido láctico, inibe o escurecimento de frutas e vegetais e melhora as propriedades do leite em pó e leite condensado (ANTUNES & CANHOS, 1983).

BAIRD-PARKER (1980) ressalta algumas limitações para o uso de ácidos orgânicos como inibidores de microrganismos em alimentos: a) geralmente são ineficientes quando a carga microbiana inicial é alta; b) muitos microrganismos utilizam os ácidos orgânicos como fonte de carbono metabolizável; c) há uma inerente variabilidade na resistência de linhagens individuais; d) tipos resistentes podem ser selecionados sob as condições usuais.

HOCKING (1988) destaca que as interações entre a Aa e pH são extremamente importantes na seleção da microflora dominante de um produto em particular. A Figura 2.9 realça estas interações. A pH neutro e alta Aa (acima de 0,95), os microrganismos mais importantes são as bactérias, mas em pH baixo (abaixo de 4,0), as leveduras costumam ser dominantes, além de algumas espécies de *Lactobacillus* e fungos

filamentosos que resistem bem a alta Aa e pH baixo. Na faixa de Aa de 0,90-0,75 as leveduras e os bolores são os microrganismos deterioradores de maior importância.

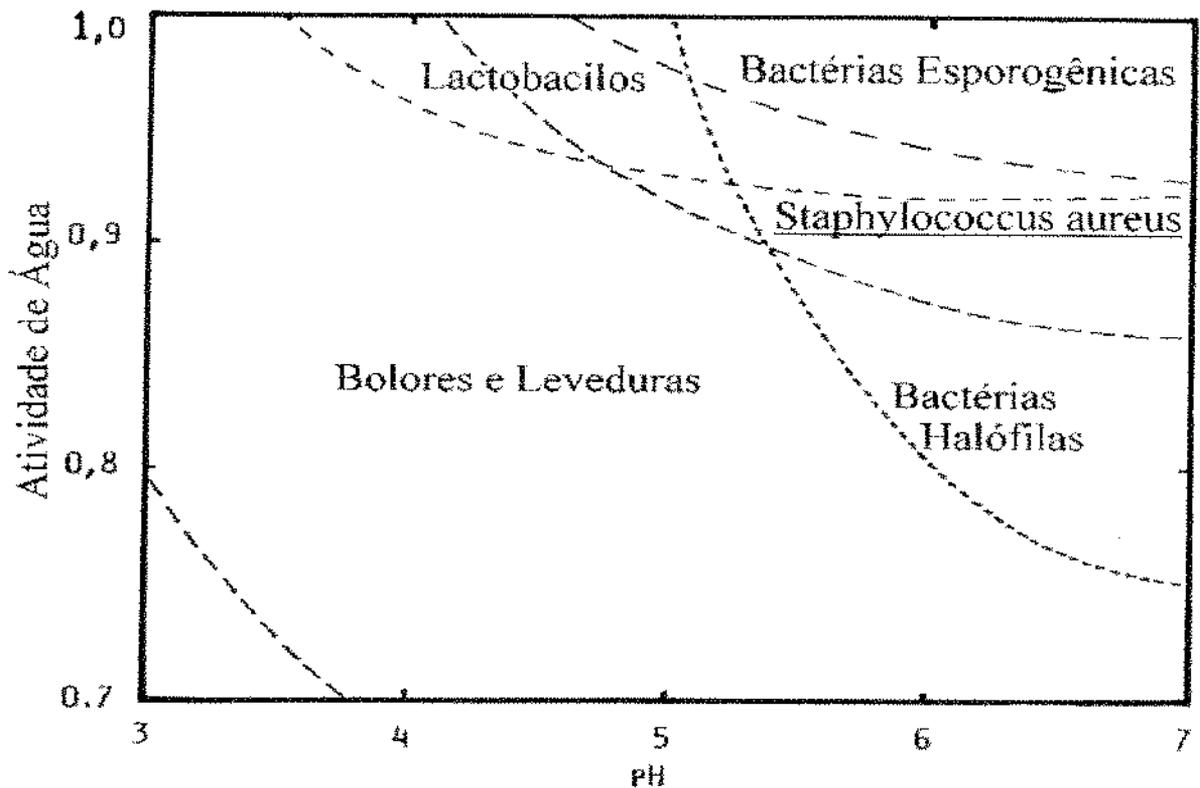


FIGURA 2.9 - Diagrama esquemático da influência combinada do pH e Aa no crescimento microbiano.

Fonte: HOCKING (1988)

2.5. CONSERVADORES

Conservadores são determinados aditivos intencionais utilizados na indústria alimentícia em substituição total ou parcial aos tratamentos de preservação física do alimento, que incluem: refrigeração, congelamento, pasteurização, esterilização, secagem e irradiação. Têm ação inibidora da proliferação microbiana ou a evita, sendo, desse modo, agentes fungistáticos ou bacteriostáticos (ANGELUCCI, 1989).

Segundo o Decreto - Lei nº 986 de 21/10/69, da Legislação Brasileira (ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992) " aditivo intencional é

toda substância ou mistura de substâncias, dotadas ou não de valor nutritivo, ajuntada ao alimento com a finalidade de impedir as alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor, modificar ou manter seu estado físico geral ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do mesmo.”

São poucos os conservadores de uso liberado para alimentos, devido às exigências dos órgãos oficiais de normalização quanto a inocuidade de aditivos necessariamente ingeridos conjuntamente com os alimentos. O Comitê do Codex Alimentarius, da FAO (Food Agricultural Organization)/ OMS (Organização Mundial de Saúde), estabelece para a maioria dos aditivos o valor da I.D.A (Acceptable Daily Intake - A.D.I. - Ingestão Diária Aceitável). Segundo a Resolução da Comissão de Normas e Padrões para Alimentos nº 17/76 do Decreto-Lei nº 986 de 21/10/69, a IDA foi definida como: “ a quantidade máxima do aditivo ou substância, que ingerida diariamente durante a existência do indivíduo, não ofereça risco aparente ou apreciável à saúde, expressa em miligramas de substância por quilograma de peso corpóreo (mg/Kg p. c.). “

O ácido sórbico e seus sais são os conservadores menos tóxicos de uso permitido no Brasil. A IDA proposta pelo Comitê Misto FAO/OMS é de 0 a 25 mg/Kg de peso corpóreo. Nos Estados Unidos este aditivo é reconhecido como seguro - GRAS (“Generally Recognized as Safe”), sendo que os limites máximos são estipulados somente para certos alimentos com padrões de identidade estabelecidos, como queijos e margarinas. Estudos de toxicidade aguda em ratos, determinaram para o ácido sórbico valores de DL_{50} (DL_{50} =dose letal cinquenta por cento) de 7,4 a 10,5 g/Kg de peso corpóreo para os sorbatos de potássio e de sódio , valores de DL_{50} respectivamente entre 4,2 e 6,2 g/Kg e 5,9 a 7,2 g/Kg de peso corpóreo (SOFOS, 1989). Para efeito de comparação a DL_{50} para sal comum (NaCl) é de 5 g/Kg de peso corpóreo (SLOAN & LABUZA, 1975), para o SO_2 (sulfitos, bissulfitos e metabissulfitos de sódio, potássio e cálcio) é de 0 a 0,7 mg/Kg p.c. e para o ácido benzóico 0 a 5 mg/Kg de peso corpóreo (NAZÁRIO, 1989).

A grande maioria dos conservadores utilizados em alimentos constituem-se de ácidos orgânicos fracos não dissociados, de natureza lipófila, sendo, portanto, solúveis na membrana celular, alcançando facilmente o protoplasma e devem ser preferencialmente, hidrossolúveis, atóxicos, insípidos, inodoros e de baixo custo (LEITÃO, 1990).

Embora existam diferenças importantes entre os vários conservadores, o efeito fisiológico provocado pelos mesmos é semelhante e pode ser dividido em dois tipos, conforme exposto por LEITÃO (1989). Existem as células microbianas não adaptadas ao conservador, as quais são permeáveis ao conservador na forma não dissociada, sendo impermeáveis aos ânions. O conservador penetra na célula e se dissocia no seu interior. Observa-se que o pH citoplasmático decresce em função da dissociação do conservador, havendo eliminação do ânion através da célula; em consequência, o equilíbrio da reação é alterado, havendo novo afluxo do conservador, que se dissocia novamente no citoplasma, liberando prótons que acidificam ainda mais o conteúdo celular. O segundo tipo seriam as células adaptadas ao conservador que são capazes de evitar um aumento excessivo da concentração intracelular do conservador, permitindo a eliminação do ânion do interior da célula, mas utilizando energia (na forma de ATP) para remover os íons H^+ que adentram continuamente na célula através da molécula não dissociada do conservador. Num ambiente ácido os conservadores orgânicos injuriam as células tornadas permeáveis aos mesmos, em consequência as células não conseguem manter o pH citoplasmático, havendo aceleração da atividade fermentativa, com isto há um decréscimo na razão de crescimento e produção de massa celular, inibição do sistema de transporte ativo e o acúmulo do ânion do conservador intracelularmente, fazendo com que haja uma redução no pH citoplasmático.

LENOVICH et alii (1988) avaliaram o efeito dos solutos sacarose, glicose e propileno glicol na resistência ao sorbato pela levedura osmotolerante *Zygosaccharomyces rouxii* e concluíram que o tipo de soluto tem pequeno efeito nas células adaptadas ao conservador e cresce na ordem glicose <propileno glicol <sacarose para as células não adaptadas ao conservador.

O fato dos fungos evidenciarem capacidade de multiplicação em meios ácidos, com pH inferior a 5,0, e poucas espécies de bactérias (exceto lácticas, acéticas e algumas esporogênicas) revelarem idêntico comportamento, torna os bolores e leveduras de maior importância e significado para a adequada preservação dos alimentos ácidos, nos quais os conservadores são utilizados (LEITÃO, 1990). A Tabela 2.10 mostra comparativamente a resistência dos microrganismos a alguns conservadores. Observa-se que o ácido sórbico é efetivo para controlar o crescimento de bolores e leveduras.

TABELA 2.10 - Espectro de atividade antimicrobiana de alguns ácidos orgânicos utilizados em alimentos.

Ácido Orgânico	Concentrações do ácido não dissociado (%) requerida para inibir microrganismos				
	Leveduras	Bolores	Enterobacteriaceae	Micrococcaceae	Bacillaceae
Ácido Sórbico	0,02	0,04	0,01	0,02	0,02
Ácido Benzóico	0,05	0,10	0,01	0,01	0,02
Ácido Propiônico	0,20	0,05	0,05	0,10	0,10
Ácido Cítrico	>0,005	>0,005	>0,005	0,001	>0,005
Ácido Láctico	>0,01	>0,02	>0,01	>0,01	>0,03
Ácido Acético	0,50	0,10	0,05	0,05	0,10

Fonte: BAIRD-PARKER (1980).

WARTH (1985) estudou a resistência de algumas espécies de leveduras a conservadores, alguns destes dados estão mostrados na Tabela 2.11. Sem dúvida a *Z. bailii* é uma das mais importantes leveduras agentes de deteriorações em produtos ácidos e com maior resistência aos conservadores. UBOLDI EIROA et alii (1984) estudaram a eficiência dos conservadores benzoato de sódio, sorbato de potássio, e metabissulfito de sódio na inibição de *Z. bailii* em suco de laranja reconstituído, com variação das concentrações e do número de células contaminantes e concluíram que o sorbato de potássio apresentou maior eficiência comparativamente ao benzoato de sódio, sendo que o metabissulfito de potássio se mostrou totalmente ineficiente.

TABELA 2.11 - Concentração mínima de conservadores capaz de prevenir o crescimento anaeróbico de leveduras, pH=3,5, 25°C, dentro de 1000 horas.

Espécie	Conservador		
	Ácido Sórbico (mM)	Ácido Benzóico (mM)	SO ₂ livre (mM)
<i>Klockeria apiculata</i>	1,4	2	0,11
<i>Hansenula anomala</i>	1,5	1	0,89
<i>Candida Krusei</i>	ND	ND	1,2
<i>Z. bailii</i> (FRR 2227)	6	6	2,9
<i>S. cerevisiae</i>	3	3	1,2
<i>K. fragilis</i>	1,5	ND	ND
<i>S. pombe</i>	6	6	1,9

sendo: ND = valor não determinado

Fonte: WARTH (1985)

Os conservadores mais utilizados e permitidos para frutas e seus produtos são os ácidos sórbico e benzóico e seus sais de sódio, cálcio e potássio e o dióxido de enxofre e sulfitos. O dióxido de enxofre (SO_2) e sulfitos inibem o desenvolvimento de leveduras, fungos e bactérias, mas são seletivos, sendo as leveduras (principalmente as com atividade fermentativa) e os fungos mais resistentes do que as bactérias lácticas e acéticas (JAY, 1970). Embora o SO_2 e, principalmente, o metabissulfito de sódio já tenham sido utilizados na preservação de polpa de goiaba, estes aditivos não são permitidos atualmente no Brasil para uso em polpas de frutas, doces em pasta e geléias.

DE MARTIN et alii (1975) utilizaram 1.000 e 1.500 ppm de metabissulfito de sódio na preservação de polpa de goiaba da variedade vermelha e concluíram que 1.000 ppm são suficientes para manter a preservação da polpa quanto aos aspectos químicos e microbiológicos, por no mínimo 6 meses, à temperatura ambiente, em tambores de fibra de 50 litros, desde que se faça a pasteurização prévia do produto.

SALOMON et alii (1976) estudaram a preservação da polpa de goiaba da variedade vermelha com a adição de 600, 800 e 1.000 ppm de metabissulfito de sódio (expressos em SO_2) e compararam esta polpa com uma amostra-controle de purê pasteurizado, sem aditivos e estocado sob congelamento à -20°C . Concluiu-se que o metabissulfito preservou o purê em qualquer das três concentrações utilizadas, não se verificando diferenças significativas em relação ao purê congelado no final de seis meses de armazenamento.

DE MARTIN & KATO (1991) afirmam que a adição de 0,1% em peso de ácido sórbico e benzóico ou seus derivados de sódio, cálcio e potássio é suficiente para preservar a polpa de goiaba em perfeitas condições durante um período de seis meses de armazenamento à temperatura ambiente.

BREKKE et alii (1970) estudaram a conservação de purê de goiaba concentrado (22,5% de sólidos solúveis) com a adição de 1.000 ppm de sorbato de potássio. O produto se manteve microbiologicamente estável durante a estocagem de 5 meses a 7°C ; o aroma e o sabor foram considerados bons até o quarto mês de estocagem. O concentrado apresentou escurecimento após 2 meses de estocagem, que se pronunciou ainda mais no decorrer da estocagem.

Outros conservadores tem sido também estudados. AGUILERA & CHIRIFE (1994) relatam que o etanol pode ser utilizado em baixas concentrações para controlar o crescimento de *Staphylococcus aureus* e como fungicida. DELAQUIS & MAZZA (1995) destacam a potencialidade do uso de isotiocianatos, composto natural como agente antimicrobiano em alimentos embalados.

2.5.1. Ácido sórbico e seus sais

O ácido sórbico (2,4 hexadienóico - $\text{CH}_3 - \text{CH} = \text{CHCH} = \text{CHCOOH}$) é monocarboxílico de cadeia reta, α , β insaturado, trans-trans. O grupo carboxílico do ácido sórbico reage facilmente formando sais e ésteres. O ácido sórbico apresenta-se na forma de pó branco, cristalino de baixa solubilidade em água a 20°C, (0,16 g / 100ml) sendo mais solúvel em etanol 100% (14,8 g / 100ml). Os seus sais de cálcio, sódio e potássio apresentam maior solubilidade em água, sendo bastante utilizados, principalmente o sorbato de potássio (139,2 g / 100ml, 20°C) (SOFOS, 1989; EARLE & PUTT, 1984).

Existem vários fatores que influenciam a atividade antimicrobiana do ácido sórbico e seus sais nos alimentos como: atividade de água, pH, temperatura, carga microbiológica inicial, tipo de microflora, ingredientes do produto, outros aditivos presentes, processo, embalagem e sanificação (SOFOS & BUSTA, 1981). A adição de certas substâncias, como o sal e o açúcar, ao alimento, reduz a atividade de água, melhorando a ação antimicrobiana dos sorbatos. Alguns ácidos podem aumentar a ação do sorbato como, por exemplo, ácido cítrico, ácido láctico e ácido acético. (RESTAINO et alii, 1981; RESTAINO et alii, 1982; SMITTLE & FLOWERS, 1982). SMITTLE & FLOWERS (1982) observaram que no caso do uso de ácido cítrico há uma ligeira interação entre pH e sorbato de potássio, pois a maior redução do crescimento microbiano ocorreu com o aumento da concentração de sorbato sendo o efeito do pH muito pequeno.

O número e a variedade de microrganismos presentes em um alimento irá influenciar a habilidade do sorbato para conter ou prevenir o crescimento microbiano (LIEWEN & MARTH, 1985). EARLE & PITT (1984) recomendam que o sorbato não deve ser utilizado como substituto a uma boa higienização durante o processo e estocagem dos alimentos, e nem tão pouco ser usado nos casos em que elevadas contagens de

fungos são esperadas. O sorbato deve ser adicionado sempre nas doses necessárias e dentro dos níveis permitidos, nestes casos raramente se observa interferência no sabor dos produtos. O aumento do custo de produção pela introdução de sorbato em um produto será compensado pelo aumento da vida-de-prateleira.

O mecanismo pelo qual o sorbato inibe o crescimento de microrganismos ainda não está completamente esclarecido. Alguns autores sugerem inibição de vários sistemas enzimicos, enquanto que outros sugerem a inibição do transporte de substrato para as células, segundo revisão de literatura realizada por LIEWEN & MARTH (1985). SOFOS (1989) também aborda os possíveis mecanismos de ação do sorbato.

SOFOS (1989) afirma que há inúmeros trabalhos feitos em todo o mundo que comprovam a efetividade dos sorbatos contra microrganismos. A ação inibitória dos sorbatos é mais pronunciada contra leveduras e bolores. A concentração mínima inibitória varia de 0,001 a 0,20% de acordo com a espécie, características, pH do substrato, etc. A ação inibitória dos sorbatos pode ocorrer durante todos os estágios do desenvolvimento dos bolores e leveduras incluindo a germinação dos esporos, inibição do crescimento e do crescimento micelar.

Algumas bactérias como as lácticas e as do gênero *Clostridium*, com reação catalase negativa, são mais tolerantes aos sorbatos. SOFOS (1989) destaca que o sorbato pode inibir bactérias tanto deteriorativas como as patogênicas, gram positivas ou negativas, catalase positiva ou negativa, aeróbias ou anaeróbias, mesófilas e psicrófilas, mas o que varia muito nestes casos é a concentração necessária para a inibição, que em alguns casos chega a ser de 1%, mas algumas espécies são resistentes aos sorbatos podendo metabolizá-lo.

Com relação aos bolores, há diferenças na resistência frente aos sorbatos de acordo com os gêneros e as espécies. LIEWEN & MARTH (1985) apontam um espectro variável para as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, como pode ser visto na Tabela 2.12.

TABELA 2.12 - Concentração máxima de sorbato de potássio (ppm) que permite o crescimento de alguns bolores a 25 e 4°C.

Cultura	Temperatura de incubação (°C)	
	25	4
<i>P. viridicatum</i>	9.000	2.000
<i>P. crustosum</i>	6.000	2.000
<i>P. notatum</i>	500	500
<i>P. roqueforti</i>	9.000	3.000
<i>P. digitalum</i>	1.000	500
<i>A. flavus</i> (89717)	500	500
<i>A. parasiticus</i> (3315)	500	NC
<i>A. niger</i>	500	NC

NC= não cresce

Fonte: LIEWEN & MARTH (1985).

BILLS et alii (1982) comentam que a levedura osmotolerante *Saccharomyces rouxii*, apresentou maior resistência ao sorbato se preconditionada em meios contendo 0,1% de sorbato de potássio anteriormente a sua inoculação em xarope de chocolate. O mesmo foi verificado por GOLDEN & BEUCHAT (1992) que afirmam que a tolerância de *Z. rouxii* ao sorbato de potássio é intensificada se as células forem previamente adaptadas a elevadas concentrações de sorbato.

GERSCHEMSON et alii (1986 a e b) trabalhando com preservação de pêssegos por métodos combinados (Aa=0,94, pH=3,5 e 1000 ppm de sorbato de potássio e 150 ppm de tiosulfato de sódio) e soluções de sacarose e glicose (Aa=0,94, pH=3,5 e 4,5) relataram perdas de respectivamente 40% e 35% do conteúdo inicial de sorbato durante a estocagem por cerca de 120 e 90 dias a 30°C. Estes resultados estão de acordo com os expostos por BOLIN et alii (1980) que observou que a perda de sorbato em ameixas está ligada ao período e temperatura de estocagem, conteúdo de umidade e de ácido sórbico e é independentemente da carga de microrganismos inoculada.

CECCHI (1989) relata que existem vários métodos citados na literatura para análise de sorbatos, tanto qualitativos (cromatografia em papel com reações

colorimétricas) como quantitativos (desde os mais simples como espectrofotometria UV até os mais sofisticados como a cromatografia líquida de alta eficiência). CECCHI (1988) comparou três métodos de análise de ácido benzóico e sórbico, utilizando absorção na região ultra-violeta (UV), cromatografia em camada delgada - UV (CCD-UV) e cromatografia de alta eficiência - UV (CLAE-UV) em oito produtos (refrigerante de limão, suco de caju, catchup, maionese, margarina, iogurte, gelêia de uva e goiabada). No método de espectrofotometria de absorção ultra-violeta, os conservadores extraídos são quantificados diretamente no espectrofotômetro sem nenhuma etapa de limpeza. É um método bastante simples, rápido, preciso e de baixo custo, mas que pode ter seus resultados prejudicados pela presença de interferentes na amostra ou mesmo pela mistura de ambos os conservadores. O método que utiliza separação em camada delgada antes da determinação por espectrofotometria de absorção ultra-violeta (CCD-UV), tem a vantagem da separação dos interferentes da matriz, além da separação entre os dois conservadores, quando ambos estão presentes no alimento. Mas existe a desvantagem de ser um método demorado e trabalhoso. O método UV apresenta recuperação de 94% e o CCD-UV de 92%. As determinações devem ser feitas de tal forma a atingir valores de coeficientes de variação (CV) abaixo de 10%, para as mesmas amostras.

2.6. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

A metodologia de superfície de resposta é a técnica de otimização mais conhecida na tecnologia de alimentos, pela facilidade de compreensão da sua base teórica, razoável eficiência e simplicidade. ARTEAGA et alii (1994) citam vários exemplos de aplicações recentes da otimização através da metodologia de superfície de respostas para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios.

Segundo BARROS NETO et alii (1995) a metodologia de superfícies de resposta é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada. A modelagem, normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de

máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

Os delineamentos experimentais mais freqüentemente utilizados são os fatoriais de 2^n e 3^n , onde 2 e 3 correspondem ao número de níveis e n é o número de variáveis (fatores) e as funções que geralmente representam estes experimentos são modelos polinomiais de primeira ou de segunda ordem (MATARAZZO, n.d).

THOMPSON (1982) afirma que a maioria dos experimentos de superfície de resposta de 2^n ordem, utiliza o delineamento central composto rotacional ou o delineamento proposto por Box-Behnken.

O delineamento mais comumente utilizado é o composto rotacional central, no qual todos os pontos utilizados estão equidistantes do central. Se o número de variáveis independentes é menor que 5, geralmente é utilizado o fatorial completo. O composto rotacional para duas, três e quatro variáveis contém um mínimo de $(2^n + 2n + 1)$ pontos ou experimentos, onde n é o número de variáveis. Os experimentos definidos por estes pontos compreendem 2^n pontos fatoriais, $2n$ pontos axiais ou pontos estrelas, que estão localizados a uma distância α do ponto central, sendo os pontos centrais repetidos várias vezes para estimar o erro experimental ou a variabilidade (ARTEAGA et alii, 1994). Para um delineamento composto rotacional de segunda ordem completo, satisfazendo a ortogonalidade, com duas variáveis o ponto α está a uma distância de $2^{1/2}$ do ponto central, temos 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais ou estrelas e 8 repetições do ponto central, totalizando 16 observações (GACULA & SINGH, 1984). A Figura 2.10 mostra a distribuição destes pontos neste tipo de delineamento.

THOMPSON (1982) afirma que os modelos de primeira ordem raramente representam fenômenos biológicos. Os modelos quadráticos ou fatoriais de segunda ordem permitem relacionar, simultaneamente, diversas variáveis e suas interações em relação aos efeitos na resposta ou em várias respostas e obter o ajuste linear entre a resposta y e os n fatores, além de outras vantagens como o fato dele fornecer uma relação curvilínea simples entre um número elevado de variáveis, possuir um ótimo claramente definido matematicamente e utilizar algoritmos computacionais simples usando o método dos mínimos quadrados para escrever os coeficientes (que podem ser determinados através dos programas estatísticos Statgraphics, SAS, etc.), porém estes

modelos não são confiáveis se extrapolados. O modelo quadrático completo utilizado na metodologia de superfície de resposta, segue o seguinte modelo:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k b_{ij} x_i x_j$$

Quando se utilizam duas variáveis ($k=2$) a expressão acima pode ser escrita como:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2$$

Na metodologia de superfícies de resposta o número de variáveis não é uma restrição, nem o número de respostas. BARROS NETO et alii (1995) relatam que esta metodologia é bastante flexível podendo ser aplicada a qualquer número de variáveis independentes, modelando simultaneamente várias respostas. Essa característica é muito importante em situações práticas, sobretudo na indústria, onde vários critérios têm que ser contemplados ao mesmo tempo.

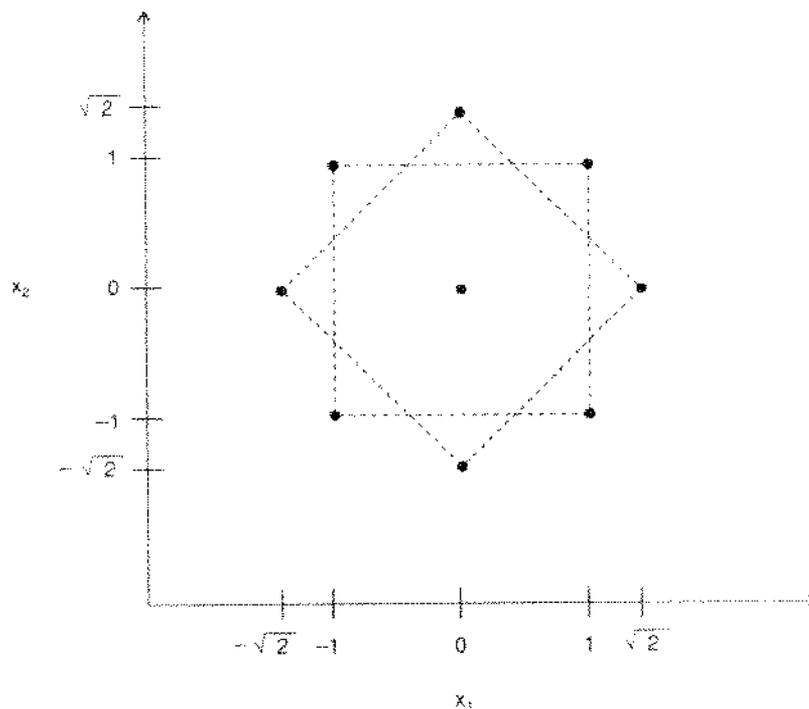


FIGURA 2.10 - Planejamento em estrela para duas variáveis.

Fonte: BARROS NETO et alii (1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Matéria-prima

Polpa de goiaba concentrada (15° Brix), processo "hot-fill". As goiabas utilizadas na produção da polpa eram da variedade IAC-4, processadas em Monte Alto/SP na safra de 1995.

As amostras da polpa foram cedidas pela Cia. Industrial de Conservas Alimentícias - CICA em dois tambores de 200 litros, os quais foram abertos em condições higiênicas na Seção de Operações Unitárias/ITAL e reacondicionados em sacos duplos de polietileno de (35x50) cm, com 100 µ de espessura, selados um a um, em porções de 5 Kg para facilitar o manuseio e congelados em câmara a -20 °C.

As polpas recebidas foram avaliadas nos aspectos microbiológico, físico e químico.

3.1.2. Outros materiais

Solutos: a sacarose utilizada foi o "Cristalçucar" (Copersucar LTDA), açúcar invertido Dedini Agropecuária Ltda e Cia. União de Refinadores; glicose P.A. Merck (Alemanha) e glicerol P.A. Ecibra Ltda.

Ácidos: cítrico P. A. (monohidratado) Merck; láctico (85%) P.A. Ecibra Ltda; orto-fosfórico (85%) P.A. Merck.

Conservador: sorbato de potássio USP (99,5% de pureza), Merse Ltda.

Meios de cultura e diluentes para as análises microbiológicas de rotina: PDA (Ágar de batata dextrose), ref. 10130 Merck, Alemanha, adicionado de 2ml de solução de antibióticos para cada 100 ml de meio (solução de antibióticos: 500 mg de cloranfenicol e 500 mg de clorotetraciclina-HCl em 100 ml de tampão fosfato pH 7,2 estéril) e MRS Ágar (Ágar de Man, Rogosa e Sharpe) ref. 10660 Merck, Alemanha; Água salina peptonada (1,0 litro de água destilada, 8,5g de NaCl, 1,0g de Peptona-L37, Oxoid, Inglaterra).

Meios de cultura utilizados para seleção, identificação e manutenção das cepas isoladas: PDA; MRS Ágar; Ágar Rogosa, ref. 5413 Merck, Alemanha; OSA (Ágar Soro de Laranja), ref. 0521, Difco Laboratories, EUA; Ágar Malte, ref. 0024-01-1, Difco Laboratories, EUA; Ágar Extrato de Malte, ref. 5398, Merck, Alemanha; Meio de Wickerham (0,67 g de Bacto Yeast Nitrogen Base, ref. 0392-15, Difco Laboratories, EUA e 1 g de glicose PA Merck, Alemanha para 100 ml de H₂O destilada) e Meio para Teste de Nitrato (1,17 g de Bacto Yeast Carbon Base, ref. 0391-15-0, Difco Laboratories, EUA e 0,078 g de KNO₃ para 100 ml de H₂O destilada). Os meios OA (Ágar de Aveia), PCA (Ágar de Batata e Cenoura) e CYA (Ágar Extrato de Levedura de Czapek) foram preparados e as suas formulações encontram-se no Apêndice D.

3. 2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.2.1. Isolamento e identificação dos microrganismos inoculados

A microbiota deteriorante da polpa de goiaba é constituída basicamente por bolores, leveduras e bactérias lácticas. Com o objetivo de isolar estes microrganismos do seu habitat natural foi visitada uma fábrica de polpas pasteurizadas e congeladas de frutas na região de Campinas/SP, onde foram coletadas várias amostras do ambiente industrial: ar, equipamentos, utensílios, superfícies e polpas de frutas. Esta fábrica é de porte médio e apresenta algumas características interessantes como expressão da realidade da maioria das fábricas de polpas de frutas do país. A linha de produção possui duas salas diferentes. Para facilitar a referência destes ambientes designou-se aleatoriamente estas salas como salas 1 e 2. Na sala 1 são feitas a recepção, lavagem, seleção e cozimento das matérias primas utilizadas; já na sala 2 tem-se as operações de preparo, desintegração, pasteurização e enchimento. Após a avaliação visual da linha de produção foram escolhidos cinco pontos diferentes para coletar amostras do ar a saber: sala 1 próximo à porta, sala 2 próximo ao preparo, sala 2 próximo ao exaustor, sala 2 próximo ao desintegrador e sala 2 próximo ao enchimento. Nestes locais foram colocadas placas de Petri previamente preparadas com os seguintes meios de cultura: PDA, OSA, Rogosa e MRS Ágar. O primeiro meio visando o isolamento de bolores e leveduras e os demais, bactérias lácticas. Estas placas foram deixadas por cerca de 20 minutos abertas, expondo o meio de cultura ao ambiente industrial, sendo incubadas no mesmo dia da visita a 25°C, por 5 dias, no caso das placas de PDA e a 30°C (72 horas)

no caso das placas de OSA, Rogosa e MRS. No caso das bactérias lácticas a incubação das placas foi feita em atmosfera microaerófila em jarros de anaerobiose (22,5 cm de altura e 12 cm de diâmetro) onde era colocada uma mistura de 7,63 g de bicarbonato de sódio e 5,79 g de ácido cítrico à qual adicionou-se imediatamente antes do fechamento 10 ml de água. Após incubação foram isolados os microrganismos que apresentavam diferentes morfologias e transferidos para tubos inclinados com o respectivo meio. Esta indústria foi visitada no período da tarde, à temperatura ambiente era de cerca de 22°C.

Para complementação desta microbiota deteriorante uma porção da polpa de goiaba utilizada nos experimentos, foi exposta ao ambiente industrial de outra empresa processadora de doces de goiaba na região de Campinas/SP, deixando-se por cerca de 10 dias até a sua deterioração. Os microrganismos presentes foram igualmente isolados e transferidos para tubos inclinados, como já mencionado.

Foram amostradas também cinco superfícies diferentes: mesa de madeira (utilizada na limpeza e seleção das matérias-primas "in natura"), mesa de inox (utilizada na mistura de frutas e açúcar), balde plástico (onde estavam acondicionadas as frutas congeladas que iriam ser reprocessadas), desintegrador (entrada do desintegrador de frutas) e saída do desintegrador. Estas superfícies foram amostradas através de esfregaço com zaragatoas estéreis que foram imediatamente transferidas para tubos com 5 ml de solução salina peptonada e colocados na geladeira e processados no dia posterior à visita, da seguinte forma: primeiramente esperou-se que o conteúdo destes tubos atingisse à temperatura ambiente, após este período os tubos foram agitados em Vortex - 2 Genie (Scientific Industries, Inc, EUA), e retirou-se uma alíquota de 0,1 ml, e fez-se o plaqueamento com espalhamento em superfície nos mesmos meios de cultura mencionados para o ambiente industrial. Estas placas foram incubadas nas mesmas condições já citadas, e após incubação foram isoladas as colônias que apresentavam diversa morfologia e transferidas para tubos inclinados com os meios adequados para manutenção.

No caso específico das frutas que estavam sendo processadas, foram retiradas amostras assepticamente, colocadas em sacos estéreis e transportadas refrigeradas até o laboratório onde foram mantidas sob refrigeração até o dia seguinte para a sua efetiva análise. As amostras analisadas foram morango, contendo também sementes de morango (congeladas), morango "in natura", morango congelado, morango congelado

adicionado de açúcar e polpa de maracujá. Foram tomadas porções de 25g de cada amostra e analisadas individualmente. Estas amostras foram homogenizadas por 30 segundos em Stomacher - 400 (Seward Medical, Inglaterra) com 225 ml de água salina peptonada. Após a homogeneização foram preparadas diluições decimais sucessivas e realizada inoculação em superfície sendo os meios utilizados, condições de incubação e tempos os mesmos já mencionados anteriormente. Como informação complementar foram adquiridas goiabas "in natura" no mercado e também examinadas no aspecto microbiológico. Aproximadamente 350 g de goiaba foram adicionadas de igual peso de solução salina peptonada em sacos plásticos estéreis (17 x 30 cm) sendo massageadas para promover a remoção dos microrganismos. Em continuação, retirou-se uma alíquota da água de lavagem (0,1 ml) e procedeu-se as diluições decimais sucessivas e os demais procedimentos já citados para as demais frutas analisadas. No caso das frutas, havia um interesse tanto no isolamento das colônias como nas contagens obtidas nas placas, pois estes dados forneceriam elementos para determinar a população microbiana a ser inoculada nas polpas a serem testadas.

Todas as culturas isoladas foram separadas por origem, devidamente codificadas e purificadas quando necessário. Prioritariamente, foram feitas lâminas para observação direta ao microscópio de 183 culturas em que havia a necessidade de separar leveduras de bactérias. Foram selecionadas, nesta primeira fase, por morfologia e características peculiares, 94 culturas, sendo 66 de leveduras e 28 de bactérias. Todas as culturas de leveduras foram inoculadas por estrias em superfície de placas de Petri com meio de Ágar Malte e incubadas a 25°C por 5 dias. Após esse período, as placas foram observadas sob microscópio estereoscópico (BAUSCH & LOMB, EUA) e foram separadas as culturas que se diferenciavam pela sua morfologia. De cada colônia característica e bem isolada foram retiradas duas amostras uma para preparação de lâmina para observação microscópica direta em Microscópio (CARL ZEISS, Alemanha, com contraste de fase) e outra para ser transferida para tubo com Ágar Malte inclinado. De acordo com a morfologia e características peculiares foram selecionadas, para compor o inóculo a ser adicionado às polpas 26 culturas de leveduras. Como a levedura *Zygosaccharomyces bailii* apresenta grande resistência aos conservadores, acrescentou-se a composição deste inóculo uma cepa pura desta levedura (CCT 0778=NCYC 1427), gentilmente cedida pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello". Todas estas

culturas de leveduras foram mantidas em tubos inclinados com Ágar malte, sob refrigeração (7°C), sendo transferidas, no máximo, a cada 3 meses.

As culturas de leveduras foram identificadas com o uso de kit para identificação rápida de leveduras API 20 C AUX (Bio Mérieux S.A., França) sendo os dados obtidos complementados com provas de assimilação de nitrato (LODDER, 1971), crescimento a 37°C (LODDER, 1971) e observação microscópica. Para a realização das provas de assimilação de nitrato, as culturas foram inoculadas em Ágar Malte, incubadas por 3 dias a 25°C, removidas com a ajuda do meio de Wickerham esterilizado, sendo 0,2 ml desta suspensão incubados em 5 ml de meio de Wickerham, por 48 horas a 25°C. Essas culturas foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 20 minutos em centrífuga Universal, modelo UV, International Equipment, EUA. O sedimento foi novamente suspenso em água destilada estéril e centrifugado, sendo as culturas logo após suspensas em água destilada estéril até turvação +1 na escala de Wickerham (LODDER, 1971). Tomou-se 0,1 ml desta suspensão e inoculou-se nos tubos contendo 5 ml de Meio para Teste de Nitrato, incubou-se por até 7 dias a 25°C. O conteúdo dos tubos que apresentaram turvação, indicando crescimento positivo, foi novamente inoculado no Meio para Teste de Nitrato. Após a incubação por 7 dias a 25°C, foi realizada a leitura final, registrando-se os tubos com crescimento positivo.

As 28 culturas de bactérias foram inoculadas por estrias em superfície em placas de Petri com o meio Ágar MRS e incubadas nas condições já descritas anteriormente para o caso de lácticas. De cada colônia característica foi separada duas porções: uma para observação ao microscópio e outra transferida para tubo com Ágar MRS inclinado, seguido de incubação a 30°C por 72 horas. Após este período foi realizada a coloração de Gram (RIBEIRO & SOARES, 1993), sendo que as bactérias lácticas são Gram positivas. A observação das lâminas foi feita em microscópio (Spencer, EUA). Como a coloração de Gram não é conclusiva foi realizado também, o teste da Catalase (SKERMAN, 1969); as bactérias lácticas apresentam reação de catalase negativa. Assim, foram selecionadas 12 culturas de bactérias lácticas. Estas culturas foram devidamente identificadas pela utilização de kit para identificação rápida de *Lactobacillus* API 50 CHL (Bio Mérieux, França). Todas estas culturas compunham o inóculo das

bactérias lácticas e foram mantidas em tubos inclinados com Ágar MRS, sob refrigeração (7°C) sendo transferidas mensalmente.

O conteúdo dos 55 tubos que apresentavam crescimento de bolores foi inoculado por estrias em superfície de placas com Ágar Extrato de Malte para purificação e incubados a 25°C por 5 dias. Todos os bolores visualmente diferentes (28) foram selecionados e purificados novamente em tubos com Ágar Extrato de Malte, sendo incubados nas mesmas condições anteriores. Após incubação foram feitas lâminas para observação ao microscópio e uma nova seleção separando-se os bolores por gêneros, para o seu cultivo nos meios apropriados para a sua identificação.

Os *Penicillium* foram cultivados em MEA e CYA, as placas foram inoculadas em três pontos equidistantes e incubadas a 28°C por 7 dias. Após esse período foi feita as medições das colônias, observações das mesmas na lupa e lâminas para as medições ao microscópio dos conídeos, fiáides, vesículas e métulas, de acordo com cada caso. A identificação das espécies foi feita com o auxílio das chaves propostas por PITT (1988).

Os demais bolores dos gêneros *Fusarium*, *Cladosporium*, *Coelomyces*, *Scopulariopsis*, *Ascomycetes* foram cultivados respectivamente nos seguintes meios: OA, MA, PCA, CYA e MEA. A inoculação foi feita através de uma estria com agulha na parte central das placas. Essas placas foram deixadas no laboratório à temperatura ambiente por cerca de 7 dias ou mais de acordo com o desenvolvimento das culturas. Em duas culturas de *Ascomycetes* foi possível a visualização dos ascos, foram feitas as medidas pertinentes de largura e comprimento dos ascosporos, e utilizada a chave de classificação proposta por GRAHAM & LUTTRELL (1961).

Os bolores do gênero *Fusarium* foram identificados utilizando a chave proposta por NELSON et alii (1983). Os bolores do gênero *Cladosporium* foram identificados utilizando-se a chave proposta por DOMSCH et alii (1993). Dentre as culturas analisadas havia também uma *Scopulariopsis* cuja identificação foi feita com auxílio da chave proposta por MORTON & SMITH (1963).

3.2.2. Ensaio com polpa de goiaba

Os ensaios foram programados tendo como finalidade definir as formulações e condições mais adequadas para a conservação da polpa. Estes ensaios foram divididos em dois grupos mencionados a seguir.

a) Ensaio Preliminares

O objetivo dos ensaios preliminares foi avaliar as capacidades individuais de alguns ácidos e solutos na redução, respectivamente, de pH e atividade de água. Os ácidos testados foram o fosfórico, cítrico e láctico e os percentuais adicionados (0 a 10%) referem-se a % ácido em relação à polpa. Os solutos utilizados foram o glicerol, glicose e açúcar invertido e os percentuais adicionados (quantidade suficiente para reduzir a A_w até cerca de 0,9) estão em relação à mistura soluto e polpa (% p/p). O levantamento destes dados permitiu selecionar alguns coadjuvantes de conservação e simplificou o número de variáveis a serem consideradas nos experimentos definitivos.

Estes ingredientes testados e as quantidades de polpa correspondentes foram devidamente pesados em balança semi-analítica e homogenizados através de batedeira Walita, por cerca de 2 minutos, em velocidade média.

b) Ensaio Definitivos

Foram realizadas cinco seqüências de experimentos. Os três primeiros experimentos visavam avaliar a conservação da polpa sem o uso de conservadores e utilizaram um soluto (sacarose) e um ácido (ácido cítrico). As concentrações de sacarose utilizadas nestes experimentos foram aumentando à medida que os resultados eram obtidos até o limite máximo que inviabilizava, do ponto de vista tecnológico, a sua utilização. No caso do Experimento I, as concentrações de sacarose utilizadas referem-se a % de sacarose em relação à água disponível na mistura e à concentração de ácido em relação a mistura total (sacarose, polpa e ácido). Nos demais experimentos, a concentração de sacarose é expressa em porcentagem em relação ao total da mistura (p/p) e a quantidade de ácido é expressa em porcentagem em relação à polpa. No caso do Experimento I, a concentração de sacarose variou de 0 a 55,44% e a concentração de ácido cítrico de 0 a 3%. Nos demais experimentos, a quantidade de ácido variou de 0 a 1,5% e a de sacarose foi de 43 a 57% (Experimento II) e 50 a 70% (Experimento III).

Como não foi possível conservar a polpa apenas com sacarose e ácido cítrico foi realizado um quarto experimento para avaliar a quantidade mínima de sorbato de potássio a ser adicionada neste produto que permitisse estender a sua conservação por um período maior aos encontrados nos experimentos anteriores. Foram fixadas duas concentrações de sacarose 0 e 50% e uma de ácido cítrico 0,75% (ponto central da grande maioria dos experimentos realizados) e variou-se a concentração de sorbato de potássio (0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,1 % - % p/p da mistura total) para definição do percentual mínimo que controlaria a deterioração. Com base nestes resultados foi realizado o Experimento V em que se fixou a quantidade do conservador utilizado (neste caso, sorbato de potássio, 0,06% p/p) e variou-se os níveis de adição do soluto e do ácido. Foram testados alguns pontos adicionais não contemplados pelo delineamento adotado para complementação das informações como a exclusão de ácido cítrico, percentual menor de sorbato de potássio (0,05%) nos pontos teoricamente mais estáveis (pontos de mais longa vida-de-prateleira nos experimentos anteriores). No Experimento IV houve um erro de formulação no tratamento que apresentou estabilidade (0,06% de sorbato de potássio), tendo esta amostra um percentual de sacarose de 54%. O Experimento V foi realizado baseado nos resultados obtidos do Experimento IV, assim, foi adotado o valor máximo de 54% de sacarose de estabilidade já testada e comprovada, e o percentual mínimo foi de 0%.

Os Experimentos I, II, III e V foram estatisticamente delineados em superfície de resposta do tipo central completo rotacional de 2ª ordem (BOX et alii, 1978; DANIEL, 1976) visando avaliar o efeito combinado de duas variáveis independentes: S (soluto-sacarose) e A (ácido cítrico) na estabilidade da polpa de goiaba. Cada variável foi examinada em 5 níveis diferentes codificados como -1,414; -1; 0; +1; +1,414. A Tabela 3.1 mostra o valor das variáveis em código e nos valores originais para os Experimentos I, II, III e V. No caso do Experimento IV, não foi utilizado o delineamento em superfície de resposta, apenas foram testados dois pontos com diferentes concentrações de sorbato, já citadas anteriormente. Os demais experimentos foram compostos de 16 combinações das variáveis independentes, sendo 8 combinações diferentes e 8 repetições do ponto central ao nível 0 (GACULA Jr & SINGH, 1983), além de mais uma formulação definida como branco, constituída da polpa mais o inóculo de microrganismos para confirmar a eficiência deste como agente deteriorante. Para o Experimento IV temos apenas 12 combinações, pois este foi utilizado apenas como teste para definição do percentual de

sorbato de potássio a ser utilizado no Experimento V. As Tabelas 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 mostram todas as combinações das variáveis utilizadas respectivamente nos Experimentos I, II, III, IV e V.

TABELA 3.1 - Valores das variáveis em código e em suas unidades originais dos experimentos delineados pela metodologia de superfície de resposta.

VARIÁVEL	Código				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
<u>Experimento I</u>					
% Sacarose ^a	0	8,12	27,72	47,32	55,44
% Ác. cítrico ^c	0	0,44	1,50	2,56	3,00
<u>Experimento II</u>					
% Sacarose ^b	43,00	45,05	50,00	54,95	50,00
% Ác. cítrico ^c	0	0,22	0,75	1,28	1,50
<u>Experimento III</u>					
% Sacarose ^b	50,00	52,93	60,00	67,07	70,00
% Ác. cítrico ^c	0	0,22	0,75	1,28	1,50
<u>Experimento V</u>					
% Sacarose ^b	0	7,91	27,00	46,09	54,00
% Ác. cítrico ^c	0	0,22	0,75	1,28	1,50

sendo: a= em relação à água disponível na mistura;

b= em relação ao total da mistura;

c= em relação à polpa.

TABELA 3.2 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do primeiro Delineamento Experimental (Experimento I).

Tratamento	Ponto do Delineamento	% Sacarose	% Ácido Cítrico
1	(-1, -1)	8,12	0,44
2	(+1, -1)	47,32	0,44
3	(-1, +1)	8,12	2,56
4	(+1, +1)	47,32	2,56
5	(-1,414, 0)	0	1,50
6	(+1,414, 0)	55,44	1,50
7	(0, -1,414)	27,72	0
8	(0, +1,414)	27,72	3,00
9	(0, 0)	27,72	1,50
10	(0, 0)	27,72	1,50
11	(0, 0)	27,72	1,50
12	(0, 0)	27,72	1,50
13	(0, 0)	27,72	1,50
14	(0, 0)	27,72	1,50
15	(0, 0)	27,72	1,50
16	(0, 0)	27,72	1,50
Branco	-	0	0

TABELA 3.3 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do segundo Delineamento Experimental (Experimento II).

Tratamento	Ponto do Delineamento	% Sacarose	% Ácido Cítrico
1	(-1, -1)	45,05	0,22
2	(+1, -1)	54,95	0,22
3	(-1, +1)	45,05	1,28
4	(+1, +1)	54,95	1,28
5	(-1,414, 0)	43,00	0,75
6	(+1,414, 0)	57,00	0,75
7	(0, -1,414)	50,00	0
8	(0, +1,414)	50,00	1,50
9	(0, 0)	50,00	0,75
10	(0, 0)	50,00	0,75
11	(0, 0)	50,00	0,75
12	(0, 0)	50,00	0,75
13	(0, 0)	50,00	0,75
14	(0, 0)	50,00	0,75
15	(0, 0)	50,00	0,75
16	(0, 0)	50,00	0,75
Branco	-	0	0

TABELA 3.4 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do terceiro Delineamento Experimental (Experimento III).

Tratamento	Ponto do Delineamento	% Sacarose	% Ácido Cítrico
1	(-1, -1)	52,93	0,22
2	(+1, -1)	67,07	0,22
3	(-1, +1)	52,93	1,28
4	(+1, +1)	67,07	1,28
5	(-1,414, 0)	50,00	0,75
6	(+1,414, 0)	70,00	0,75
7	(0, -1,414)	60,00	0
8	(0, +1,414)	60,00	1,50
9	(0, 0)	60,00	0,75
10	(0, 0)	60,00	0,75
11	(0, 0)	60,00	0,75
12	(0, 0)	60,00	0,75
13	(0, 0)	60,00	0,75
14	(0, 0)	60,00	0,75
15	(0, 0)	60,00	0,75
16	(0, 0)	60,00	0,75
Branco	-	0	0

TABELA 3.5 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do quarto Delineamento Experimental (Experimento IV).

Tratamento	Ponto do Delineamento	% Sacarose	% Ácido Cítrico	% Sorbato de Potássio
5.0	(-1,414, 0)	0	0,75	0
5.1	(-1,414, 0)	0	0,75	0,01
5.2	(-1,414, 0)	0	0,75	0,02
5.3	(-1,414, 0)	0	0,75	0,04
5.4	(-1,414, 0)	0	0,75	0,06
5.5	(-1,414, 0)	0	0,75	0,10
6.0	(+1,414, 0)	50,00	0,75	0
6.1	(+1,414, 0)	50,00	0,75	0,01
6.2	(+1,414, 0)	50,00	0,75	0,02
6.3	(+1,414, 0)	50,00	0,75	0,04
6.4	(+1,414, 0)	54,00*	0,75	0,06
6.5	(+1,414, 0)	50,00	0,75	0,10
Branco	-	0	0	0

* erro experimental de pesagem.

TABELA 3.6 - Valores das combinações das variáveis de cada tratamento do quinto Delineamento Experimental (Experimento V).

Tratamento	Ponto do Delineamento	% Sacarose	% Ácido Cítrico	% Sorbato de Potássio
1	(-1, -1)	7,91	0,22	0,06
2	(+1, -1)	46,09	0,22	0,06
3	(-1, +1)	7,91	1,28	0,06
4	(+1, +1)	46,09	1,28	0,06
5	(-1,414, 0)	0	0,75	0,06
6	(+1,414, 0)	54,00	0,75	0,06
7	(0, -1,414)	27,00	0	0,06
8	(0, +1,414)	27,00	1,50	0,06
9	(0, 0)	27,00	0,75	0,06
10	(0, 0)	27,00	0,75	0,06
11	(0, 0)	27,00	0,75	0,06
12	(0, 0)	27,00	0,75	0,06
13	(0, 0)	27,00	0,75	0,06
14	(0, 0)	27,00	0,75	0,06
15	(0, 0)	27,00	0,75	0,06
16	(0, 0)	27,00	0,75	0,06
Branco	-	0	0	
18	(+1,414, -1,414)	54,00	-	0,06
19	(+1, +1)	46,09	1,28	0,05
20	(+1,414, 0)	54,00	0,75	0,05

3.2.3. Preparo do inóculo, formulação das amostras e inoculação dos microrganismos.

O inóculo utilizado nos experimentos foi constituído de 12 culturas de bactérias lácticas, 27 de leveduras e 28 de bolores. As bactérias foram repicadas 3 dias antes da data dos experimentos (em triplicata) em tubos inclinados com Ágar MRS e incubadas a 30°C, já os bolores e leveduras foram repicados (em duplicata) 5 dias antes dos experimentos em tubos inclinados com Ágar Malte e incubados a 25°C. Após o período

de incubação o crescimento dos microrganismos foi removido dos tubos com solução salina fisiológica (0,85% de NaCl) e transferidos para erlenmeyers com pérolas de vidro, um para cada tipo de microrganismos (bolores, leveduras e bactérias lácticas) que eram submetidos a agitação em shaker (Gyrotory modelo G-25, New Brunswick Scientific Company Inc., EUA), por cerca de 30 minutos a 140 rpm. Os valores aproximados das diferentes populações microbianas foram estimados no dia dos experimentos por contagem direta na Câmara de Petroff-Hausser (C.A. Hausser & Son, EUA). Os inóculos reais foram determinados por plaqueamento nos meios e condições já citados para cada grupo.

Nos Experimentos I e II, o inóculo utilizado foi da ordem de 10^4 UFC/g de cada grupo de microrganismos e nos demais foi usado 10^3 UFC/g. Conhecida a carga dos inóculos, estimava-se o volume de inóculo a ser adicionado em função da massa de amostra a ser inoculada. Procurava-se trabalhar com o inóculo mais concentrado para que a adição de água nas amostras fosse sempre a mínima necessária para não alterar a atividade de água das mesmas. Nos Experimentos I e II foram utilizadas amostras em duplicata perfazendo um total de 1500 g de produto (2 vidros de 600 g e material para as análises do 0 dia). Nos Experimentos III, IV e V cada formulação tinha 2500g (3 vidros de 600 g e material para análises do 0 dia). Para a realização das análises de rotina apenas um dos frascos era aberto, ficando os demais ou o outro como contra prova. As amostras foram sempre retiradas com toda a assepsia devida.

Todos os tratamentos de cada experimento foram definidos de acordo com o delineamento experimental adotado e preparados no mesmo dia. A quantidade de inóculo adicionado em cada experimento era variável em função das contagens de cada grupo de microrganismos e das intensidades dos inóculos. Todas as formulações foram checadas e as observações pertinentes anotadas no momento do preparo. A seqüência das adições nas formulações era polpa, ácido, açúcar, conservador (quando este fazia parte da formulação adotada) e inóculo. O tempo de mistura era de cerca de 3 minutos em batedeira planetária (Kitchen Aid, modelo K5-A, The Hobart MFG Co., EUA), velocidade 2, antes de adicionar o inóculo. Os inóculos eram manualmente agitados antes da sua incorporação e adicionados na seguinte seqüência: bactérias lácticas, leveduras e bolores. Esta mistura era homogenizada por mais 2 minutos no mesmo equipamento e velocidades já citadas e, antes de colocar nas embalagens finais (vidros

com tampas rosqueáveis de 600g) era feita uma nova mistura manual. Esses vidros foram previamente lavados e esterilizados por 30 minutos em água em ebulição, e as tampas por 10 minutos. Os vidros foram reciclados, porém as tampas eram sempre novas. Ao final de cada formulação, o recipiente de homogeneização, a pá e a colher de raspagem da batedeira planetária eram devidamente lavados em água quente e secos com papel toalha descartável de primeira qualidade. As amostras eram delicadamente acomodadas nos vidros com o auxílio de bastões de vidro evitando-se assim a presença de bolhas de ar. As tampas dos vidros eram levemente rosqueadas e os mesmos eram acondicionados em caixas de papelão fechadas e identificadas. A temperatura da sala de estocagem dos vidros foi controlada e mantida a 25°C, no verão com o uso de ar condicionado instalado nesta sala e no inverno as amostras foram estocadas em estufa incubadora para Disponibilidade Biológica de Oxigênio - BOD (Tecnal, modelo NT 105).

3.2.4. Determinações

As determinações físico-químicas de acompanhamento, a saber, Aa, pH, sólidos solúveis (°Brix) e acidez total (acidez cítrica) foram realizadas a aproximadamente 0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias das datas de início dos experimentos, variando de acordo com a duração de cada tratamento. As determinações para caracterização da matéria-prima foram realizadas apenas no início dos experimentos (umidade, proteína, lipídios totais, cinzas, fibra, pectina e microbiológica). As determinações de vitamina C e açúcares redutores e totais foram realizadas na amostra original e nas finais que se mostraram estáveis. As análises de residual de sorbato, sensorial e cor foram realizadas apenas nas amostras estáveis. As análises microbiológicas de acompanhamento dos experimentos foram feitas a períodos de tempo de aproximadamente 3, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias, de acordo com a duração de cada experimento.

As amostras de todos os tratamentos dos experimentos realizados eram avaliadas diariamente quanto aos aspectos visuais (aparência externa do frasco - vazamentos, bolhas de ar e superfície do produto e aspectos gerais) e aroma, sendo todas as alterações registradas e acompanhadas. A duração das amostras era determinada com base nestes dados. Nas amostras deterioradas era feita a determinação de pH e sólidos solúveis (°Brix).

a) Acidez Total e Curvas de Acidez

A acidez total foi determinada pelo método acidimétrico da A.O.A.C. n. 942.15 B (HELRICH, 1990), utilizando-se na titulação solução de NaOH 0,2N.

A acidez está expressa em porcentagem de ácido cítrico.

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

b) Atividade de água (Aa) teórica, experimental e curvas de calibração do higrômetro.

O primeiro passo para a formulação do produto final foi determinar as quantidades de soluto requeridas para alcançar os níveis desejados de Aa.

Para o cálculo das Aa teóricas das soluções de sacarose, glicose e glicerol, não eletrólitos, utilizou-se o Modelo de Norrish (vide Revisão Bibliográfica item 2.3.2). Exemplos destes cálculos podem ser vistos no Apêndice C. No caso específico do açúcar invertido, o cálculo de Aa teórica foi feito com base na composição do açúcar invertido fornecida pelo fabricante, ou seja, 30% de glicose, 30% de frutose, 40% de sacarose e 76,8 °Brix, utilizando-se o Modelo de Ross (vide Revisão Bibliográfica item 2.3.2). Para o cálculo das Aa teóricas das misturas (Aa calculada) utilizou-se o Modelo de Ross, conhecendo-se experimentalmente a Aa da polpa original.

A medida experimental da Aa das amostras foi feita em um AQUA-LAB, digital, modelo CX-2, fabricado pela Decagon Devices Inc., EUA. Foram retiradas 3 amostras de cada produto, sendo feitas 3 leituras de cada amostra em seqüências alternadas. A temperatura para leitura da Aa foi controlada a $25,0 \pm 0,3$ °C.

Nos ensaios preliminares foram medidas as Aa das polpas puras e com adição de solutos a várias concentrações.

O Aqua-lab foi periodicamente limpo sendo a sua precisão aferida várias vezes durante a realização destes experimentos. Construiu-se as curvas de calibração à mesma temperatura utilizada nas leituras das amostras, com soluções salinas saturadas, padrões de referência (KITIC et alii, 1986). Essas leituras foram feitas em quadruplicatas de seis soluções salinas saturadas diferentes (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, BaCl_2 , KNO_3 e

K_2SO_4) na faixa de Aa de 0,75-1,00, utilizada neste trabalho. Foi feita uma análise de regressão linear e traçadas as respectivas curvas, que podem ser vistas juntamente com os valores levantados no Apêndice B.

c) Sólidos Solúveis (°Brix)

Os graus Brix foram determinados por refratometria de acordo com o método 13.6.1 do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). A leitura dos graus Brix foi utilizada como medida do teor de sólidos solúveis. Os valores medidos foram corrigidos em relação à temperatura de 20°C, de acordo com a Tabela Internacional de Correção de Temperatura 936.19 (HELRICH, 1990). No caso das amostras com teores de acidez total superiores a 1%, as leituras obtidas foram corrigidas em função do teor de ácido cítrico, com auxílio da Tabela de Correção de °Brix em função do teor de ácido cítrico anidro (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

O refratômetro utilizado foi do modelo ABBE - 3L, fabricado pela THE BAUSCH & LOMB, EUA.

d) pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, nº. 4.7.2 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Utilizou-se um pHmetro, digital, modelo pH 1400, INCIBRÁS, calibrado periodicamente com as soluções padrões adequadas.

e) Umidade

Determinada, em duplicata, de acordo com o método 934.06 (HELRICH, 1990).

f) Açúcares redutores e totais

Foram determinados segundo metodologia de Munson & Walker 31.037-31.044 (WILLIAMS, 1984), com amostras em duplicata.

g) Cinzas

Determinada, em duplicata, pelo método 940.26 (HELRICH, 1990).

h) Proteína bruta

Determinada, com amostras em duplicata, de acordo com o método 46-12 (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 1983).

i) Lipídios totais

Determinados, em duplicata, por hidrólise de acordo com a metodologia 936.15 (HELRICH, 1990).

j) Pectina

Determinada, em duplicata, de acordo com o método de Carré & Haynes (PEARSON, 1976).

k) Fibra

Determinada, em duplicata, de acordo com o método de Scharrer & Kurschner (DIEMAIR, 1963).

l) Vitamina C

Foi determinada, pela média de quatro titulações, de acordo com o método de Tillmans (LEES, 1975). Está expressa em mg de ácido ascórbico por 100g de amostra.

m) Residual de sorbato de potássio

O sorbato de potássio foi quantificado por espectrofotometria, em duplicata, segundo metodologia proposta por CECCHI (1988). Foram calculadas as médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos valores obtidos. Tomou-se inicialmente, aleatoriamente, uma das amostras e testou-se por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria, para verificar-se a presença de possíveis interferentes. Como foi comprovada a ausência de interferentes, as demais amostras foram analisadas apenas por espectrofotometria.

Cromatografia em camada delgada

Pesou-se 50 g da amostra e adicionou-se 100 ml de etanol (álcool etílico hidratado 92,8° INPM marca comercial "Coperalcool", Copersucar). Agitou-se a mistura por 30 minutos em agitador mecânico e filtrou-se. Tomou-se uma alíquota de 50 ml do filtrado e

evaporou-se num evaporador rotatório a 40 °C até cerca de 25 ml. Adicionou-se 25 ml de água destilada e 4 ml de H₃PO₄ 4N e colocou-se num funil de separação. Extraiu-se com 50 ml da mistura de éter etílico e éter de petróleo (1:1). Reservou-se a fase orgânica. Fez-se nova extração com mais 50 ml da mistura etérea. A fase orgânica foi reservada e a fase aquosa descartada. Juntou-se as duas fases orgânicas e evaporou-se em evaporador rotatório a 40 °C até cerca de 2 ml. A amostra foi seca completamente com injeção de nitrogénio e logo após dissolvida com 2 ml de etanol.

Condições utilizadas na cromatografia por camada delgada:

- fase estacionária: sílica gel GF 254
- fase móvel: hexano / ácido acético (90:10)
- volume de aplicação: 10µl.
- altura do solvente: cerca de 12 cm.
- solução padrão: ácido sórbico 10 mg/100 ml de etanol.

Após o término da cromatografia, o padrão e a amostra foram raspados da placa cromatográfica para um balão volumétrico de 10 ml com o auxílio de uma espátula de aço inoxidável. De uma porção não utilizada da placa, foi raspada uma área aproximadamente igual à da amostra, para servir como branco na leitura espectrofotométrica. Após a diluição com 7 ml de etanol, o balão foi tampado e agitado por 30 segundos e o volume foi completado. A solução foi deixada até o dia seguinte em repouso para separação da sílica-gel. O sobrenadante foi recolhido numa cubeta de quartzo de 1 cm³ e foi registrado o espectro entre 200 e 325 nm.

Tomou-se os valores das absorbâncias máximas nos espectros Ultra Violeta (UV) do conservador em cada amostra e interpolou-se na curva padrão Absorbância x Concentração, previamente levantada, obtendo-se assim os valores da concentração de sorbato nas amostras analisadas. Tal curva foi construída a partir das seguintes concentrações de ácido sórbico : 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg em 100 ml de etanol.

Espectrofotometria

Pesou-se 1g de amostra num erlenmeyer com tampa e adicionou-se 100 ml de etanol. Agitou-se por 30 minutos em agitador mecânico e filtrou-se. Tomou-se uma alíquota de 25 ml do filtrado e colocou-se num balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume

com etanol. Quando necessário fez-se novas diluições para que as leituras da absorbância fossem sempre abaixo de 0,800. O espectrofotômetro utilizado foi Ultra Violeta (UV)/Visível, duplo feixe, com registrador, marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 6. A concentração de sorbato foi calculada da mesma forma já descrita na cromatografia de camada delgada.

n) Cor

As amostras de polpa de goiaba dos Experimentos IV e V que se mostraram estáveis (armazenamento de 4 meses a 25 °C) e uma amostra da polpa original foram passadas em desaerador de laboratório a vácuo (Cunnigton and Cooper Ltda, Inglaterra) até a ausência de bolhas de ar, sendo a seguir colocadas em cápsula de fundo de quartzo e feitas as leituras na faixa de 360 a 740 nm, tendo as amostras opacidade comprovada para a medição da cor.

As medidas de cor foram feitas por reflexão em espectrofotômetro Color Eye COMCOR 1500 Plus (COMEXIM Mat. Primas Indústria e Comércio Ltda, São Paulo), iluminante C, ângulo de observação de 2°, sistema L*a*b* CIE ("Commission Internationale de L' Eclairage"), abertura normal e configuração DREOL, sendo que L* mede a luminosidade, isto é, o quanto a cor é clara ou escura, a* mede a intensidade de vermelho e b* mede a intensidade de amarelo. A metodologia adotada foi proposta por FERREIRA, 1981.

Os resultados são médias de duas determinações. Com os dados obtidos calculou-se o croma ($C = [(a)^2 + (b)^2]^{1/2}$) e a diferença total da cor em relação à amostra original ($\Delta E = [(L_p - L_a)^2 + (a_p - a_a)^2 + (b_p - b_a)^2]^{1/2}$, sendo que os índices \underline{p} e \underline{a} referem-se respectivamente, a amostra original da polpa e as demais amostras testadas) (FRANCIS & CLYDESDALE, 1975).

Estas mesmas amostras foram também avaliadas visualmente e ordenadas quanto a intensidade de luminosidade, vermelho e amarelo por uma equipe de 9 julgadores com discriminação superior para cor (FERREIRA et alii, 1989). As amostras (blocos completos) foram colocadas em xícaras brancas codificadas com números de 3 dígitos, niveladas e apresentadas aleatoriamente aos julgadores, em cabine de luz Super Skylight (Macbeth, EUA), sob o iluminante C. Os dados da avaliação visual foram

analisados pelo Teste de Friedman, utilizando-se a Tabela de Newel e MacFarlane (NEWELL & MacFARLANE, 1987). A ficha utilizada na avaliação visual encontra-se no Apêndice E. Os coeficientes de correlação foram calculados segundo HOFFMANN & VIEIRA, 1987 e SPIEGEL, 1974.

o) Sensorial

A avaliação sensorial foi realizada apenas nos tratamentos estáveis dos Experimentos IV e V que apresentavam variações no teor de sorbato adicionado e / ou diferença de formulações (Tratamento 6.5 - Experimento IV e Tratamentos 2, 6, 18 e 20 - Experimento V).

Pela facilidade de preparo e melhor percepção sensorial optou-se pela elaboração de suco de goiaba. Esta análise foi feita com o objetivo de avaliar o efeito da adição de sorbato de potássio no sabor do suco elaborado a partir desta polpa e a influência das diversas formulações na percepção do sabor do sorbato. Para o preparo do suco, as polpas foram formuladas segundo cada tratamento e diluídas sem qualquer correção até 12° Brix. Estas amostras foram homogenizadas em liquidificador Walitta, sendo a espuma formada na superfície separada no momento dos testes. Os tratamentos utilizados aqui, foram formulados a partir da polpa original, de modo a evitar quaisquer riscos de contaminação microbiológica aos provadores.

Inicialmente, foi feita uma seleção de provadores, representantes de diferentes grupos sociais, que gostavam de suco de goiaba e que possuíam sensibilidade de percepção ao sabor do sorbato. Para testar a sensibilidade ao sorbato, foi realizado um teste com suco adicionado de 0,3% de sorbato que é bem superior ao utilizado nos tratamentos a serem avaliados que atingiam o máximo de 0,1%, capacitando assim, os provadores a distinguirem o sabor e a sensação do sorbato ao ser ingerido. O suco utilizado neste treinamento foi preparado a partir do tratamento 2 (Experimento V) que possuía menos ácido e sacarose na sua formulação do que os demais tratamentos testados. Este treinamento inicial contou com a participação de 24 pessoas das quais 21 foram selecionadas.

Para a avaliação da diferença dos tratamentos foi escolhido o Método Sensorial Duo-Trio, em que a amostra teste era oferecida juntamente com uma amostra controle (sem

sorbato). Caso fosse detectada a diferença, era solicitado ao provador, que em outra ficha, quantificasse a intensidade de sabor estranho percebido através de escala de intensidade de 7 pontos (MEILGAARD et alii, 1987). Os dados coletados foram analisados estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade segundo o Teste de Significância para o teste Duo-Trio Unilateral ($p=1/2$) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1994). Estas análises foram realizadas em cabines individuais, com luz vermelha e as amostras foram codificadas com 3 dígitos. Os testes foram realizados sempre pela manhã, em dias alternados. As fichas utilizadas na avaliação sensorial estão colocadas no Apêndice E.

p) Microbiológica

As amostras de polpa de goiaba original foram examinadas quanto a contagem de bactérias lácticas, bolores e leveduras, *Salmonella* e coliformes fecais segundo as metodologias recomendadas por SPECK (1984) e VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992). As amostras dos experimentos foram acompanhadas por contagens de bactérias lácticas e bolores e leveduras pelas mesmas metodologias já citadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. POLPA DE GOIABA - CARACTERIZAÇÃO

Nas amostras de polpa de goiaba, recebidas do fornecedor não foram evidenciados bolores, leveduras e bactérias lácticas viáveis. Houve ausência de *Salmonella* em 25 g e não foram detectados coliformes fecais (NMP/g < 3). Os resultados destas análises evidenciaram qualidade microbiológica satisfatória de acordo com a Legislação de Alimentos vigente (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 1992). Uma amostra desta polpa foi colocada em um frasco e deixada a 25°C para testar a sua durabilidade que foi de 10 dias sem a adição de qualquer outro ingrediente, determinada visualmente e pelo odor característico de produtos deteriorados.

A caracterização físico-química das amostras está apresentada na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 - Caracterização físico-química da polpa de goiaba utilizada nos experimentos.

DETERMINAÇÕES	POLPA A	POLPA B
Umidade (%)	80,63	80,80
Cinzas (%)	0,76	0,80
Açúcares Totais (%)	16,72	17,18
Açúcares Redutores (%)	13,21	11,56
Proteína (Nx6,38) (%)	0,94	1,05
Lípidios Totais (%)	0,33	0,34
Pectina (%)	1,40	1,30
Fibra (%)	0,51	0,53
Acidez Cítrica (%)	0,69	0,70
pH	3,92	3,95
°Brix (20°C)	15,2	15,2
Aa	0,991	0,994
Vit.C(mg ác.ascórb/100g am)	49,35	60,14

Como estas amostras eram bastante semelhantes na sua composição, foi utilizada aleatoriamente a amostra B em quase todos os testes, com exceção do Experimento V, e ao findar desta, utilizou-se a amostra A.

4.2. SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DETERIORANTE.

Todos os microrganismos isolados do ambiente industrial (ar, equipamentos e superfícies) e de frutas e seus produtos foram separados e identificados. O interesse em isolar os microrganismos do seu próprio habitat natural era obter cepas que já estavam adaptadas às condições encontradas em polpas de frutas (baixo pH, concentração de açúcar elevada, presença de conservadores, etc) pois as células microbianas apresentam maior resistência às condições adversas se preconditionadas anteriormente a estas situações.

No caso específico da amostragem da saída do desintegrador nenhuma colônia foi isolada, pois esta região é aquecida e as bactérias lácticas e fungos, salvo raras exceções, apresentam baixa resistência térmica. De modo geral, obteve-se uma microbiota variada dos três grupos de interesse em todas as amostragens. Em alguns casos, foi necessário descartar as placas pois estas estavam tão povoadas de vários tipos de microrganismos que não era possível isolá-los. Assim, os dados mencionados nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 referem-se à facilidade de isolamento das colônias dos microrganismos alvos e não à sua quantificação como um todo. Observou-se, pelos dados colocados nestas Tabelas e pelo número de culturas isoladas inicialmente (ao redor de 240), que as leveduras estão amplamente distribuídas e presentes em todas as amostragens efetuadas (foram isoladas ao todo, cerca de 135 cepas de leveduras). Foram isoladas inicialmente 55 cepas de bolores e 42 de bactérias lácticas. Houve um predomínio de bolores e leveduras no ambiente industrial e no isolamento a partir das frutas e seus produtos. As bactérias lácticas tiveram maior ocorrência nas amostragens das superfícies dos equipamentos, mesas de madeira (utilizada na manipulação da matéria-prima "in natura") e mesa de inox (utilizada para misturas de frutas já limpas e açúcar). Na polpa de goiaba deteriorada por exposição ao ambiente industrial (que não está colocada juntamente com os produtos de frutas) todos os microrganismos foram isolados em PDA, sendo 07 de bolores, 01 de bactéria láctica e 01 de levedura.

Em relação aos meios de cultura utilizados, tem-se, pelos dados das Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4, que o PDA foi bastante eficiente para o isolamento dos bolores e leveduras. Como os meios utilizados para o crescimento de bactérias lácticas são muito ricos e não seletivos, observa-se que os fungos apresentam crescimento também neste meio (principalmente as leveduras). O Ágar Rogosa foi o que menos possibilitou o isolamento dos microrganismos alvos. Os meios Ágar MRS e OSA apresentaram comportamento semelhante em relação ao número de colônias isoladas.

TABELA 4.2 - Número de cepas de bactérias lácticas, bolores e leveduras isoladas do ambiente industrial (ar) em diferentes meios de cultura.

Meio	Bactérias Lácticas	Leveduras	Bolores
PDA	5	17	34
OSA	1	4	-
MRS	2	6	1
ROGOSA	1	1	-
TOTAL	9	28	35

TABELA 4.3 - Número de cepas de bactérias lácticas, bolores e leveduras isoladas do ambiente industrial (superfícies dos equipamentos, mesas e balde) em diferentes meios de cultura.

Meio	Bactérias Lácticas	Leveduras	Bolores
PDA	1	11	-
OSA	3	12	-
MRS	6	5	-
ROGOSA	12	2	-
TOTAL	22	30	-

TABELA 4.4 - Número de cepas de bactérias lácticas, bolores e leveduras isoladas das amostras de frutas (polpa de maracujá, morango congelado, morango natural, morango e sementes de morango congeladas e morango congelado adicionado de açúcar) em diferentes meios de cultura.

Meio	Bactérias Lácticas	Leveduras	Bolores
PDA	-	31	9
OSA	7	22	3
MRS	3	21	1
ROGOSA	1	2	-
TOTAL	11	76	13

Os inóculos utilizados em todos os experimentos realizados foram separados por grupos (bactérias lácticas, leveduras e bolores) e formados por 12 cepas de bactérias lácticas, 27 cepas de leveduras (uma já previamente estabelecida, *Z. bailii*) e 28 cepas de bolores que foram identificadas conforme pode ser visto nas Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7. Nestas tabelas não foram mencionadas as cepas iguais em gênero e espécie para o mesmo local de amostragem.

Pela Tabela 4.5 observa-se que entre as bactérias lácticas tem-se uma ocorrência próxima entre os gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* com respectivamente 6 e 5 cepas. Já para as leveduras a maior ocorrência pelos dados da Tabela 4.6 foi de *Candida* com 8 cepas. Entre os bolores de maior ocorrência está o gênero *Penicillium* do qual tem-se 09 cepas, seguido pelo *Ascomycetes* com 06 cepas (Tabela 4.7).

No caso dos bolores e leveduras não foi possível identificar todas as cepas utilizadas no inóculo, devido a complexidade desta atividade que envolveria um trabalho minucioso com a complementação dos dados com outras provas, o que exigiria um tempo bastante extenso e a participação de especialistas nestes gêneros, o que foge aos objetivos deste trabalho. Algumas cepas mais comuns foram identificadas apenas

pelo gênero (identificação visual) e para as mais complexas, a identificação tem caráter provisório, necessitando de outras provas para a sua confirmação.

No caso específico dos *Ascomycetes* estas cepas seriam supostamente deste gênero, pois não foi possível visualizar os ascos na observação ao microscópio. Estas culturas teriam que ser cultivadas em OA com pedaços de folha de bananeira por cerca de 6 meses o que foge aos objetivos deste trabalho. Porém, em duas culturas foi possível a visualização dos ascos, o que permitiu a sua identificação.

TABELA 4.5 - Bactérias lácticas isoladas do ambiente industrial e de frutas.

LOCAL DE AMOSTRAGEM	Identificação
Balde plástico	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris</i>
Balde plástico	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Mesa de inox	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Mesa de inox	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides/ dextranicum</i>
Polpa morango congelado	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris</i>
Mesa de madeira	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides/ dextranicum</i>
Sala 1 (próximo à porta)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Polpa morango e sementes congeladas	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Desintegrador	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides/ dextranicum</i>
Polpa de maracujá	<i>Lactobacillus brevis</i>
Maracujá "in natura"	<i>Leuconostoc citreum</i>

TABELA 4.6 - Leveduras isoladas do ambiente industrial e de frutas e seus produtos.

LOCAL DE AMOSTRAGEM	IDENTIFICAÇÃO
Sala 2 (próximo ao exaustor)	provável: <i>Candida krusei</i>
Sala 2 (próximo ao exaustor)	provável: <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
Sala 2 (próximo ao enchimento)	<i>Rhodotorula sp</i>
Sala 2 (próximo ao preparo)	<i>Candida magnoliae</i>
Sala 2 (próximo ao desintegrador)	<i>Rhodotorula sp</i>
Sala 2 (próximo ao desintegrador)	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Sala 2 (próximo ao desintegrador)	provável: <i>Candida guilliermondii</i>
Desintegrador	<i>Rhodotorula sp</i>
Desintegrador	<i>Kloeckera apiculata</i>
Desintegrador	<i>Torulopsis candida</i>
Desintegrador	<i>Candida magnoliae</i>
Balde plástico	<i>Trichosporon pullulans</i> (provisório)
Mesa de inox	<i>Hansenula sp</i>
Polpa de morango e sementes congeladas	provável: <i>Candida parapsilosis</i>
Polpa de morango congelada adicionada de açúcar	<i>Candida pelliculosa</i>
Polpa de maracujá	<i>Candida inconspicua</i>
Polpa de maracujá	<i>Kloeckera apiculata</i>
Polpa de maracujá	<i>Trichosporon pullulans</i>
Polpa de maracujá	provável: <i>Hansenula anomala</i>
Polpa de maracujá	provável: <i>Hansenula platypodis</i>
Maracujá "in natura"	<i>Torulopsis magnoliae</i>
Maracujá "in natura"	"Yeast like fungi" (levedura com micélio verdadeiro)
Morango "in natura"	<i>Candida magnoliae</i>
Morango "in natura"	<i>Kloeckera apiculata</i>

TABELA 4.7 - Bolores isolados do ambiente industrial e frutas e seus produtos.

LOCAL DE AMOSTRAGEM	IDENTIFICAÇÃO
Sala 2 (próximo ao exaustor)	<i>Penicillium glabrum</i>
Sala 2 (próximo ao exaustor)	<i>Ascomycetes sp</i>
Sala 2 (próximo ao desintegrador)	<i>Penicillium variabile</i>
Sala 2 (próximo ao desintegrador)	<i>Penicillium crustosum</i>
Sala 2 (próximo ao desintegrador)	<i>Coelomycetes sp</i>
Sala 2 (próximo ao enchimento)	<i>Ascomycetes sp</i>
Sala 2 (próximo ao enchimento)	<i>Leptosphaerulina australis</i>
Sala 2 (próximo ao enchimento)	<i>Penicillium viridicatum</i>
Sala 2 (próximo ao enchimento)	<i>Coelomycetes sp</i>
Sala 2 (próximo ao enchimento)	<i>Penicillium glabrum</i>
Sala 2 (próximo ao preparo)	<i>Penicillium glabrum</i>
Sala 2 (próximo ao preparo)	<i>Leptosphaerulina australis</i>
Sala 2 (próximo ao preparo)	<i>Ascomycetes sp</i>
Polpa deteriorada de goiaba	<i>Penicillium crustosum</i>
Polpa deteriorada de goiaba	<i>Scopulariopsis sphaerospora</i>
Polpa deteriorada de goiaba	<i>Penicillium solitum</i>
Polpa deteriorada de goiaba	<i>Cladosporium sp</i>
Polpa deteriorada de goiaba	<i>Coelomycetes sp</i>
Maracujá "in natura"	<i>Fusarium verticillioides ou F. moniliforme</i>
Maracujá "in natura"	<i>Fusarium subglutinans</i>
Maracujá "in natura"	<i>Cladosporium sp</i>
Goiaba "in natura"	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
Goiaba "in natura"	<i>Penicillium solitum</i>
Polpa de morango congelada adicionada de açúcar	<i>Ascomycetes sp</i>

No caso das frutas e seus produtos o interesse não foi apenas isolar microrganismos, mas também quantificar a sua incidência para utilizar os dados desta contagem no estabelecimento da intensidade do inóculo a ser utilizado nos experimentos.

A Tabela 4.8 apresenta os dados das contagens de microrganismos em frutas e seus produtos. No caso específico da goiaba "in natura" temos que esta era da variedade de mesa, plantada, colhida e transportada com maior zelo do que normalmente as destinadas ao processamento industrial, por este motivo temos aqui uma contagem menor do que a habitual para produtos "in natura", se comparada com os morangos, por exemplo. As polpas de frutas apresentaram contagens da ordem de 10^2 - 10^3 UFC/g, com exceção da polpa de maracujá que apresentou contagem da ordem de 10^4 UFC/g. A intenção inicial era trabalhar com carga microbiana acima da máxima tolerada pela Legislação Brasileira de Alimentos vigente (ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS BRASILEIRA DA ALIMENTAÇÃO, 1992), que é de 10^3 UFC/g, sendo esta empregada nos Experimentos I e II (10^4 UFC/g). Porém, após os resultados destes experimentos, da dificuldade apresentada em conter a deterioração microbiológica com cargas desta ordem e pela análise das contagens de polpas já pasteurizadas citadas na Tabela 4.8, adotou-se o nível de contaminação de 10^3 UFC/g, que estava mais condizente com a contaminação normalmente encontrada nestes produtos. No caso do uso da tecnologia de métodos combinados é recomendado que o processador de alimentos adote práticas adequadas de higiene e sanificação, como por exemplo, a lavagem satisfatória das frutas antes do processamento que ajudarão a reduzir a carga inicial da matéria-prima, além da pasteurização da polpa que fará com que este produto esteja certamente com nível de contaminação microbiana igual ou menor que 10^3 UFC/g.

A quantidade de inóculo adicionada em cada experimento variou em função das contagens de cada grupo de microrganismos e das intensidades das preparações dos inóculos. Foi observado em todos os experimentos realizados que a Câmara de Petroff funcionou satisfatoriamente para a estimativa rápida da contagem dos inóculos, sendo bastante coerente com as contagens obtidas pelo plaqueamento. As contagens reais obtidas estavam de acordo ou próximas ao nível de contaminação desejado em todos os experimentos realizados. Em alguns casos, ocorreram que um grupo de microrganismos

isoladamente apresentou contagens inferiores às desejadas, no entanto, a contagem total de microrganismos estava dentro do valor da contaminação desejada.

TABELA 4.8 - Contagem de bolores, leveduras e bactérias lácticas em frutas e seus produtos.

Amostra	Bolores e Leveduras (UFC/g)*	Bactérias Lácticas (UFC/g)*	
		OSA	MRS
Morango e sementes congeladas	$4,2 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^3$
Morango natural	$1,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$
Morango congelado			$1,7 \cdot 10^3$
Morango congelado adicionado de açúcar	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	
Polpa de maracujá	$3,3 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$
Goiaba "in natura"	$2,3 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^3$	

* UFC/g = unidades formadoras de colônias por grama

4.3 ENSAIOS PRELIMINARES

O objetivo destes ensaios foi avaliar os efeitos individuais da adição de solutos e ácidos na polpa de goiaba.

4.3.1. Efeito da adição de ácidos no pH e acidez da polpa de goiaba.

Avaliou-se a influência dos ácidos mais usados na indústria de alimentos e que são permitidos para os produtos mais populares elaborados a partir da polpa de goiaba. A Figura 4.1. apresenta a comparação do efeito dos ácidos fosfórico, cítrico e láctico com relação ao pH da polpa de goiaba. Os ácidos testados apresentaram comportamento semelhante na redução do pH apenas para as concentrações muito baixas, para as demais o ácido fosfórico abaixou mais o pH seguido pelo cítrico e láctico, nas mesmas concentrações. Embora nos testes tenham sido utilizados ácidos

fosfórico e láctico 85% em solução, estas concentrações foram corrigidas para 100% para a comparação dos seus efeitos.

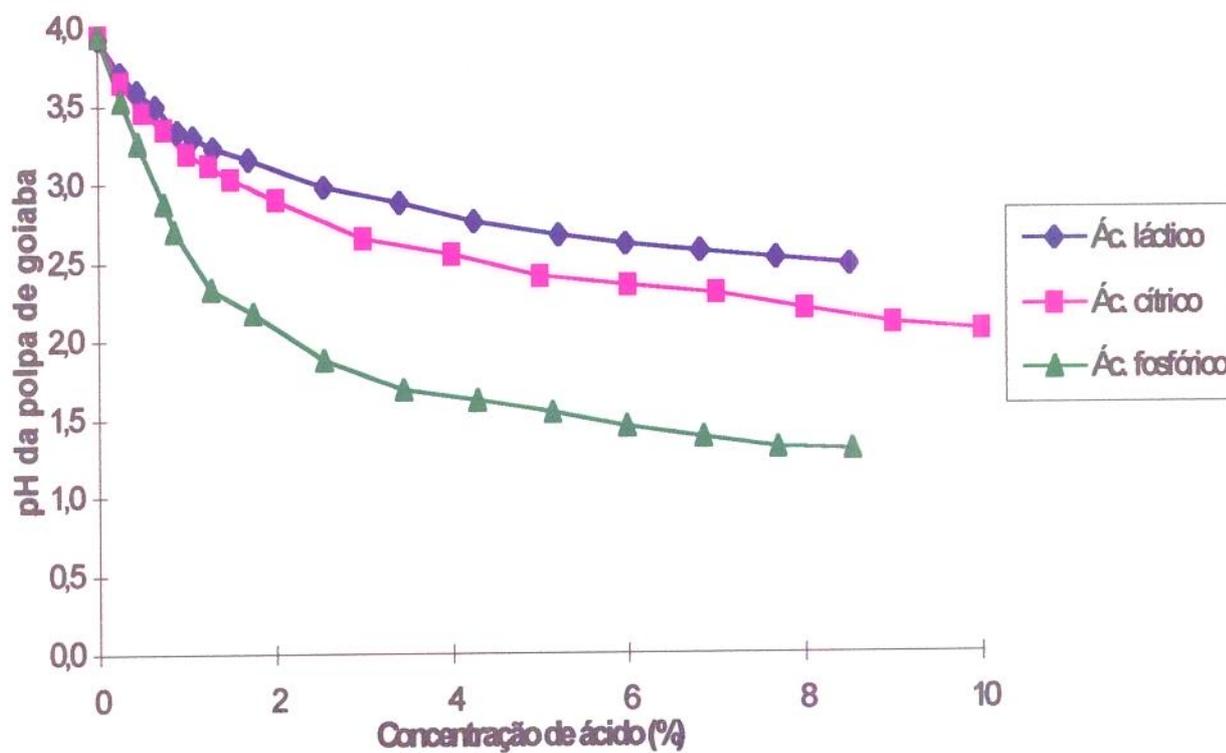


FIGURA 4.1 - Efeito da adição de ácidos no pH da polpa de goiaba.

A Figura 4.2 apresenta o efeito dos ácidos testados sobre a acidez da polpa de goiaba. Observa-se que o ácido fosfórico aumentou mais a acidez da polpa de goiaba seguido pelo cítrico e láctico. Em baixas concentrações, até cerca de 1% estes ácidos apresentam comportamento semelhantes.

Como o objetivo deste trabalho não era reduzir drasticamente o pH nem a acidez da polpa, o que poderia trazer consequências negativas (como sinérese, alteração de sabor nos produtos a serem elaborados a partir desta polpa, etc.) e pelo fato destes ácidos apresentarem comportamento muito semelhantes até os níveis de pH e acidez aceitáveis (pH no mínimo de 3,0 e acidez máxima de 1%) optou-se pela utilização do ácido mais popularmente utilizado para o controle de pH em geléias e doces que é o ácido cítrico.

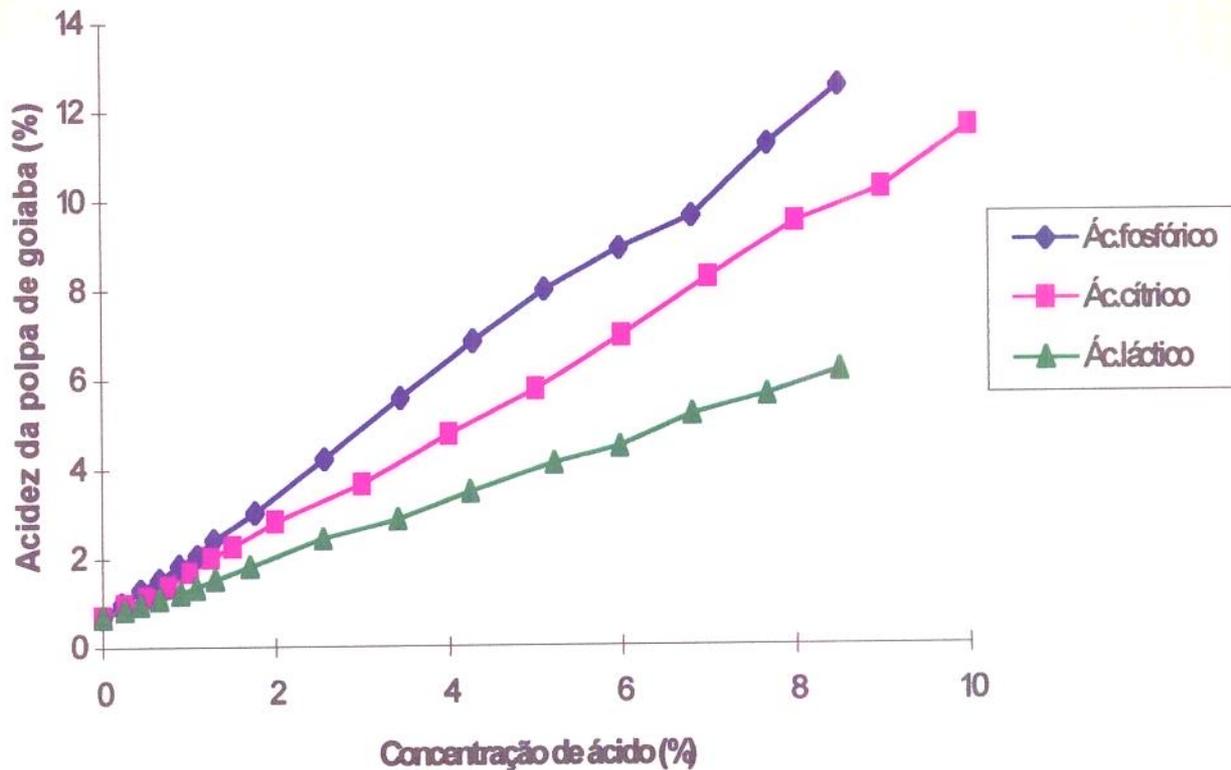


FIGURA 4.2 - Efeito da adição de ácidos na acidez da polpa de goiaba.

4.3.2. Efeito da adição do ácido cítrico no teor de sólidos solúveis (°Brix) e na Aa da polpa de goiaba.

Para a avaliação do teor de sólidos solúveis (°Brix) e Aa em relação a utilização de ácidos foi adicionado o máximo da concentração de ácido cítrico (1,5 %) utilizada na maioria dos experimentos, com exceção do Experimento I no qual foi utilizado 3,0% (concentração esta também investigada) e realizadas as medidas pertinentes. Os resultados estão mostrados na Tabela 4.9. Praticamente a Aa não sofreu variação pois a diferença de 0,003 está dentro do erro experimental existente, que é de cerca de 0,005. Com relação à variação em termos de sólidos solúveis (°Brix) foi observado que a adição de ácido cítrico aumenta ligeiramente a concentração do produto.

TABELA 4.9 - Variação de sólidos solúveis (°Brix) e Aa em relação a adição de ácido cítrico.

AMOSTRA	Sólidos Solúveis (°Brix, 20°C)	Aa
Polpa inicial	15,1	0.991
Polpa com 1,5 % de ácido cítrico	16,1	0.988
Polpa com 3,0 % de ácido cítrico	17,1	0.988

4.3.3. Efeito da adição de solutos na Aa (teórica e experimental) da polpa de goiaba.

Para a determinação experimental de Aa agregou-se à polpa de goiaba sacarose, glicose, glicerol e açúcar invertido a diferentes concentrações suficientes para reduzir Aa até cerca de 0,90.

As Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 comparam os valores de Aa experimentais, teóricos e calculados (vide item 3.6.2 - Materiais e Métodos) da polpa de goiaba em função da adição dos solutos. Para todos os solutos testados a comparação das curvas experimentais, teóricas e calculadas, revela que há uma concordância razoável entre valores experimentais e preditos por equações. Os valores de Aa calculados e experimentais se mostraram bastante próximos para estes solutos. Para a sacarose e glicose houve uma diferença maior entre esses valores nas concentrações acima de 30%, para o glicerol acima de 20%, e para o açúcar invertido apenas para os valores acima de 45%. Assim seria possível prever os valores de Aa após a adição destes solutos nos casos em que a polpa de goiaba apresentasse Aa iniciais diferentes.

De modo geral os valores de Aa experimentais apresentaram-se ligeiramente menores que os calculados ou bastante próximos, indicando que em termos práticos pode-se alcançar valores de Aa ainda menores que os projetados, conferindo assim uma melhor estabilidade microbiológica ao produto.

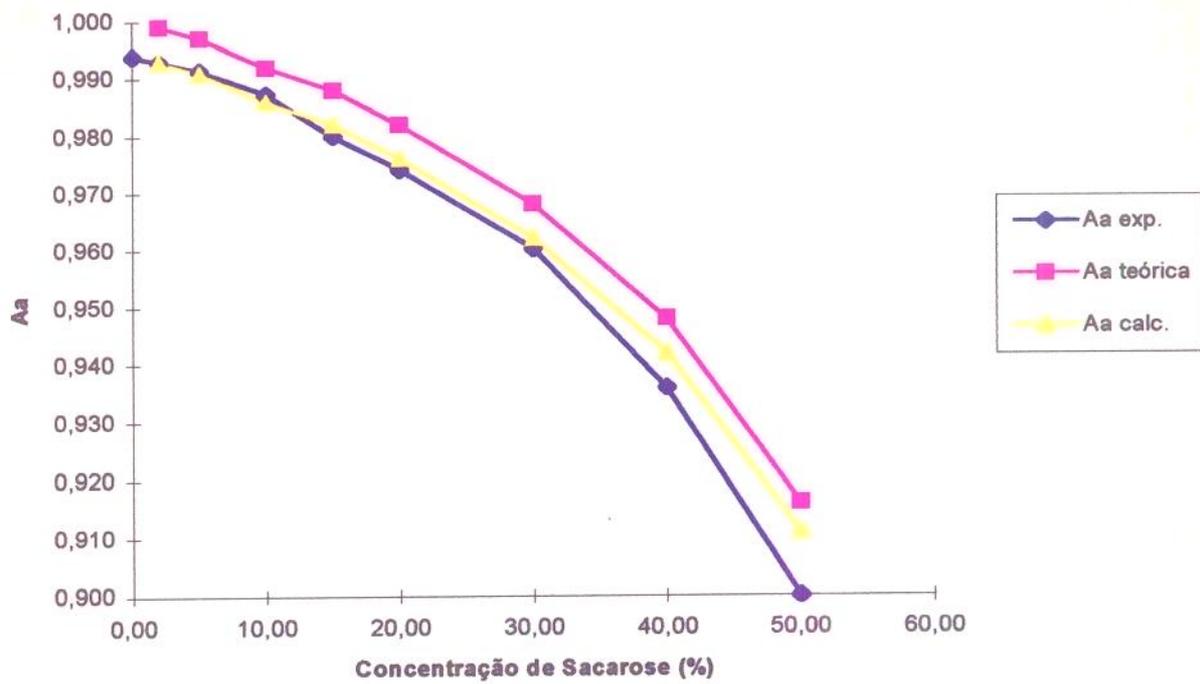


FIGURA 4.3 - Efeito da adição de sacarose na Aa teórica, experimental e calculada da polpa de goiaba.

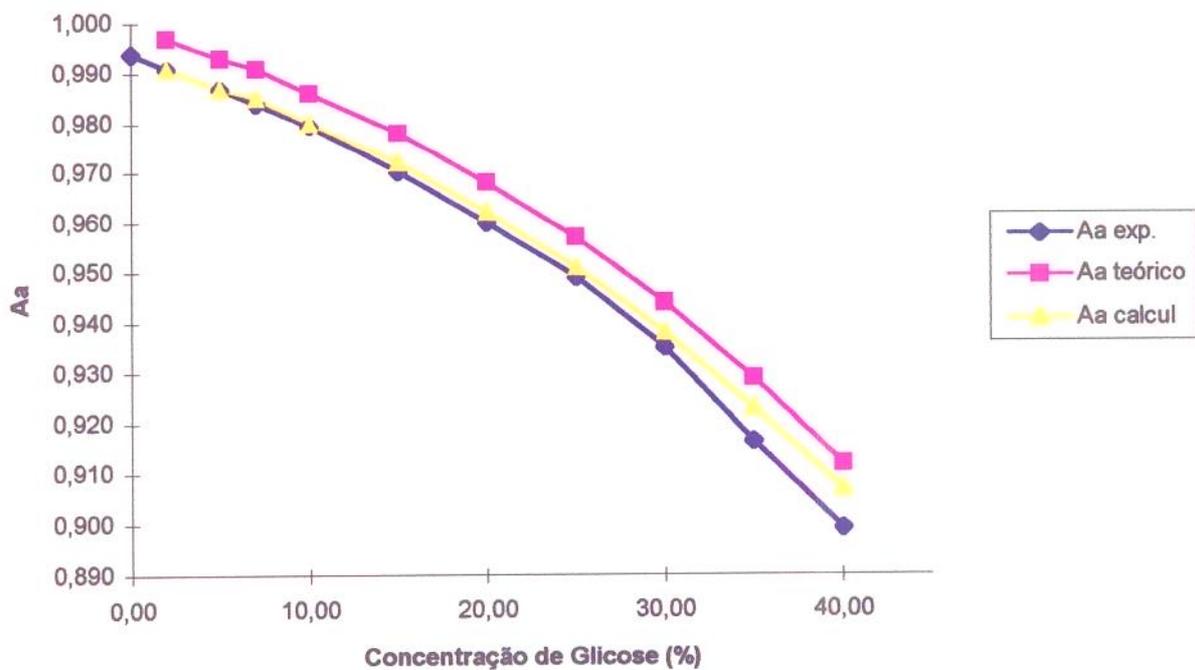


FIGURA 4.4 - Efeito da adição de glicose na Aa teórica, experimental e calculada da polpa de goiaba.

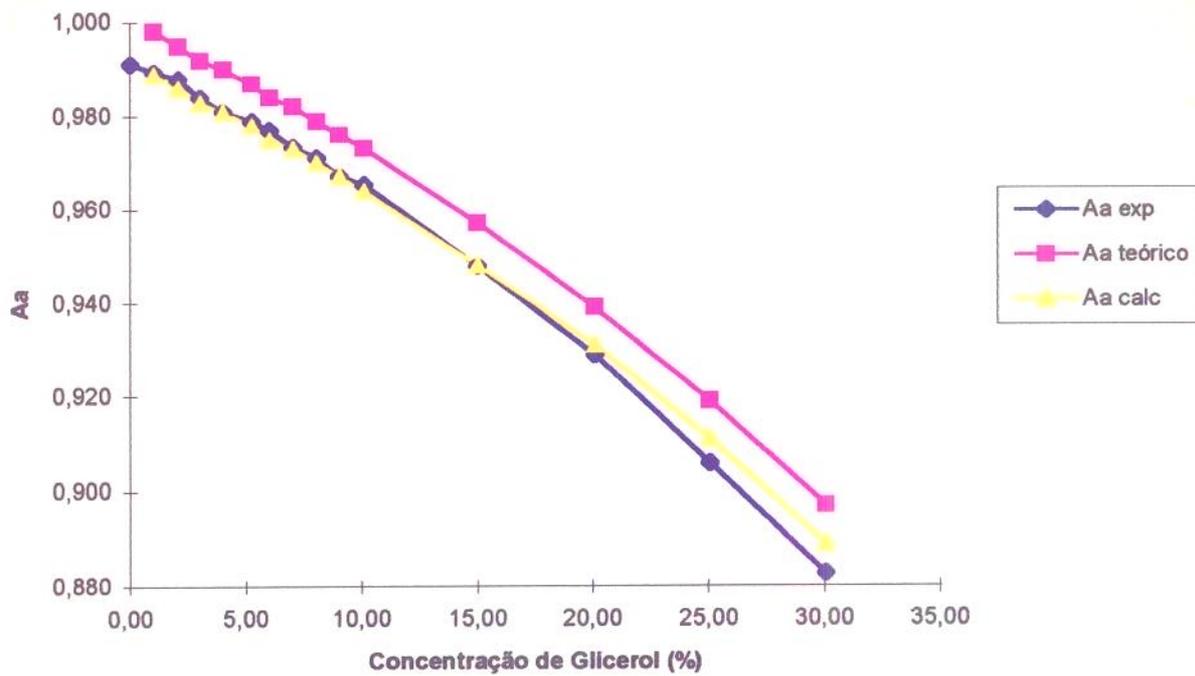


FIGURA 4.5 - Efeito da adição de glicerol na Aa teórica, experimental e calculada da polpa de goiaba.

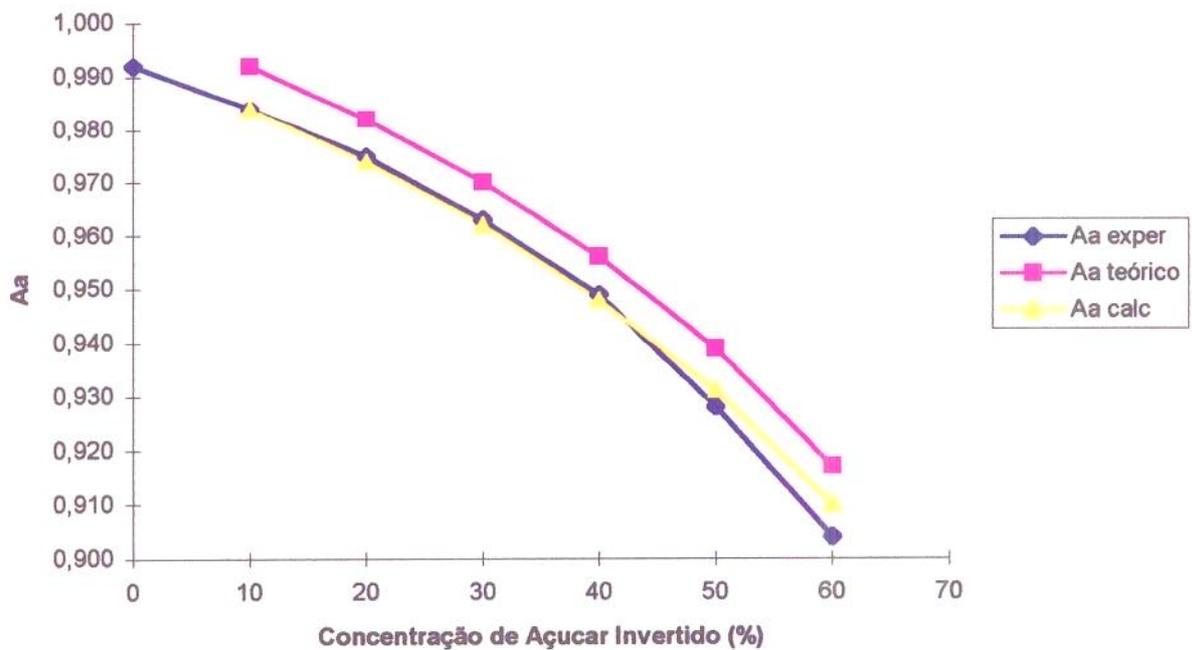


FIGURA 4.6 - Efeito da adição de açúcar invertido na Aa teórica, experimental e calculada da polpa de goiaba.

A Figura 4.7 retrata uma comparação da capacidade de redução de Aa provocada pela adição de solutos na polpa de goiaba. Observa-se que o glicerol é o maior depressor de Aa do produto, seguido pela glicose, sacarose e açúcar invertido. Esse fato está relacionado aos pesos moleculares desses solutos que crescem na seguinte ordem: glicerol, glicose e sacarose. Até cerca de 20 % de concentração o açúcar invertido reduz ligeiramente mais a Aa do que a sacarose, porém acima desta concentração a sacarose apresenta maior eficiência na redução de Aa. Apesar do açúcar invertido ser composto de mistura de glicose e frutose de menores pesos moleculares que a sacarose, o açúcar invertido também apresenta na sua composição sacarose e água que contribuem para a menor eficiência deste soluto na redução de Aa nas mesmas concentrações.

A escolha do soluto utilizado considerou os seguintes aspectos: o glicerol possui sabor amargo-doce sendo mais indicado para produtos salgados e possui preço maior que a sacarose e açúcar invertido (vide Figura 2.4 - Revisão Bibliográfica), a glicose encareceria o produto (vide Figura 2.4 - Revisão Bibliográfica) e o açúcar invertido foi o menos eficiente na redução de Aa. A preferência foi dada ao produto mais popularmente empregado na indústria de alimentos nacional como é o caso da sacarose de cana-de-açúcar, de fácil utilização e de preço relativamente menor.

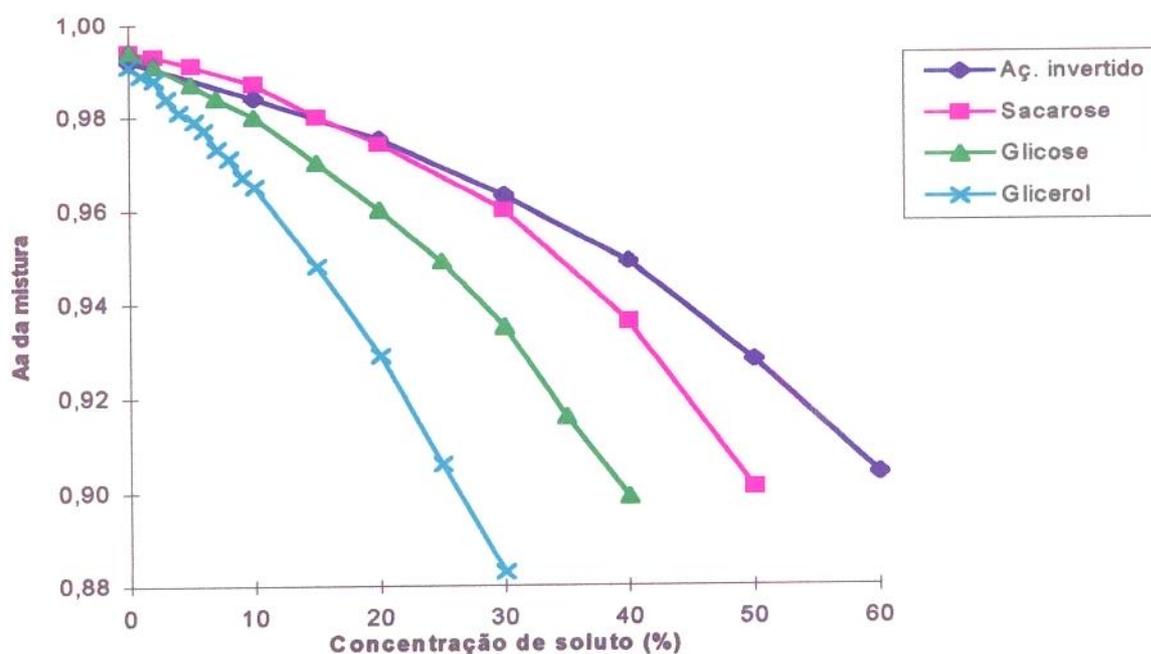


FIGURA 4.7 - Efeito da adição de solutos na Aa da polpa de goiaba.

4.4. ENSAIOS DEFINITIVOS

4.4.1. Experimentos I, II e III.

Nestes experimentos tentou-se atingir a estabilidade química e microbiológica da polpa de goiaba pela combinação de dois fatores de obstáculos: concentração de sacarose e ácido cítrico, escolhidos pelas observações dos ensaios preliminares. Todos esses experimentos foram delineados pela Metodologia de Superfície de Resposta. Partiu-se inicialmente da concentração de sacarose de 0% e foi-se aumentando esta concentração ao longo desses experimentos até o ponto que inviabilizasse a sua utilização (concentração limite estabelecida pela legislação vigente de alimentos para produtos de goiaba). Tentou-se nestes três primeiros experimentos alcançar a estabilidade microbiológica das amostras apenas pela redução de Aa e pH. No entanto, estes dois obstáculos apenas, não foram suficientes para conter a deterioração das amostras. Os níveis de Aa variaram de 0,980 a 0,884 no Experimento I, 0,913 a 0,853 no Experimento II e 0,892 a 0,828 no Experimento III. O pH variou de 3,95 a 3,00 no Experimento I, 3,88 a 3,10 no Experimento II e 3,91 a 3,10 no Experimento III. Nos Experimentos I e II foi utilizado o inóculo de 10^4 UFC/g, e no Experimento III 10^3 UFC/g, adotados segundo critérios já expostos no item 4.2.

A Figura 4.8 apresenta as condições de cada tratamento empregado nos Experimentos I, II e III e suas respectivas vidas-de-prateleira. Como o Experimento I foi delineado em função da % sacarose em relação a água disponível na mistura, suas unidades foram convertidas para %p/p para uniformização com os demais experimentos. O tempo de vida-de-prateleira foi aumentando ao longo dos novos delineamentos mas não alcançou os valores desejados (120 dias). A deterioração microbiana foi bastante evidente pela produção de gás e odor desagradável. No caso do Experimento I, a deterioração foi tão veloz que não possibilitou a primeira contagem que seria ao terceiro dia, nem tão pouco o acompanhamento físico-químico e microbiológico ao sétimo dia.

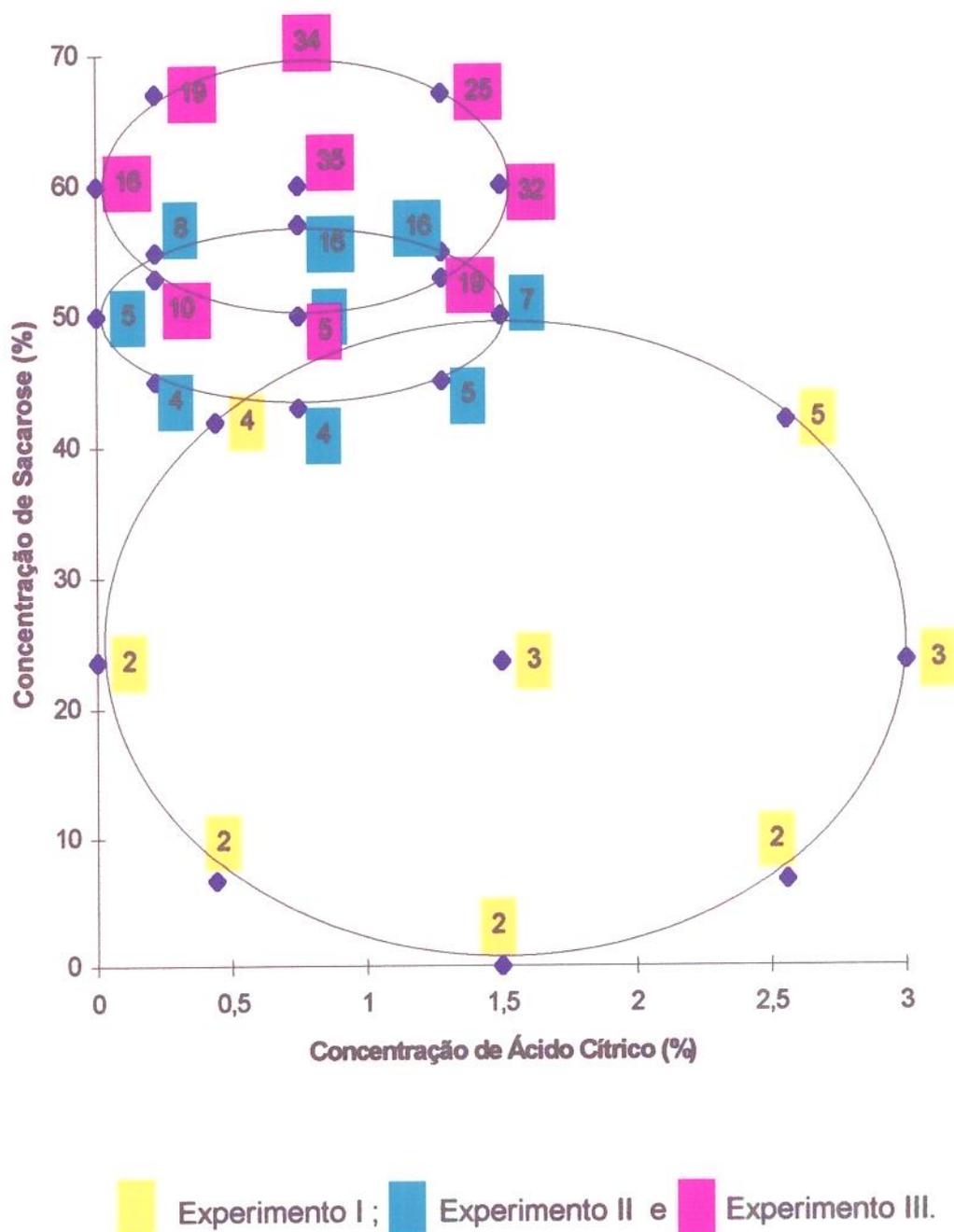


FIGURA 4.8 - Distribuição dos tratamentos dos Experimentos I, II e III e suas respectivas vidas-de-prateleira em dias.

A Figura 4.9 mostra dados dos únicos tratamentos do Experimento II que possibilitaram apenas o primeiro acompanhamento físico-químico. Observa-se que a Aa praticamente se manteve estável, as alterações ocorridas foram na terceira casa decimal que está dentro dos erros de leitura do equipamento. As alterações no pH e teor de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) foram pequenas, devido ao próprio equilíbrio ao longo da estocagem. A acidez cítrica se manteve inalterada. A Figura 4.10 apresenta a evolução das contagens microbianas por grupo de microrganismos inoculados para os tratamentos que apresentaram cargas até o 7^o dia, que foi a última contagem efetuada no Experimento II. Na maioria dos tratamentos a responsável pelas deteriorações foram as leveduras, como pode ser comprovado pelo aumento das cargas em relação a carga inoculada ou pela evolução das contagens. A observação das placas de PDA no momento das contagens, permitiu a detecção da presença de microbiota mista, indicando os efeitos das várias culturas agindo para a deterioração dos tratamentos, não se sobressaindo este ou aquele gênero. As bactérias lácticas e os bolores tem pouca influência na deterioração destas amostras, aparecem em poucos tratamentos e com cargas inferiores ou semelhantes às inoculadas. Em um único tratamento (3), cuja Aa era de 0,905 e pH de 3,30, a carga de bactérias lácticas aumentou, devido certamente as condições favoráveis de Aa e pH, porém neste caso houve também a ação das leveduras que também incrementaram suas cargas em relação a inoculada.

No Experimento III obteve-se contagem de bactérias lácticas apenas aos 7 dias nos tratamentos 1, 5 e 7 estas com respectivamente valores de Aa e pH de 0,882 e 3,67, 0,893 e 3,32, e, 0,839 e 3,88. Novamente os microrganismos responsáveis pela deterioração dos tratamentos foram as leveduras, como pode ser visto na Figura 4.11, e de microbiota mista, embora neste caso se excetua a presença do gênero *Rhodotorula*, facilmente detectável pela coloração característica da colônia (rósea), porém com crescimento a níveis maiores de Aa. Alguns tratamentos (4, 6, 7, 8 e 9) conseguiram inibir inicialmente as culturas, devido ao impacto inicial da baixa Aa, entretanto, já aos 7 dias temos contagens em ascensão. As leveduras estavam presentes em todos os pontos centrais do delineamento adotado, porém como o comportamento era semelhante e para melhor visualização, foi graficado apenas as contagens do tratamento 9.

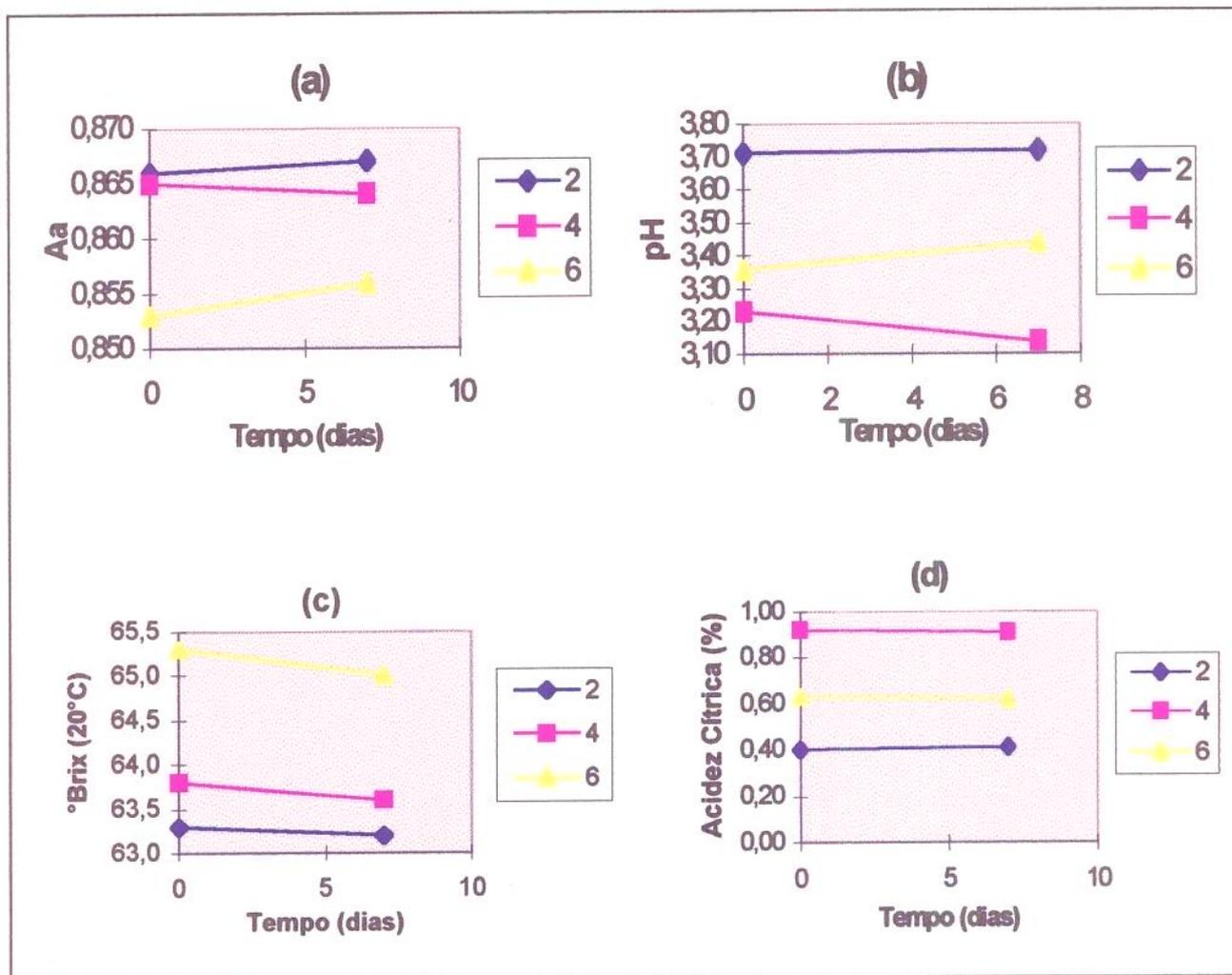


FIGURA 4.9 - Comportamento físico-químico dos tratamentos 2 (54,95% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 4 (54,95% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico) e 6 (57% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico) do Experimento II que apresentaram mais longa vida-de-prateleira em função do tempo de armazenamento a 25° C, de acordo com os parâmetros: (a) Aa, (b) pH, (c) Sólidos Solúveis (°Brix, 20°C) e (d) Acidez Cítrica.

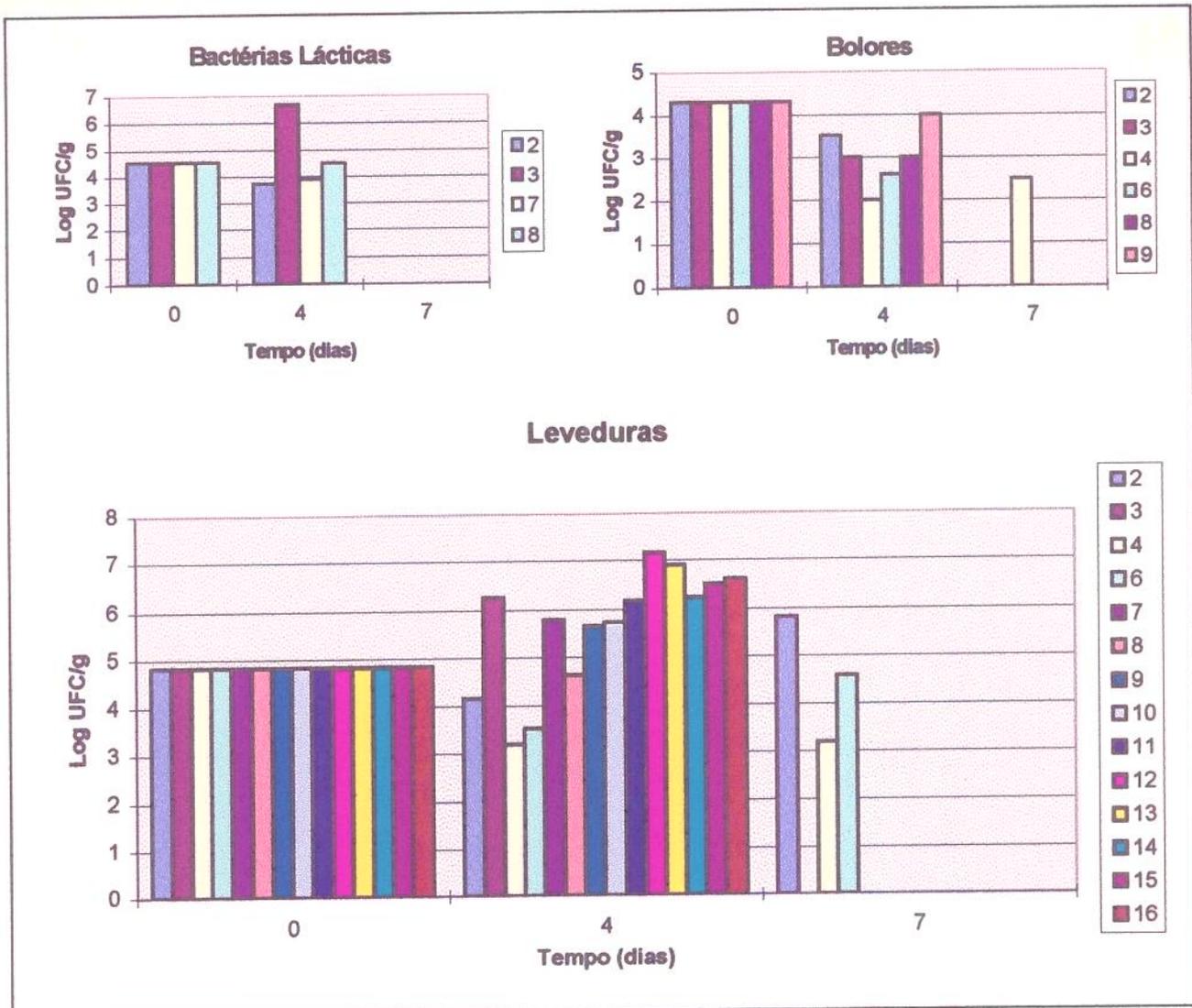


FIGURA 4. 10 - Evolução da contagem microbiana dos tratamentos 2 (54,95 % de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 3 (45,05% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 4 (54,95% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 6 (57% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico), 7 (50% de sacarose), 8 (50% de sacarose e 1,5% de ácido cítrico) e 9 , 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 (50% sacarose e 0,75% de ácido cítrico) no decorrer do Experimento II.

Os bolores em alguns casos apresentaram populações maiores na primeira contagem efetuada, a microbiota dessa contagem era bastante variada em função do próprio material inoculado. Com o decorrer do armazenamento a população de bolores ficou abaixo ou dentro dos valores inoculados, estando dentro dos limites permitidos pela legislação vigente. Aos trinta dias de armazenamento, apenas uma das amostras apresentou contagem de bolores, mostrando mais uma vez que este é um grupo facilmente controlável.

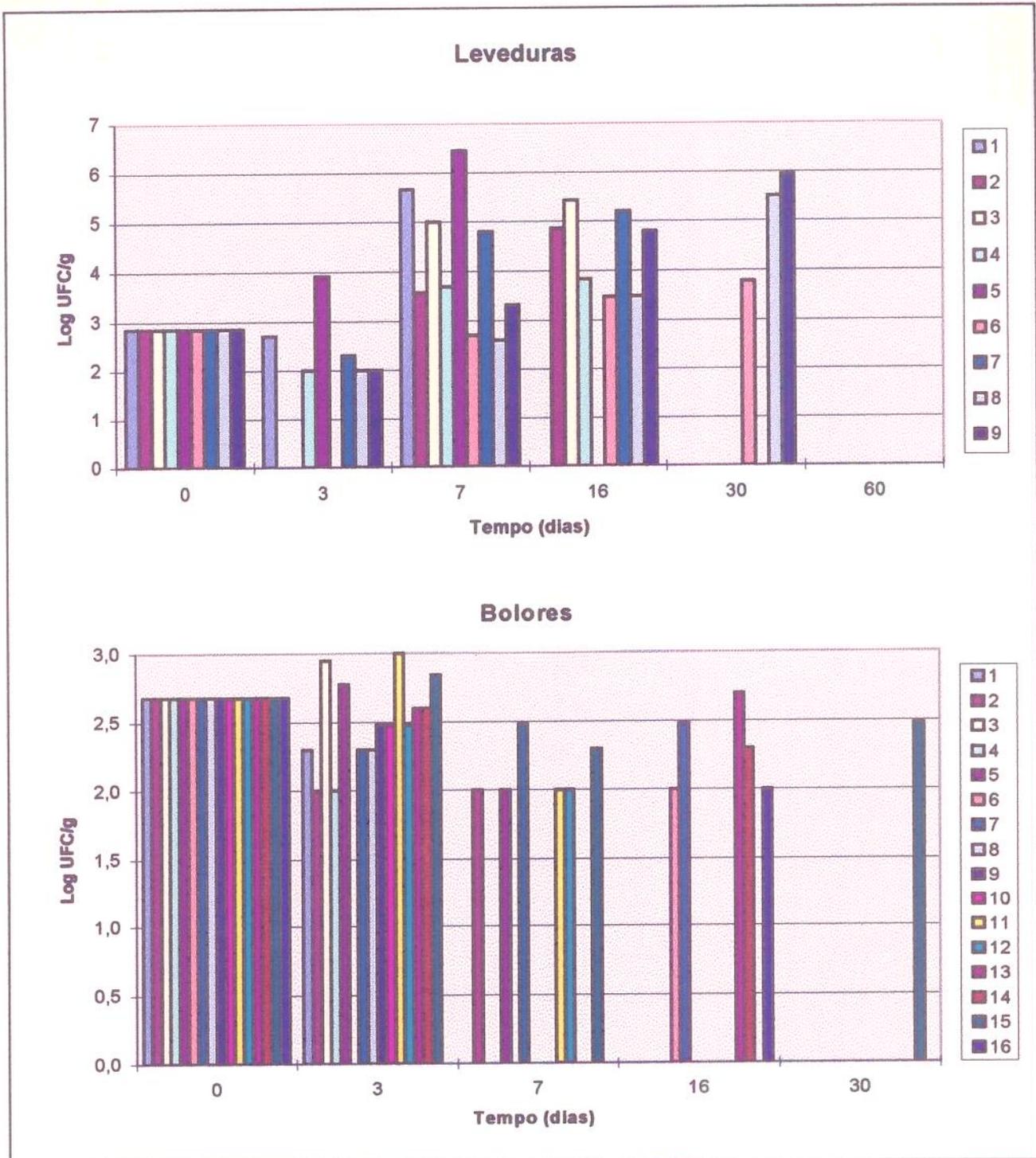


FIGURA 4. 11 - Evolução da contagem de leveduras e bolores no decorrer do Experimento III para os tratamentos 1 (52,93% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 2 (67,07% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 3 (52,93% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 4 (67,07% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 5 (50% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico), 6 (70% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico), 7 (60% de sacarose), 8 (60% de sacarose e 1,5% de ácido cítrico) e 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 (60% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico).

A Figura 4.12 mostra o comportamento físico-químico das amostras do Experimento III que permitiram pelo menos dois acompanhamentos. O pH e a acidez praticamente se mostraram inalterados. A Aa e o teor de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) apresentaram comportamento semelhante, em alguns casos um leve declínio e em outros um ligeiro incremento, porém tudo dentro dos erros usuais envolvidos nas análises. Foi utilizado aleatoriamente, como exemplo do comportamento dos tratamentos do ponto central o tratamento 9.

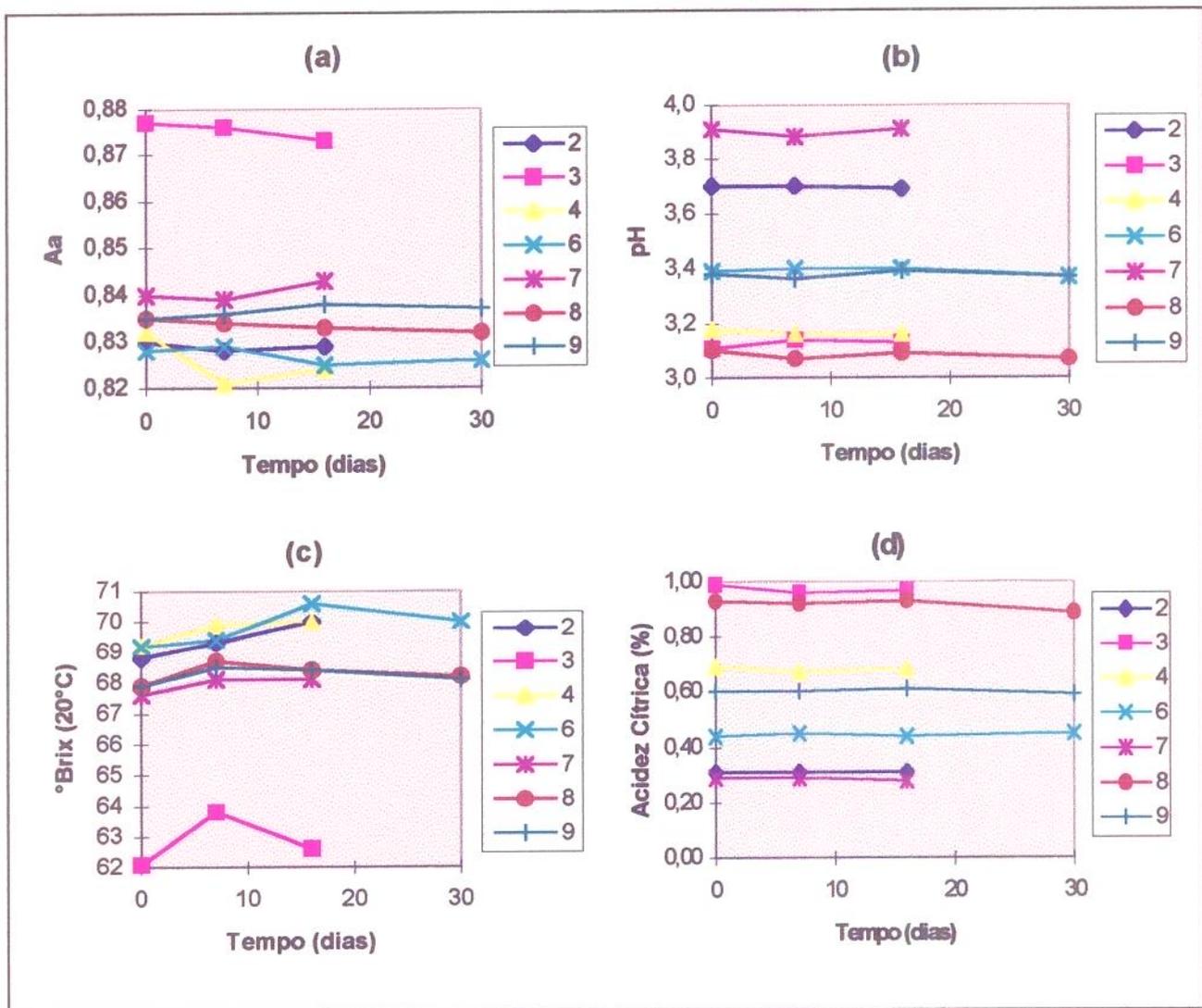


Figura 4.12 - Alterações físico-químicas dos tratamentos 2 (67,07% de sacarose e 0,22% de ácido cítrico), 3 (52,93% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 4 (67,07% de sacarose e 1,28% de ácido cítrico), 6 (70% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico), 7 (60% de sacarose), 8 (60% de sacarose e 1,5% de ácido cítrico) e 9 (60% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico) do Experimento III sendo (a) Aa; (b) pH; (c) sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix, 20°C) e (d) Acidez Cítrica.

Nos Experimentos I, II e III os sinais da deterioração eram facilmente detectáveis como vazamento, mau cheiro, produção intensa de gás, expansão de volume, sinérese (observada apenas nos tratamentos com maior teor de ácido), fermentações e bolhas de ar em todo o conteúdo do frasco. A determinação de pH e sólidos solúveis (°Brix) das amostras deterioradas mostrou valores muito próximos aos iniciais ou menores (Experimento I e II). No caso do Experimento III algumas amostras revelaram valores de °Brix superiores aos iniciais, no entanto, vale ressaltar que estas mesmas amostras apresentaram também diminuição de Aa ao longo do período de armazenamento. Todos os dados coletados nestes experimentos tanto do acompanhamento físico-químico como microbiológico encontram-se no Apêndice A. As maiores evidências da deterioração foram verificadas quando as contagens microbianas alcançavam valores da ordem de $10^5 - 10^6$ UFC/g, as contagens crescentes eram, sem dúvida, um indício de uma potencial deterioração. A Figura 4.13 mostra deteriorações típicas destes experimentos.

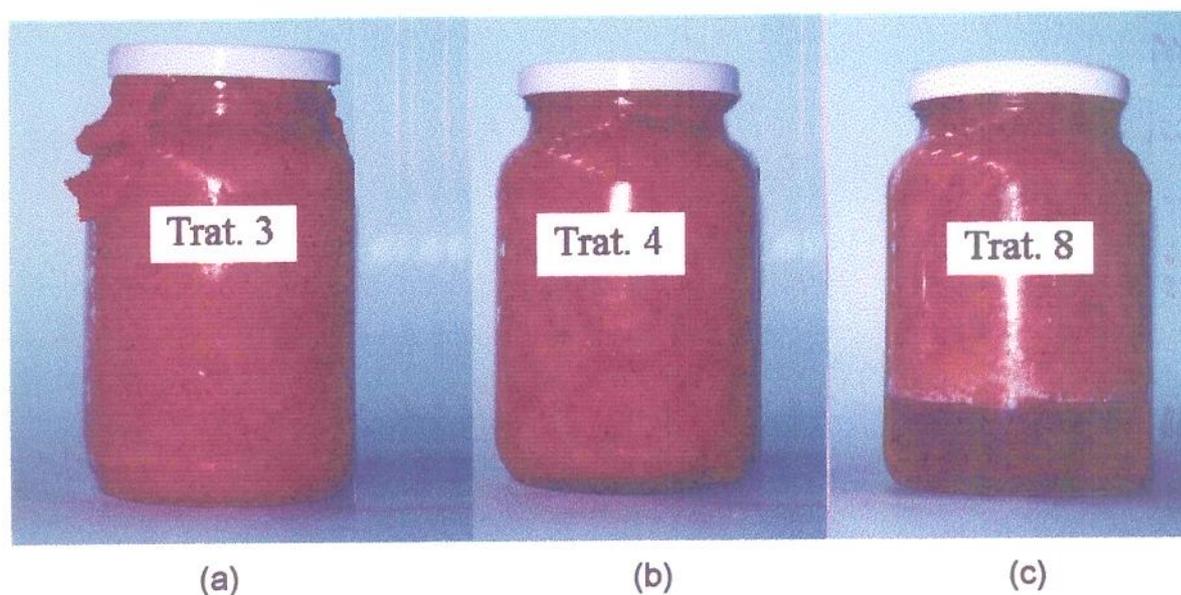


FIGURA 4.13 - Evidências da deterioração encontradas nos Experimentos I, II e III, sendo (a) expansão de volume, (b) bolhas de ar e (c) sinérese.

4.4.2. Experimento IV

Como todos os experimentos anteriores não se mostraram eficientes o suficiente para a conservação da polpa de goiaba e como o grande responsável pela deterioração foram as leveduras, utilizou-se o sorbato de potássio comprovadamente eficiente para conter este tipo de microrganismo, menos tóxico para a saúde humana entre os sorbatos, legalmente permitido para uso tanto em geléias como para doces em massa e tem maior valor de pKa que o benzoato. O sorbato não é eficiente para conter as bactérias lácticas, porém estas foram facilmente controladas pela redução de Aa e pH. Os bolores, embora não sendo problemáticos, são também eficientemente controlados pelo sorbato. Como tinha-se entre as leveduras uma bastante resistente tanto à redução de Aa e pH quanto ao uso de sorbatos, que era a *Z. baillii*, testou-se algumas concentrações de sorbato descritas na literatura (0,06 e 0,10%) e outras variações para avaliação da eficiência da sua inibição quando alterava-se conjuntamente a concentração de sorbato, Aa e pH. Assim o ideal seria reduzir pouco a Aa e pH para afetar o mínimo as características organolépticas do produto e utilizar ao mesmo tempo o mínimo de sorbato.

Havia relatos na literatura que com concentrações de 0,1% de sorbato era possível preservar a polpa de goiaba sem o uso de qualquer outro ingrediente. Tomou-se então dois pontos que pudessem testar estas afirmações (0 e 50% de sacarose, fixando-se a quantidade de ácido em 0,75%) e verificar a quantidade mínima de sorbato a ser utilizada juntamente com a sacarose na preservação do produto. A Figura 4.14 mostra o efeito destes tratamentos. A polpa de goiaba (com 0,75% de ácido cítrico) só é passível de preservação quando se utiliza 0,1% de sorbato. Com o emprego de sacarose, ácido cítrico e sorbato de potássio foi observado que em todas as concentrações de sorbato há um aumento do tempo de vida-de-prateleira, alcançando os níveis desejados nas concentrações acima de 0,06%.

As amostras estragadas apresentavam os mesmos sinais que comprovavam a sua deterioração já relatados, porém a medida que se incrementava a quantidade de sorbato utilizada, observou-se que as manifestações desta deterioração eram mais discretas.

A Figura 4.15 apresenta o comportamento físico químico dos tratamentos que se mostraram estáveis no Experimento IV. A Aa teve um leve declínio em todos os tratamentos analisados que não foi acompanhado de alterações na concentração das amostras, pois os valores de °Brix se mantiveram estáveis. A maior alteração ocorreu no tratamento 5.5 (0% de sacarose e 0,1% de sorbato de potássio) em que observou-se uma queda acentuada de pH e aumento considerável da acidez, sem que esta amostra mostrasse sinais visíveis de alteração.

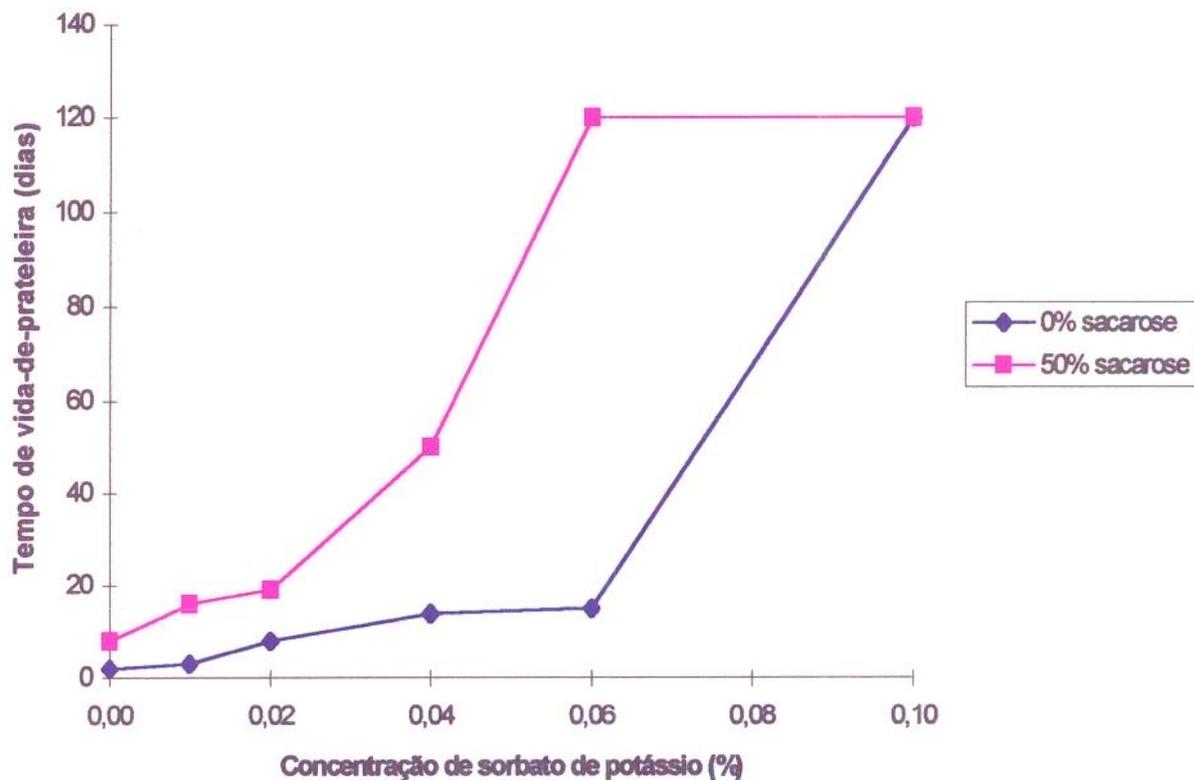


FIGURA 4.14 - Vidas-de-prateleira obtidas no Experimento IV em função da concentração de sorbato de potássio e sacarose.

A Figura 4.16 apresenta a evolução da carga microbiana dos tratamentos do Experimento IV. Todos esses tratamentos foram eficientes para conter os microrganismos inoculados. Nos tratamentos 5.5 e 6.5 foram detectadas contagens respectivamente de bolores e leveduras, porém em cargas muito baixas que foram controladas pelo próprio meio, como pode ser observado pelas contagens subseqüentes que exibiram novamente carga zero.

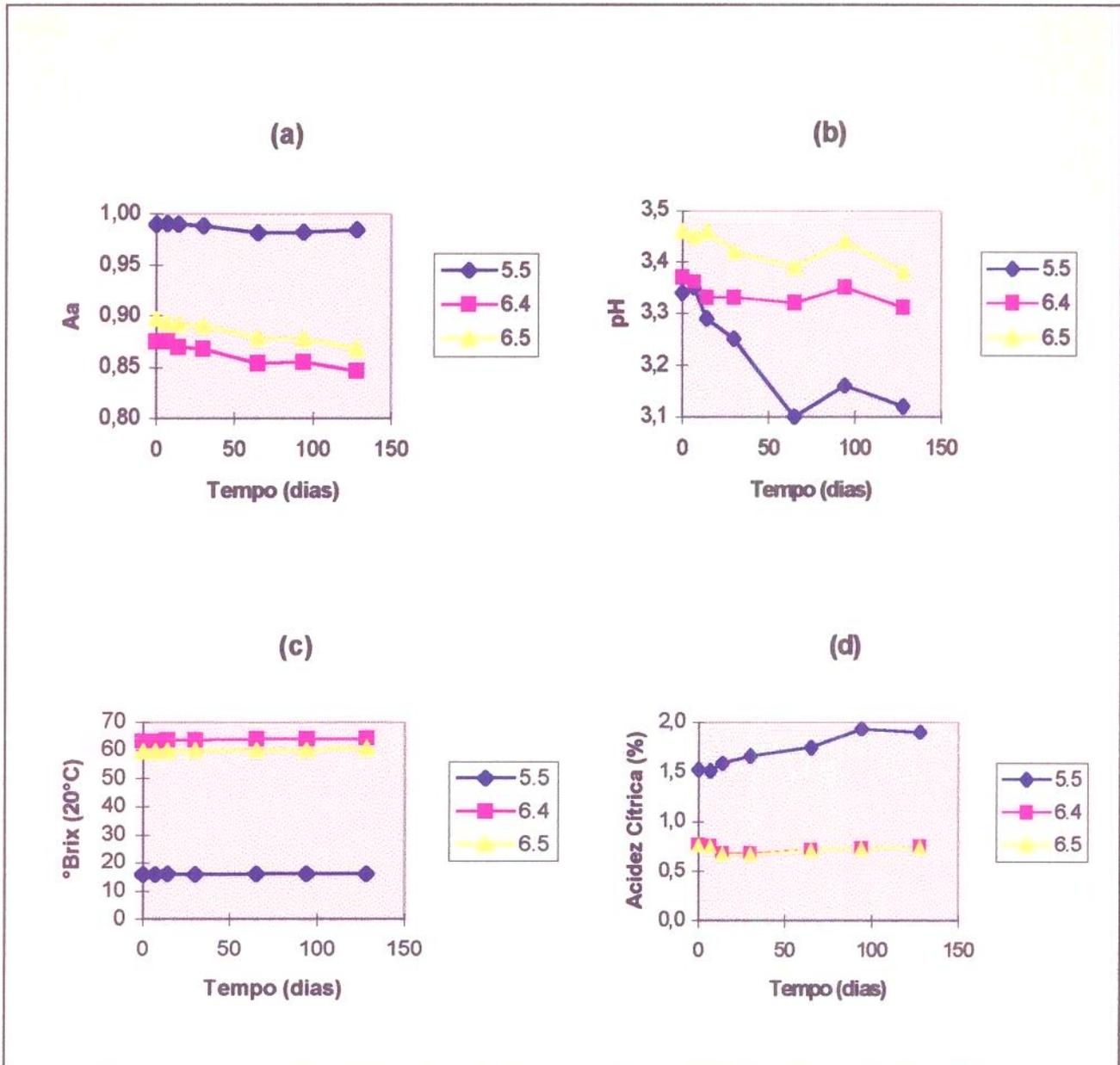


FIGURA 4.15 - Comportamento físico-químico dos tratamentos que apresentaram mais longa vida-de-prateleira do Experimento IV: 5.5 (0,75% de ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio), 6.4 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio) e 6.5 (50% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio) em função do tempo de armazenamento a 25 °C, de acordo com os parâmetros: (a) Aa, (b) pH, (c) sólidos solúveis (°Brix) e (d) Acidez Cítrica.

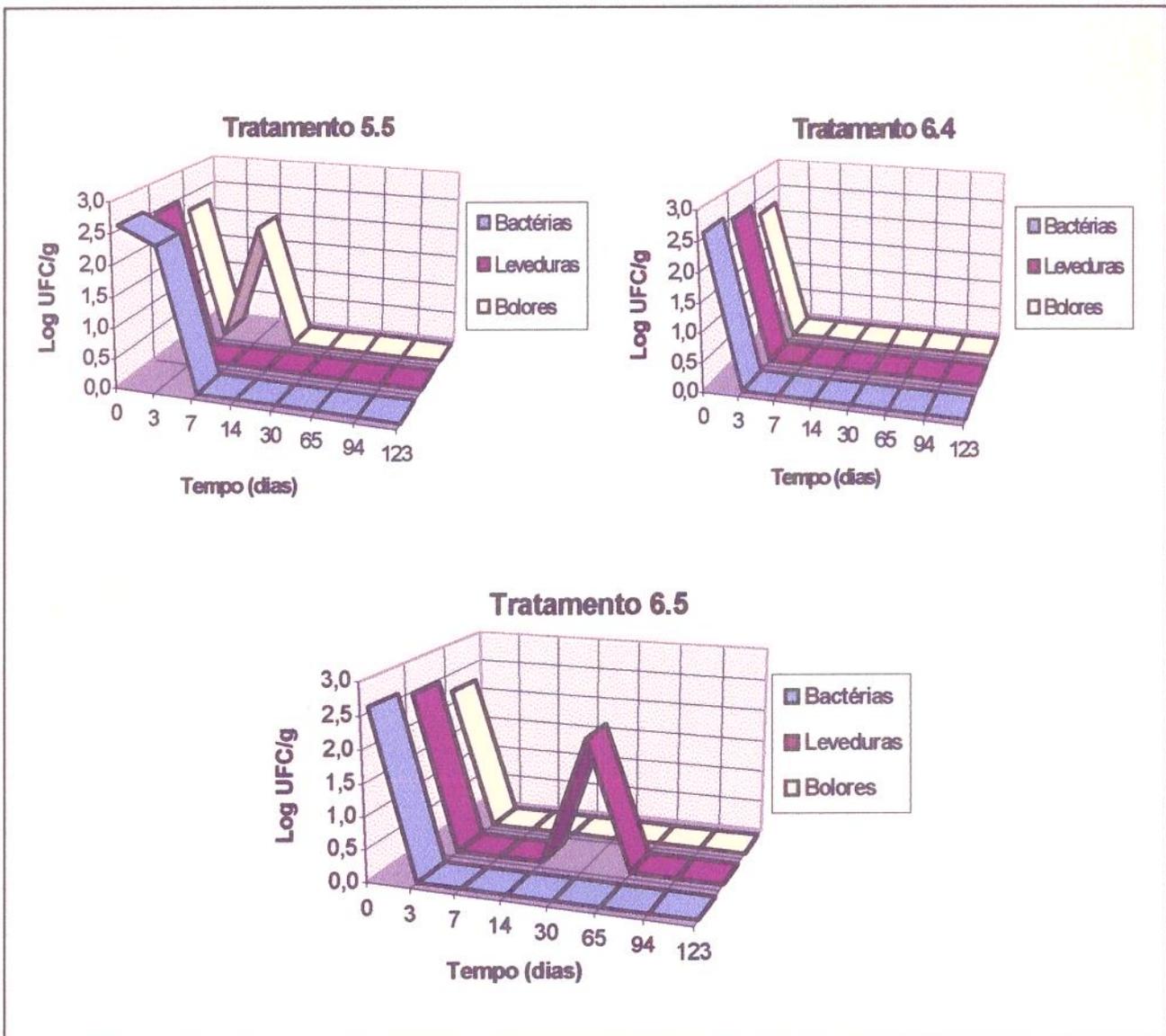


FIGURA 4.16 - Comportamento microbiológico dos tratamentos que apresentaram mais longa vida-de-prateleira do Experimento IV, 5.5 (0,75% de ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio), 6.4 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio) e 6.5 (50% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio), em função do tempo de armazenamento a 25 °C.

4.4.3. Experimento V

Em função dos dados obtidos do Experimento IV executou-se o Experimento V usando-se o Delineamento em Superfície de Resposta, fixando-se a quantidade de sorbato de potássio em 0,06% e testando-se também alguns pontos que se mostraram mais estáveis em experimentos anteriores com 0,05% de sorbato de potássio e outro sem adição de ácido. Os tratamentos utilizados neste experimento e suas respectivas vidas-de-prateleira estão apresentados na Figura 4.17.

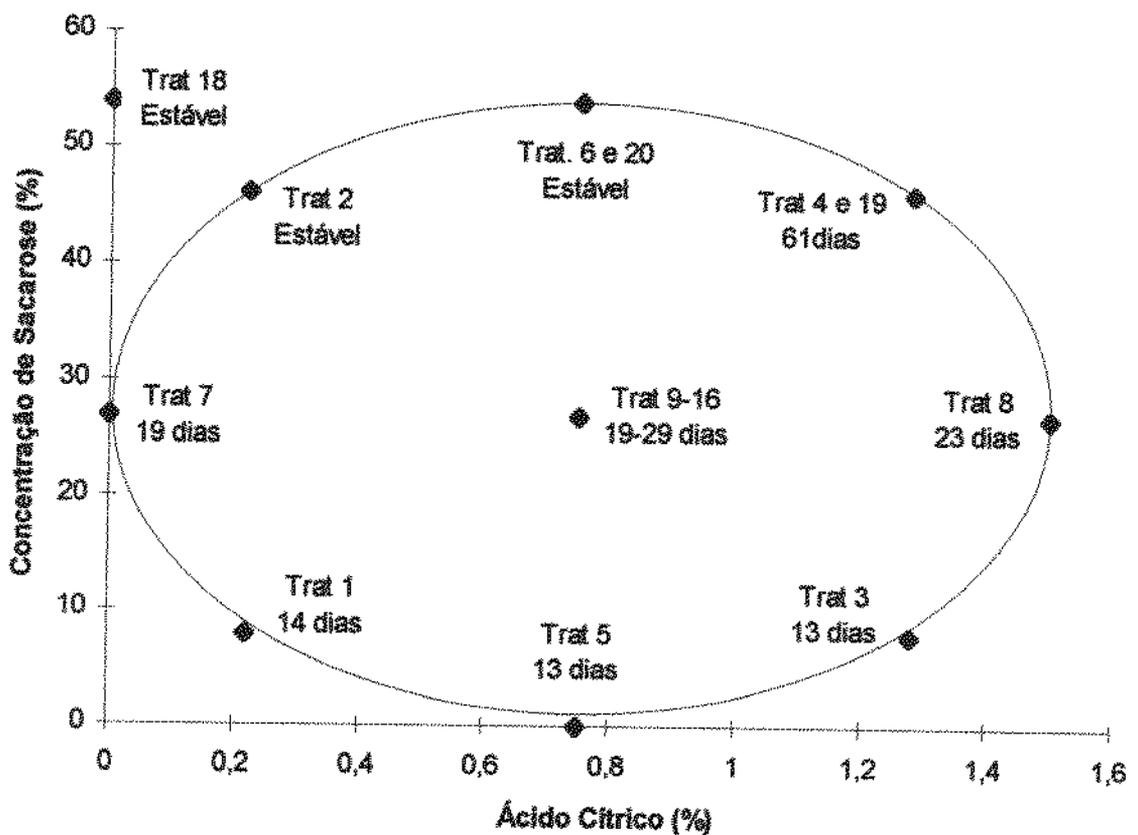


FIGURA 4.17 - Delineamento utilizado no Experimento V e suas respectivas vidas-de-prateleira.

A Figura 4.18 apresenta o comportamento físico-químico dos tratamentos estáveis do Experimento V. Todos os tratamentos mostraram redução de Aa ao longo do período de armazenamento e conseqüente aumento da concentração (ligeiro incremento

de °Brix). A acidez e o pH se mantiveram relativamente constantes, sendo o tratamento 2 o que mais oscilou em relação ao pH, mas ainda dentro dos erros experimentais que estão, neste caso, na segunda casa decimal.

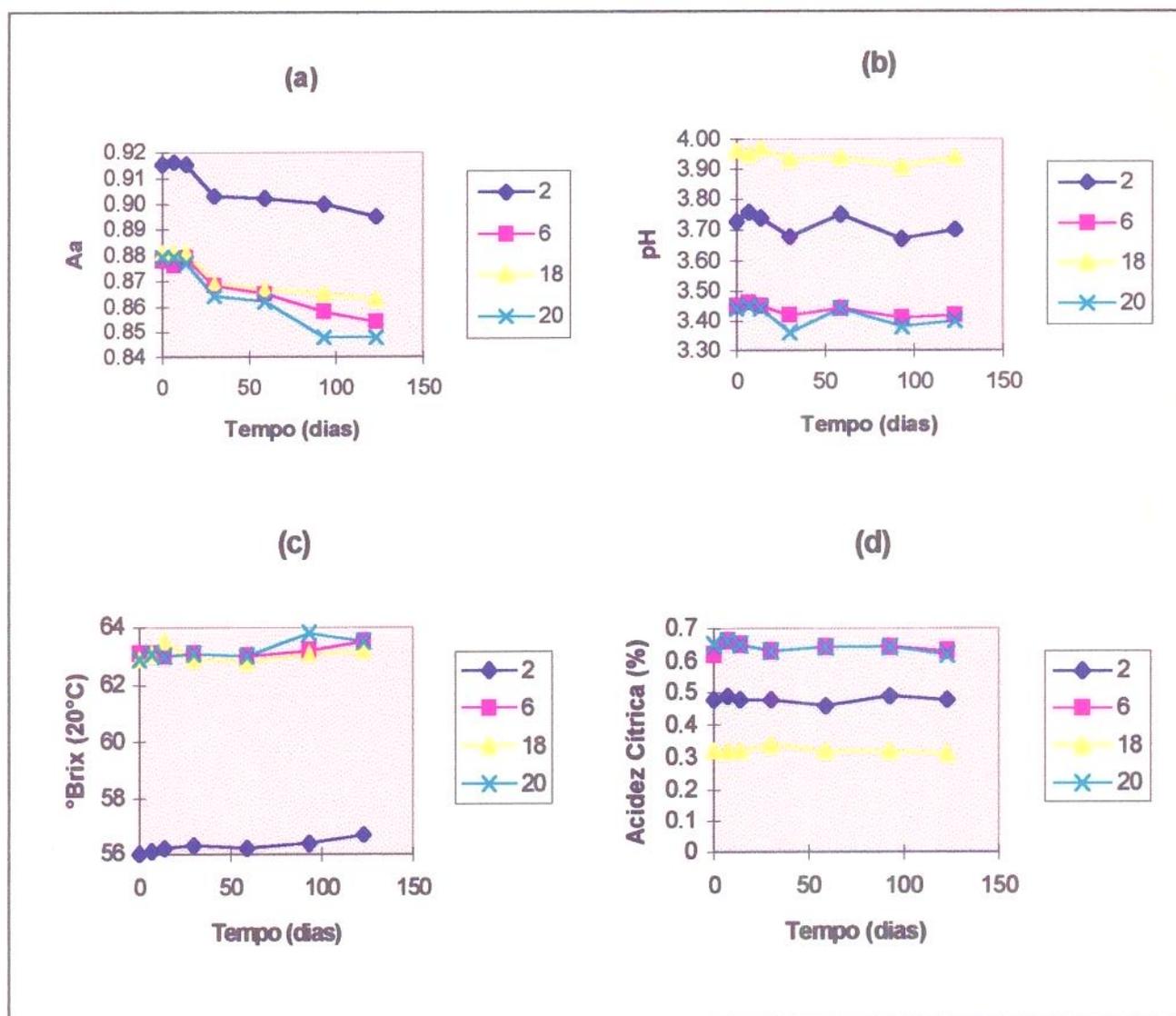


FIGURA 4.18 - Comportamento físico-químico dos tratamentos de mais longa vida-de-prateleira do Experimento V: 2 (46,09% de sacarose, 0,22% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio), 6 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio), 18 (54% de sacarose, 0,06% de sorbato de potássio) e 20 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,05% de sorbato de potássio) em função do tempo de armazenamento a 25 °C, de acordo com os parâmetros: (a) Aa, (b) pH, (c) sólidos solúveis (°Brix) e (d) Acidez Cítrica.

A Figura 4.19 retrata o comportamento microbiológico dos tratamentos de mais longa vida-de-prateleira do Experimento V. No tratamento 2, a amostra utilizada nas análises (do total de 3) se deteriorou ao longo do período de armazenamento, permanecendo as outras duas estáveis. Por esta razão a curva de leveduras apresentou um pico e depois retorna a zero e novamente no último acompanhamento uma outra amostra exibiu uma pequena contagem de leveduras. No tratamento 20, também a amostra utilizada nas análises exibiu contagem ascendente no último acompanhamento.

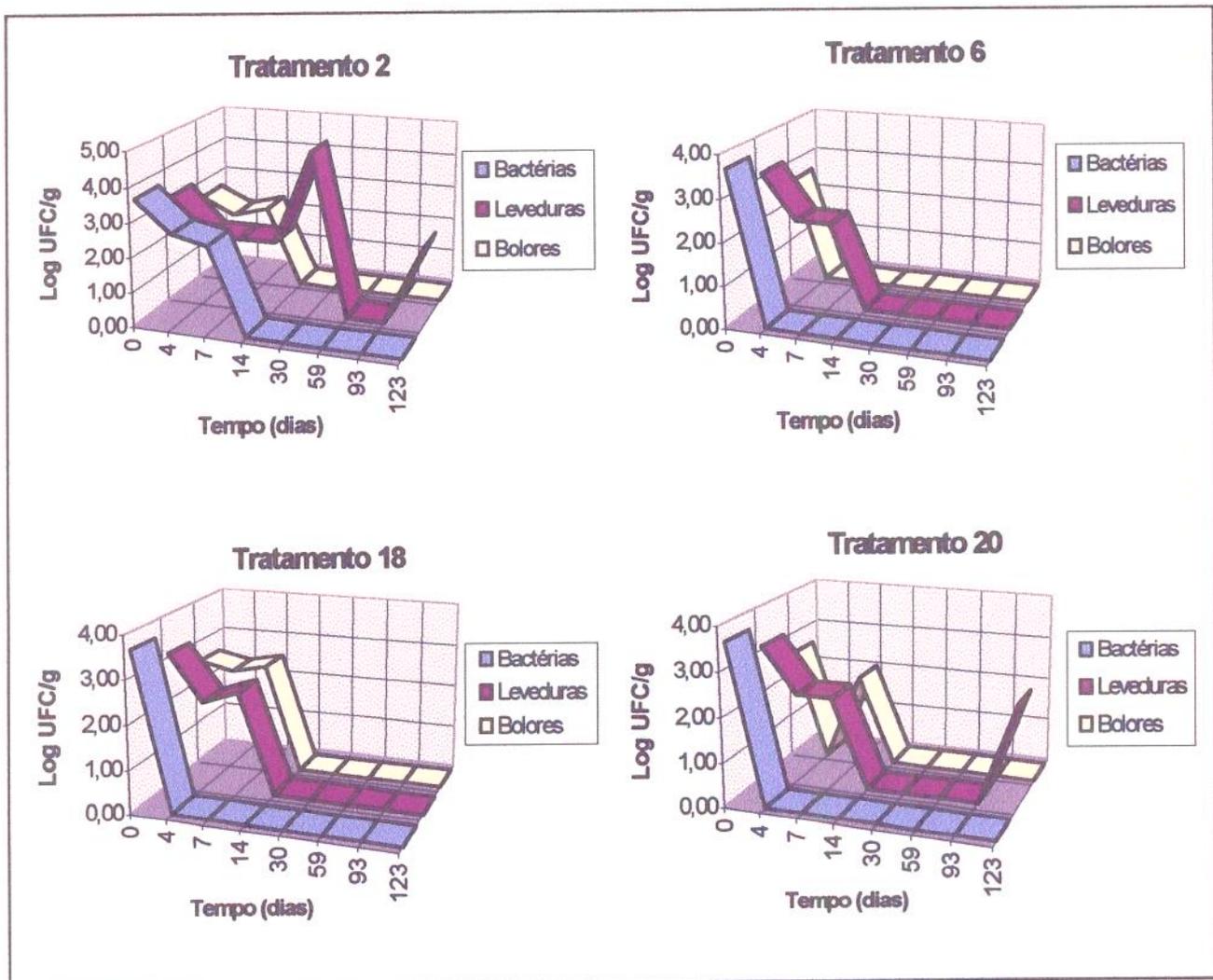


FIGURA 4.19 - Comportamento microbiológico dos tratamentos de mais longa vida-de-prateleira do Experimento V: 2 (46,09% de sacarose, 0,22% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio), 6 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio), 18 (54% de sacarose, 0,06% de sorbato de potássio) e 20 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,05% de sorbato de potássio) em função do tempo de armazenamento (dias) a 25°C.

Os bolores apareceram nos tratamentos 3 e alguns do ponto central (10, 11, 13, 14 e 15) que deterioraram até a contagem realizada aos 14 dias. No caso do tratamento 3 a Aa era de 0,98 já para o ponto central era de 0,96. As contagens foram pequenas e notou-se a presença de *Penicillium viridicatum*, que é resistente ao abaixamento de Aa, mas que não foi detectado nos tratamentos estáveis que possuem menor Aa além da presença de sorbato.

Pelos resultados do tratamento 18, que possuía a mesma concentração de sacarose que o tratamento 6, porém sem a adição de ácido, e do tratamento 2 que possuía menos ácido que o tratamento 4 e se preservou, observa-se que o abaixamento de pH influencia pouco a preservação do produto e que no caso específico do tratamento 4 pode ter servido como substrato para o crescimento das leveduras. A preservação reside no controle de Aa (0,848 - 0,895) e na adição de sorbato de potássio. Foi verificado através do tratamento 20 que é possível a adição de até 0,05% de sorbato e a preservação do produto por, no mínimo 120 dias, quando se utiliza concentração de 54 % de sacarose e 0,75 % de ácido. Esse tratamento apresentou a maior redução de Aa (Figura 4.18) ao longo do armazenamento o que, sem dúvida, contribuiu para a maior preservação do produto.

Mesmo com o uso de sorbato observou-se que a causa principal da deterioração dos tratamentos foi o desenvolvimento das leveduras. As amostras que apresentaram uma certa estabilidade até cerca de 60 dias apresentaram uma microbiota de características semelhantes. Isolou-se estas culturas e foi identificada a cultura do tratamento 4 que apresentava as condições mais drásticas de Aa (0,894), pH (3,20) e sorbato (0,06%) dentre as amostras que também deterioraram. Esta cultura foi identificada pelos mesmos procedimentos já descritos para a identificação de leveduras como sendo a *Zygosaccharomyces baillii*, comprovando sua elevada tolerância a condições adversas.

Nos Experimentos I e II observa-se que todas as amostras do ponto central se deterioraram no mesmo período de tempo, o que não se verificou a partir do Experimento III. Com vistas a uma possível conservação dos tratamentos por um período mais longo de tempo e assim a necessidade de ter maior quantidade de material para as análises periódicas e observações pertinentes, a quantidade de material por tratamento foi aumentada a partir do Experimento III. Como continuou-se utilizando a

mesma batedeira planetária para as misturas, foi verificada a deficiência da homogeneização deste material, principalmente quando se trabalhava com altas concentrações de sacarose o que tornava a mistura mais consistente. Tentou-se amenizar este problema homogeneizando-se o material manualmente antes de se colocar nas embalagens finais. Foi constatada uma tendência das embalagens primeiramente abertas e homogeneizadas pelas próprias exigências das análises envolvidas a se deteriorarem mais depressa do que as que permaneciam como contra prova. Com raras exceções uma ou outra amostra se deteriorou antes da contra prova. Porém não há como negar o fato de uma amostra apresentar contagem até pequenas de leveduras e se deteriorar com o passar dos dias. A conservação das amostras só foram efetivas quando não foram evidenciadas leveduras viáveis.

4.4.4. Análise dos delineamentos pela metodologia de superfície de resposta e modelamento matemático.

Tomou-se os dados dos Experimentos I, II, III e V que foram delineados utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta, segundo o modelo completo central composto rotacional polinomial de segunda ordem, que tem sido largamente usado para descrever comportamentos biológicos, e levantou-se as respectivas curvas e as equações que as descrevem. As curvas e os coeficientes de regressão múltipla foram determinados pelo programa estatístico SAS. As Figuras 4.20, 4.21, 4.22 e 4.23 mostram o comportamento respectivamente dos Experimentos I, II, III e V em relação à adição de sacarose e ácido com a resposta tempo de vida-de-prateleira. No caso dos Experimentos III e V o tempo de vida-de-prateleira não foi o mesmo para todas as amostras do mesmo tratamento, assim optou-se pelo tempo das amostras da contra-prova, que foram de maneira geral as últimas a se deteriorarem. A Tabela 4.10 mostra as equações obtidas em cada Experimento e os respectivos valores do coeficiente determinação (R^2) e coeficiente de variação (C.V.). Nota-se, pelos valores de R^2 obtidos, que o ajuste do modelo aos dados observados foi plenamente satisfatório. Os valores de C.V. foram maiores para os Experimentos III e V, porém nestes experimentos tem-se uma maior diferença entre os tempos de vida-de-prateleira obtidos no ponto central.

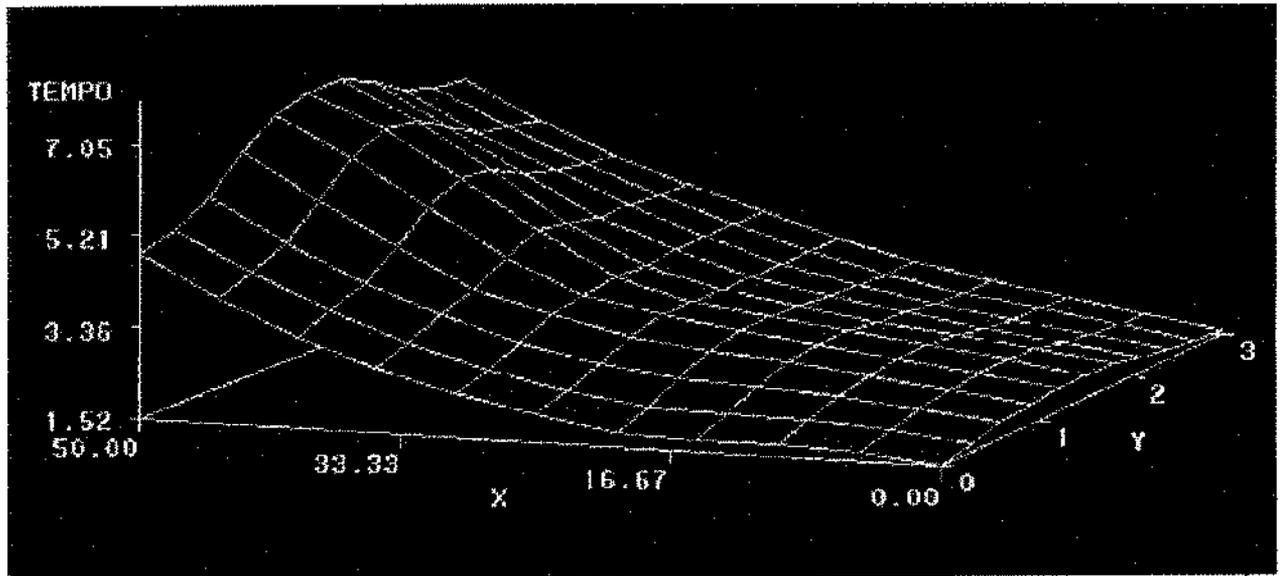


FIGURA 4.20 - Superfície de resposta dos tratamentos do Experimento I em relação a vida-de-prateleira (tempo em dias), sendo X = concentração de sacarose (%p/p em relação à mistura) e Y = concentração de ácido cítrico (%p/p em relação à polpa).

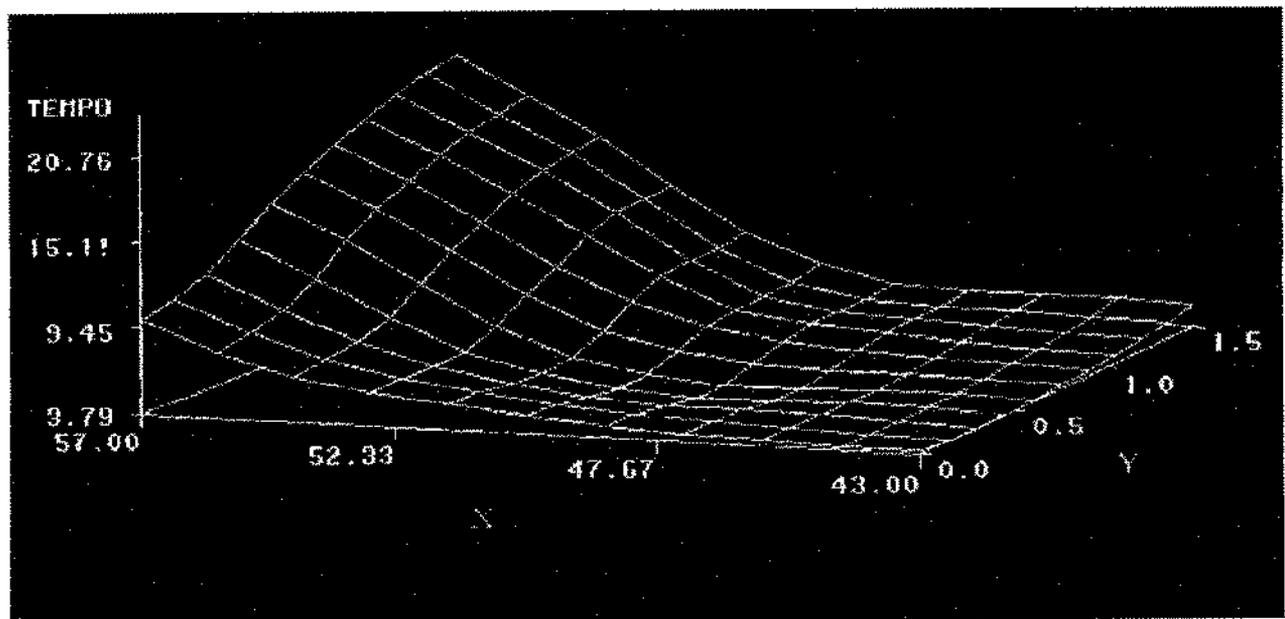


FIGURA 4.21 - Superfície de resposta dos tratamentos do Experimento II em relação a vida-de-prateleira (tempo em dias), sendo X = concentração de sacarose (%p/p em relação à mistura) e Y = concentração de ácido cítrico (%p/p em relação à polpa).

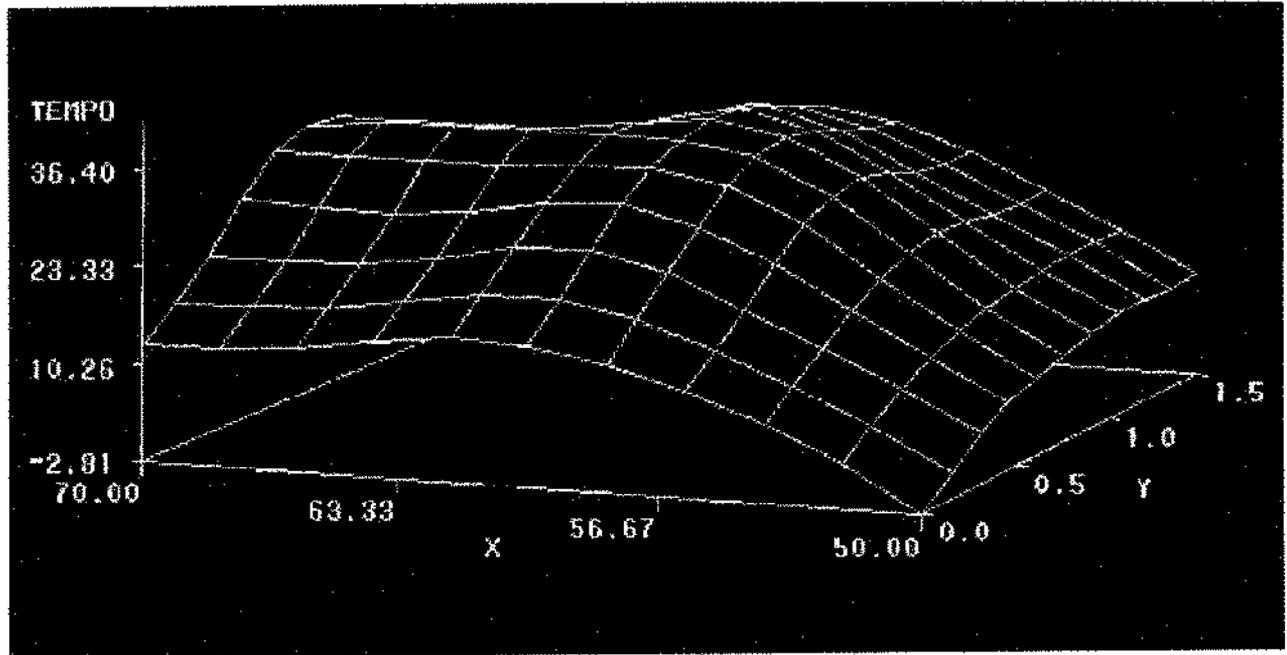


FIGURA 4.22 - Superfície de resposta dos tratamentos do Experimento III em relação a vida-de-prateleira (tempo em dias), sendo X = concentração de sacarose (%p/p em relação à mistura) e Y = concentração de ácido cítrico (%p/p em relação à polpa).

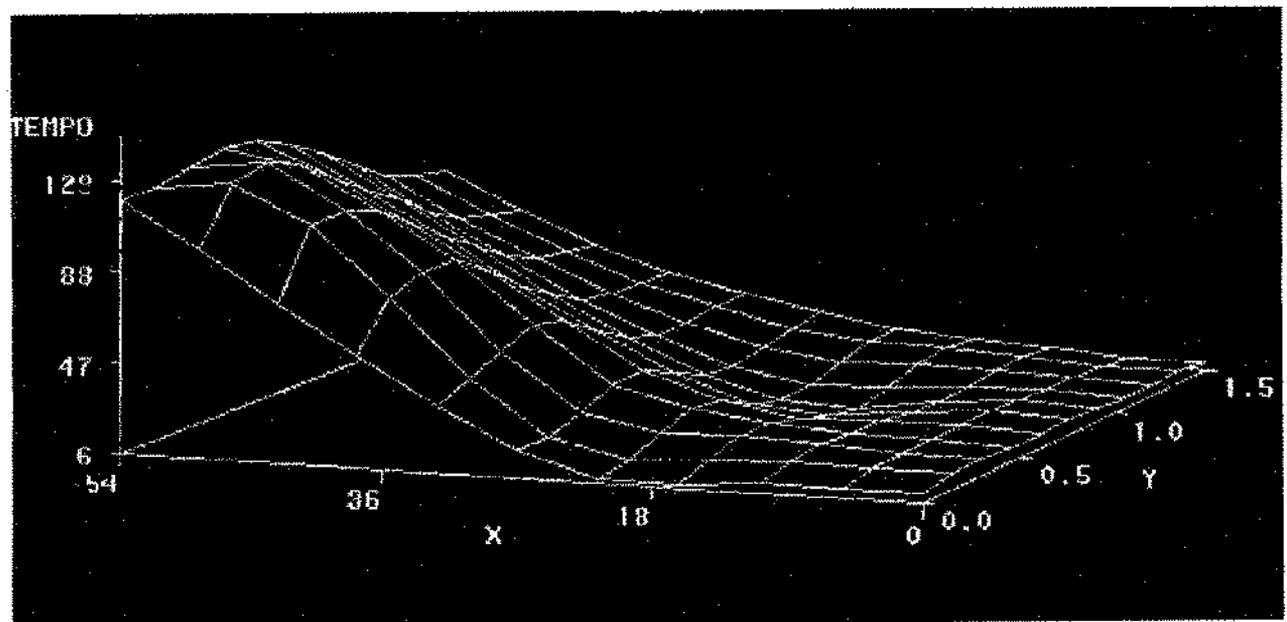


FIGURA 4.23 - Superfície de resposta dos tratamentos do Experimento V em relação a vida-de-prateleira (tempo em dias), sendo X = concentração de sacarose (%p/p em relação à mistura) e Y = concentração de ácido cítrico (%p/p em relação à polpa).

TABELA 4.10 - Equações obtidas nos delineamentos experimentais que utilizavam a metodologia de superfície de resposta para estimativa do tempo de preservação (t) e os respectivos valores do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente de variação (C.V.).

Experi- mento	Equação	R^2	C.V.
I	$t = 1,644 - 0,035 S + 0,799 A + 0,002 S^2 - 0,277 A^2 + 0,013 S A$	0,9763	7,5463
II	$t = 250,172 - 10,153 S - 33,564 A + 0,105 S^2 + 2,000 A^2 + 0,667 S A$	0,9753	11,1748
III	$t = -605,493 + 19,646 S + 55,555 A - 0,155 S^2 - 23,115 A^2 - 0,200 S A$	0,8860	14,8906
V	$t = -1,640 - 0,380 S + 22,893 A + 0,064 S^2 + 1,996 A^2 - 1,433 S A$	0,9589	23,9100

sendo: t = tempo estimado (dias), S = % de sacarose (%p/p em relação ao total da mistura) e A = % de ácido cítrico (%p/p em relação à polpa).

As Figuras 4.24, 4.25, 4.26 e 4.27 apresentam as curvas de nível correspondentes às superfícies de resposta mostradas, respectivamente, nas Figuras 4.20, 4.21, 4.22 e 4.23. Observa-se por estas curvas de nível que a variável que mais afetou o tempo de vida-de-prateleira foi a concentração de sacarose, pois as linhas de tempo de vida-de-prateleira foram praticamente paralelas ao eixo da concentração de ácido, a ligeira inclinação observada pode ser decorrente do fato de tratar-se de um fenômeno biológico de difícil modelação com os valores obtidos experimentalmente.

Os resultados dos Experimentos I, II e III revelaram ser possível a conservação do produto (sem a adição de sorbato de potássio) por períodos curtos de tempo, necessários para o transporte da fábrica de polpa para a de processamento. Desta forma, para conservação até duas semanas, o Experimento II mostrou a necessidade de adição de 57% de sacarose e 1,5% de ácido cítrico. Para conservação de até um mês, o Experimento III indicou a necessidade de adição de 60% de sacarose e 1,5% de ácido cítrico. Para tempos de vida-de-prateleira maiores, faz-se necessária a adição de 0,06% de sorbato de potássio e de 46 a 54% de sacarose com ou sem adição de ácido cítrico, conforme os dados obtidos no Experimento V.

Destaca-se que esses tempos de vida-de-prateleira eram para polpas inoculadas com nível de 10^4 ou 10^3 UFC/g, dependendo do Experimento. Espera-se que com boas práticas de manufatura, esses tempos de vida-de-prateleira sejam mais longos. Essa hipótese foi baseada na comparação dos Experimentos II e III, onde para as mesmas condições (50% de sacarose e 0,75% de ácido cítrico) os tempos de vida-de-prateleira duplicam (5 para 10 dias) para uma redução de inóculo de uma ordem de grandeza (10^4 para 10^3 UFC/g).

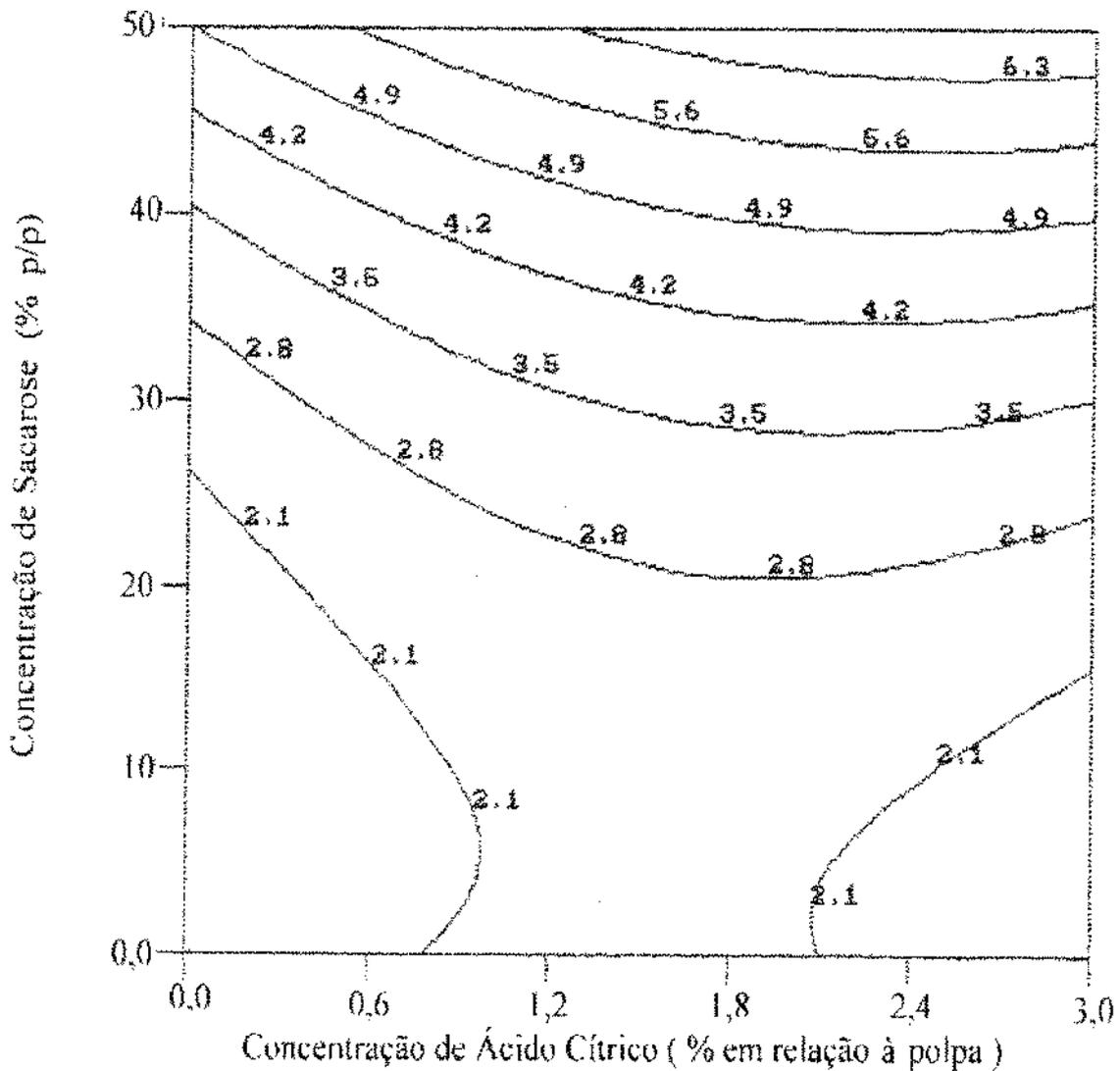


FIGURA 4.24 - Curva de nível mostrando a vida-de-prateleira em função da concentração de sacarose e ácido cítrico, para o Experimento I.

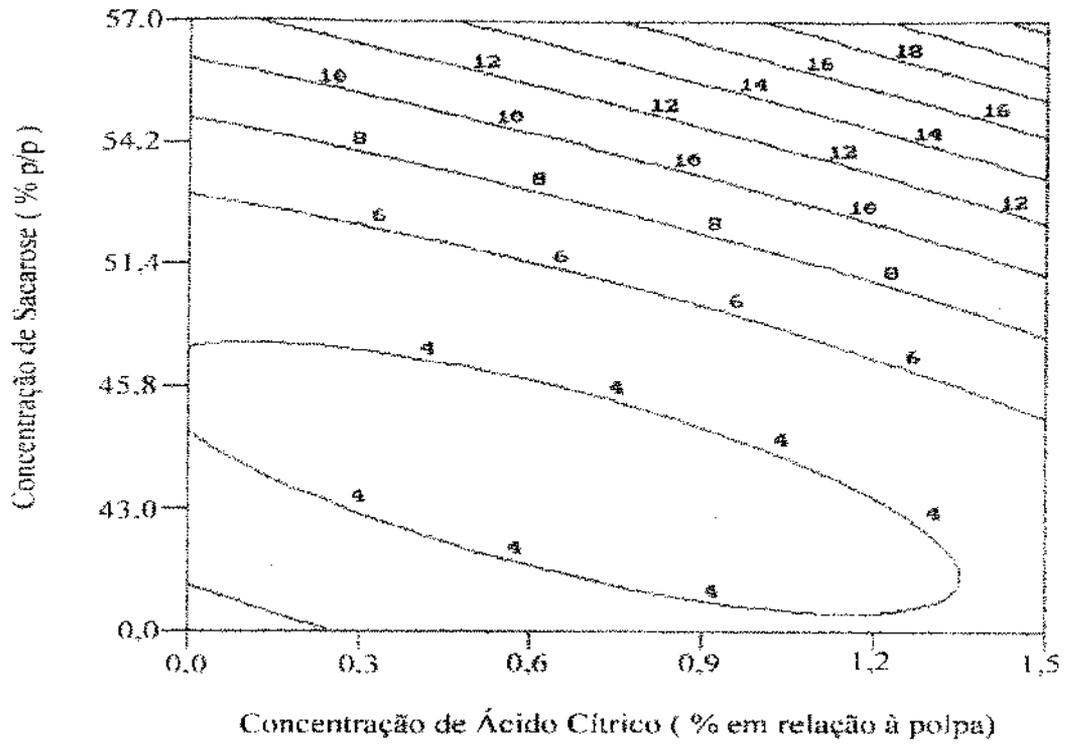


FIGURA 4.25 - Curva de nível mostrando a vida-de-prateleira em função da concentração de sacarose e ácido cítrico, para o Experimento II.

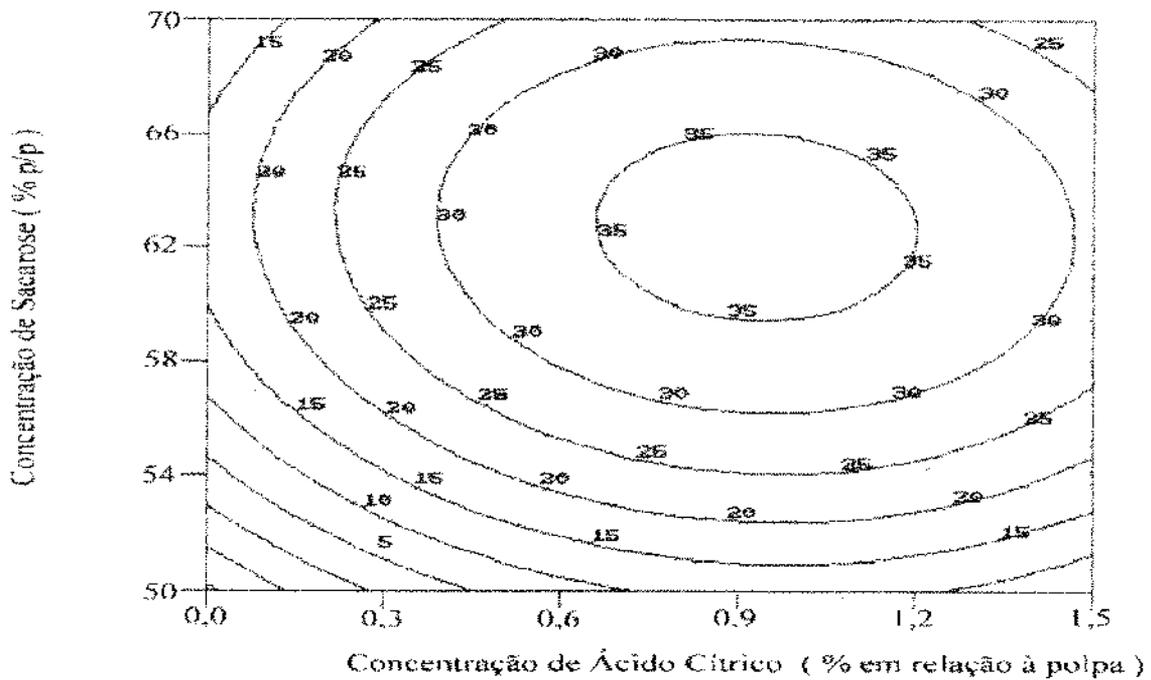


FIGURA 4.26 - Curva de nível mostrando a vida-de-prateleira em função da concentração de sacarose e ácido cítrico, para o Experimento III.

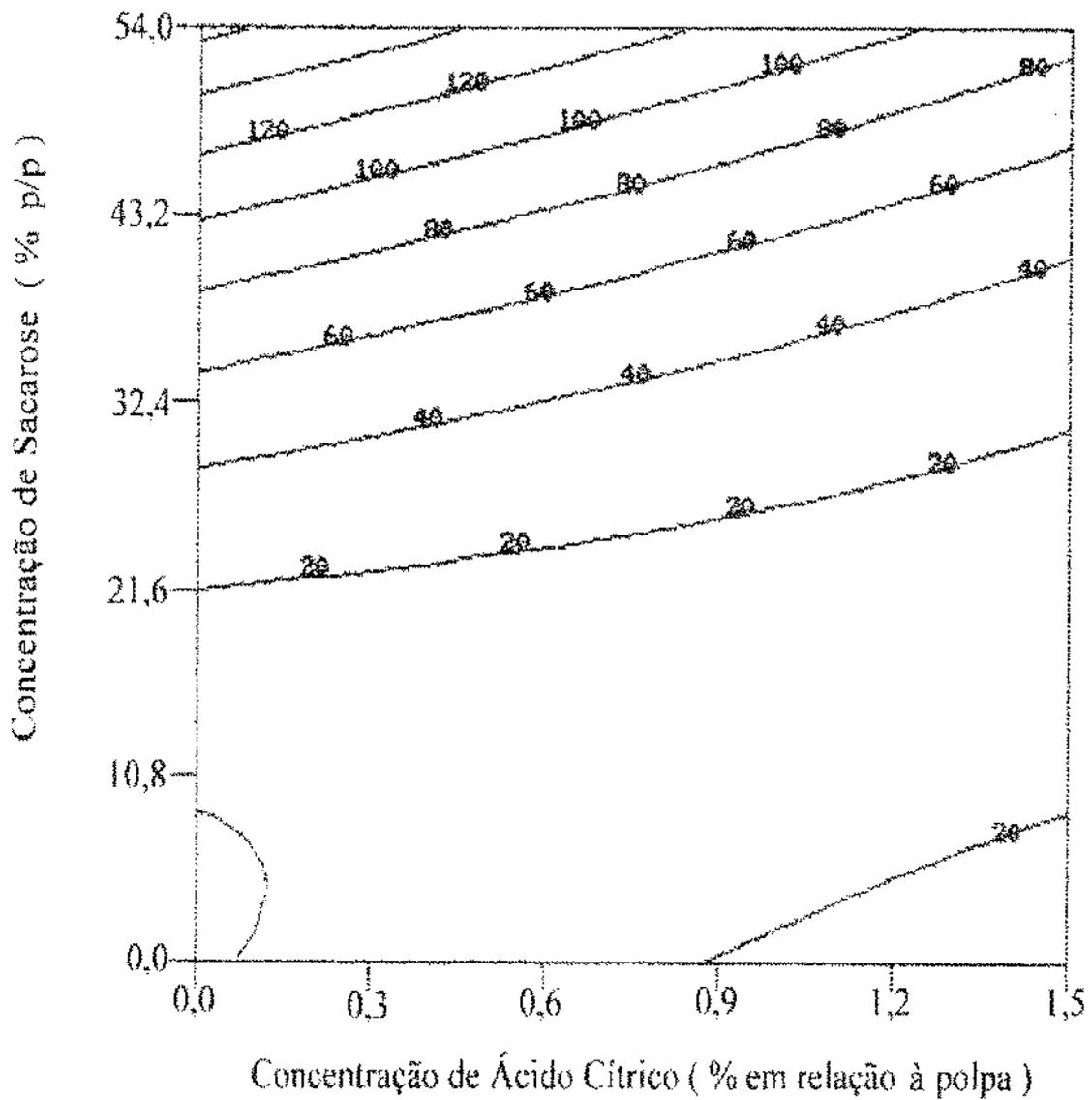


FIGURA 4.27 - Curva de nível mostrando a vida-de-prateleira em função da concentração de sacarose e ácido cítrico, para o Experimento V.

4.5. ANÁLISES FINAIS DOS TRATAMENTOS ESTÁVEIS DOS EXPERIMENTOS IV e V.

4.5.1. Residual de sorbato

Como foi comprovada a ausência de interferentes, as amostras puderam ser analisadas apenas por espectrofotometria. Os resultados destas análises estão colocados na Tabela 4.11. Os tratamentos 5.5, 6.4 e 6.5 referem-se ao Experimento IV e os de números 2, 6, 18 e 20 ao Experimento V. Observa-se que os dados apresentam

desvios padrões muito pequenos e conseqüentemente valores de coeficientes de variação também pequenos e menores que os recomendados (até 10%). As porcentagens de recuperação foram acima de 85% em todos os casos, revelando que poderia haver perda de sorbato na faixa de no máximo, 15%. Em nenhum dos tratamentos analisados a % de sorbato residual foi igual à adicionada, em todos os casos houve perdas, porém essas foram menores que as relatadas na literatura (30-40% - BOLIN et alii, 1980; GERSCHENSON et alii, 1986 a e b). Os dados da literatura utilizaram a temperatura de estocagem de 30°C, como a perda de sorbato é afetada pela temperatura e neste trabalho utilizou-se temperaturas menores de estocagem, obteve-se também perdas menores de sorbato. Esta perda não afetou a estabilidade das amostras analisadas. A maior % Recuperação foi obtida pelo tratamento 5.5 que não possui adição de sacarose, seguido pelo tratamento 2 que, entre os demais possui também menor concentração de sacarose, indicando que a presença de altas concentrações de sacarose contribuem para a maior perda do conservador ou que aumenta a dificuldade da quantificação analítica.

TABELA 4.11 - Análise de residual de sorbato nos tratamentos estáveis de polpa de goiaba dos Experimento IV e V.

Resultados	TRATAMENTO						
	5.5	6.4	6.5	2	6	18	20
%sorbato adicionada	0,10	0,06	0,10	0,06	0,06	0,06	0,05
% sorbato residual *	0,097	0,054	0,090	0,056	0,053	0,051	0,046
Desvio Padrão	0	0,001	0,001	0,002	0,001	0	0,0005
C.V.	0	1,85	1,11	3,57	1,89	0	1,10
%Recuperação	97,00	90,00	90,00	93,33	88,33	85,00	92,00

sendo: *média de 2 leituras e C.V.= coeficiente de variação.

A Figura 4.28 mostra o resultado da leitura espectrofotométrica obtida numa das leituras do tratamento 20, tomado aleatoriamente como exemplo dos demais valores obtidos. Nota-se que o pico de absorbância está em 255 nm, típico para sorbatos, que foi também observado nas demais amostras.

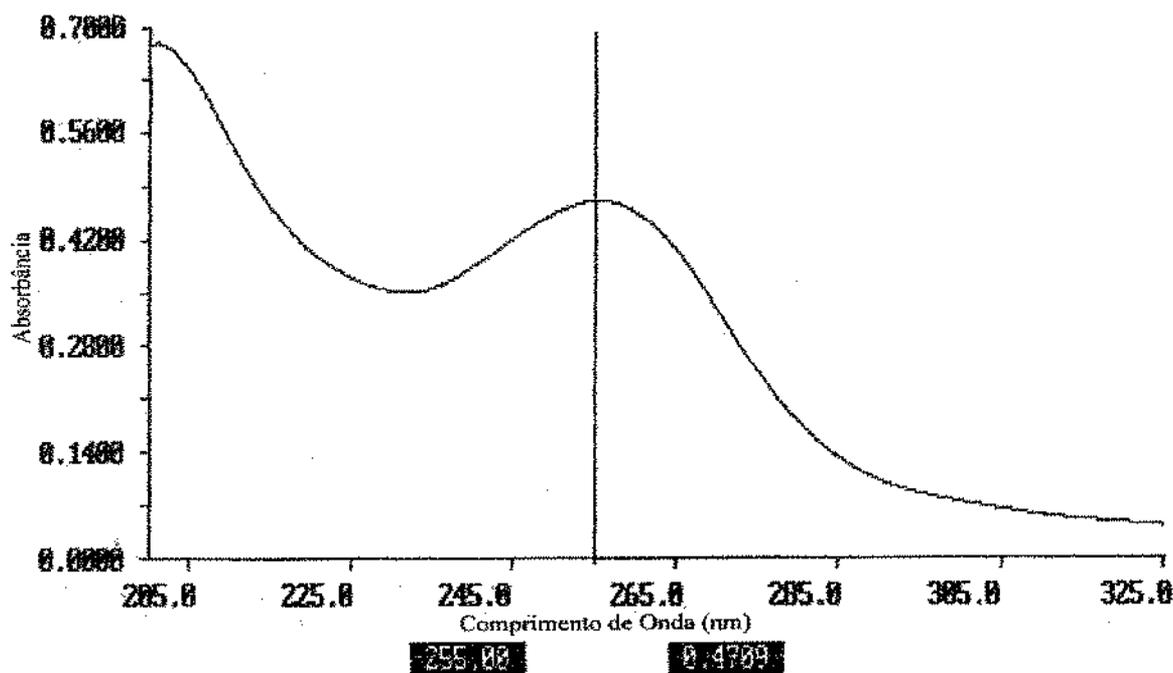


FIGURA 4.28 - Exemplo da leitura de absorvância de sorbato, por espectrofotometria, para uma das amostras do tratamento 20.

4.5.2. Análise de Vitamina C.

A Tabela 4.12 mostra os valores de vitamina C apresentados pelas amostras estáveis dos Experimentos IV e V após o período de vida-de-prateleira de respectivamente cerca de 150 e 120 dias a 25°C. Como os tratamentos 6.4 e o 6 possuem formulações idênticas, foi feita a análise apenas do tratamento 6. Os dados revelam que todos os tratamentos reduziram a % de vitamina C em relação a amostra original (média ~ 55 mg de ácido ascórbico/100g de amostra, vide Tabela 4.1). Isto era esperado visto que a perda de ácido ascórbico em alimentos é amplamente verificada, principalmente nas condições adotadas nestes Experimentos, cujo objetivo principal era a estabilidade do produto. Observa-se que as perdas de vitamina C foram ao redor de 50% para os tratamentos 6.5, 2, 6, 18 e 20, considerando-se esta perda em relação à polpa, pois o restante da formulação é sacarose. Observa-se que o tempo de estocagem não influenciou a perda de vitamina C para estes tratamentos, visto que o tratamento 6.5 possui um período de estocagem mais longo que os demais e apresentou perda de

vitamina C semelhante. Os valores de perda de vitamina C estão de acordo como os dados da literatura (BREKKE et alii, 1970; PANADÉS et alii, 1993; e TEIXEIRA NETO, 1996). O tratamento 5.5 relativamente aos demais foi o que apresentou maior perda de vitamina C, da ordem de 68%, visto que este não possuía qualquer adição de sacarose, porém possuía um período de estocagem mais longo (cerca de 150 dias). Nota-se, assim, que a adição de sacarose favoreceu a retenção de vitamina C nas amostras analisadas.

TABELA 4.12 - Resultados da análise de vitamina C nos tratamentos estáveis dos Experimentos IV e V.

Tratamento	Vitamina C residual (mg ác. ascor/100g amostra) Média ^a ± Desvio Padrão	% de perda em relação à polpa original ^b
5.5	17,79 ± 0,77	67,65
6.5	13,88 ± 0,58	49,53
2	13,75 ± 0,85	53,70
6	11,22 ± 0,65	55,65
18	12,78 ± 0,85	49,49
20	13,42 ± 0,55	46,96

sendo: a = médias de 3 a 4 titulações efetuadas e b = média dos valores de vitamina C das amostras de polpas utilizadas (Itém 4.1).

4.5.3. Análise de cor

As amostras de todos os experimentos foram avaliadas diariamente quanto ao aspecto visual. As amostras, de maneira geral, ao serem adicionadas de açúcar, logo após a mistura, aparentemente ficavam "mais vermelhas" e "mais brilhantes". Isto se verificou até cerca de 50% de sacarose (% p/p). Porém quando o nível de adição era muito elevado acima de 60% de sacarose (% p/p) as amostras tornavam-se opacas e de tom mais alaranjado. Assim, procedeu-se a uma avaliação visual da cor em termos

físicos e pela ordenação visual apenas das amostras dos Experimentos IV e V, que se mostraram mais estáveis do que as demais, para simplificação do número de amostras e da análise dos dados. Estas avaliações foram feitas no final dos experimentos e na amostra inicial da polpa de goiaba (sem tratamento). Notou-se que todas estas amostras apresentavam um certo escurecimento na camada superficial. As amostras do Experimento IV apresentavam um escurecimento superficial que foi mais evidente na amostra 5.5 (amostra sem adição de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,10% de sorbato de potássio) do que na 6.4 (54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio) e 6.5 (50% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio). Essa camada escurecida variou de cerca de 1,5 cm para a amostra 5.5 a 0,5 cm para a 6.4, sendo que a amostra 6.5 apresentou valor ao redor de 1 cm. As amostras do Experimento V praticamente não relevaram escurecimento superficial evidente, porém as amostras do Experimento IV possuíam cerca de um mês a mais de período de estocagem. Este escurecimento foi mais pronunciado nos recipientes reservados para amostragem. As amostras dos recipientes sem espaço livre apresentaram valores de escurecimento menores. Para as análises teve-se o cuidado de retirar a amostra abaixo da região de escurecimento.

A Figura 4.29 apresenta os dados da avaliação física da cor das amostras de polpa de goiaba segundo os valores médios de L^* , a^* , b^* (CIE) e os calculados de ΔE e C . Observa-se que em termos de luminosidade (L^*) a amostra sem tratamento e a 5.5 obtiveram os maiores valores, enquanto que a 18 foi o menor, e as demais amostras apresentaram valores intermediários. De maneira geral os tratamentos aplicados diminuíram a luminosidade das amostras. Os teores de vermelho (a^*) foram maiores nas amostras sem tratamento, 5.5 e 6.5 e menores nas amostras 6, 18 e 6.4. Excetuando-se as amostras 5.5 e 6.5, os tratamentos diminuíram os teores de vermelho das amostras. Os teores de amarelo (b^*) diminuíram com os tratamentos, excetuando a amostra 5.5 que apresentou valor próximo ao da amostra sem tratamento.

Com relação à diferença total de cor (ΔE) em relação a amostra sem tratamento, a 5.5 foi a que apresentou o menor valor, sendo bem próxima a esta. As demais apresentaram valores maiores de ΔE , distanciando-se mais em termos de cor da amostra inicial, sendo que a amostra 18 a que apresentou maior diferença, caracterizada pelos menores valores de L^* , a^* e b^* obtidos. Os valores de croma (C),

excetuando a amostra 5.5, diminuíram com os tratamentos, tendo a amostra 18 apresentado o menor valor.

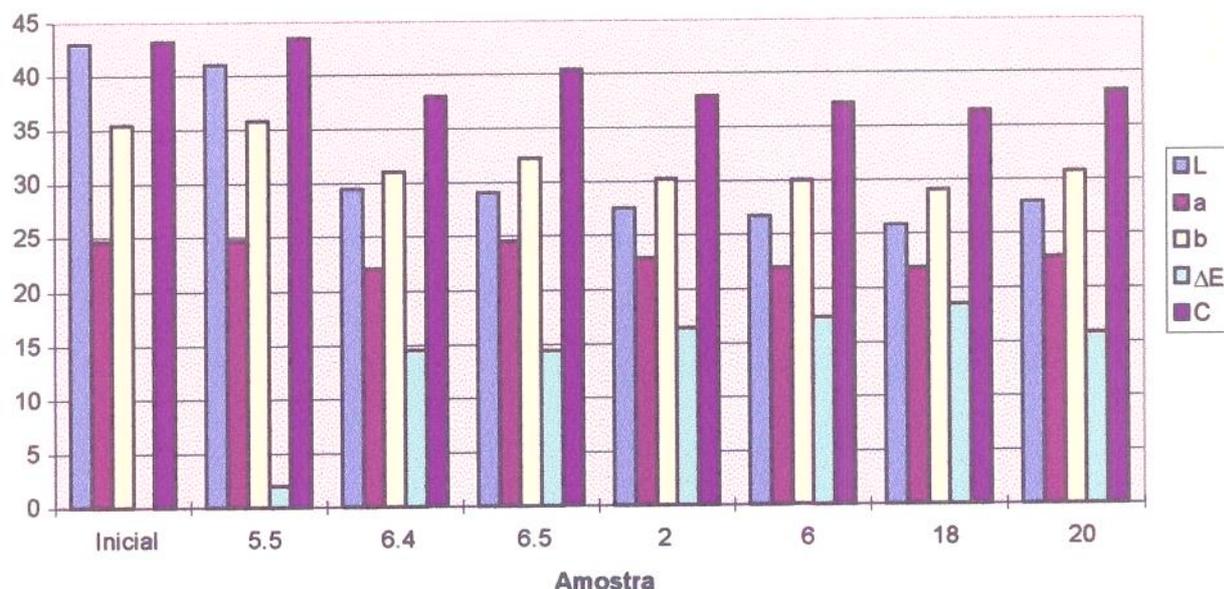


FIGURA 4.29 - Dados de cor no sistema L*a*b* CIE, diferença total de cor (ΔE) e croma (C) das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.

A avaliação visual das polpas de goiaba foram apresentadas nas Tabelas 4.13, 4.14 e 4.15. Quanto à ordenação pela luminosidade (Tabela 4.13), o tratamento 18 foi considerado pelos julgadores como o mais escuro e a polpa inicial como a mais clara. Pela aplicação do Teste de Friedman a polpa inicial diferiu quanto a luminosidade a nível de 1% de probabilidade dos tratamentos 2, 6 e 18 e do tratamento 20 a nível de 5% de probabilidade. O tratamento 5.5 diferiu significativamente a nível de 1% dos tratamentos 2, 6 e 18; o tratamento 6.4 diferiu a nível de 5% do tratamento 18 e o tratamento 6.5 diferiu a nível de 5% dos tratamentos 6 e 18. A ordenação média do tratamento mais claro para o mais escuro foi: polpa inicial, 5.5, 6.5, 6.4, 20, 2, 6 e 18.

A ordenação visual dos tratamentos quanto ao teor de vermelho (Tabela 4.14) mostrou que a polpa inicial diferiu a nível de 1% de probabilidade dos tratamentos 2, 6 e 18 e a nível de 5% do tratamento 20. O tratamento 5.5 diferiu a nível de 1% dos tratamentos 2, 6 e 18. Em termos de ordenação do tratamento mais para o menos vermelho, foram obtidos os seguintes resultados: 18, 2, 6, 20, 6.5, 6.4, 5.5 e polpa

inicial. Observa-se que a polpa inicial, ou seja, sem nenhum tratamento, foi considerada a menos vermelha seguida do tratamento 5.5.

TABELA 4.13 - Soma das ordenações visuais da luminosidade com a aplicação do Teste de Friedman (Tabela de Newell e MacFarlane) das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.

TRATAMENTO	Polpa Inicial	5.5	6.4	6.5	2	6	18	20
Soma das ordens	72	63	45	54	24	20	10	36
5.5		9	27	18	48**	52**	62**	36*
6.4			18	9	39**	43**	53**	27
6.5				9	21	25	35*	9
2					30	34*	44*	18
6						4	14	12
18							10	16
20								26

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade e ** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs. Quanto menores as somas das ordens, mais escuras são as amostras.

Quanto ao teor de amarelo (Tabela 4.15) observou-se que a polpa inicial diferiu significativamente a nível de 1% de probabilidade dos tratamentos 2, 6 e 18 e ao nível de 5% de probabilidade do tratamento 20; o tratamento 5.5 diferiu estatisticamente ao nível de 1% dos tratamentos 2, 6 e 18; e os tratamentos 6.4 e 6.5 diferiram significativamente a nível de 1% do tratamento 18. Pelo resultado das somas das ordens do tratamento mais amarelo para o menos amarelo temos: polpa inicial, 5.5, 6.5, 6.4, 20, 2, 6 e 18.

De uma forma geral, L^* diminui com o aumento do teor de sacarose, a^* foi maior para os teores máximos de sorbato de potássio (0,1%) independente do teor de sacarose e b^* foi maior para os teores máximos de sorbato de potássio e mínimo de sacarose.

TABELA 4.14 - Soma das ordenações visuais do vermelho com a aplicação do Teste de Friedman (Tabela de Newell e MacFarlane) das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.

TRATAMENTO	Polpa inicial	5.5	6.4	6.5	2	6	18	20
Soma das ordens	71	64	43	42	25	28	14	37
5.5		7	28	29	46**	43**	57**	34*
6.4			21	22	39**	36**	50**	27
6.5				1	18	15	29	6
2					17	14	28	5
6						3	11	12
18							14	9
20								23

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade e ** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs. Quanto menores as somas das ordens, mais vermelhas são as amostras.

TABELA 4.15 - Soma das ordenações visuais do amarelo com a aplicação do Teste de Friedman (Tabela de Newell e MacFarlane) das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.

TRATAMENTO	Polpa inicial	5.5	6.4	6.5	2	6	18	20
Soma das ordens	9	18	33	32	56	61	70	45
5.5		9	24	23	47**	52**	61**	36*
6.4			15	14	38**	43**	52**	27
6.5				1	23	28	37**	12
2					24	29	38**	13
6						5	14	11
18							9	16
20								25

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade e ** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Obs. Quanto menores as somas das ordens, mais amarelas são as amostras.

A Tabela 4.16 apresenta os dados dos coeficientes de correlação entre as medições objetivas e subjetivas da cor. Estes dados mostraram maiores coeficientes entre a ordenação visual da luminosidade (OVL), vermelho (OVV) e amarelo (OVA) com o valor de b^* (amarelo), ou seja, os provadores ordenaram as amostras tendo como parâmetro principal o amarelo. Os coeficientes de correlação foram ligeiramente melhorados nas correlações múltiplas da ordenação pela intensidade de vermelho e valores objetivos de cor. Foram observados coeficientes de correlação entre o croma (C) e a ordenação de vermelho (OVV).

TABELA 4.16 - Coeficientes de correlação linear e múltipla entre os dados das medições objetivas e subjetivas da cor das polpas de goiaba estáveis dos Experimentos IV e V.

MEDIÇÕES OBJETIVAS	MEDIÇÕES SUBJETIVAS		
	OVL	OVV	OVA
Luminosidade (L^*)	0,8613	0,9369	-0,8825
Vermelho (a^*)	0,8614	0,8024	-0,8218
Amarelo (b^*)	0,9240	0,9601	-0,9263
L^*a^*	0,9125	0,9435	0,9074
L^*b^*	0,9359	0,9603	0,9289
a^*b^*	0,9295	0,9643	0,9264
$L^*a^*b^*$	0,9360	0,9656	0,9297
Croma (C)	0,9289	0,9401	-0,9198

Sendo: OVL=Ordenação Visual de Luminosidade; OVV=Ordenação Visual do Vermelho e OVA=Ordenação Visual do Amarelo.

4.5.4 - Análise de açúcares redutores e totais.

A Tabela 4.17 mostra os valores obtidos nas análises de açúcares totais e redutores dos tratamentos estáveis dos Experimentos IV e V que apresentavam adição de sacarose na sua formulação. Como os tratamentos 6.4 (Experimento IV) e 6

(Experimento V) apresentavam a mesma formulação, foi analisada apenas a amostra do tratamento 6 para simplificação do número de análises. Observa-se pelos dados da Tabela 4.17 que todos os tratamentos possuem um teor mais elevado de açúcares totais do que o adicionado, porém isto é plenamente compreensível visto que a polpa de goiaba utilizada nos tratamentos possui cerca de 17% de açúcares totais e 12% de açúcares redutores e contribui com os seus açúcares para o aumento dos teores de açúcares totais e redutores. Nota-se que o teor de ácido cítrico contribui para a hidrólise da sacarose visto que o tratamento 18 que não possui qualquer quantidade de ácido cítrico adicionada apresentou o menor percentual de açúcares redutores. Os tratamentos 6 e 20 que possuem as mesmas quantidades de sacarose e ácido cítrico apresentaram valores próximos de açúcares totais e redutores. O tratamento 2, que possui menor teor de sacarose e ácido cítrico que os demais, apresentou valores também menores de açúcares totais e redutores, mas observa-se que pequenas quantidades de ácido cítrico adicionadas contribuem para a hidrólise da sacarose. O tempo de armazenamento a 25°C tem influência na hidrólise da sacarose, visto que o tratamento 6.5, apresentou a mais elevada concentração de açúcares redutores e possui um período de estocagem de cerca de 30 dias mais longo do que os demais tratamentos.

TABELA 4.17 - Análise de açúcares totais e redutores nas amostras estáveis de polpa de goiaba dos Experimentos IV e V.

TRATAMENTO	AÇÚCARES TOTAIS (%)	AÇÚCARES REDUTORES (%)
6.5 (50% sacarose, 0,75% ác. cítrico e 0,1% de sorbato)	60,30	18,38
2 (46% de sacarose, 0,22% de ác. cítrico e 0,06% de sorbato)	51,59	11,36
6 (54% de sacarose, 0,75% de ác. cítrico e 0,06% de sorbato)	59,36	13,53
18 (54% de sacarose e 0,06% de sorbato)	61,85	8,14
20 (54% sacarose, 0,75% de ác. cítrico e 0,05% de sorbato)	62,92	14,46

4.5.5. Avaliação sensorial

Como os tratamentos estáveis utilizavam sorbato de potássio como conservador, havia uma dúvida se as concentrações utilizadas influenciariam o sabor dos produtos elaborados a partir das polpas obtidas. Optou-se pela elaboração de suco de goiaba, por ser um produto mais diluído, em que as concentrações de sorbato pudessem ser mais facilmente notadas. Assim, foram testadas cada uma das concentrações utilizadas e em cada formulação que apresentava diferenças. Foram testados os tratamentos 6.5 - Experimento IV (50% sacarose, 0,75% ácido cítrico e 0,1% de sorbato de potássio), 2, 6, 18 e 20 (Experimento V), com respectivamente concentrações (%) de sacarose, ácido cítrico e sorbato de potássio de : 46,09, 0,22 e 0,06; 54, 0,75 e 0,06; 54, 0 e 0,06; e 54, 0,75 e 0,05.

Os resultados obtidos estão colocados na Tabela 4.18. Apenas para o tratamento 2 o sabor do sorbato de potássio foi percebido sensorialmente no suco de goiaba. Em todos os demais tratamentos, em que havia maior concentração de sacarose e ácido nas formulações originais, a percepção de sorbato não foi significativa ao nível de 5% de probabilidade. Notou-se que o ácido cítrico influenciaram pouco a percepção do sorbato, visto que nas amostras com ou sem ácido cítrico os resultados foram os mesmos. Porém a sacarose influenciaram a percepção do sabor do sorbato, pois em todas as amostras com concentrações acima de 50% de sacarose, a diferença entre as amostras não foi significativa.

Com relação a intensidade percebida de sorbato a média obtida foi correspondente a 2,1, sabor estranho muito ligeiro da escala utilizada.

TABELA 4.18 - Resultados da avaliação sensorial de alguns tratamentos de polpa de goiaba com relação ao sabor de sorbato de potássio, utilizando o Método do Duo-Trio.

Tratamento	6.5	2	6	18	20
Julgamentos totais	18	19	20	20	18
Julgamentos corretos	11	14	08	09	09
nº mínimo de respostas corretas (5% de probabilidade)	13	14	15	15	13
Diferença significativa	Não	Sim	Não	Não	Não

5. CONCLUSÕES

Deste trabalho foi possível concluir-se que:

Pelo número de cepas isoladas, observou-se que houve um predomínio de leveduras e bolores nas amostras do ambiente industrial e de frutas e seus produtos examinados.

As bactérias lácticas tiveram maior incidência nas superfícies dos equipamentos, mesas de madeira e mesas de inox e foram facilmente controladas pelo abaixamento da Aa.

Entre as cepas microbianas identificadas a maior ocorrência de leveduras foi no gênero *Candida* e *Penicillium* entre os bolores. No caso das bactérias lácticas os gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* ocorreram praticamente em proporções equivalentes.

Os ácidos fosfórico, cítrico e láctico apresentaram comportamento semelhantes na redução de pH e aumento da acidez da polpa de goiaba até os níveis desejados (pH=3,0 e acidez máxima de 1%).

Os valores de Aa experimentais obtidos para os solutos sacarose, glicose, glicerol e açúcar invertido se mostraram bastante próximos ou um pouco menores do que os previstos pelos modelos, indicando que pode-se alcançar, na prática, valores de Aa ainda menores que os projetados, conferindo assim uma melhor estabilidade microbiológica ao produto.

Nos três primeiros experimentos a deterioração das amostras foi bastante evidente e causada por uma microbiota mista de leveduras não se sobressaindo nenhuma espécie em particular.

Os resultados dos Experimentos I, II e III evidenciaram que não é possível conservar-se a polpa de goiaba apenas pelo controle de Aa (até os níveis de 0,828) e pH (mínimo de 3,10) com a adição de sacarose e ácido cítrico.

A acidez cítrica e o pH se mantiveram praticamente estáveis durante o período de armazenamento das polpas de goiaba na grande maioria dos tratamentos em todos os

experimentos. Na maioria dos tratamentos a Aa decresceu ao longo do período de armazenamento e a concentração de sólidos solúveis apresentou comportamento variável.

A deterioração microbiológica foi bastante evidente quando a população atingiu valores da ordem de 10^5 a 10^6 UFC/g.

É possível conservar-se a polpa de goiaba por períodos de pelo menos 120 dias a 25°C com a adição de alguns ingredientes, nas seguintes combinações:

- 0,75% de ácido cítrico e 0,10% de sorbato de potássio;
- 46% de sacarose, 0,22% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio;
- 50% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,10% de sorbato de potássio;
- 54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio;
- 54% de sacarose e 0,06% de sorbato de potássio;
- 54% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,05% de sorbato de potássio.

A levedura causadora de deterioração nos experimentos que utilizavam o sorbato de potássio como conservador foi identificada como sendo a *Zygosaccharomyces bailii*, que é reconhecidamente resistente aos conservadores.

Entre os bolores, o único que apresentou uma certa resistência à adição de 0,06% de sorbato de potássio e abaixamento de Aa até 0,96 foi o *Penicillium viridicatum*.

Os tempos de vida-de-prateleira de polpa de goiaba preservada com adição de sacarose e ácido cítrico podem ser estimados através das seguintes equações:

- contaminação inicial de 10^4 UFC/g:

- concentração de 0 a 50% de sacarose e de 0 a 3% de ácido cítrico:

$$\text{tempo(dias)} = 1,644 - 0,035 (\% \text{sacarose}) + 0,799 (\% \text{ác. cítrico}) + 0,002 (\% \text{sacarose})^2 - 0,277 (\% \text{ác. cítrico})^2 + 0,013 (\% \text{sacarose} \times \% \text{ác. cítrico}).$$

. concentração de 43 a 57% de sacarose e 0 a 1,5% de ácido cítrico:

$$\text{tempo(dias)} = 250,172 - 10,153(\% \text{sacarose}) - 33,564(\% \text{ác. cítrico}) + 0,105 (\% \text{sacarose})^2 + 2,000 (\% \text{ác. cítrico})^2 + 0,667 (\% \text{sacarose} \times \% \text{ác. cítrico}).$$

- contaminação inicial de 10^3 UFC/g:

. concentração de sacarose de 50 a 70% e de 0 a 1,5% de ácido cítrico:

$$\text{tempo(dias)} = -605,493 + 19,646(\% \text{sacarose}) + 55,555(\% \text{ác. cítrico}) - 0,155(\% \text{sacarose})^2 - 23,155 (\% \text{ác. cítrico})^2 - 0,200 (\% \text{sacarose} \times \% \text{ác. cítrico}).$$

. concentração de sacarose de 0 a 54%, 0 a 1,5% de ácido cítrico e 0,06% de sorbato de potássio:

$$\text{tempo(dias)} = -1,640 - 0,380 (\% \text{sacarose}) + 22,893 (\% \text{ác. cítrico}) + 0,064 (\% \text{sacarose})^2 + 1,996(\% \text{ác. cítrico})^2 - 1,433 (\% \text{sacarose} \times \% \text{ác. cítrico}).$$

O sorbato de potássio não sofre perda considerável durante o período de armazenamento a 25°C em polpas de goiaba com e sem adição de sacarose e ácido cítrico.

A perda de vitamina C foi da ordem de 50% para as formulações com adição de sacarose e de 70% para a formulação com 0% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,10% de sorbato de potássio.

Com relação à cor da polpa de goiaba, a luminosidade diminuiu com o aumento do teor de sacarose, o teor de vermelho foi maior com a adição de 0,1% de sorbato de potássio e o teor de amarelo foi maior para 0,1% de sorbato de potássio e 0% de sacarose. Todos os tratamentos aplicados diminuíram a luminosidade, teor de vermelho e amarelo das amostras com relação a polpa de goiaba inicial com exceção do tratamento com 0% de sacarose, 0,75% de ácido cítrico e 0,10% de sorbato de potássio que obteve dados bastante próximos ao da inicial.

Os resultados da avaliação sensorial mostraram que para os tratamentos estáveis com mais de 50% de sacarose o sabor do sorbato não pode ser notado no suco de goiaba (concentração de sorbato de potássio de 0,05 à 0,10%). Quanto à percepção do

sabor de sorbato de potássio observou-se que a sacarose mascara esta percepção e o ácido cítrico não interferiu na percepção do sabor do sorbato. Apenas na amostra com menor teor de ácido (0,22%) e menor teor de sacarose (46%) o sabor do sorbato foi detectado sensorialmente a nível de 5% de probabilidade. A intensidade percebida foi considerada muito ligeira pelos degustadores.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testes em escala semi-industrial para avaliação da tecnologia;
- Testes com cargas de inóculos mais realistas aos produtos devidamente pasteurizados observando as boas práticas de manufatura (10^1 e 10^2 UFC/g);
- Testes com outras composições de inóculo;
- Uso de microbiologia preditiva;
- Uso de outros tipos de solutos e ácidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGAB, M. A. & COLLINS, M. Effect of treatments environment (temperature, pH, water activity (aw) on the heat resistance of yeasts. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, **29**(1): 5-9, 1992.
2. AGUILERA, J. M.; CHIRIFE, J.; PARADA-ARIAS, E.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. CYTED - D AHI: an Ibero-american project on intermediate moisture foods and combined methods technology. **AIChE Symposium Series**, New York, **297** (89): 72-79, 1993.
3. AGUILERA, J. M. & CHIRIFE, J. Combined methods for the preservation of foods in Latin America and the CYTED-D project. **Journal of Food Engineering**, Oxford, **22** (1-4): 433-444, 1994.
4. AGUILERA, J. M.; FRANCKE, A.; FIGUEROA, G.; BORNHARDT, C. Preservation of minced pelagic fish by combined methods. **Internacional Journal of Food Science & Technology**, Oxford, **27** (2): 171-177, 1992.
5. AGUILERA, J. M. & PARADA-ARIAS, E. CYTED - D AHI: an Ibero American project on intermediate moisture foods and combined methods technology. **Food Research Internacional**, Oxford, **25**(2): 159-165, 1992.
6. AHVENAINEN, A. New approaches in improving the shelf of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, **7** (6): 179-187, 1996.
7. ALZAMORA, S.M.; GERSCHENSON, L. N.; CERRUTI, P.; ROJAS, A. M. Shelf-stable pineapple for long-term non-refrigerated storage. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, Londres, **22** (5): 233-236, 1989.

8. ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M. S.; ARGALÍZ, A.; WELLI, J. Application of combined methods technology in minimally processed fruits. **Food Research International**, Oxford, **26** (2): 125-130, 1993.
9. AMARO, A. A. Aspectos Econômicos. In: PEREIRA, F. M. & MARTINEZ JÚNIOR, M. **Goiaba para industrialização**. Jaboticabal, UNESP. Regis Summa, 1986. p. 22-41.
10. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods**, 8th ed, vol II, St. Paul, AACC, 1983.
11. ANGELUCCI, E. Conservadores em alimentos: legislação brasileira. In: ANGELUCCI, E. (coord.) **Seminário: conservadores e acidulantes em alimentos**. Campinas, ITAL, 1989. p. 1-7.
12. ANTUNES, A. J. & CANHOS, W.P. **Aditivos em alimentos**. São Paulo. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo, 1983. 178p.
13. ARTEAGA, G. E.; LI-CHAN, E.; VAZQUEZ-ARTEAGA, M. C.; NAKAI, S. Systematic experimental designs for product formula optimization. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, **5** (8): 243-254, 1994.
14. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação brasileira de alimentos**. São Paulo. 1992.
15. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Teste duo-trio em análise sensorial. NBR 13169. Projeto 13: 014. 01-005, Junho/ 1994. 4 p.

16. BAIRD-PARKER, A. C. Organic acids. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (eds). **Microbial ecology of foods: factors affecting life and death of microorganisms**. vol I. New York, Academic Press, 1980. p. 126-135.
17. BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S. ; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas, Editora da UNICAMP, 1995. 299 p. (Série Manuais).
18. BEUCHAT, L. R. Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. **Journal of Food Science**, Chicago, **47** (5): 1679-1682, 1982.
19. BEUCHAT, L. R. & NAIL, B. V. Evaluation of media for enumerating yeasts and molds in fresh and frozen fruit purees. **Journal of Food Protection**, Ames, **48** (4): 312-315, 1985.
20. BILLS, S.; RESTAINO, L.; LENOVICH, L. W. Growth response of an osmotolerant sorbato-resistant yeast, *Saccharomyces rouxii*, at different sucrose and sorbate levels. **Journal of Food Protection**, Ames, **45** (12): 1120-1124, 1982.
21. BREKKE, J. E.; TONAKI, K. I.; CAVALETTO, C. G.; FRANK, H. A. Stability of guava puree concentrate during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, Chicago, **35** (4): 469-471, 1970.
22. BOBBIO, P. A. & BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. Campinas, Fundação Cargill, 1984. 232 p.
23. BOLIN, H. R.; KING JR, A. D.; STAFFORD, A. E. Sorbic acid loss from high moisture prunes. **Journal of Food Science**, Chicago, **45** (5): 1434-1435, 1980.

24. BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1978. 657 p.
25. CAL-VIDAL, J. Effects of combination of solutes on depression of water activity. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 1 (2): 73-84, 1981.
26. CECCHI, H. M. **Comparação e desenvolvimento de métodos analíticos para ácidos benzóico e sórbico em alimentos**. Campinas, 1988. 152 p. [Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
27. CECCHI, H. M. Determinação de ácidos benzóico e sórbico em alimentos. In: ANGELUCCI, E. (coord.) **Seminário: conservadores e acidulantes em alimentos**. Campinas, ITAL, 1989. p. 13-20.
28. CERRUTI, P.; ALZAMORA, S. M.; CHIRIFE, J. Effect of potassium sorbate and sodium bisulfite on thermal inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in media of lowered water activity. **Journal of Food Science**, Chicago, 53 (6): 1911-1912, 1988.
29. CHEN, A. C. C. & KARMAS, E. Solute activity effect on water activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, Londres, 13 (2): 101-104, 1980.
30. CHIRIFE, J. Predicción de la actividad de agua en alimentos. In: Jardim, D. C. P. (coord). **I Seminário sobre atividade de água em alimentos**. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1987. p. 1-40.
31. CHIRIFE, J. Physicochemical aspects of food preservation by combined factors. **Food Control**, Oxford, 4 (4): 210-215, 1993.

32. CHIRIFE, J. & FAVETTO, G. J. Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. **Food Research Internacional**, Oxford, **25** (5): 389-396, 1992.
33. CHIRIFE, J.; FAVETTO, G. J.; BALLESTEROS, S.; KITIC, D. Mumification in ancient Egypt: an old example of tissue preservation by hurdle technology. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, Londres, **24** (1): 9-11, 1991.
34. CHIRIFE, J.; FAVETTO, G.; FERRO FONTÁN, C. The water activity of fructose solutions in the intermediate moisture range. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, Londres, **15** (3): 159-160, 1982.
35. CHIRIFE, J. & FERRO FONTÁN, C. Water activity of fresh foods. **Journal of Food Science**, Chicago, **47** (2): 661-663, 1982.
36. CHIRIFE, J.; FERRO FONTÁN, C.; BENMERGUI, E. A. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. IV. aw prediction in aqueous non electrolyte solutions. **Journal of Food Technology**, Oxford, **15** (1): 59-70, 1980.
37. CIFUENTES, A. F. J. de la T. . **Desenvolvimento, avaliação física, química e microbiológica e testes de aceitação de salsicha com aw reduzida por glicerol e cloreto de sódio**. Campinas, 1987. 124p. [Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
38. CHRISTIAN, J. H. B. Reduced water activity. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (eds). **Microbial ecology of foods: factors affecting life and death of microorganisms**. vol I. New York, Academic Press, 1980. p. 70-91.

39. COLE, M. B.; FRANKLIN, J. G.; KEENAN, M. H. J. Probability of growth of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in a model fruit drink system. **Food Microbiology**, Londres, **4** (2): 115-119, 1987.
40. CORLETT Jr., P. A.; BROWN, M. H. pH and acidity. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (eds). **Microbial ecology of foods: factors affecting life and death of microorganisms**. vol I. New York, Academic Press, 1980. p. 92-111.
41. CYTED - D PROGRAM (ed.) Programa Iberoamericano de ciencia y tecnologia para el desarrollo V centenario CYTED - D. Aportaciones al desarrollo tecnologico de los alimentos de humedad intermedia preservados mediante metodos combinados. **Informacion Tecnica**, **4**, 1991. 136 p.
42. DANIEL, C. **Applications of statistics to industrial experimentation**. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1976. 289 p.
43. DEAK, T. & BEUCHAT, L. R. Use of indirect conductimetry for predicting growth of food spoilage yeasts under various environmental conditions. **Journal of Industrial Microbiology**, Hants, **12** (3-5): 301-308, 1993.
44. DELAQUIS, P. J. & MAZZA, G. Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. **Food Technology**, Chicago, **49** (11): 73-84, 1995.
45. DE MARTIN, Z.; CIA, G.; TEIXEIRA, C. G.; ANGELUCCI, E.; LEITÃO, M. F. de F.; BLEINROTH, E. W.; TOSELO, Y. Industrialização da polpa de goiaba da variedade vermelha. **Cotetânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, **6** (1): 11-36, 1975.

46. DE MARTIN, Z. J. & KATO, K. . Processamento: produtos, características e utilização. In: MEDINA, J.C. et alii. **Goiaba: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2a. ed. rev. e ampl.. Campinas, ITAL, 1991. p. 141-175. (Série Frutas Tropicais, 6).
47. DIEMAIR, W. **Laboratoriumsbuch fur Lebensmittelchemiker**. 8 Aufl. Drisdén, Verlag Von Theodor Steinkopff, 1963.
48. DOMINGUES, J. A. **Salsichas de umidade intermediária para climas tropicais**. Campinas, 1977. 76 p. [Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas].
49. DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. vol I. Alemanha, IHW-Verlag, 1993. p. 201-210.
50. EARLE, M. D. & PUTT, G. Sorbates in food - a review. **Food Technology in New Zealand**, Auckland, **19** (9): 29, 31, 33,35, 1984.
51. ERICKSON, L. E. Recent developments in intermediate moisture foods. **Journal of Food Protection**, Ames, **45** (5): 484-491, 1982.
52. FERREIRA, V. L. P. **Princípios e aplicações da colorimetria em alimentos**. Campinas, ITAL, 1981. 85 p. (Instruções Técnicas, 19)
53. FERREIRA, V. L. P.; FRANCIS, J. F.; YOTSUYANAGI, K. Cor e carotenóides totais em suco de maracujá (*Passiflora edulis*, Sims). **Coletânea do Ital**, Campinas, **19** (1): 50-58, 1989.
54. FOX, M. & LONCIN, M. Investigations into the microbiological stability of water-rich foods processed by a combination of methods. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, Londres, **15** (6) 321-325, 1982.

55. FRANCIS, J. F. & CLYDESDALE, F. M. **Food colorimetry: theory and application**. Westport, AVI, 1975. 447p.
56. FRANKS, F. Water activity: a credible measure of food safety and quality? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, **2** (3): 68-72, 1991.
57. GACULA Jr., M. C. & SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research**. Academic Press Inc., 1984. 505 p.
58. GARZA, S.; PIRO, A.; VIÑAS, I.; SANCHIS, V. Isolation and identification of spoilage organisms in commercial peach puree. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, **VI** (3): 351-355, 1994.
59. GERSCHENSON, L. N.; ALZAMORA, S. M.; CHIRIFE, J. Stability of sorbic acid in model food systems of reduced water activity: sugar solutions. **Journal of Food Science**, Chicago, **51** (4): 1028-1031, 1986 (a).
60. GERSCHENSON, L. N.; ALZAMORA, S. M.; CHIRIFE, J. Kinetics of sorbic acid loss during storage of peaches preserved by combined factors. **Journal of Food Technology**, Oxford, **21** (4): 517-519, 1986 (b).
61. GOLDEN, D. A. & BEUCHAT, L. R. Effects of potassium sorbate on growth patterns, morphology, and heat resistance of *Zygosaccharomyces rouxii* at reduced water activity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, **38** (12): 1252-1259, 1992.
62. GOULD, G. W. & JONES, M. V. Combination and synergistic effects. In: GOULD, G. W. (ed). **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London, Elsevier Applied Science, 1989. p. 401-420.
63. GRAHAM, J. H. & LUTTRELL, E. S. Species of *Leptosphaerulina* on forage plants. **Phytopathology**, **51**: 680-693, 1961.

64. GRAJALES, G. M. A. **Avaliação microbiológica do concentrado de tomate em diferentes pontos da linha do processamento.** Campinas, 1996. 140 p. [Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
65. GRIJSPAARDT-VINK, C. Food preservation by hurdle technology. **Food Technology**, Chicago, **48** (12): 28, 1994.
66. GUERRERO, S.; ALZAMORA, S. M.; GERSCHENSON, L. N. Development of a shelf-stable banana purée by combined factors: microbial stability. **Journal of Food Protection**, Ames, **57** (10): 902-907, 1994.
67. GUILBERT, S.; CLEMENT, O.; CHEFTEL, J. C. Efficacité comparée d'agents depreseurs de l'aw en solution et dans des aliments à humidité intermédiaire. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, Londres, **14** (5) 245-251, 1981.
68. HELRICH, K. (ed). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15 th ed., Arlington, A.O.A.C., 1990. 1298 p.
69. HOCKING, A. D. Moulds and yeasts associated with foods of reduced water activity: ecological interactions. In: SEOW, C. C.; TENG, T. T.; QUAH, C.H. (ed.) **Food preservation by moisture control.** Londres, Elsevier Applied Science Publishers Ltd, 1988. p. 57-72.
70. HOFFMANN, R.& VIEIRA, S. **Análise de regressão: uma introdução à econometria.** 2ª edição. São Paulo, Editora Hucitec, 1987. 379 p.
71. HOLLAND, G. Overview of intermediate moisture foods and markets. **Journal Ins. Can. Sci. Technol. Aliment.**, Ottawa, **19** (2) vi-viii, x-xii, 1986.

72. HORNER, K. J. & ANAGNOSTOPOULOS, G. D. Combined effects of water activity, pH and temperature on the growth and spoilage potential of fungi. **The Journal of Applied Bacteriology**, Londres, **36**(3): 427-436, 1973.
73. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª ed., v.1. São Paulo, 1985. 533p.
74. INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Previsões e Estimativas das Safras Agrícolas do Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, **26** (5): 94, 1996.
75. JACKIX, M. H. **Doces, geléias e frutas em calda**. Campinas, Editora da Unicamp, São Paulo, Ícone Editora, 1988. 172 p. (Coleção ciência e tecnologia ao alcance de todos: Série tecnologia de alimentos).
76. JAGLIANI, J.; CHAN Jr., H.T.; SAKA, W.S. . **Tropical Fruit Processing**. Londres, Academic Press Inc. Ltd., 1988. p. 9-43.
77. JARDIM, D. C. P. **Concentrado de tomate auto-estável pelo efeito combinado da Atividade de Água e Acidez**. Campinas, 1991. 125 p. [Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
78. JARDIM, D. C. P. Uso dos métodos combinados para a produção de alimentos. In: AGUIRRE, J. M. de & GASPARINO FILHO, J. (coord.). **Desidratação de frutas e hortaliças**. Campinas, ITAL, 1996. p.7.1-7.6. (Manual Técnico).
79. JARVIS, B. Do mycotoxins present a potencial hazard for intermediate moisture foods? In: DAVIES, R.; BIRCH, G. G.; PARKER, K. J. (ed). **Intermediate moisture foods**. Londres, Applied Science Publishers Ltd., 1976. p. 239-247.

80. JAYARAMAN, K. S.; RAMANUJA, M. N.; BHATIA, B. S.; NATH, H. Some studies on the preparation of intermediate moisture guava. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, **11**(4): 162-165, 1974.
81. JAYARAMAN, K. S.; RAMANUJA, M. N.; VENUGOPAL, M. K.; LEELA, R. K.; BHATIA, B. S. Studies on the preparation of intermediate moisture pineapple. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, **12** (6):309-312, 1975.
82. JAYARAMAN, K. S. Development of intermediate moisture tropical fruit and vegetable products - technological problems and prospects. In: SEOW, C. C.; TENG, T. T.; QUAH, C.H. (ed.) **Food preservation by moisture control**. Londres, Elsevier Applied Science Publishers Ltd, 1988. p. 175-198.
83. JAY, J. M. **Modern food microbiology**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1970. 328 p.
84. JERMINI, M. F. G. & SCHMIDT-LORENZ, W. Growth of osmotolerant yeasts at different water activity values. **Journal of Food Protection**, Ames, **50** (5): 404-410, 1987.
85. KAREL, M. Technology and application of new intermediate moisture foods. In: DAVIES, R.; BIRCH, G. G.; PARKER, K. J. (ed) **Intermediate moisture foods**. Londres, Applied Science Publishers Ltd., 1976. p. 4-31.
86. KARMAS, E. & LAUBER, E. Novel products from underutilized fish using combined processing technology. **Journal of Food Science**, Chicago, **52** (1) :7-9, 1987.
87. KITIC, D.; JARDIM, D. C. P; FAVETTO, G. J.; RESNIK, S. L.; CHIRIFE, J. Theoretical prediction of water activity of standard saturated salt solutions at various temperatures. **Journal of Food Science**, Chicago, **51** (4) :1037-1041, 1986.

88. LABUZA, T. P. The properties of water in relationship to water binding in food: a review. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport , **1** (2): 167-190, 1977.
89. LEE, S. H. & LABUZA, T. P. Destruction of ascorbic acid as a function of water activity. **Journal of Food Science**, Chicago, **40** (2): 370-373, 1975.
90. LEES, R. **Food Analysis: Analytical and Quality Control Methods for the Food Manufacturer and Buyer**. 3^a ed. Londres, Leonard Hill Books. 1975. 245 p.
91. LEIRAS, M. C.; CHIRIFE, J.; ALZAMORA, S. M. Development of a shelf-stable hydrolyzed concentrated cheese whey. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, Londres, **24** (1) 12-16, 1991.
92. LEISTNER, L. & RÖDEL, W. The stability of intermediate moisture foods with respect to micro-organisms. In: DAVIES, R.; BIRCH, G. G.; PARKER, K. J. (ed). **Intermediate moisture foods**. Londres, Applied Science Publishers Ltd., 1976. p. 120-137.
93. LEISTNER, L.; RÖDEL, W.; KRISPIEN, K. Microbiology of meat and meat products in high and intermediate moisture ranges. In: ROCKLAND, L. & STEWART, G. F. (eds). **Water activity: influences on food quality**. New York, Academic Press Inc, 1981. p. 855-916.
94. LEISTNER, L. Food Preservation by Combined Methods. **Food Research International**, Oxford, **25** (2): 151-158, 1992.
95. LEISTNER, L. **Food design by hurdle technology and HACCP**. Kulmbach, Adalbert Raps Foundation, 1994. 62 p.

96. LEISTNER, L. Principles and applications of hurdle technology. In: GOULD, G. W. (ed.) **New methods of food preservation**. Londres, Chapman & Hall, 1995. p. 1-22.
97. LEISTNER, L. & GORRIS, G. M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, **6** (2): 41-46, 1995.
98. LEITÃO, M. F. de F. Atividade de água e transformações microbiológicas de deterioração. In: Jardim, D. C. P (coord). **I Seminário sobre atividade de água em alimentos**. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1987. p. 1-12.
99. LEITÃO, M. F. de F. Conservadores em alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microrganismos. In: ANGELUCCI, E. (coord.) **Seminário: conservadores e acidulantes em alimentos**. Campinas, ITAL, 1989. p. 59-80.
100. LEITÃO, M. F. de F. Conservadores em alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microrganismos. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **20** (2): 116-127, 1990.
101. LEITÃO, M. F. de F. Microbiologia de sucos, polpas e produtos ácidos. In: SOLER, M. P. et alii. **Industrialização de frutas**. Campinas, ITAL, 1991. p. 33-52. (Manual Técnico, nº 8).
102. LENOVICH, L. M.; BUCHANAN, R. L.; WORLEY, N. J.; RESTAINO, L. Effect of solute type on sorbate resistance in *Zygosaccharomyces rouxii*. **Journal of Food Science**, Chicago, **53** (3): 914-916, 1988.
103. LIEWEN, M. B. & MARTH, E. H. Growth and inhibition of microorganisms in the presence os sorbic acid: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, **48** (4): 364-375, 1985.

104. LODDER, J. **The yeasts. A taxonomic study.** 2ª ed., Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1971. 1385 p.
105. LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; WELTI, J.; CORTE, P.; ARGAIZ, A. Shelf-stable high moisture papaya minimally processed by combined methods. **Food Research Internacional**, Oxford, **27** (6): 545-553, 1994.
106. LUSAS, E. W; G & GUZMAN, G. J. **Intermediate moisture legume and cereal food product and method of producing.** United States Patent 5.296.253, 1994.
107. MAHAN, B. H. **Química um curso universitário.** 2ª. ed., revisada, 5ª. reimpressão. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 1981. 656 p.
108. MAIA, M. L.; GARCIA, A. E. B.; LEITE, R. S. da S. F. . Aspectos Econômicos da Produção e Mercado. In: MEDINA, J. C. et alii. **Goiaba: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos** 2ª. ed. rev. e ampl.. Campinas, ITAL, 1991. p. 177-224. (Série Frutas Tropicais, 6)
109. MAIMER, E. & BUSSE, M. Growth properties and gas formation by yeasts isolated from processed fruits in media with various Brix values and sorbic acid contents. **Journal of Food Protection**, Ames, **55** (3): 192-197, 1992.
110. MATARAZZO, A. A. W. Metodologia de superfície de resposta e sua aplicação na tecnologia de alimentos. Campinas, ITAL, n.d. 29 p. (não publicado).
111. MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**, vol 1. Boca Raton, CRC Press Inc., 1987. 125 p.

112. MEYER, R. S.; GRANT, M. A.; LUEDECKE, L. O.; LEUNG, H. K. Effects of pH and water activity on microbiological stability of salad dressing. **Journal of Food Protection**, Ames, **52** (7): 477-479, 1989.
113. MOKADY, S.; COGAN, U.; LIEBERMAN, L. Stability of vitamin C in fruits and fruits blends. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, **35** (4): 452-456, 1984.
114. MONSALVE-GONZÁLES, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; McEVILY, A. J.; IYENGAR, R. Inhibition of enzymatic browning in apple products by 4-hexylresorcinol. **Food Technology**, Chicago, **49** (4): 110-118, 1995.
115. MORETTO, E. **Contribuição ao estudo de carne de umidade intermediária estocada a temperatura tropical**. Campinas, 1981. 65p. [Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas].
116. MORTON, F. J. & SMITH, G. The genera *Scopulariopsis* Bainier *Microascus* Zukal, and *Doratomyces* Corda. **Mycological Papers**, Surrey, **20** (86): 17-20, 1963.
117. MULTON, J. L. L'état actuel des travaux de la Commission "Aliments à humidité intermédiaire" du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation. **Ind. Aliment. Agric.** **98**:291-302, 1981.
118. NAZÁRIO, G. Aspectos toxicológicos de conservadores e acidulantes. In: ANGELUCCI, E. (coord.) **Seminário: conservadores e acidulantes em alimentos**. Campinas, ITAL, 1989. p. 81-84.
119. NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species. An illustrated manual for identification**. The Pennsylvania State University Press, EUA, 1983. pag. 135-138.

120. NEWELL, G. J. & MacFARLANE, S. D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. **Journal of Food Science**, Chicago, **52** (6): 1721-1725, 1987.
121. NOGUEIRA, M. T. Ácido cítrico e seus sais na indústria de alimentos. In: ANGELUCCI, E. (coord.) **Seminário: conservadores e acidulantes em alimentos**. Campinas, ITAL, 1989. p. 47-48.
122. NORRISH, R. S. An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. **Journal of Food Technology**, Oxford, **1** (1): 25-39, 1966.
123. NOTERMANS, S.; VELD, P. in't; WIJZES, T.; MEAD, G. C. A user's guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. **Food Microbiology**, Londres, **10** (2): 145-157, 1993.
124. PANADÉS, G.; TEJO, T.; SEVILLANO, E.; RAVELO, E. Influencia del procesamiento y almacenamiento asepticos en tanques sobre la calidad de la pulpa de guayaba. **Alimentaria**, Madrid, **242** (5): 75-77, 1993.
125. PARADA-ARIAS, E. Investigación cooperativa iberoamericana sobre alimentos de humedad intermedia. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, Valencia, **32** (2): 131-138, 1992.
126. PARADA-ARIAS, E. IMF: an Iberoamerican cooperative project. **Journal of Food Engineering**, Oxford, **22** (1-4): 445-452, 1994.
127. PEARSON, D. **The chemical analysis of foods**. 7^a ed. London, Churchill Livingstone, 1976. 575 p.

128. PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Sydney, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Division of Food Processing. 1988. pag. 6-27, 52-57, 104-163.
129. POTIER, S.; PASCAT, B.; BENOUALID, K. Augmentation de la durée de conservation d' un aliment à humidité intermédiaire conditionné sous atmosphère modifiée ou contrôlée. **Sciences des Aliments**, Paris, **9** (4): 701-712, 1989.
130. QUAST, D. G. & TEIXEIRA NETO, R. O. Atividade de água em alguns alimentos de teor intermediário de umidade. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, **6** (1): 203-232, 1975.
131. RAUCH, G. H. **Jam manufacture**. Londres, Leonard Hill Books, 1965. 191 p.
132. RESTAINO, L.; KOMATSU, K. K.; SYRACUSE, M. J. Effects of acids on potassium sorbate inhibition of food-related microorganisms in culture media. **Journal of Food Science**, Chicago, **47** (1): 134-138, 1981.
133. RESTAINO, L.; LENOVICH, L. M.; BILLS, S. Effect of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. **Journal of Food Protection**, Ames, **45** (12): 1138-1142, 1982.
134. RIBEIRO, M. C. & SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática - Roteiro e Manual Bactérias e Fungos**. São Paulo, Livraria Atheneu Editora, 1993. 112 p
135. ROBSON, J. N. Some introductory thoughts on intermediate moisture foods. In: DAVIES, R.; BIRCH, G. G.; PARKER, K. J. (ed). **Intermediate moisture foods**. Londres, Applied Science Publishers Ltd., 1976. p. 32-42.

136. ROSS, K. D. Estimation of water activity in intermediate moisture foods. **Food Technology**, Chicago, **29** (3): 26-34, 1975.
137. RUSSO, C. L' attività dell' acqua negli alimenti: quale credibilità ha ancora la sua misura? **Industrie Alimentari**, Pinerolo, **33** (326): 505-521, 1994.
138. SALOMON, E. A. G.; DE MARTIN, Z. J.; KATO, K.; FERREIRA, V. L. P.; EIROA, M. N. U.; BLEINROTH, E. W. . Conservação da polpa de goiaba em grandes recipientes por meio de metabissulfito de sódio. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **7**: 217-231, 1976.
139. SAVITCI, L. A.; GASPARINO FILHO, J.; GARCIA, A. E. B.; BLISKA, F. M. de M.; MORETTI, V. A.; LEITE, R. S. da S. F.; VIEIRA, M. C. Potencial agroindustrial no setor de frutas na sub-região de Campinas. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **24** (1): 105-119, 1994.
140. SENA, W. Z. **Economias de escala no processamento de frutas e hortaliças: uma análise da viabilidade de implantação de agroindústrias de pequeno porte em áreas rurais**. Viçosa, 1988. 109 p. [Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa].
141. SEVERINI, C.; PIZZIRANI, S.; ANESE, M.; LERICI, C. R. Use of ethanol added syrups in food vegetable concentration by direct osmosis. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, **32** (321): 1220-1222, 1993.
142. SILVIA FALCÓ, A., LARRAURI, J. A.; BORROTO, B.; SEVILLANO, E.; NÚÑEZ, M. Empleo de metodos combinados para la conservacion de una mermelada concentrada obtenida a partir de residuos de fresas. **Alimentaria**, Madrid, **242** (5): 69-71, 1993.

143. SINGH, R. K. & LUND, D. B. Kinetics of ascorbic acid degradation in stored intermediate moisture apples. In: LE MAGUER, M. & JELEN, P. **Food Engineering and Process Applications**. New York, Elsevier Applied Science Publishers Ltd, v. 1, 1986. p. 313-321.
144. SKERMAN, V. B. D. **Abstracts of microbiological methods**. EUA, John Wiley & Sons, Inc. 1969. 883 p.
145. SLOAN, A. E. & LABUZA, T. P. Investigating alternative humectants for use in foods. **Food Product Development**, Mendota, **9** (7): 75-88, 1975.
146. SMITTLE, R. B. & FLOWERS, R. S. Acid tolerant microorganisms involved in the spoilage of salad dressings. **Journal of Food Protection**, Ames, **45** (10): 977-983, 1982.
147. SOFOS, J. N. & BUSTA, F. F. Antimicrobial activity of sorbate. **Journal of Food Protection**, Ames, **44** (8): 614-622, 1981.
148. SOFOS, J. N. **Sorbate Food Preservatives**. Boca Raton, CRC Press, Inc., 1989. 236 p.
149. SOLER, M. P. Processamento industrial. In: SOLER, M. P. (coord). **Industrialização de geléias**. Campinas, ITAL, 1991. p. 1-20. (Manual Técnico nº 7).
150. SOLER, M. P.; RADOMILLE, L. R.; TOCCHINI, R. P. Processamento. In: SOLER, M. P. (coord.) **Industrialização de frutas**. Campinas, ITAL, 1991. p. 53-115. (Manual Técnico nº8).
151. SPECK, M. L. (ed). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2ª ed., Washington, D.C., APHA, 1984. 914 p.

152. SPIEGEL, M. R. **Estatística**. 6ª impressão. São Paulo, Editora McGraw Hill do Brasil Ltda, 1974. 580 p.
153. TANDON, D. K.; KALRA, S. K.; KULKARNI, J. K.; CHADHA, K. L. Chemical and microbiological evaluation of stored guava pulp in PVC containers. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, **20** (3): 118-120, 1983.
154. TAOUKIS, P. S.; BREENE, W. M.; LABUZA, T. P. Intermediate moisture foods. In: POMERANZ, Y. (ed). **Advanced in Cereal Science and Technology**, St. Paul, **9**: 91-128, 1988.
155. TEIXEIRA NETO, R. O. Alterações na qualidade de frutas e hortaliças desidratadas durante a estocagem. In: AGUIRRE, J. M. de & GASPARINO FILHO, J. (coord.) **Desidratação de frutas e hortaliças**. Campinas, ITAL, 1996. p.8.1-8.9. (Manual Técnico).
156. TEIXEIRA NETO, R. O.; VITALI, A. A.; GONÇALVES, J. R.; MORI, E. E. M.; BORDON, A. A. O. Resfriamento de polpas semi-concentradas em tambores de 200 l. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, **1**(1): 1-22, 1981.
157. THOMPSON, D. R. Response surface experimentation. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, **6** (3): 155-188, 1982.
158. TOKUOKA, K. & ISHITANI, T. Minimum water activities for the growth of yeasts isolated from high-sugar foods. **Journal Gen. Appl. Microbiol.**, Tokyo, **37** (1): 111-119, 1991.
159. UBOLDI EIROA, M. N. *Zygosaccharomyces bailii*: características e significado na indústria de alimentos. **Boletim do Ital**, Campinas, **20** (1): 19-37, 1983.

160. UBOLDI-EIROA, M. N.; LEITÃO, M. F. de F.; DAVENPORT, R. R.; CULLEN, B. de T. *Zygosaccharomyces bailii* em sucos de frutas concentrados: estudo da ocorrência e avaliação da sua resistência ao calor e aos conservadores químicos. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **14**: 57-72, 1984.
161. UBOLDI-EIROA, M. N. Microbiologia de frutas e hortaliças desidratadas. In: AGUIRRE, J. M. de & GASPARINO FILHO, J. (coord.). **Desidratação de frutas e hortaliças**. Campinas, ITAL, 1996. p. 6.1-6.26. (Manual Técnico).
162. VALLEJO-CORDOBA, B.; NAKAI, S.; POWRIE, W. D.; BEVERIDGE, T. Protein hydrolysates for reducing water activity in meat products. **Journal of Food Science**, Chicago, **51** (5): 1156-1161, 1986.
163. VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. (ed). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3ª ed. Washington, American Public Health Association, 1992. 1219 p.
164. VEGRO, C. L. R. & MIRANDA, M. C. Estrutura e dinâmica do mercado de goiaba e derivados. **Informações Econômicas**, São Paulo, **24** (8): 15-26, 1994.
165. VITALI, A. de A. Importância da atividade de água em alimentos. In: Jardim, D. C. P (coord). **I Seminário sobre atividade de água em alimentos**. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. p. 1-5.
166. WARTH, A. D. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. **Journal of Food Protection**, Ames, **48** (7): 564-569, 1985.
167. WARTH, A. D. Preservative resistance of *Zygosaccharomyces bailii* and other yeasts. **CSIRO Food Research Quartely**, Sydney, **46** (1): 1-8, 1986.

168. WELTI, J.; TAPIA DE DAZA, M. S.; AGUILERA, J. M.; CHIRIFE, J.; PARADA-ARIAS, E.; LÓPEZ MALO, A.; LÓPEZ, L. C.; CORTE, P. Classification of intermediate moisture foods consumed in Ibero-America. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, Valencia, **34** (1): 53-63, 1994.
169. WILLIAMS, S. (ed). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14^a ed., Arlington, AOAC Inc., 1984. 1141 p.

APÊNDICE A

TABELA A.1 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento I.

Solutos: sacarose

Ácido: cítrico

Inóculo: 10^4 UFC/g (de cada microrganismo).

PTO/TRATAMENTO	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS			
		0 dia	07 dias	16 dias	Estragada/Análise
1 (-1,-1) (6,63% Açúcar e 0,44% Ácido) 1A	2 (gás + mau cheiro)				
	2 (gás+mau cheiro)	0,977 3,71 22,4 0,93			Aa 3,63 pH 20,6 SS % ac
2 (+1,-1) (41,93% Açúcar e 0,44% Ácido) 2A	4 (gás+mau cheiro)				
	4 (gás+mau cheiro)	0,916 3,63 53,2 0,67			Aa 3,60 pH 51,7 SS % ac
3 (-1, +1) (6,63% Açúcar e 2,56% Ácido) 3A	2 (gás+mau cheiro)				
	2 (gás+mau cheiro)	0,975 3,19 22,2 2,13			Aa 3,08 pH 21,6 SS % ac
4 (+1,+1) (41,93% Açúcar e 2,56% Ácido) 4A	5 (gás+mau cheiro)				
	5 (gás+mau cheiro)	0,913 3,22 53,2 1,89			Aa 2,84 pH 52,3 SS % ac
5 (-1,414,0) (0% Açúcar e 1,50% Ácido) 5A	2 (gás+mau cheiro)				
	2 (gás+mau cheiro)	0,980 3,40 15,2 1,58			Aa 3,35 pH 15,4 SS % ac
6 (+1,414, 0) (50% Açúcar e 1,50% Ácido) 6A	erro experimental				
	erro experimental	0,884 3,16 59,8 1,22	0,886 2,98 59,5 1,14	0,884 3,07 59,5 1,12	Aa pH SS % ac
7 (0,-1,414) (23,56%Açúcar e 0%Ác) 7A	2 (gás+mau cheiro)				
	2 (gás+mau cheiro)	0,957 3,95 37,0 0,54			Aa 3,88 pH 35,8 SS % ac
8 (0, +1,414) (23,56% Aç e 3,0% Ácido) 8A	3 (gás+mau cheiro)				
	3 (gás+mau cheiro)	0,954 3,01 37,4 2,27			Aa 2,96 pH 36,4 SS % ac

9 (0,0) (23,56% Açúcar e 1,50% Ácido) 9A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	0,957 3,40 36,8 1,40	Aa 3,30 pH 36,0 SS % ac
10(0,0) (23,56% Açúcar e 1,50% Ácido) 10A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	0,956 3,35 36,8 1,40	Aa 3,29 pH 36,2 SS % ac
11(0,0) (23,56% Açúcar e 1,50% Ácido) 11A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	0,955 3,34 36,8 1,40	Aa 3,30 pH 36,2 SS % ac
12(0,0) (23,56% Açúcar e 1,50% Ácido) 12A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	0,956 3,32 36,8 1,40	Aa 3,27 pH 36,2 SS % ac
13(0,0) (23,56% Açúcar e 1,50% Ácido) 13A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	0,957 3,35 36,8 1,40	Aa 3,30 pH 35,8 SS % ac
14(0,0) (23,56% Açúcar e 1,50% Ácido) 14A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	0,958 3,35 36,9 1,40	Aa 3,29 pH 35,8 SS % ac
15(0,0) (23,56% Açúcar e 1,50% Ácido) 15A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	0,957 3,35 36,6 1,40	Aa 3,25 pH 36,0 SS % ac
16(0,0) (23,56% Açúcar e 1,50% Ácido) 16A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	0,958 3,37 37,0 1,40	Aa 3,25 pH 35,9 SS % ac
17 (Branco) 17A	1,5(mau cheiro +gás) 1,5(mau cheiro +gás)	0,985 3,95 16,1 0,75	Aa 3,87 pH 14,8 SS % ac

Análise da amostra inicial:

Aa=0,990; pH=3,92; Sólidos Solúveis=15,2 °Brix (20°C) e Acidez Cítrica=0,73%

TABELA A.2 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento I.

Soluto: sacarose

Ácido: cítrico

Inóculo : 10^4 UFC/g (de cada microrganismo)

PTO/Tratamento	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	CONTAGEM MICROBIANA (UFC/g)			
		3 dias	07 dias	15 dias	30 dias/MO
1 (-1,-1) (6,63% Aç e 0,44% Ácido) 1A	2 (gás+mau cheiro)				
2 (+1,-1) (41,93% Aç e 0,44% Ácido) 2A	4 (gás+mau cheiro)				
3 (-1, +1) (6,63% Aç e 2,56% Ácido) 3A	2 (gás+mau cheiro)				
4 (+1,+1) (41,93% Aç e 2,56 % Ácido) 4A	5 (gás+mau cheiro)				
5 (-1,414,0) (0% Aç e 1,50% Ácido) 5A	2 (gás+mau cheiro)				
6 (+1,414, 0) (50% Aç e 1,50% Ácido) 6A	erro experimental	-	-	-	Bact
	erro experimental	1.10^2	1.10^3	-	Lev
					Bol
7 (0,-1,414) (23,56% Aç e 0% Ácido) 7A	2 (gás+mau cheiro)				
8 (0, +1,414) (23,56% Aç e 3,0% Ácido) 8A	3 (gás+mau cheiro)				
9 (0,0) (23,56%Aç e 1,50% Ácido) 9A	3 (gás+mau cheiro)				
10 (0,0) (23,56% Aç e 1,50% Ácido) 10A	3 (gás+mau cheiro)				
11 (0,0) (23,56% Aç e 1,50% Ácido) 11A	3 (gás+mau cheiro)				
12 (0,0) (23,56% Aç e 1,50% Ácido) 12A	3 (gás+mau cheiro)				
13 (0,0) (23,56% Aç e 1,50% Ácido) 13A	3 (gás+mau cheiro)				
14 (0,0) (23,56% Aç e 1,50% Ácido) 14A	3 (gás+mau cheiro)				

15 (0,0) (23,56% Aç e 0,75% Ácido) 15A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	
16 (0,0) (23,56% Aç e 1,50% Ácido) 16A	3 (gás+mau cheiro) 3 (gás+mau cheiro)	
17 (Branco) 17A	1,5 (mau cheiro + gás) 1,5 (mau cheiro + gás)	

TABELA A.3 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento II.

Soluto: sacarose

Ácido: cítrico

Inóculo : 10^4 UFC/g (de cada microrganismo)

PTO/TRATAMENTO	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS		
		0 dia	07dias	Estragada/Análise
1 (-1, -1) (45,05 % Aç e 0,22% Ácido) 1A	4 (gás+mau cheiro + vazamento) 4 (gás+mau cheiro + vazamento)			
		0,909		Aa
		3,70		pH
		56,4		3,68
		0,40		54,9
				% ac
2 (+1, -1) (54,95% Aç e 0,22% Ácido) 2A	8 (gás+mau cheiro + vazamento) 8 (gás+mau cheiro + vazamento)			
		0,866	0,867	Aa
		3,71	3,72	pH
		63,7	63,6	3,73
		0,40	0,41	64,1
				% ac
3 (-1, +1) (45,05% Aç e 1,28% Ácido) 3A	5 (muita produção gás+vaz+mau cheiro) 5 (muita produção gás + vaz + mau cheiro)			
		0,905		Aa
		3,30		pH
		56,2		3,21
		1,10		55,4
				% ac
4 (+1, +1)(54,95% Aç e 1,28% Ácido) 4A	16(vazamento+gás) 14 (segmentada +gás+mau cheiro)			
		0,865	0,864	Aa
		3,23	3,14	pH
		64,2	63,6	3,17
		0,92	0,91	63,7
				% ac
5 (-1,414, 0) (43% Aç e 0,75% Ácido) 5A	4 (gás+mau cheiro +vazamento) 4 (gás+mau cheiro +vazamento)			
		0,913		Aa
		3,37		pH
		54,2		3,41
		0,84		53,6
				% ac
6 (+1,414, 0) (57% Aç e 0,75% Ácido) 6A	16 (gás + mau cheiro +vazamento) 10 (segmentada + gás)			
		0,853	0,856	Aa
		3,36	3,44	pH
		65,7	65,4	3,42
		0,63	0,62	65,3
				% ac
7 (0, -1,414) (50% Aç e 0% Ácido) 7A	5 (bolhas de ar + mau cheiro) 5 (bolhas de ar + mau cheiro)			
		0,889		Aa
		3,88		pH
		60,0		3,83
		0,34		59,7
				% ac
8 (0, +1,414) (50% Aç e 1,50% Ácido) 8A	7(segmentada+gás) 7(segmentada+gás)			
		0,886		Aa
		3,10		pH
		60,2		3,09
		1,13		59,6
				% ac

9 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 9A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	0,886 3,50 60,2 0,73	3,39 59,2	Aa pH SS % ac
10 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 10A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	0,883 3,45 60,2 0,73	3,46 59,4	Aa pH SS % ac
11 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 11A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	0,887 3,49 60,2 0,74	3,35 59,6	Aa pH SS % ac
12 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 12A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	0,889 3,47 60,1 0,74	3,42 59,6	Aa pH SS % ac
13 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 13A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	0,891 3,48 60,0 0,73	3,44 59,2	Aa pH SS % ac
14 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 14A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	0,888 3,51 60,0 0,73	3,36 59,6	Aa pH SS % ac
15 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 15A	5(gás+mau cheiro +vazamento) 5(gás+mau cheiro +vazamento)	0,887 3,51 60,2 0,73	3,48 59,4	Aa pH SS % ac
16 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 16A	5(gás+mau cheiro +vazamento) 5(gás+mau cheiro +vazamento)	0,888 3,54 60,0 0,73	3,37 59,6	Aa pH SS % ac
17 (Branco) 17A	1,5 (mau cheiro +gás) 1,5(mau cheiro +gás)	0,982 3,88 15,6 0,68	3,85 15,4	Aa pH SS % ac

Análise da amostra inicial:

Aa=0,988; pH=3,89; SS=15,5°Brix (20°C) e Acidez Cítrica= 0,70%

TABELA A.4 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento II.

Solute: sacarose

Ácido: cítrico

Inóculo : 10^4 UFC/g (de cada microrganismo)

PTO/Tratamento	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	CONTAGEM MICROBIANA (UFC/g)				MO
		04 dias	07 dias	15 dias	30 dias	
1 (-1,-1) (45,05% Aç e 0,22% Ácido) 1A	4 (gás+mau cheiro + vazamento) 4 (gás+mau cheiro + vazamento)					
2 (+1,-1) (54,95% Aç e 0,22% Ácido) 2A	8 (gás+mau cheiro + vazamento) 8 (gás+mau cheiro + vazamento)	$5 \cdot 10^3$ $1,4 \cdot 10^4$ $3,3 \cdot 10^3$	- $6,4 \cdot 10^5$ -			Bact Lev Bol
3 (-1, +1) (45,05% Aç e 1,28% Ácido) 3A	5 (muita produção gás + vaz + mau cheiro) 5 (muita produção gás+vaz+mau cheiro)	$4,7 \cdot 10^6$ $1,8 \cdot 10^6$ $1 \cdot 10^3$				Bact Lev Bol
4 (+1, +1) (54,95% Aç e 1,28% Ácido) 4A	16 (vazamento+gás) 14 (segmentada +gás+mau cheiro)	- $1,6 \cdot 10^3$ $1 \cdot 10^2$	- $1,6 \cdot 10^3$ $3 \cdot 10^2$			Bact Lev Bol
5 (-1,414,0) (43% Aç e 0,75% Ácido) 5A	4 (gás+mau cheiro + vazamento) 4 (gás+mau cheiro + vazamento)					
6 (+1,414,0) (57% Aç e 0,75% Ácido) 6A	16 (gás+mau cheiro+vazamento) 10 (segmentada +gás)	- $3,4 \cdot 10^3$ $4 \cdot 10^2$	- $3,9 \cdot 10^4$ -			Bact Lev Bol
7 (0,-1,414) (50% Aç e 0% Ácido) 7A	5 (bolhas de ar + mau cheiro) 5 (bolhas de ar + mau cheiro)	$7,5 \cdot 10^5$ $6,1 \cdot 10^5$ -				Bact Lev Bol
8 (0, +1,414) (50% Aç e 1,50% Ácido) 8A	7 (segmentada + gás) 7 (segmentada + gás)	$3,1 \cdot 10^4$ $4,2 \cdot 10^3$ $1 \cdot 10^3$				Bact Lev Bol
9 (0,0) (50%Aç e 0,75% Ácido) 9A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	- $4,5 \cdot 10^5$ $1 \cdot 10^2$				Bact Lev Bol
10 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 10A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	- $5,310^4$ -				Bact Lev Bol

11 (0,0) (50 % Aç e 0,75% Ácido) 11A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	- 1,5.10 ⁶ -	Bact Lev Bol
12 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 12A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	- 1,5.10 ⁷ -	Bact Lev Bol
13 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 13A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	- 7,9.10 ⁶ -	Bact Lev Bol
14 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 14A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	- 1,7.10 ⁶ -	Bact Lev Bol
15 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 15A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	- 3,2.10 ⁶ -	Bact Lev Bol
16 (0, 0) (50% Aç e 0,75% Ácido) 16A	5 (gás+mau cheiro + vazamento) 5 (gás+mau cheiro + vazamento)	- 4,1.10 ⁶ -	Bact Lev Bol
17 (Branco) 17A	1,5 (mau cheiro + gás) 1,5 (mau cheiro + gás)		

TABELA A.5 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento III.

Solute: sacarose

Ácido: cítrico

Inóculo : 10^3 UFC/g (de cada microrganismo)

PTO/Tratamento	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS				
		0 dias	08 dias	16 dias	30 dias	Estragada/Análise
1F (-1, -1) (52.93% Açúcar e 0,22% Ácido)	10 (leveduras+mau cheiro+ bolhas de ar parte superior)	0,883	0,882			Aa
		3,62	3,67		3,69	pH
		61,9	62,5		61,8	SS
		0,44	0,44			%ac
1G	8 (bolores)				3,67 62,3	pH SS
1H	8 (leveduras na superfície)				3,67 62,1	pH SS
2F (+1, -1) (67,07 % Açúcar e 0,22 % Ácido)	12 (bolhas de ar+ mesclas)	0,830	0,828			Aa
		3,70	3,70		3,67	pH
		68,8	69,3		68,7	SS
		0,31	0,31			%ac
2G	19 (bolhas de ar+ mau cheiro)			0,829		Aa
				3,69	3,67	pH
				70,0	69,0	SS
				0,31		%ac
2H	19 (bolhas de ar + mau cheiro)				3,77 69,0	pH SS
3F (-1,+1) (52.93% Açúcar e 1,28% Ácido)	9 (bolhas de ar+ mesclas + segmentação)	0,877	0,876			Aa
		3,11	3,14		3,15	pH
		62,1	63,8		62,0	SS
		0,99	0,96			%ac
3G	19 (bolhas de ar + segmentação + mau cheiro + separação de fases)			0,873		Aa
				3,13	3,15	pH
				62,6	62,2	SS
				0,97		%ac
3H	19 (vazamento + pequenas bolhas ar)				3,11 62,2	pH SS
4F (+1, +1) (67,07% Açúcar e 1,28% Ácido)	16 (bolhas de ar+ mau cheiro+ mesclas)	0,832	0,821			Aa
		3,18	3,16		3,19	pH
		69,2	69,9		69,3	SS
		0,69	0,67			%ac
4G	21 (mau cheiro+ segmentação + bolhas de ar)			0,824		Aa
				3,16	3,19	pH
				70,0	69,7	SS
				0,68		%ac
4H	25 (vazamento+ ferm localizada)				3,20 69,6	pH SS
5F (-1,+1, 0) (50% Açúcar, 0,75% de Ácido)	7 (expansão de vol + bolhas de ar + mau cheiro)	0,892				Aa
		3,34			3,32	pH
		59,6			59,7	SS
		0,76				%ac
5G	9 (bolhas de ar parte superior + mau cheiro)		0,893			Aa
			3,32		3,28	pH
			59,9		59,5	SS
				0,77		%ac
5H	9 (expansão de volume + bolhas de as)				3,33 59,7	pH SS

6F (+1,414, 0) (70%Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (segmentada+ bolhas de ar +mau cheiro + mesclas)	0,828	0,829			Aa
		3,39	3,40		3,37	pH
		69,2	69,4		69,0	SS
		0,44	0,45			%ac
6G	21 (mau cheiro+ segmentação +bolhas de ar + vazamento)			0,825		Aa
				3,40	3,38	pH
				70,6	69,4	SS
				0,44		%ac
6H	34 (expansão de volume +bolhas de ar + mau cheiro)				0,826	Aa
					3,37	pH
					70,0	SS
					0,45	%ac
7F (0, -1,141) (60%Açúcar e 0% Ácido)	9 (bolhas de ar na parte superior)	0,840	0,839			Aa
		3,91	3,88		3,91	pH
		67,6	68,1		67,6	SS
		0,29	0,29			%ac
7G	16 (gás+mau cheiro+ bolhas de ar)			0,843		Aa
				3,91	4,14	pH
				68,1	67,6	SS
				0,28		%ac
7H	16 (gás+mau cheiro +bolhas de ar)					Aa
					4,24	pH
					67,6	SS
						%ac
8F (0, +1,414) (60% Açúcar e 1,50% Ácido)	13 (bolhas de ar+ separação de fases)	0,835	0,834			Aa
		3,10	3,07		3,05	pH
		67,9	68,7		68,1	SS
		0,93	0,92			%ac
8G	20 (fermentação+ bolhas de ar+mesclas+ segmentação + mau cheiro)			0,833		Aa
				3,09	3,06	pH
				68,4	68,1	SS
				0,93		%ac
8H	32 (expansão de volume + bolhas de ar+ vazamento + mau cheiro)				0,832	Aa
					3,07	pH
					68,2	SS
					0,89	%ac
9F (0, 0) (60%Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (separação de fases+ mau cheiro + bolhas de ar)	0,835	0,836			Aa
		3,38	3,36		3,37	pH
		67,9	68,5		67,8	SS
		0,60	0,60			%ac
9G	19 (bolhas de ar + segmentação + mau cheiro)			0,838		Aa
				3,39	3,42	pH
				68,4	68,0	SS
				0,61		%ac
9H	32 (expansão de volume + bolhas de ar+ mau cheiro)				0,837	Aa
					3,37	pH
					68,1	SS
					0,59	%ac
10F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (separação de fases+ mau cheiro + bolhas de de ar)	0,839	0,834			Aa
		3,38	3,36		3,37	pH
		68,0	68,5		67,7	SS
		0,59	0,61			%ac
10G	19 (bolhas de ar + fragmentação + mau cheiro)			0,838		Aa
				3,39	3,35	pH
				68,4	67,9	SS
				0,61		%ac
10H	33 (expansão de volume + bolhas de ar)				0,836	Aa
					3,34	pH
					68,2	SS
					0,63	%ac

11F (0,0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (segmentada+bolhas de ar + mau cheiro + mesclas)	0,838	0,835		Aa
		3,37	3,36	3,33	pH
		67,9	68,5	67,9	SS
11G	21 (mau cheiro+ segmentação +bolhas de ar)			0,836	%ac
				3,36	Aa
				68,2	3,39
11H	34 (expansão de vol +bolhas de ar + mau cheiro)			0,61	SS
				0,835	%ac
				3,37	3,38
				68,0	SS
				0,59	%ac
12F (0,0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	16 (mau cheiro +bolhas de ar + separação de fases)	0,839	0,835		Aa
		3,37	3,38	3,37	pH
		67,9	68,9	67,9	SS
12G	22 (mesclas+ bolhas de ar + mau cheiro)			0,61	%ac
				0,836	Aa
				3,37	3,36
12H	36 (mau cheiro + mesclas + bolhas de ar na superfície)			68,2	SS
				0,61	%ac
				0,835	Aa
				3,36	pH
				68,1	SS
				0,58	%ac
13F (0,0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	16 (mau cheiro+ bolhas de ar+separ fases+ fermentação no fundo do frasco)	0,836	0,835		Aa
		3,36	3,36	3,39	pH
		67,9	68,3	68,0	SS
13G	21 (mau cheiro+ segmentação + bolhas de ar)			0,61	%ac
				0,837	Aa
				3,35	3,39
13H	42 (mau cheiro + mesclas)			68,4	SS
				0,61	%ac
				0,835	Aa
				3,36	pH
				68,3	SS
				0,63	%ac
14F (0,0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (segmentada+bolhas de ar+ mau cheiro + mesclas)	0,836	0,836		Aa
		3,36	3,37	3,43	pH
		67,9	68,3	67,8	SS
14G	21 (mau cheiro+ segmentação + bolhas de ar)			0,61	%ac
				0,837	Aa
				3,39	3,36
14H	33 (expansão de volume + bolhas de ar + mau cheiro)			68,3	SS
				0,59	%ac
				0,836	Aa
				3,36	pH
				68,0	SS
				0,57	%ac

15F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (gás+ bolhas de ar + mesclas + mau cheiro)	0,836 3,39 67,8 0,61	0,836 3,36 68,3 0,60				Aa pH SS %ac
15G	22 (mesclas+ bolhas de ar+ mau cheiro)			0,836 3,38 68,5 0,61		3,41 3,34 68,0	Aa pH SS %ac
15H	34 (expansão de volume + bolhas de ar + mau cheiro)				0,835 3,35 68,2 0,59	3,36 3,36 67,9	Aa pH SS %ac
16F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (separação de fases+ mau cheiro + bolhas de ar)	0,839 3,34 67,8 0,61	0,835 3,36 68,3 0,61				Aa pH SS %ac
16G	20 (bolhas de ar + segmentação + separação de fases+ mau cheiro)			0,837 3,38 68,4 0,61		3,39 67,9	Aa pH SS %ac
16H	34 (expansão de volume + bolhas de ar + mau cheiro)				0,835 3,36 68,0 0,58	3,39 68,2	Aa pH SS %ac
17 (Branco)	2(mau cheiro + gás)	0,988 3,83 15,6 0,72				3,87 14,7	Aa pH SS %ac
17A	2(mau cheiro + gás)						
17AA	2(mau cheiro + gás)						

Análise da amostra inicial:

Aa=0,989

pH=3,81

SS=15,7°Brix (20°C)

Acidez Cítrica= 0,71%

TABELA A.6 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento III.

Soluto: sacarose

Ácido: cítrico

Inóculo : 10^3 UFC/g (de cada microrganismo)

PTO/Tratamento	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	CONTAGEM MICROBIANA (UFC/g)					MO
		03 dias	07 dias	16 dias	30 dias	60 dias	
1F (-1, -1) (52,93% Açúcar e 0,22% Ácido) 1G 1H	10 (leveduras+mau cheiro+ bolhas de ar parte superior)	- 5.10^2 2.10^2	3.10^4 $4,7.10^5$ -				Bact Lev Bol
	8 (fungada)						
	8 (leveduras superf)						
2F (+1, -1) (67,07% Açúcar e 0,22% Ácido) 2G 2H	12 (bolhas de ar+ mesclas)	- - 1.10^2	- - $3,9.10^3$ 1.10^2				Bact Lev Bol
	19 (bolhas de ar + mau cheiro)			- $7,3.10^4$ -			Bact Lev Bol
	19 (bolhas de ar + mau cheiro)						
3F (-1,+1) (52,93% Açúcar e 1,28% Ácido) 3G 3H	9 (bolhas de ar+ mesclas + segmentação)	- - 9.10^2	- - 1.10^5				Bact Lev Bol
	19 (bolhas de ar + segmentação+ mau cheiro+sep fases)			- $2,7.10^3$ -			Bact Lev Bol
	19 (vazamento+ pequenas bolhas ar						
4F (+1, +1) (67,07% Açúcar e 1,28% Ácido) 4G 4H	16 (bolhas de ar+ mau cheiro + mesclas)	- 1.10^2 1.10^2	- - 5.10^3				Bact Lev Bol
	21 (mau cheiro+ segmentação + bolhas de ar)			- 7.10^3 -			Bact Lev Bol
	25 (vazamento+ ferm localizadas)						
5F (-1,414, 0) (50% Açúcar, 0% de Ácido) 5G 5H	7 (expansão de vol + bolhas de ar + mau cheiro)	- $8,3.10^3$ 6.10^2					Bact Lev Bol
	9 (bolhas de ar parte superior + mau cheiro)		$4,2.10^5$ $2,8.10^6$ 1.10^2				Bact Lev Bol
	9 (expansão de volume + bolhas de ar)						
6F (+1,414, 0) (70% Açúcar e 0,75% Ácido) 6G 6H	12 (segmentada+ bolhas de ar +mau cheiro + mesclas)	- - -	- - 5.10^2				Bact Lev Bol
	21 (mau cheiro+ segmentação + bolhas de ar + vazamento)			- 3.10^3 1.10^2			Bact Lev Bol
	34 (expansão de volume + bolhas de ar + mau cheiro)				- 6.10^3 -		Bact Lev Bol

7F (0, -1,141) (60% Açúcar e 0% Ácido) 7G	9 (bolhas de ar na parte superior do frasco) 16 (gás+mau cheiro + bolhas de ar)	- 2.10 ² 2.10 ²	2.10 ³ 6,4.10 ⁴ 3.10 ²	- 1,6.10 ⁵ 3.10 ²	Bact Lev Bol Bact Lev Bol
7H	16 (gás+mau cheiro +bolhas de ar)				
8F (0, +1,414) (60% Açúcar e 1,50% Ácido) 8G	13 (bolhas de ar+ separação de fases) 20 (ferm + bolhas de ar + mesclas + mau cheiro+ segmentação)	- 1.10 ² 2.10 ²	- 4.10 ² -	- 3,1.10 ³ -	Bact Lev Bol Bact Lev Bol
8H	32 (expansão de vol + bolhas de ar+ vazamento+ mau cheiro)			- 3,2.10 ⁵ -	Bact Lev Bol
9F (0,0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido) 9G	12 (separação de fases+ mau cheiro + bolhas de ar) 19 (bolhas de ar + fragmentação + mau cheiro)	- 1.10 ² 3.10 ²	- 2,1.10 ³ -	- 6,5.10 ⁴ -	Bact Lev Bol Bact Lev Bol
9H	32 (expansão de vol + bolhas de ar + mau cheiro)			- 8,9.10 ⁵ -	Bact Lev Bol
10F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido) 10G	12 (separação de fases+ mau cheiro + bolhas de ar) 19 (bolhas de ar + fragmentação + mau cheiro)	- 1.10 ² 3.10 ²	- 7,4.10 ³ -	- 6,1.10 ⁴ -	Bact Lev Bol Bact Lev Bol
10H	33 (expansão de vol + bolhas de ar)			- 2,2.10 ⁴ -	Bact Lev Bol
11F (0,0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido) 11G	12 (segmentada + bolhas de ar+ mau cheiro + mesclas) 21 (mau cheiro+ segmentação + bolhas de ar)	- 1.10 ³	- 1.10 ² 1.10 ²	- 4.10 ³ -	Bact Lev Bol Bact Lev Bol
11H	34 (expansão de volume + bolhas de ar + mau cheiro)			- 2,3.10 ⁴ -	Bact Lev Bol
12F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido) 12G	16 (mau cheiro +bolhas de ar + separação de fases) 22 (mesclas+ bolhas de ar+ mau cheiro)	- 3.10 ²	- 1.10 ²	- 3,1.10 ³ -	Bact Lev Bol Bact Lev Bol
12H	36 (bolhas de ar na superfície + mau cheiro + mesclas)			- 3.10 ³ -	Bact Lev Bol

13F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	16 (mau cheiro+ bolhas de ar+separ fases+ ferm fundo)	-	-			Bact
13G	21 (mau cheiro+ segmentação + bolhas de ar)	4.10 ²	-		1,6.10 ³	Lev
13H	42 (mesclas + mau cheiro)				5.10 ²	Bol
						Bact
					2.10 ¹	Lev
						Bol
14F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (segmentada +bolhas de ar + mau cheiro + mesclas)	-	-			Bact
14G	21 (mau cheiro+ segmentação + bolhas de ar)	4.10 ²	7.10 ²			Lev
14H	33 (expansão de volume + bolhas de ar + mau cheiro)					Bol
						Bact
					9.10 ²	Lev
					2.10 ²	Bol
						Bact
					4,7.10 ⁴	Lev
						Bol
15F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (gás+ bolhas de ar + mesclas + mau cheiro)	-	-			Bact
15G	22 (mesclas+ bolhas de ar+ mau cheiro)	7.10 ²	1,3.10 ³			Lev
15H	34 (expansão de volume + bolhas de ar + mau cheiro)		2.10 ²			Bol
						Bact
					4.10 ²	Lev
						Bol
						Bact
					3.10 ³	Lev
					3.10 ²	Bol
16F (0, 0) (60% Açúcar e 0,75% Ácido)	12 (separação de fases+ mau cheiro + bolhas de ar)	-	-			Bact
16G	20 (bolhas de ar + segmentação + sep fases+ mau cheiro)	-	1.10 ²			Lev
16H	34 (expansão de vol + bolhas de ar + mau cheiro)	-	-			Bol
						Bact
						Lev
					7.10 ³	Bol
					1.10 ²	Bact
						Lev
						Bol
					1,1.10 ³	Lev
						Bol
17 (Branco)	2 (mau cheiro+gás					
17A	2(mau cheiro+gás					
17AA	2 (mau cheiro+gás					

TABELA A.7 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento IV.

Sóluto: sacarose

Ácido: cítrico

Conservador: Sorbato de Potássio

Inóculo : 10^3 UFC/g (de cada microrganismo)

PTO/Tratamento	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS						Estr /Anál
		0dia	7dias	14dias	30dias	65dias	94dias	
5.0 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0% Sorbato) 5.0 J 5.0 L	2 (gás + leveduras na superfície + mau cheiro)							3,28 pH 15,6 SS
	2 (gás + leveduras na superfície + mau cheiro)							3,28 pH 15,6 SS
	2 (gás + leveduras na superfície + mau cheiro)	0,992 3,34 15,8 1,51						Aa 3,28 pH 15,6 SS %ac
5.1 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0,01% Sorb) 5.1 J 5.1 L	3 (formação de gás + mau cheiro + lev na superfície + pouca exp volume)							
	3 (formação de gás + mau cheiro + lev na superfície + pouca exp volume)							
	3 (formação de gás + mau cheiro + lev na superfície + pouca exp volume)	0,993 3,34 16,0 1,50						Aa 3,30 pH 15,4 SS %ac
5.2 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0,02% Sorb) 5.2 J 5.2 L	8 (mau cheiro + formação de gás + bolhas de ar)		0,989 3,30 15,8 1,56					Aa 3,33 pH 15,5 SS %ac
	6 (cheiro azedo + gás + leved na sup + bolhas de ar)							3,35 pH 15,9 SS
	5 (cheiro azedo + formação de gás + leveduras na superfície)	0,994 3,30 16,0 1,52						Aa 3,26 pH 15,4 SS %ac
5.3 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0,04% Sorb) 5.3 J 5.3 L	14 (cheiro azedo + leveduras na superf + formação de gás + bolhas de ar)			0,992 3,30 15,7 1,51				Aa 3,33 pH 14,9 SS %ac
	8 (cheiro azedo + leveduras na superf + gás + bolhas de ar)		0,989 3,32 15,9 1,51					Aa 3,32 pH 15,5 SS %ac
	6 (cheiro azedo + lev na superfície+ formação de gás)	0,989 3,34 16,0 1,50						Aa 3,35 pH 16,2 SS %ac

5.4 I (-1,414 ; 0) (0% Aç; 0,75% Ác e 0,06% Sorb)	15 (mau cheiro+ formação de gás +bolhas de ar)									0,991 3,33 16,0 1,50	Aa 3,36 pH 14,7 SS %ac
5.4 J	12 (leveduras em toda a superfície da amostra)									0,990 3,34 16,1 1,49	Aa 3,28 pH 16,1 SS %ac
5.4 L	7 (mau cheiro + leveduras na superfície + formação de gás)	0,990 3,33 16,0 1,51									Aa 3,34 pH 16,1 SS %ac
5.5 I (-1,414 ; 0) (0% Aç; 0,75% Ác e 0,10% Sorb)	ESTÁVEL										
5.5 J	ESTÁVEL									0,989 3,32 16,1 1,49	Aa pH SS %ac
5.5 L	ESTÁVEL	0,990 3,34 16,0 1,52	0,991 3,35 15,8 1,51	0,990 3,29 16,1 1,59	0,989 3,25 16,0 1,66	0,982 3,10 16,1 1,74	0,983 3,16 16,1 1,93	0,985 3,12 16,1 1,90			Aa pH SS %ac
6.0 I (+1,414 ; 0) (50% Açúcar . 0,75% Ácido e 0% Sorbato)	8 (expansão de vol + formação de gás+ vazamento)										3,33 pH 60,1 SS
6.0 J	8 (formação de gás + mau cheiro + bolhas de ar)									0,896 3,28 59,6 0,76	Aa 3,35 pH 59,5 SS %ac
6.0 L	5 (vazamento contínuo+ bolhas de ar)	0,897 3,30 59,6 0,75									Aa 3,29 pH 59,7 SS %ac
6.1 I (+1,414 ; 0) (50% Açúcar . 0,75% Ác e 0,01% Sorbato)	16 (formação de gás + mau cheiro + bolhas de ar)										3,33 pH 59,8 SS
6.1 J	16 (formação de gás + mau cheiro + bolhas de ar)									0,895 3,30 59,2 0,68	Aa 3,33 pH 59,4 SS %ac
6.1 L	9 (formação de gás + bolhas de ar)	0,896 3,34 59,6 0,77	0,895 3,31 59,7 0,75								Aa pH SS %ac
6.2 I (+1,414 ; 0) (50% Açúcar. 0,75% Ácido e 0,02% Sorbato)	19 (cheiro azedo + bolhas de ar parte superior)										3,33 pH 59,5 SS
6.2 J	16 (formação de gás + bolhas de ar parte superior)									0,893 3,33 59,8 0,68	Aa 3,32 pH 59,6 SS %ac
6.2 L	12 (bolhas de ar em toda a amostra)	0,897 3,37 59,6 0,75	0,895 3,34 59,6 0,75								Aa pH SS %ac

6.3 I (+1,414 ; 0) (50% Açúcar , 0,75% Ácido e 0,04% Sorbato)	50 (cheiro azedo + leveduras na superfície)									
6.3 J	50 (cheiro azedo + leveduras na superfície)				0,890					Aa
					3,36					pH
					59,9					SS
					0,67					%ac
6.3 L	29 (formação de gás+ mau cheiro + bolhas de ar parte superior)	0,896	0,895	0,893						Aa
		3,38	3,35	3,36					3,36	pH
		59,6	58,8	59,7					59,8	SS
		0,76	0,75	0,68						%ac
6.4 I (+1,414 ; 0) (50% Açúcar , 0,75% Ácido e 0,06% Sorbato)	ESTÁVEL									
6.4 J	ESTÁVEL									
6.4 L	ESTÁVEL	0,875	0,875	0,870	0,868	0,854	0,855	0,847		Aa
		3,37	3,36	3,33	3,33	3,32	3,35	3,31		pH
		63,4	63,4	63,6	63,6	63,9	64,0	64,3		SS
		0,76	0,75	0,68	0,68	0,71	0,73	0,74		%ac
6.5 I (+1,414 ; 0) (50% Açúcar , 0,75% Ácido e 0,1% Sorbato)	ESTÁVEL									
6.5 J	ESTÁVEL									
6.5 L	ESTÁVEL	0,897	0,893	0,892	0,890	0,878	0,877	0,868		Aa
		3,46	3,45	3,46	3,42	3,39	3,44	3,38		pH
		59,6	59,6	59,8	60,1	60,1	60,2	60,8		SS
		0,76	0,75	0,68	0,67	0,71	0,73	0,74		%ac
Branco I	2 (gás + leveduras na superfície + mau cheiro)									
Branco J	2 (gás + leveduras na superfície + mau cheiro)									
Branco L	2 (gás + leveduras na superfície + mau cheiro)	0,991								Aa
		3,82							3,85	pH
		15,4							15,4	SS
		0,72								%ac

TABELA A.8 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento IV.

Solute: sacarose

Ácido: cítrico

Conservador: Sorbato de Potássio

Inóculo : 10^3 UFC/g (de cada microrganismo)

PTO/Tratamento	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	CONTAGEM MICROBIANA (UFC/g)							
		3 dias	07 dias	14 dias	30 dias	65 dias	94 dias	128 dias /MO	
5.0 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0% Sorbato)	2 (gás + leveduras na superfície+ mau cheiro)								
5.0 J	2 (gás + lev superf +mau cheiro)								
5.0 L	2 (gás + lev superf + mau cheiro)								
5.1 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0,01% Sorb)	3 (gás+mau cheiro + lev na superfície +pouca exp vol)								
5.1 J	3 (gás+mau cheiro + lev na superfície +pouca exp vol)								
5.1 L	3 (gás+mau cheiro + lev na superfície +pouca exp vol)								
5.2 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0,02% Sorb)	8 (mau cheiro + formação de gás + bolhas de ar)		-						Bact Lev Bol
5.2 J	6 (cheiro azedo + gás + leved na sup + bolhas de ar)		$7,1 \cdot 10^5$						
5.2 L	5 (cheiro azedo + formação de gás + leved na superfície)	-							Bact Lev Bol
5.3 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0,04% Sorb)	14 (cheiro azedo+ lev na superf + gás + bolhas de ar)								Bact Lev Bol
5.3 J	8 (cheiro azedo + lev na superf + gás + bolhas de ar)								Bact Lev Bol
5.3 L	6 (cheiro azedo + lev na superfície+ formação de gás)	$1 \cdot 10^2$							Bact Lev Bol
5.4 I (-1,414 ; 0) (0% Aç ; 0,75% Ác e 0,06% Sorb)	15 (mau cheiro + formação de gás + bolhas de ar)								Bact Lev Bol
5.4 J	12 (leveduras em toda a superf da amostra)								Bact Lev Bol
5.4 L	7 (mau cheiro + leveduras na sup + formação de gás)	$1 \cdot 10^2$							Bact Lev Bol
5.5 I (-1,414 ; 0) (0% Aç; 0,75% Ác e 0,1% Sorbato)	ESTÁVEL								
5.5 J	ESTÁVEL								
5.5 L	ESTÁVEL	$2 \cdot 10^2$							Bact Lev Bol

6.0 I (+1,414 ; 0) (50% Aç , 0,75% Ác e 0% Sorbato) 6.0 J 6.0 L	8 (expansão de vol + formação de gás+ vazamento) 8 (formação de gás + mau cheiro + bolhas de ar) 5 (vazamento contínuo+ bolhas de ar)	- 7,7.10 ⁵ 1.10 ² - 3,3.10 ³ 1.10 ²							Bact Lev Bol Bact Lev Bol
6.1 I (+1,414 ; 0) (50% Aç , 0,75% Ác e 0,01 % Sorb) 6.1 J 6.1 L	16 (formação de gás + mau cheiro + bolhas de ar) 16 (formação de gás + mau cheiro + bolhas de ar) 9 (formação de gás + bolhas de ar)	- 2,3.10 ⁵ - - 2,6.10 ⁵ 1.10 ²							Bact Lev Bol Bact Lev Bol
6.2 I (+1,414 ; 0) (50% Aç , 0,75% Ác e 0,02% Sorb) 6.2 J 6.2 L	19 (cheiro azedo + bolhas de ar parte superior do frasco) 16 (formação de gás + bolhas de ar parte superior) 12 (bolhas de ar em toda a amostra)	- 2,3.10 ⁴ - - - 1.10 ³ 2.10 ²							Bact Lev Bol Bact Lev Bol
6.3 I (+1,414 ; 0) (50% Aç , 0,75% Ác e 0,04% Sorb) 6.3 J 6.3 L	50 (cheiro azedo + leveduras na superfície) 50 (cheiro azedo + leveduras na superfície) 29 (gás + cheiro alterado+ bolhas de ar parte superior)	- 8,6.10 ³ - 1.10 ² 1.10 ² 1.10 ²							Bact Lev Bol Bact Lev Bol
6.4 I (+1,414 ; 0) (50% Aç , 0,75% Ác e 0,06% Sorb) 6.4 J 6.4 L	ESTÁVEL ESTÁVEL ESTÁVEL	- - -							Bact Lev Bol
6.5 I (+1,414 ; 0) (50% Aç , 0,75% Ác e 0,1% Sorb) 6.5 J 6.5 L	ESTÁVEL ESTÁVEL ESTÁVEL	- - -							Bact Lev Bol
Branco I Branco J Branco L	2 (gás+leved na superf+mau cheiro) 2 (gás+leved na superf+mau cheiro) 2 (gás+leved na superf+mau cheiro)								

TABELA A.9 - Análises físico-químicas dos tratamentos do Experimento V.

Solute: sacarose

Ácido: cítrico

Inóculo : 10^3 UFC/g (de cada microrganismo)

Conservador: Sorbato de Potássio (0,06%)

FTO/Tratamento	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS							Estr/Anál
		0dia	7dias	14dias	30dias	59dias	93dias	123dias	
1A	14 (gás+ leveduras na superfície)								3,64 pH 21,7 SS
1B	17 (cheiro azedo + bolhas de ar na parte superior do frasco + gás)			0,986 3,69 22,6 0,84					Aa 3,68 pH 22,4 SS %ac
1C (-1, -1) (7,91% Açúcar, 0,22% Ácido)	8 (bolhas de ar na parte superior + cheiro fortemente azedo)	0,984 3,68 22,7 0,83	0,987 3,66 22,5 0,89						Aa 3,64 pH 21,4 SS %ac
2A	ESTÁVEL								
2B	ESTÁVEL					0,902 3,75 56,2 0,46	0,900 3,67 56,4 0,49	0,895 3,70 56,7 0,48	Aa pH SS %ac
2C (+1, -1) (46,09% Açúcar e 0,22% Ácido)	35 (cheiro azedo + bolhas de ar)	0,915 3,73 56,0 0,48	0,916 3,76 56,1 0,49	0,915 3,74 56,2 0,48	0,903 3,68 56,3 0,48				Aa 3,74 pH 55,7 SS %ac
3A	13 (leveduras na parte superior + bolhas de ar)			0,984 3,15 23,0 1,83					Aa 3,13 pH 23,4 SS %ac
3B	13 (gás + cheiro azedo + bolhas de ar)								3,15 pH 22,6 SS
3C (-1, +1) (7,91% Açúcar e 1,28% Ácido)	13 (leveduras na parte superior + fermentação)	0,983 3,15 22,9 1,74	0,984 3,15 23,6 1,82						Aa 3,13 pH 22,6 SS %ac
4A	61 (cheiro azedo + bolhas de ar)					0,894 3,20 56,6 1,05			Aa 3,15 pH 56,4 SS %ac
4B	50 (cheiro azedo + bolhas de ar)								3,15 pH 56,5 SS
4C (+1, +1) (46,09% Açúcar e 1,28% Ácido)	41 (cheiro azedo + bolhas de ar)	0,911 3,18 56,3 1,05	0,912 3,19 56,6 1,05	0,910 3,21 56,6 1,03	0,897 3,13 56,7 1,00				Aa 3,16 pH 56,6 SS %ac
5A	13 (leveduras parte superior + bolhas de ar + cheiro azedo)								3,34 pH 15,4 SS
5B	10 (vazamento+ bolhas de ar)								3,34 pH 15,7 SS
5C (-1,14, 0) (0% Açúcar, 0,75% Ácido)	7 (cheiro fortemente azedo e + bolhas de ar parte superior)	0,989 3,40 15,7 1,34	0,991 3,29 14,9 1,74						Aa 3,30 pH 14,3 SS %ac

6A	ESTÁVEL								
6B	ESTÁVEL								
6C (+1,414, 0) (54% Açúcar e 0,75% Ácido)	ESTÁVEL	0,878	0,876	0,879	0,868	0,865	0,858	0,854	Aa
		3,45	3,46	3,45	3,42	3,44	3,41	3,42	pH
		63,1	63,1	63,0	63,1	63,0	63,2	63,5	SS
		0,62	0,66	0,65	0,63	0,64	0,64	0,63	%ac
7A	19 (cheiro azedo + bolhas de ar)			0,962					Aa
				3,89				3,89	pH
				40,2				39,4	SS
				0,51					%ac
7B	13 (cheiro azedo + gás)							3,89	pH
								39,2	SS
7C (0, -1,141) (27% Açúcar e 0% Ácido)	10 (cheiro azedo + bolhas de ar na parte superior do frasco)	0,961	0,963						Aa
		3,90	3,90					3,88	pH
		39,7	39,9					39,4	SS
		0,50	0,52						%ac
8A	23 (cheiro azedo + vazamento)							3,07	pH
								40,0	SS
8B	19 (cheiro azedo + bolhas de ar + gás)			0,957					Aa
				3,09				3,08	pH
				40,8				40,4	SS
				1,56					%ac
8C (0, +1,414) (27% Açúcar e 1,50% Ácido)	14 (cheiro azedo + bolhas de ar)	0,959	0,957						Aa
		3,09	3,08					3,08	pH
		41,0	40,8					40,1	SS
		1,56	1,59						%ac
9A	19 (cheiro azedo + bolhas de ar)			0,960					Aa
				3,37				3,38	pH
				40,2				40,2	SS
				1,03					%ac
9B	14 (fermentação na parte superior)							3,37	pH
								39,6	SS
9C (0,0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	10 (bolhas de ar na parte superior + cheiro azedo + gás)	0,962	0,961						Aa
		3,36	3,37					3,39	pH
		39,9	40,3					39,0	SS
		1,04	1,05						%ac
10A	26 (lev na superf + fermentação inic +cheiro azedo)							3,36	pH
								39,4	SS
10B	19 (cheiro fortemente azedo + bolhas de ar)			0,960					Aa
				3,36				3,37	pH
				40,0				39,8	SS
				1,03					%ac
10C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar + gás)	0,960	0,960						Aa
		3,37	3,37					3,39	pH
		40,0	40,2					39,8	SS
		1,04	1,05						%ac
11A	23 (lev na superf + ferm inicial + cheiro azedo)							3,36	pH
								39,4	SS
11B	29 (cheiro azedo)			0,959					Aa
				3,37				3,33	pH
				40,2				39,9	SS
				1,03					%ac
11C (0,0) (27 % Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	0,961	0,961						Aa
		3,38	3,38					3,38	pH
		40,0	40,1					39,5	SS
		1,04	1,04						%ac

12A	23 (lev na superf + ferm inicial + cheiro azedo)			3,34 pH 39,8 SS
12B	20 (cheiro azedo + bolhas de ar na superfície)	0,961 3,38 40,1 1,02		Aa 3,36 pH 39,8 SS %ac
12C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	0,960 0,961 3,38 3,37 40,0 40,0 1,03 1,05		Aa 3,38 pH 39,8 SS %ac
13A	23 (lev na superf + ferm inicial + cheiro azedo)			3,35 pH 39,7 SS
13B	19 (cheiro fortemente azedo + bolhas de ar)	0,960 3,37 40,2 1,04		Aa 3,38 pH 39,8 SS %ac
13C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar + gás)	0,960 0,960 3,38 3,37 40,1 41,2 1,02 1,05		Aa 3,39 pH 39,4 SS %ac
14A	26 (lev na superf + ferm inicial + cheiro azedo)			3,34 pH 39,8 SS
14B	19 (cheiro azedo + bolhas de ar)	0,959 3,39 40,2 1,03		Aa 3,38 pH 40,0 SS %ac
14C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	0,960 0,960 3,39 3,39 40,1 40,3 1,03 1,03		Aa 3,40 pH 39,7 SS %ac
15A	29 (cheiro azedo)			3,33 pH 40,1 SS
15B	23 (bolhas de ar + fermentação na parte superior + cheiro azedo)	0,960 3,36 40,4 1,02		Aa 3,37 pH 39,6 SS %ac
15C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	0,960 0,960 3,38 3,37 39,9 40,2 1,04 1,04		Aa 3,39 pH 39,9 SS %ac
16A	23 (lev na superf + ferm inicial + cheiro azedo)			3,37 pH 39,4 SS
16B	31 (cheiro azedo + bolhas de ar)	0,960 0,950 3,37 3,30 40,2 40,1 1,04 1,02		Aa 3,31 pH 40,1 SS %ac
16C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	0,960 0,959 3,40 3,36 40,1 40,3 1,03 1,04		Aa 3,39 pH 39,8 SS %ac

17 A (Branco) 17 B 17 C	2 (mau cheiro+gás 2(mau cheiro+gás 2 (mau cheiro+gás	0,991 3,84 15,5 0,69							Aa 3,82 pH 14,7 SS %ac
18A 18B 18C(+1,414,-1,414 (54% Açúcar e 0% Ácido)	ESTÁVEL ESTÁVEL ESTÁVEL	0,881 0,881 0,881 3,96 3,95 3,97 62,9 63,1 63,5 0,32 0,32 0,32	0,869 3,93 62,9 0,34	0,867 3,94 62,8 0,32	0,865 3,91 63,1 0,32	0,863 3,94 63,2 0,31		Aa pH SS %ac	
19A 19B 19C (+1, +1) (46,09% Açúcar, 1,28% Ácido e 0,05% Sorbato)	61 (cheiro azedo + lev na superf.) 61 (cheiro azedo + lev. na superf.) 35 (cheiro azedo + bolhas de ar)							3,13 pH 56,6 SS Aa 3,12 pH 56,6 SS %ac Aa 3,16 pH 56,5 SS %ac	
20A 20B 20C(+1,414, 0) (54% Açúcar, 0,75% Ácido e 0,05% Sorbato)	ESTÁVEL ESTÁVEL ESTÁVEL	0,879 0,879 0,877 3,44 3,45 3,44 62,9 63,1 63,0 0,65 0,66 0,65	0,864 3,36 63,1 0,63	0,862 3,44 63,0 0,64	0,848 3,38 63,8 0,64	0,848 3,40 63,5 0,62		Aa pH SS %ac	

Análise da amostra inicial:

Aa=0,992

pH=3,83

SS=15,2 °Brix (20°C)

Acidez Cítrica= 0,69%

TABELA A.10 - Contagens microbianas dos tratamentos do Experimento V.

Soluto: sacarose

Ácido: cítrico

Inóculo : 10^3 UFC /g (de cada microrganismo)

Conservador: Sorbato de Potássio (0,06%)

PTO/Tratamento	DETERIORAÇÃO TEMPO (DIAS)	CONTAGEM MICROBIANA (UFC/g)						
		4 dias	7 dias	14 dias	30 dias	59 dias	93 dias	123 dias/MO
1A	14 (gás+ leveduras na superfície)							
1B	17 (cheiro azedo + bolhas de ar na parte superior do frasco+ gás)			-				Bact Lev Bol
1C (-1, -1) (7,91% Açúcar, 0,22% Ácido)	8 (bolhas de ar na parte superior + cheiro fortemente azedo)	2.10^2	-					Bact Lev Bol
		-	$9,6.10^5$					
2A	ESTÁVEL					-	-	Bact
2B	ESTÁVEL					-	-	Lev Bol
2C (+1, -1) (46,09% Açúcar e 0,22% Ácido)	35 (cheiro azedo + bolhas de ar)	5.10^2	3.10^2	-	-			Bact Lev Bol
		1.10^2	1.10^2	1.10^2	$5,5.10^4$			
3A	13 (leveduras na parte superior + bolhas de ar)			-				Bact Lev Bol
				$2,6.10^6$				
3B	13 (gás + cheiro azedo + bolhas de ar)			1.10^2				Bact Lev Bol
				1.10^2	2.10^3			
3C (-1,+ 1) (7,91% Açúcar e 1,28% Ácido)	13 (leveduras na parte superior + fermentação)	1.10^3	-					Bact Lev Bol
		1.10^2	2.10^3					
4A	61 (cheiro azedo + bolhas de ar)					-		Bact Lev Bol
						$1,3.10^5$		
4B	50 (cheiro azedo + bolhas de ar)					-		
4C (+1, +1) (46,09% Açúcar e 1,28% Ácido)	41 (cheiro azedo + bolhas de ar)	-	-	-	-			Bact Lev Bol
		1.10^2	-	-	$2,4.10^3$			
5A	13 (leveduras parte super + bolhas de ar + cheiro azedo)							
5B	10 (vazamento+ bolhas de ar)		4.10^2					Bact Lev Bol
			$3,9.10^6$					
5C (-1,414, 0) (0% Açúcar, 0,75% Ácido)	7 (cheiro fortemente azedo + bolhas de ar parte superior)	8.10^2						Bact Lev Bol
		$2,7.10^3$						

6A 6B	ESTÁVEL ESTÁVEL								- Bact - Lev - Bol
6C (+1,414, 0) (54% Açúcar e 0,75% Ácido)	ESTÁVEL	- 1.10 ² -	- 1.10 ² -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	Bact Lev Bol
7A	19 (cheiro azedo + bolhas de ar)								Bact Lev Bol
7B	13 (cheiro azedo +gás)								
7C (0, -1,141) (27% Açúcar e 0% Ácido)	10 (cheiro azedo + bolhas de ar na parte super frasco)	2.10 ² 5.10 ² 1.10 ²	- 4,1.10 ⁵ 1.10 ²						Bact Lev Bol
8A	23 (cheiro azedo + vazamento)								
8B	19 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)								Bact Lev Bol
8C (0, +1,414) (27% Açúcar e 1,50% Ácido)	14 (cheiro azedo + bolhas de ar)	1.10 ² 2.10 ² 1.10 ²	1.10 ² 1.10 ² 4.10 ²						Bact Lev Bol
9A	19 (cheiro azedo + bolhas de ar)								Bact Lev Bol
9B	14 (fermentação na parte superior)								
9C (0,0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	10 (bolhas de ar na parte superior + cheiro azedo + gás)	4.10 ² 2.10 ² -	- 1.10 ⁵ 2.10 ²						Bact Lev Bol
10A	26 (lev na superf + ferment inicial + cheiro azedo)								
10B	19 (cheiro fortemente azedo + bolhas de ar)								Bact Lev Bol
10C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar + gás)	2.10 ² 1.10 ² -	- 2.10 ² -						Bact Lev Bol
11A	23 (lev na superf + ferment inicial + cheiro azedo)								
11B	29 (cheiro azedo)								Bact Lev Bol
11C (0,0) (27 % Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	3.10 ² 1.10 ² 3.10 ²	1.10 ² 9.10 ² 1.10 ²						Bact Lev Bol

12A	23 (lev na superf + ferment inicial + cheiro azedo)							
12B	20 (cheiro azedo + bolhas de ar na superfície)							Bact Lev Bol
12C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	$3 \cdot 10^2$ $1 \cdot 10^2$ -	- - $2 \cdot 10^2$					Bact Lev Bol
13A	23 (lev na superf + ferment inicial + cheiro azedo)							
13B	19 (cheiro fortemente azedo +bolhas de ar)							Bact Lev Bol
13C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	$1 \cdot 10^2$ $4 \cdot 10^2$ $2 \cdot 10^2$	- $8,1 \cdot 10^3$ $1 \cdot 10^2$					Bact Lev Bol
14A	26 (lev na superf + ferment inicial + cheiro azedo)							
14B	19 (cheiro azedo + bolhas de ar)							Bact Lev Bol
14C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	$6 \cdot 10^2$ $3 \cdot 10^2$ $1 \cdot 10^2$	- $2,3 \cdot 10^3$ $1 \cdot 10^2$					Bact Lev Bol
15A	29 (cheiro azedo)							
15B	23 (bolhas de ar + ferment na parte sup+ cheiro azedo)							Bact Lev Bol
15C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	$1 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^3$ $1 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$ - -					Bact Lev Bol
16A	23 (lev na superf + ferment inicial + cheiro azedo)							
16B	31 (cheiro azedo + bolhas de ar)							Bact Lev Bol
16C (0, 0) (27% Açúcar e 0,75% Ácido)	13 (cheiro azedo + bolhas de ar+ gás)	$5 \cdot 10^2$ - $1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$ $2,8 \cdot 10^3$ $1 \cdot 10^2$					Bact Lev Bol
17 A	2 (mau cheiro+gás)							
17 B	2(mau cheiro+gás)							
17 C (Branco)	2 (mau cheiro+gás)							
18A	ESTÁVEL							- Bact
18B	ESTÁVEL							- Lev
								- Bol
18C(+1,414,-1,414 (54% Açúcar e 0% Ácido)	ESTÁVEL	- $1 \cdot 10^2$ $2 \cdot 10^2$	- $2 \cdot 10^2$ $3 \cdot 10^2$					Bact Lev Bol

19A	6l (lev na superf. + bolhas de ar)								
19B	6l (lev na superf. + bolhas de ar)							8,2.10 ⁴	Bact Lev Bol
19C (+1, +1) (46,09% Açúcar, 1,28% Ácido e 0,05% Sorbato)	35 (cheiro azedo + bolhas de ar)	-	-	-	-	-	-	2,2.10 ⁴	Bact Lev Bol
20A	ESTÁVEL								
20B	ESTÁVEL							2.10 ²	Bact Lev Bol
20C(+1,414, 0) (54% Açúcar, 0,75% Ácido e 0,05% Sorbato)	ESTÁVEL	1.10 ²	1.10 ²	-	-	-	-	-	Bact Lev Bol

APÊNDICE B

CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO AQUA-LAB

TABELA B.1 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 19/01/95.

Sal	Aa lida	Aa real
NaCl	0,752	0,751
	0,750	0,751
	0,751	0,751
	0,753	0,751
NH ₄ SO ₄	0,795	0,803
	0,796	0,803
	0,796	0,803
	0,794	0,803
KCl	0,838	0,842
	0,836	0,842
	0,835	0,842
	0,836	0,842
BaCl ₂	0,889	0,903
	0,889	0,903
	0,890	0,903
	0,891	0,903
KNO ₃	0,916	0,926
	0,916	0,926
	0,915	0,926
	0,918	0,926
K ₂ SO ₄	0,957	0,975
	0,958	0,975
	0,960	0,975
	0,958	0,975

Resultado da Regressão:

Constante:	-0,05112
Err Pdr da Est Y:	0,002683
Coef. de Confiabilidade:	0,998855
No. de Variáveis:	24
Graus de Liberdade:	22
Coeficiente X:	1,069847
Err Pdr do Coef. X:	0,07719

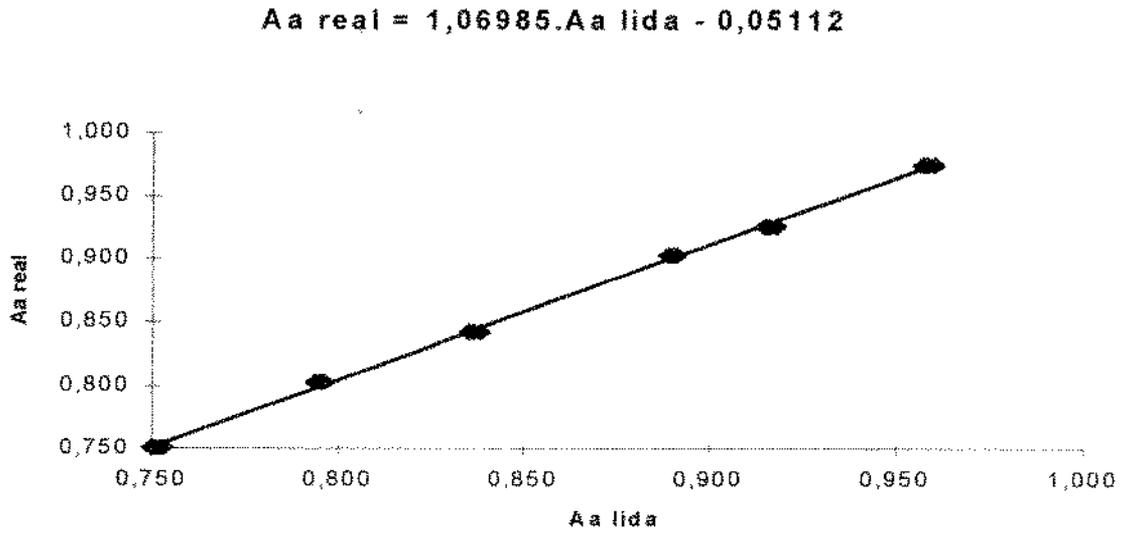


FIGURA B.1 - Curva de calibração do Aqua-lab de 19/01/95.

TABELA B.2 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 19/07/95.

Sat	Aa lida	Aa real
NaCl	0,753	0,751
	0,751	0,751
	0,754	0,751
	0,754	0,751
NH ₄ SO ₄	0,797	0,803
	0,799	0,803
	0,799	0,803
	0,799	0,803
KCl	0,839	0,842
	0,837	0,842
	0,838	0,842
	0,837	0,842
BaCl ₂	0,894	0,903
	0,895	0,903
	0,894	0,903
	0,894	0,903
KNO ₃	0,918	0,926
	0,919	0,926
	0,920	0,926
	0,920	0,926
K ₂ SO ₄	0,963	0,975
	0,963	0,975
	0,963	0,975
	0,964	0,975

Resultado da Regressão:

Constante:	-0,04193
Err Pdr da Est Y:	0,001853
Coef. de Confiabilidade:	0,999454
No. de Variáveis:	24
Graus de Liberdade:	22
Coeficiente X:	1,055281
Err Pdr do Coef. X:	0,005256

$$Aa \text{ real} = 1,05528. Aa \text{ lida} - 0.04193$$

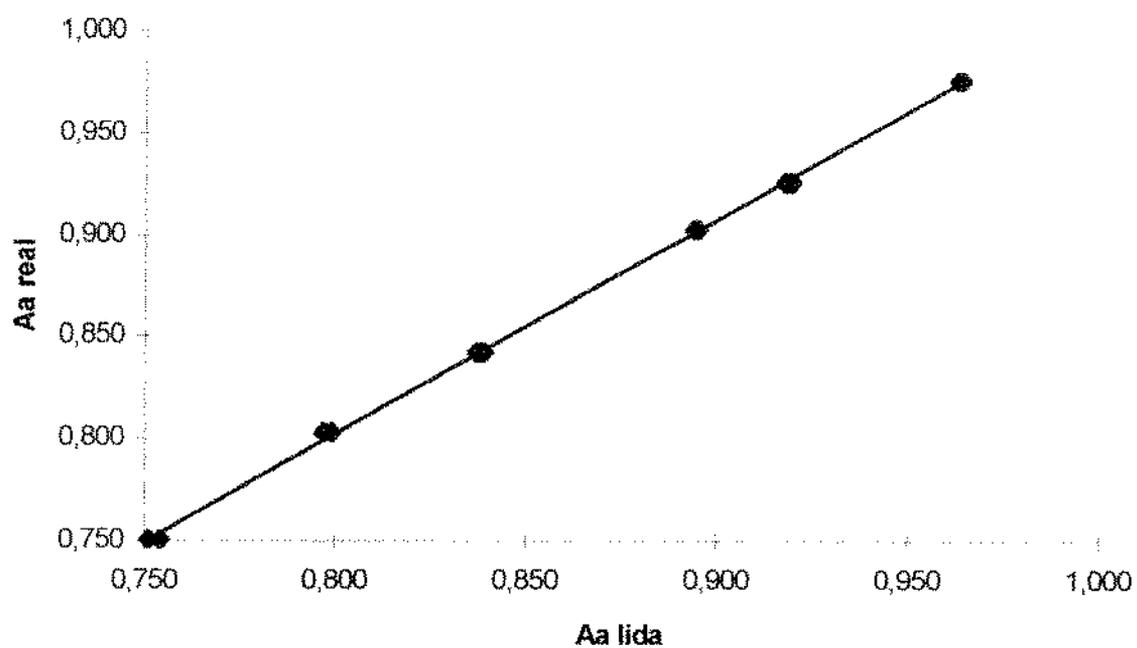


FIGURA B.2 - Curva de calibração do Aqua-lab de 19/07/95.

TABELA B.3 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 02/10/95.

Sal	Aa lida	Aa real
NaCl	0,758	0,751
	0,755	0,751
	0,753	0,751
	0,753	0,751
NH ₄ SO ₄	0,797	0,803
	0,796	0,803
	0,792	0,803
	0,791	0,803
KCl	0,840	0,842
	0,840	0,842
	0,837	0,842
	0,838	0,842
BaCl ₂	0,892	0,903
	0,893	0,903
	0,892	0,903
	0,893	0,903
KNO ₃	0,920	0,926
	0,920	0,926
	0,921	0,926
	0,921	0,926
K ₂ SO ₄	0,966	0,975
	0,967	0,975
	0,965	0,975
	0,966	0,975

Resultado da Regressão:

Constante:	-0,02983
Err Pdr da Est Y:	0,004254
Coef. de Confiabilidade:	0,997123
No. de Variáveis:	24
Graus de Liberdade:	22
Coeficiente X:	1,041136
Err Pdr do Coef. X:	0,011921

$$Aa \text{ real} = 1,04114 \cdot Aa \text{ lida} - 0,02983$$

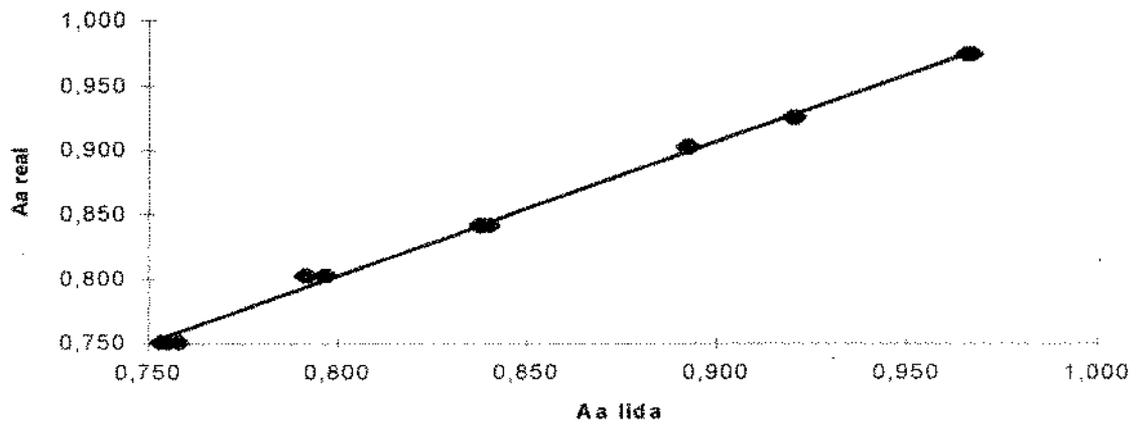


FIGURA B.3 - Curva de calibração do Aqua-lab de 02/10/95.

TABELA B.4 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 29/12/95.

Sal	Aa lida	Aa real
NaCl	0,748	0,751
	0,748	0,751
	0,749	0,751
	0,750	0,751
NH ₄ SO ₄	0,793	0,803
	0,793	0,803
	0,793	0,803
	0,794	0,803
KCl	0,833	0,842
	0,833	0,842
	0,833	0,842
	0,834	0,842
BaCl ₂	0,885	0,903
	0,886	0,903
	0,887	0,903
	0,887	0,903
KNO ₃	0,913	0,926
	0,915	0,926
	0,916	0,926
	0,919	0,926
K ₂ SO ₄	0,959	0,975
	0,961	0,975
	0,961	0,975
	0,962	0,975

Resultado da Regressão:

Constante:	-0,03139
Err Pdr da Est Y:	0,003239
Coef. de Confiabilidade:	0,998333
No. de Variáveis:	24
Graus de Liberdade:	22
Coeficiente X:	1,048733
Err Pdr do Coef. X:	0,009136

Aa real = 1,04873. Aa lida - 0,03139

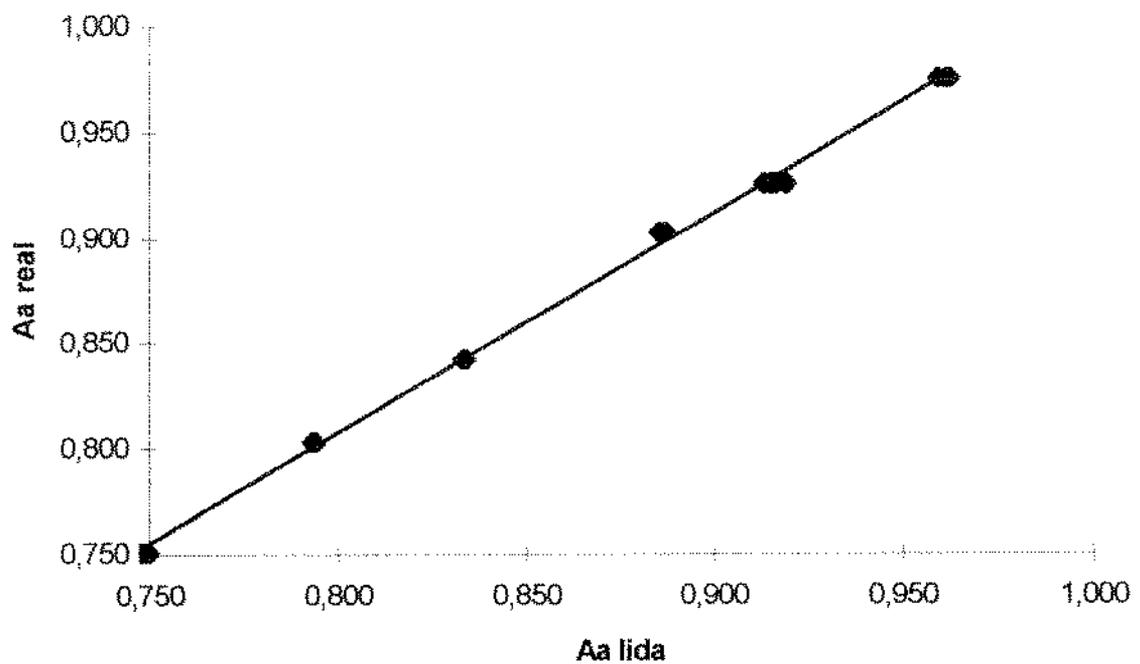


FIGURA B.4 - Curva de calibração do Aqua-lab de 29/12/95.

TABELA B.5 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 17/01/96.

Sal	Aa lida	Aa real
NaCl	0,749	0,751
	0,750	0,751
	0,751	0,751
	0,753	0,751
NH ₄ SO ₄	0,793	0,803
	0,794	0,803
	0,795	0,803
	0,796	0,803
KCl	0,833	0,842
	0,835	0,842
	0,836	0,842
	0,837	0,842
BaCl ₂	0,887	0,903
	0,888	0,903
	0,891	0,903
	0,891	0,903
KNO ₃	0,915	0,926
	0,916	0,926
	0,917	0,926
	0,917	0,926
K ₂ SO ₄	0,960	0,975
	0,961	0,975
	0,961	0,975
	0,963	0,975

Resultado da Regressão:

Constante:	-0,03792
Err Pdr da Est Y:	0,002885
Coef. de Confiabilidade:	0,998677
No. de Variáveis:	24
Graus de Liberdade:	22
Coeficiente X:	1,054452
Err Pdr do Coef. X:	0,008182

$$Aa \text{ real} = 1,05445 \cdot Aa \text{ lida} - 0,03792$$

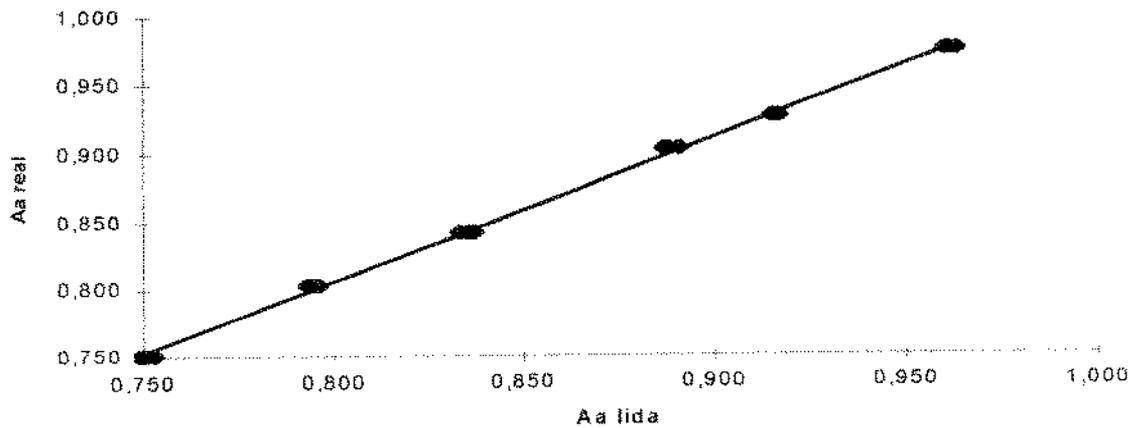


FIGURA B.5 - Curva de calibração do Aqua-lab de 17/01/96.

TABELA B.6 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em 13/05/96.

Sal	Aa lida	Aa real
NaCl	0,752	0,751
	0,752	0,751
	0,753	0,751
	0,753	0,751
NH ₄ SO ₄	0,796	0,803
	0,796	0,803
	0,797	0,803
	0,798	0,803
KCl	0,837	0,842
	0,837	0,842
	0,837	0,842
	0,839	0,842
BaCl ₂	0,890	0,903
	0,890	0,903
	0,891	0,903
	0,893	0,903
KNO ₃	0,913	0,926
	0,914	0,926
	0,917	0,926
	0,918	0,926
K ₂ SO ₄	0,959	0,975
	0,959	0,975
	0,960	0,975
	0,963	0,975

Resultado da Regressão:

Constante:	-0,05315
Err Pdr da Est Y:	0,002393
Coef. de Confiabilidade:	0,999090
No. de Variáveis:	24
Graus de Liberdade:	22
Coeficiente X:	1,070907
Err Pdr do Coef. X:	0,006890

$$Aa \text{ real} = 1,07091.Aa \text{ lida} - 0,05315$$

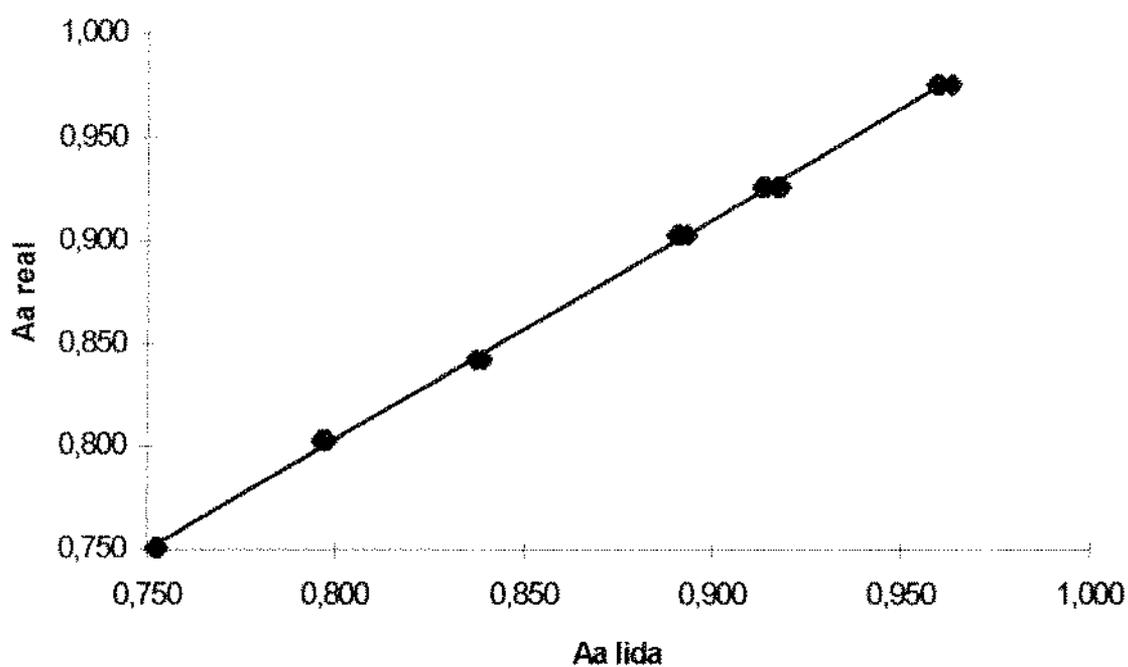


FIGURA B.6 - Curva de calibração do Aqua-lab de 13/05/96.

TABELA B.7 - Dados de leitura do Aqua-lab para sais padrões de referência em
04/07/96.

Sal	Aa lida	Aa real
NaCl	0,755	0,751
	0,754	0,751
	0,755	0,751
	0,754	0,751
NH ₄ SO ₄	0,798	0,803
	0,799	0,803
	0,794	0,803
	0,799	0,803
KCl	0,838	0,842
	0,838	0,842
	0,839	0,842
	0,838	0,842
BaCl ₂	0,892	0,903
	0,893	0,903
	0,891	0,903
	0,891	0,903
KNO ₃	0,919	0,926
	0,919	0,926
	0,919	0,926
	0,919	0,926
K ₂ SO ₄	0,964	0,975
	0,963	0,975
	0,963	0,975
	0,964	0,975

Resultado da Regressão:

Constante:	-0,04655
Err Pdr da Est Y:	0,002887
Coef. de Confiabilidade:	0,998675
No. de Variáveis:	24
Graus de Liberdade:	22
Coeficiente X:	1,060955
Err Pdr do Coef. X:	0,008236

$$Aa \text{ real} = 1,06096.Aa \text{ lida} - 0,04655$$

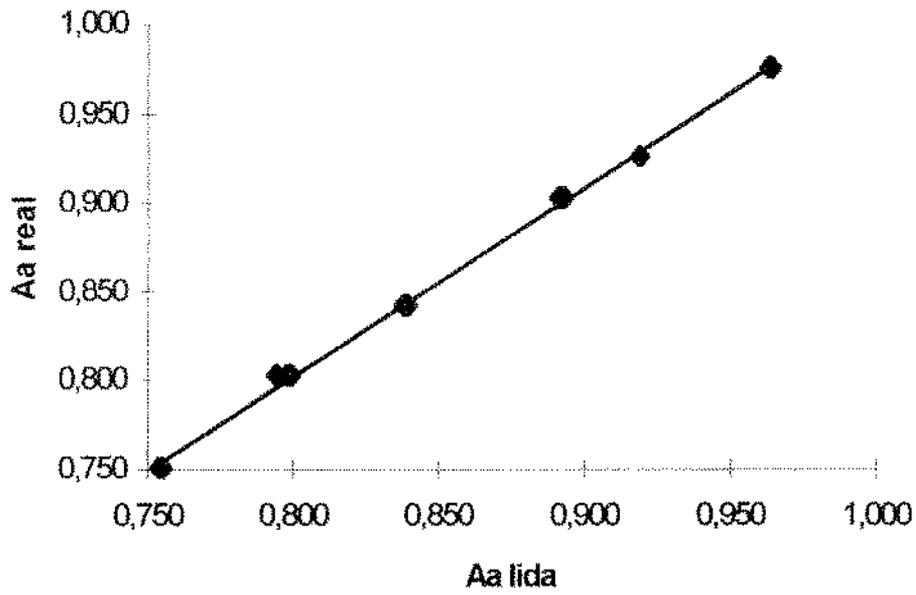


FIGURA B.7 - Curva de calibração do Aqua-lab de 04/07/96.

APÉNDICE C

EXEMPLOS DE CÁLCULO DE A_a TEÓRICA PARA SOLUÇÕES BINÁRIAS DE NÃO ELETRÓLITOS.

Equação de NORRISH (1966):

$$A_a = x_1 \exp(-k x_2^2)$$

onde:

x_1 = fração molar do componente 1;

x_2 = fração molar do componente 2;

k = constante de interação.

A fração molar é definida como o número de moles (n) de um determinado componente dividido pelo número total de moles de todos os componentes da solução, sendo que a soma de todas as frações molares é sempre igual a 1 (MAHAN, 1981). Assim para uma solução binária temos:

$$x_1 = \frac{n_1}{n_1 + n_2} \quad ; \quad x_2 = \frac{n_2}{n_1 + n_2} \quad \text{e} \quad x_1 + x_2 = 1$$

Como neste caso específico a solução é como se fosse formada por um soluto dissolvido em água, temos que:

$$x_1 = \frac{\frac{\text{massa de água}}{\text{PM (água)}}}{\frac{\text{massa água}}{\text{PM (água)}} + \frac{\text{massa soluto}}{\text{PM (soluto)}}} \quad ; \quad x_2 = \frac{\frac{\text{massa do soluto}}{\text{PM (soluto)}}}{\frac{\text{massa soluto}}{\text{PM (soluto)}} + \frac{\text{massa água}}{\text{PM (água)}}}$$

onde PM = peso molecular

Exemplo 1 - Considerando-se uma solução com 50 g de sacarose e 50 g de polpa de goiaba 15 °Brix.

Polpa 15 °Brix, 19,20 % de Sólidos Totais $\Rightarrow 50 \times 0,8080 = 40,40$ g de Água

Assim:

$$x_1 = \frac{\frac{40,40}{18}}{\frac{40,40}{18} + \frac{50}{342}} \quad e \quad x_2 = \frac{\frac{50}{342}}{\frac{50}{342} + \frac{40,40}{18}}$$

$$x_1 = 0,939$$

$$x_2 = 0,061$$

Para sacarose: $k = 6,47$

Então: $Aa = 0,939 \cdot \exp[-6,47 (0,061)^2]$

$$Aa = 0,916$$

Exemplo 2 - Considerando-se uma solução com 40 g de glicose e 60 g de polpa de goiaba 15 °Brix.

Polpa 15 °Brix, 19,20 % de Sólidos Totais $\Rightarrow 60 \times 0,8080 = 48,48$ g de Água

Assim:

$$x_1 = \frac{\frac{48,48}{18}}{\frac{48,48}{18} + \frac{40}{180}} \quad e \quad x_2 = \frac{\frac{40}{180}}{\frac{40}{180} + \frac{48,48}{18}}$$

$$x_1 = 0,924$$

$$x_2 = 0,076$$

Para glicose: $k = 2,25$

Então: $Aa = 0,924 \cdot \exp[-2,25 (0,076)^2]$

$$Aa = 0,912$$

Exemplo 3 - Considerando-se uma solução com 1 g de glicerol e 99 g de polpa de goiaba 15 ° Brix.

Polpa 15 °Brix, 19,20 % de Sólidos Totais $\Rightarrow 99 \times 0,8080 = 79,99$ g de Água

Assim:

$$x_1 = \frac{\frac{79,99}{18}}{\frac{79,99}{18} + \frac{1}{92}} \quad \text{e} \quad x_2 = \frac{\frac{1}{92}}{\frac{1}{92} + \frac{79,99}{18}}$$

$$x_1 = 0,998$$

$$x_2 = 0,002$$

Para glicerol: $k = 1,16$

Então: $Aa = 0,998 \cdot \exp[-1,16 (0,002)^2]$

$$Aa = 0,998$$

APÊNDICE D

FORMULAÇÕES DE ALGUNS MEIOS DE CULTURA, COMERCIALMENTE NÃO DISPONÍVEIS.**Ágar de Aveia (OA)**

Ingredientes:

- 25 g de Farinha de Aveia;
- 1 l de Água Destilada.

Coloca-se os ingredientes para ferver por uma hora. Filtra-se através de gaze. Completa-se o volume para um litro e adiciona-se 20 g de Bacto Agar. Estereliza-se a 121°C/15 minutos.

Ágar de Batata e Cenoura (PCA)

Ingredientes:

- 20 g de Batata;
- 20 g de Cenoura;
- 1,0 l de Água Destilada.

Coloca-se os ingredientes para ferver por uma hora. Filtra-se através de gaze. Completa-se o volume para um litro e adiciona-se de 17 a 20 g de Bacto Ágar. Estereliza-se a 121°C/15 minutos.

Ágar Extrato de Levedura de Czapeck (CYA)

Ingredientes:

- 1,0 g de Fosfato Dipotássio de Hidrogênio;
- 10,0 ml de Concentrado de Czapeck;
- 5,0 g de Extrato de Levedura;
- 30,0 g de Sacarose;

- 15,0 g de Bacto Ágar;
- 1,0 l de Água Destilada.

Dissolve-se os ingredientes em banho maria e autoclava-se a 121 °C/15 minutos.

Concentrado Czapeck

Ingredientes:

- 30 g de NaNO_3 ;
- 5 g de KCl ;
- 5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;
- 0,1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 100 ml de Água Destilada.

Junta-se todos os ingredientes. Este concentrado não deve ser autoclavado.

APÊNDICE E

ANÁLISE DE COR

FICHA PARA AVALIAÇÃO VISUAL

Nome: _____ Data: _____

Produto: _____ Série: _____

_____ mais escura

_____ mais vermelha

_____ mais amarela

_____ mais clara

_____ menos vermelha

_____ menos amarela

ANÁLISE SENSORIAL

DUO - TRIO

NOME: _____

DATA: _____

PRODUTO: _____

Em sua bandeja você tem três (3) amostras de suco de goiaba. Uma é amostra-controle (R) e duas (2) são amostras codificadas. Uma das codificadas é idêntica a R, a outra é diferente. Qual das codificadas é diferente de R ? Faça uma marca, na amostra diferente.

Código

Marque a amostra diferente

Comentários: _____

ANÁLISE SENSORIAL

FICHA PARA AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE SABOR ESTRANHO

Nome: _____ Data: _____

Série: _____

Prove, por favor, a(s) amostra(s) e assinale se você detectou sabor estranho nas escalas abaixo:

- Livre de sabor estranho
- Sabor estranho muito ligeiro
- Sabor estranho ligeiro
- Sabor estranho moderado
- Sabor estranho moderadamente intenso
- Sabor estranho intenso
- Sabor estranho muito intenso

Comentários: _____
