



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

---

**AVALIAÇÃO E ADAPTAÇÃO DE SISTEMA ASSÉPTICO PARA  
OBTENÇÃO DE ÁGUA DE COCO (*Cocos nucifera* L.) ACONDICIONADA  
EM EMBALAGENS PLÁSTICAS**

**Laura Figueiredo Abreu**

(Química Industrial /MSc. Tecnologia de Alimentos)

**Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria**  
(Orientador)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

*Campinas*

*2005*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Ab86a Abreu, Laura Figueiredo  
Avaliação e adaptação de sistema asséptico para obtenção de  
água de coco (*Cocos nucifera* L.) acondicionada em embalagens  
plásticas / Laura Figueiredo de Abreu . -- Campinas, SP: [s.n],  
2005.

Orientador: José de Assis Fonseca Faria  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Sistema asséptico. 2. Água de coco. 3. Embalagens.  
4. *Cocos nucifera* L. I. Faria, José de Assis. II.  
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia  
de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Evaluation and adaptation of aseptic system to obtention of coconut  
water (*Cocos nucifera* L.) in plastic packages

Palavras-chave em inglês (Keywords): Aseptic system, Coconut-Water, Packages,  
Cocos nucifera L.

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: José de Assis Fonseca Faria

Hélia Harumi Sato

Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva

Pilar Rodrigues de Massagues

Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Carlos Alberto Rodrigues Anjos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. José de Assis Fonseca Faria  
DTA/FEA UNICAMP

---

Dra. Hélia Harumi Sato  
DCA/FEA UNICAMP

---

Dra. Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva  
DEPAN/FEA UNICAMP

---

Dra. Pilar Rodrigues de Massaguer  
DCA/FEA UNICAMP

---

Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
DTA/FEA UNICAMP

---

Dr. Carlos Alberto Rodriguez Anjos  
DTA/FEA UNICAMP



“As coisas difíceis levam muito tempo.  
O impossível pode demorar um pouco mais.”



Dedico esta conquista aos meus  
grandes amigos e incentivadores, meus  
queridos pais Isaura e Miguel.



## AGRADECIMENTOS

A DEUS por tudo;

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso;

Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas concedidas;

Ao Prof. Assis, pela orientação, amizade e empenho durante a realização deste trabalho;

Aos professores membros da banca examinadora pela orientação durante a execução dos experimentos e pelas correções que enriqueceram muito o trabalho;

Aos professores e pesquisadores Alfredo Vitali e Mauro Leitão pelas sugestões;

Ao amigo Rodrigo Petrus por compartilharmos o desafio de desenvolver parte deste trabalho;

À Ana Lourdes Gândara, pelo apoio técnico, paciência e amizade;

Às colegas Selma, Ana Paula, Eliane, Carolina, Karin, Michela, Karina, Raquel, Daniele e às demais pessoas pela importante colaboração durante a parte experimental, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível;

Aos técnicos e funcionários Alice, Adauto, Bernadete, Ana Maria, Marlene, Zé Roberto, Nelson, José Carlos e Renata pela imensa colaboração, auxílio técnico indispensável e eterna paciência;

A todos os provadores que participaram dos testes sensoriais;

Às amigas Lidiane, Vivien, Shirley e D. Maria pela convivência e inesquecível amizade que tornaram esta caminhada mais divertida;

Ao engenheiro da AMACOCO, Sérgio Custódio, pela entrevista concedida;

Às empresas SUMÁ, Fruta & Cia, Tapon Corana, Bericap, White Cap e Sandet;

OBRIGADA



## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	<i>xi</i>
LISTA DE TABELAS .....	<i>xvii</i>
LISTA DE FIGURAS.....	<i>xx</i>
LISTA DE EQUAÇÕES .....	<i>xxii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS .....	<i>xxiii</i>
RESUMO.....	1
SUMMARY .....	3
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1 SISTEMA ASSÉPTICO .....	9
<b>2.1.1 Acondicionamento asséptico</b> .....	11
<b>2.1.2 Esterilização de embalagens</b> .....	14
2.1.2.1 Peróxido de hidrogênio .....	16
2.1.2.2 Ácido peracético .....	17
2.1.2.3 Embalagens para sistemas assépticos .....	19
2.1.2.3.1 Embalagens para água de coco .....	20
<b>2.1.3 Processamento asséptico</b> .....	21
<b>2.1.4 Binômios de tempo e temperatura de esterilização</b> .....	23
2.1.4.1 Binômios de esterilização da água de coco .....	25
<b>2.1.5 Regulamentação e avaliação da eficiência de sistemas de processamento e     acondicionamento assépticos</b> .....	25
2.1.5.1 Controle de qualidade de sistemas assépticos .....	27
<b>2.1.6 Alterações em alimentos produzidos assepticamente</b> .....	30
2.2 ÁGUA DE COCO .....	31
<b>2.2.1 Mercado do coco e da água de coco no Brasil</b> .....	31
<b>2.2.2 Variedades de coco para extração da água</b> .....	34
2.2.2.1 Variedade Gigante .....	34
2.2.2.2 Variedade Híbrida .....	35
2.2.2.3 Variedade Anã .....	35
<b>2.2.3 Características físico-químicas da água de coco</b> .....	36
<b>2.2.4 Produtos comerciais de água de coco</b> .....	39
<b>2.2.5 Características sensoriais da água de coco</b> .....	39
<b>2.2.6 Aspectos importantes na industrialização da água de coco</b> .....	41
2.2.6.1 Boas práticas de fabricação .....	41
2.2.6.2 Extração da água de coco .....	43
2.2.6.3 Escurecimento da água de coco .....	44

2.2.6.3.1 Fundamentos para o escurecimento enzimático da água de coco....	44
2.2.6.3.1.1 Enzima Polifenoloxidase (PFO) .....	46
2.2.6.3.1.2 Enzima Peroxidase (POD) .....	47
2.2.6.3.2 Fundamentos para o escurecimento não-enzimático da água de coco...	50
2.2.6.3.3 Inibidores de escurecimento enzimático e não-enzimático.....	51
2.2.6.3.3.1 Sulfitos .....	52
2.2.6.3.3.2 Ácido ascórbico .....	52
<b>2.2.7 Resíduos provenientes da extração da água de coco.....</b>	<b>53</b>
<b>2.2.8 Legislação para água de coco .....</b>	<b>54</b>
<b>3 MATERIAL E METODOLOGIA .....</b>	<b>56</b>
3.1 MATERIAL.....	57
<b>3.1.1 Água de coco verde.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1.2 Ingredientes de formulação.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1.3 Embalagens.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1.4 Extratores de água de coco.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1.5 Esterilizador de embalagens .....</b>	<b>60</b>
<b>3.1.6 Esterilizador UAT .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1.7 Sistema de acondicionamento asséptico .....</b>	<b>63</b>
3.2 METODOLOGIA.....	67
<b>3.2.1 Desenvolvimento de formulação de água de coco .....</b>	<b>67</b>
3.2.1.1 Recepção, higienização e resfriamento dos cocos .....	67
3.2.1.2 Planejamento fatorial .....	67
3.2.1.3 Análise sensorial.....	68
3.2.1.3.1 Percepção dos gostos ácido e doce das formulações de água de coco	
.....	68
3.2.1.3.2 Otimização da acidez e da doçura da água de coco .....	70
3.2.1.4 Análise estatística dos resultados .....	72
3.2.1.5 Formulação de água de coco com frutose .....	73
<b>3.2.2 Testes de avaliação da eficiência do sistema asséptico.....</b>	<b>75</b>
3.2.2.1 Higienização de superfícies .....	75
3.2.2.1.1 Extrator de água de coco.....	75
3.2.2.1.2 Esterilizador de embalagens .....	75
3.2.2.1.3 Esterilizador UAT e linha de acondicionamento.....	75
3.2.2.1.4 Sala limpa .....	78
3.2.2.2 Avaliação da contaminação de superfícies e da eficiência dos procedimentos de	
esterilização .....	78

3.2.2.2.1 Água de enxágüe das garrafas.....	78
3.2.2.2.2 Análise microbiológica das garrafas.....	79
3.2.2.2.3 Determinação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> residual nas garrafas.....	79
3.2.2.2.4 Avaliação da contaminação das superfícies da sala limpa.....	79
3.2.2.2.5 Contagem de microrganismos e partículas presentes no ar da sala limpa.....	80
3.2.2.2.6 Avaliação da contaminação da linha de processamento.....	80
<b>3.2.3 Processamento da água de coco.....</b>	<b>80</b>
3.2.3.1 Recepção e armazenamento dos cocos.....	82
3.2.3.2 Higienização dos cocos.....	82
3.2.3.3 Extração.....	82
3.2.3.4 Adição de ácido ascórbico.....	83
3.2.3.5 Resfriamento da água de coco.....	83
3.2.3.6 Ajuste de pH e Brix.....	84
3.2.3.7 Tratamento térmico.....	84
3.2.3.8 Acondicionamento asséptico e identificação.....	86
3.2.3.9 Esterilização das embalagens.....	87
3.2.3.10 Estocagem e análise das embalagens esterilizadas.....	87
<b>3.2.4 Metodologias de análise da água de coco.....</b>	<b>88</b>
3.2.4.1 Potencial de hidrogênio.....	88
3.2.4.2 Acidez titulável.....	88
3.2.4.3 Ácido ascórbico.....	88
3.2.4.4 Sólidos solúveis.....	88
3.2.4.5 Cor e turbidez.....	88
3.2.4.6 Osmolalidade.....	89
3.2.4.7 Análise de O <sub>2</sub> dissolvido.....	90
3.2.4.8 Atividade enzimática.....	90
3.2.4.9 Análises microbiológicas.....	91
3.2.4.10 Teste de esterilidade comercial.....	92
3.2.4.11 Marcha de detecção de contaminantes.....	93
<b>3.2.5 Determinação da vida útil dos lotes de água de coco dos Experimentos 1 e 3.....</b>	<b>95</b>
3.2.5.1 Análise estatística dos resultados sensoriais.....	97
<b>3.2.6 Caracterização das embalagens.....</b>	<b>98</b>
3.2.6.1 Dimensionamento das embalagens.....	98
3.2.6.2 Peso das embalagens.....	98
3.2.6.3 Capacidade volumétrica.....	98
3.2.6.4 Eficiência do fechamento das garrafas.....	98

3.2.6.5 Determinação da permeabilidade do sistema de embalagem ao oxigênio.....	99
3.2.6.6 Medida de transmitância.....	99
3.2.6.7 Torque de fechamento e abertura .....	99
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
4.1 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE ÁGUA DE COCO .....	100
<b>4.1.1 Percepção dos gostos ácido e doce nas formulações de água de coco .....</b>	<b>100</b>
<b>4.1.2 Otimização da acidez e da doçura da água de coco.....</b>	<b>104</b>
<b>4.1.3 Formulação de água de coco com frutose .....</b>	<b>112</b>
<b>4.1.4 Aceitação da formulação otimizada de água de coco com frutose .....</b>	<b>114</b>
4.2 AVALIAÇÃO DO SISTEMA ASSÉPTICO .....	116
<b>4.2.1 Avaliação dos componentes do processo nos Experimentos 1 e 3.....</b>	<b>116</b>
<b>4.2.2 Avaliação do processamento da água de coco .....</b>	<b>121</b>
4.2.2.1 Parâmetros reais e desvios de processo do Experimento 1 .....	121
4.2.2.2 Parâmetros de processo do Experimento 2 .....	123
4.2.2.3 Parâmetros de processo do Experimento 3 .....	124
<b>4.2.3 Características físico-químicas da água de coco processada do Experimento 1.....</b>	<b>125</b>
4.2.3.1 Osmolalidade .....	126
<b>4.2.4 Características físico-químicas da água de coco processada do Experimento 3.....</b>	<b>127</b>
<b>4.2.5 Análises microbiológicas da água de coco dos lotes do Experimento 1.....</b>	<b>127</b>
<b>4.2.6 Análises microbiológicas da água de coco dos lotes do Experimento 2.....</b>	<b>130</b>
<b>4.2.7 Análises microbiológicas da água de coco do lote do Experimento 3.....</b>	<b>131</b>
<b>4.2.8 Esterilidade comercial e marcha de detecção de contaminantes da água de coco dos lotes do Experimento 1.....</b>	<b>133</b>
4.2.8.1 Observação visual .....	133
4.2.8.2 Determinação de pH.....	134
4.2.8.3 Marcha de detecção de contaminantes.....	136
<b>4.2.9 Pré-incubação da água de coco dos lotes do Experimento 2 .....</b>	<b>138</b>
<b>4.2.10 Esterilidade comercial e marcha de detecção de contaminantes da água de coco do Experimento 3.....</b>	<b>139</b>
4.2.10.1 Observação visual .....	139
4.2.10.2 Determinação de pH.....	139
<b>4.2.11 Estabilidade da água de coco dos lotes do Experimento 1 .....</b>	<b>142</b>
4.2.11.1 Atividade enzimática da água de coco dos lotes do Experimento 1 .....	145
<b>4.2.12 Estabilidade da água de coco dos lotes do Experimento 2.....</b>	<b>147</b>
4.2.12.1 Atividade enzimática da água de coco dos lotes do Experimento 2.....	152
<b>4.2.13 Estabilidade da água de coco do Experimento 3.....</b>	<b>157</b>
4.2.13.1 Atividade enzimática da água de coco do Experimento 3 .....	158

4.2.14 Vida útil da água de coco dos lotes do Experimento 1 .....	159
4.2.15 Vida útil da água de coco dos lotes do Experimento 3 .....	163
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA EMBALAGEM .....	166
4.3.1 Dimensionamento da embalagem .....	166
4.3.2 Peso e capacidade volumétrica das embalagens .....	166
4.3.3 Taxa de permeabilidade ao oxigênio.....	168
4.3.4 Medida de Transmitância.....	170
4.3.5 Eficiência do fechamento das garrafas.....	171
4.3.6 Torque de fechamento e de abertura .....	172
5 CONCLUSÕES .....	173
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	175
ANEXO .....	199

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Correlação entre normas para classificação de salas limpas e ambientes controlados	12
<b>Tabela 2</b> Características físico-químicas da água de coco da variedade anão em diferentes tempos de maturação .....	37
<b>Tabela 3</b> Caracterização físico-química das águas de coco anão verdes com 7 meses de maturação.....	38
<b>Tabela 4</b> Valores D e Z da enzima peroxidase .....	49
<b>Tabela 5</b> Delineamento experimental das variáveis independentes codificadas e não codificadas .....	68
<b>Tabela 6</b> Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com pontos centrais (0) e axiais (1,41) .....	68
<b>Tabela 7</b> Formulação das amostras de água de coco utilizadas na seleção de provadores .....	69
<b>Tabela 8</b> Estimativa de RD de microrganismos e enzimas da água de coco .....	85
<b>Tabela 9</b> Ordem de processamento dos lotes da água de coco.....	86
<b>Tabela 10</b> Medidas das intensidades de gostos ácido e doce das formulações de água de coco .....	100
<b>Tabela 11</b> Efeitos estimados das variáveis independentes sobre a intensidade dos gostos ácido e doce nas formulações de água de coco .....	101
<b>Tabela 12</b> Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( <i>p</i> ), coeficiente de determinação ajustado ( <i>R</i> <sup>2</sup> ) dos modelos de intensidade de gosto ácido e gosto doce da água de coco .....	102
<b>Tabela 13</b> Medidas de gosto ácido e gosto doce ideais das formulações de água de coco .....	104
<b>Tabela 14</b> Efeitos estimados das variáveis independentes sobre os gostos ácido e doce ideais nas formulações de água de coco .....	106

<b>Tabela 15</b> Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( $p$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) dos modelos de gosto ácido e gosto doce ideais da água de coco .....	107
<b>Tabela 16</b> Rearranjo da matriz de planejamento das medidas de gosto ácido e gosto doce ideais das formulações de água de coco, utilizando a acidez titulável como variável independente....	110
<b>Tabela 17</b> Efeitos estimados das variáveis independentes, acidez titulável e Brix, sobre os gostos ácido e doce ideais nas formulações de água de coco .....	110
<b>Tabela 18</b> Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( $p$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) dos modelos de gosto ácido e gosto doce ideais da água de coco, utilizando-se a acidez titulável como variável independente.....	111
<b>Tabela 19</b> Resultado do teste de similaridade entre as formulações de água de coco com sacarose e frutose.....	112
<b>Tabela 20</b> Avaliação dos componentes do processamento asséptico de água de coco dos lotes dos Experimentos 1 e 3.....	116
<b>Tabela 21</b> Parâmetros teóricos de processo dos lotes de água de coco do Experimento 1 .....	121
<b>Tabela 22</b> Parâmetros reais de processo dos lotes de água de coco do Experimento 1.....	122
<b>Tabela 23</b> Parâmetros de processo dos lotes de água de coco do Experimento 2.....	123
<b>Tabela 24</b> Parâmetros reais de processamento do lote de água de coco do Experimento 3 ....	124
<b>Tabela 25</b> Características físico-químicas da água de coco processada dos lotes do Experimento 1 .....	125
<b>Tabela 26</b> Valores de osmolalidade da água de coco dos lotes processados, referentes aos seus respectivos sinais .....	126
<b>Tabela 27</b> Características físico-químicas da água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3 .....	127
<b>Tabela 28</b> Análises microbiológicas da água de coco <i>in natura</i> do Experimento 1, e de outras amostras de água de coco.....	128
<b>Tabela 29</b> Análises microbiológicas da água de coco formulada do Experimento 1 .....	129
<b>Tabela 30</b> Análises microbiológicas da água de coco <i>in natura</i> , formulada e processada dos lotes do Experimento 2 .....	130
<b>Tabela 31</b> Análises microbiológicas da água de coco <i>in natura</i> e formulada do Lote 3.1 do Experimento 3 .....	132
<b>Tabela 32</b> Valores de pH de 60 amostras de água de coco dos lotes do Experimento 1, após 10 dias de incubação a 35°C .....	135
<b>Tabela 33</b> Classificação dos lotes de água de coco do Experimento 1, quanto à marcha de detecção de contaminantes .....	136
<b>Tabela 34</b> Valores de pH de 60 amostras de água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3, após 10 dias de incubação a 35°C .....	139

<b>Tabela 35</b> Contagem total de 45 garrafas de água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3, após 10 dias de incubação a 35°C .....	140
<b>Tabela 36</b> Estabilidade da água de coco lotes do Experimento 1 .....	143
<b>Tabela 37</b> Estabilidade da água de coco dos lotes do Experimento 2.....	148
<b>Tabela 38</b> Atividade da enzima Peroxidase em Unidades/mL dos lotes de água de coco do Experimento 2 .....	153
<b>Tabela 39</b> Estabilidade da água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3.....	157
<b>Tabela 40</b> Atividade das enzimas PFO e POD na água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3	158
<b>Tabela 41</b> Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco dos Lotes 1.1 e 1.2, após 15 dias de estocagem .....	159
<b>Tabela 42</b> Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco do Lote 1.3 recém-processada e do Lote 1.4 após 15 dias de estocagem .....	160
<b>Tabela 43</b> Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco dos lotes 1.1 e 1.2, após 30 dias de estocagem .....	160
<b>Tabela 44</b> Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco do lote 3.1, após 15 dias de estocagem.....	163
<b>Tabela 45.</b> Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco do lote 3.1, após 30 dias de estocagem.....	163
<b>Tabela 46</b> Peso e capacidade volumétrica das embalagens .....	166
<b>Tabela 47</b> Taxa de permeabilidade ao oxigênio das embalagens .....	168
<b>Tabela 48</b> Medidas de transmitância das embalagens a 380nm.....	171

#### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Mecanismo do escurecimento enzimático pela enzima polifenoloxidase (PFO) .....	47
<b>Figura 2</b> Mecanismo do escurecimento enzimático da peroxidase (PDO).....	48
<b>Figura 3</b> Detalhamento do extrator de água de coco e da canaleta de escoamento utilizados no Experimento 1 .....	59
<b>Figura 4</b> Detalhamento do sistema de extração de água de coco utilizado nos Experimentos 2 e 3 .....	60
<b>Figura 5</b> Esterilizador de embalagens.....	61
<b>Figura 6</b> Visualização do esterilizador UAT .....	63
<b>Figura 7</b> Disposição dos equipamentos dentro da planta de processamento p/ o Experimento 1	64
<b>Figura 8</b> Disposição dos equipamentos dentro da planta de processamento p/ o Experimento 3	65
<b>Figura 9</b> Disposição dos equipamentos dentro da planta de processamento p/ o Experimento 2	66
<b>Figura 10</b> Ficha do teste de escala para seleção dos provadores .....	69
<b>Figura 11</b> Ficha do teste escala do ideal.....	71

<b>Figura 12</b> Ficha do teste de aceitação .....	72
<b>Figura 13</b> Ficha do teste de similaridade .....	74
<b>Figura 14</b> Esquema de coleta da avaliação de contaminação da água de enxágüe das garrafas (F - filtros; P - pontos de coleta).....	79
<b>Figura 15</b> Fluxograma do processamento e acondicionamento de água de coco nos Experimentos 1, 2 e 3.....	81
<b>Figura 16</b> Esquema da marcha de detecção de contaminantes.....	94
<b>Figura 17</b> Ficha do teste afetivo de aceitação utilizado na determinação de vida útil da água de coco .....	96
<b>Figura 18</b> Superfície de resposta da intensidade de gosto ácido da água de coco .....	105
<b>Figura 19</b> Superfície de resposta da intensidade de gosto doce da água de coco.....	105
<b>Figura 20</b> Superfície resposta de gosto ácido ideal da água de coco .....	109
<b>Figura 21</b> Superfície de resposta do gosto doce ideal de água de coco.....	109
<b>Figura 22</b> Superfície de resposta de gosto ácido ideal de água de coco, utilizando acidez titulável como variável independente .....	113
<b>Figura 23</b> Superfície de resposta de gosto doce ideal de água de coco, utilizando acidez titulável como variável independente .....	113
<b>Figura 24</b> Histograma das médias de aceitação atribuídas à formulação otimizada de água de coco .....	114
<b>Figura 25</b> Variação de cor ( $\Delta E$ ) com o tempo de estocagem dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2 .....	149
<b>Figura 26</b> Garrafas de água de coco dos cinco lotes do Experimento 2, recém-processada e após 93 dias de estocagem à temperatura ambiente.....	150
<b>Figura 27</b> Concentração de ácido ascórbico com o tempo de estocagem dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2.....	151
<b>Figura 28</b> Oxigênio dissolvido com o tempo de estocagem dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2 .....	151
<b>Figura 29</b> Atividade enzimática da enzima Peroxidase (PDO) dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2 .....	153
<b>Figura 30</b> Caracterização dimensional da garrafa de PET e ilustração das tampas utilizadas no Experimento 1 e no Experimento 3.....	167
<b>Figura 31</b> Espectros de transmitância das embalagens de água de coco (1-garrafa transparente; 2-garrafa verde).....	170

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	23
Equação 2.....	24
Equação 3.....	24
Equação 4.....	24
Equação 5.....	24
Equação 6.....	61
Equação 7.....	72
Equação 8.....	89
Equação 9.....	91
Equação 10.....	102
Equação 11.....	102
Equação 12.....	107
Equação 13.....	107
Equação 14.....	111
Equação 15.....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência de Vigilância Sanitária  
APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle  
CEAGESP – Central de Abastecimento do Estado de São Paulo  
CEASA – Central de Abastecimento  
CFR – *Code of Federal Regulation*  
CIP - *Clean in place*  
DTA – Departamento de Tecnologia de Alimentos  
FAO – *Food and Agriculture Organization*  
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
FDA – *Food and Drug Administration*  
FEA – Faculdade de Engenharia de Alimentos  
FS – *Federal Standard*  
HEPA - *High Efficiency Particulate Air*  
HTST – *High temperature short time*  
IDF - *International Dairy Federation*  
INS – Sistema internacional de Numeração de Aditivos Alimentares  
ISO – *International Standard Organization*  
MAA – Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
NASA - *National Aeronautics and Space Administration*  
PFO - Polifenoxidase  
POD - Peroxidase  
RODAC - *Replicate Organisms Direct Agar Contact*  
RSM – *Response Surface Methodology*  
SBPC - Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação  
SI – Sistema internacional  
SIP - *Sterilisation in place*  
UAT – Ultra alta temperature  
UHT – *Ultra high temperature*

## RESUMO

Esta pesquisa teve o objetivo de avaliar o desempenho de um sistema asséptico piloto e adaptar o sistema para obtenção de água de coco acondicionada em embalagens plásticas, visando estocagem à temperatura ambiente.

Para a padronização da matéria-prima, utilizada nos experimentos, foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^2$  para a determinação da melhor formulação de água de coco, utilizando-se ácido cítrico, ácido ascórbico, sacarose e frutose.

A avaliação do sistema asséptico foi dividida em três experimentos. Foram realizados dois experimentos em escala piloto, totalizando quatro lotes de 300 unidades, no primeiro, e um lote de 200 unidades, no segundo. Entre estes dois experimentos foi realizado um em pequena escala, onde foram produzidos cinco lotes de 21 litros cada, para avaliação das adaptações feitas tanto no sistema asséptico como nos procedimentos de obtenção da água de coco. Esse teste serviu também para determinar o melhor tratamento térmico.

A partir dos testes sensoriais, determinou-se que a água de coco com melhor aceitação apresentou pH 4,9, acidez titulável 9,4mLNaOH0,1N/100mL e Brix 6,2% utilizando-se sacarose, e 6,0% utilizando-se frutose.

O nível de contaminação dos componentes do sistema apresentaram-se dentro dos padrões microbiológicos exigidos. Dos cinco lotes produzidos em escala piloto, dois não alcançaram a esterilidade comercial, acusando a presença de mesófilos aeróbios esporulados. Em um dos lotes houve indícios de sub-processamento e em outro, de contaminação cruzada pela parte externa das embalagens. Os dois lotes que apresentaram contaminação também foram os únicos a não apresentarem escurecimento durante a estocagem.

O gradativo escurecimento observado nos demais lotes foi associado à degradação do ácido ascórbico, que pode ter sido acelerada pela regeneração da enzima peroxidase e pelo oxigênio presente no espaço livre das embalagens. Sensorialmente, a vida útil das amostras analisadas não ultrapassou 30 dias, sendo que em um dos lotes a aceitação foi baixa, com média menor que seis, mas não apresentou alteração significativa com a estocagem, atribuindo-se a baixa aceitação ao uso de cocos demasiadamente verdes.

Observou-se que os lotes de água de coco aos quais não foi adicionado ácido ascórbico apresentaram coloração rosada, imediatamente após a passagem pelo trocador de calor. A água de coco processada à temperatura de 139°C por 10 segundos foi a que apresentou menor escurecimento durante a estocagem.

O desempenho do sistema foi considerado satisfatório para produção de água de coco comercialmente estéril, necessitando ainda de algumas adaptações. Um maior rigor nos procedimentos de limpeza, esterilização e nas metodologias de detecção de contaminantes também são necessários. Com a adição de 200mg/L de ácido ascórbico e tratamento térmico de 139°C por 10 segundos, foi possível manter a coloração da água de coco o mais próximo do natural, contudo, mais testes são necessários visando aumentar a sua vida útil e a aceitação sensorial.

## SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the performance of a pilot scale aseptic system and to adapt the process to obtain stable coconut water at room temperature in plastic bottles.

A 2<sup>2</sup> full factorial design was carried out in order to determine the best coconut water formulation, by using citric acid, ascorbic acid, sucrose and fructose. This formulation was the standard used on further experiments.

The aseptic system evaluation was divided up into three different experiments. Two of them were carried out in a pilot scale, in which 5 lots of 300-200 units were produced for evaluations of its performance. The third was done in a small scale for evaluation of adaptations made on the aseptic system and on the procedures of coconut water extraction. In this experiment 5 lots of 21 liters were processed in order to determine the best processing temperature to coconut water.

Based on sensory tests, the best coconut water acceptance occurred when pH was 4.9, titulable acidity 9.4mLNaOH0.1N/mL and Brix 6.2% with sucrose and 6.0% with fructose.

The level of contamination of the system components was according with microbiological standards required. Two of the five lots produced did not achieve commercial sterility and indicated presence of mesophilics aerobic spores. There were indications of sub-processing in one lot and in the other was observed cross-contamination by outer surface of packages. These two contaminated lots showed no browning during storage.

The gradual browning observed on the other lots was associated to ascorbic acid degradation, rise for regeneration of peroxidase enzyme and headspace oxygen from packages. Sensorially, the analyzed samples indicated shelf life of 30

days, and in one of the lots, the level of acceptance was low (less than 6), although it had no significant difference during the storage. The low acceptance was possibly due to the use of excessively green coconuts.

In the small scale tests, it was observed that the thermally processed coconut water with no ascorbic acid added showed a pale-red color immediately after it exited the heat exchanger, and showed browning during storage. Coconut water processed at 139°C/10s, showed less browning during storage.

Although the system needs some adaptations, its performance was considered satisfactory to commercially sterile coconut water production. Some adaptations are necessary because two of the five lots processed on pilot scale, were contaminated by mesophilic aerobic spores that indicates sub-processing or recontamination. It suggests the necessity of more rigorous procedures of cleaning and sterilization, but also in contamination detection methodology. With addition of 200mg/L of ascorbic acid and the use of temperatures of 139°C/10s, it was possible to obtain color stability of coconut water. However, additional testing is needed in order to increase the shelf life and the sensory acceptance.

## **1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

O Brasil produz cerca de 500 milhões de litros de água de coco por ano, onde 7% deste total é destinado à exportação (Agência Brasil, 2004). Entretanto, as empresas exportadoras de água de coco, encontram dificuldades em manter sua conservação até chegar ao seu destino. O surgimento de uma coloração rosada durante a estocagem é o grande problema encontrado pelos engarrafadores. O uso da pasteurização, seguido de resfriamento, e a esterilização UAT, com o uso de conservadores como o metabissulfito, vêm sendo as soluções encontradas, afetando, contudo, a qualidade sensorial da água de coco (Agência Brasil, 2004; Custódio, 2004; Cabral, 2002; Rosa e Abreu, 2002; Abreu et al., 2004). Este segmento de mercado está em franca ascensão (3,6 milhões litros/ano) e justifica o desenvolvimento tecnológico em engenharia e controle de processos (Datamark, 2002).

A água de coco vem sendo comercializada em garrafas de PET verdes, resfriadas (0 – 10°C) e congeladas (-18°C) e em embalagens cartonadas à temperatura ambiente (Leber, 2001). Entretanto, estes produtos apresentam algumas limitações que dificultam e aumentam os custos de sua comercialização. No primeiro, há a necessidade de uma ótima cadeia de frio, pois em alguns casos este produto não sofre nenhum tratamento ou adição de conservadores, e no caso de congelamento, há a necessidade de descongelar o produto, que também acarreta perdas de qualidade, principalmente sensoriais. Estes dois tipos de água de coco são geralmente comercializados por pequenas e médias empresas, utilizando coco verde da variedade anã (Abreu, 1999a; Ranieri, 2000).

A água de coco acondicionada em embalagens cartonadas tem a vantagem da comercialização à temperatura ambiente, possibilitada pelo tratamento térmico com ultra-alta temperatura (UAT), seguido de acondicionamento asséptico. Entretanto, além do tratamento térmico, é utilizado o conservador metabissulfito de sódio, que segundo rotulagem, é utilizado para evitar o escurecimento enzimático,

acarretando, porém, perda de qualidade nutricional e sensorial do produto (Campos, 1993; Wosiacki *et al.*, 1996; Sococo, 1997; Ranieri, 2000; Custódio, 2004).

A tecnologia de sistemas assépticos é utilizada para obtenção de produtos que se destinam à estocagem e comercialização à temperatura ambiente, ou quando se quer uma maior preservação das qualidades naturais do produto. O seu princípio pode ser resumido como o processo capaz de obter e acondicionar um produto comercialmente estéril, em uma embalagem pré-esterilizada, sendo que este acondicionamento é realizado em um ambiente controlado ou áreas limpas, seguido de um fechamento asséptico e hermético (Reuter, 1988; Holdsworth, 1992; Buchner, 1993; Faria, 1993).

Devido à complexidade da tecnologia de sistemas assépticos, é necessário um alto investimento (Reuter, 1988; Buchner, 1993). No caso da água de coco, somente as grandes empresas processadoras de coco maduro utilizam esta tecnologia, sendo que a água é um subproduto da industrialização da amêndoa do coco (Ranieri, 2000). Entretanto, os maiores engarrafadores de água de coco verde são pequenas e médias empresas. Por este motivo Faria (2003) desenvolveu um sistema asséptico piloto idealizado para fornecer esta tecnologia com menor custo operacional. Foi desenvolvido para fins de produção de diferentes bebidas comercialmente estéreis, acondicionadas em embalagens plásticas, como leite fluido, caldo-de-cana, isotônicos e sucos diversos. Nesta pesquisa a água de coco foi utilizada como matéria-prima para avaliar o desempenho e a eficiência do referido sistema asséptico.

Em trabalhos anteriores, para atender às pesquisas sobre sistemas assépticos financiadas pela FAPESP, foi realizada a montagem e a avaliação do esterilizador de embalagens (Faria, 2001; Petrus, 2000; Abreu, 2001), e a montagem e certificação da sala limpa (Petrus *et al.*, 2003b). Os procedimentos de controle foram previamente estabelecidos através de testes com outros produtos

como suco de laranja e leite fluido (Petrus et al., 2003c; Bergara et al., 2003), e também em testes preliminares com água de coco (Malpelli e Faria, 2003; Gonçalves e Faria, 2003).

Um sistema asséptico em teste precisa ser avaliado quanto a sua capacidade de fornecer produtos que atendam às exigências de segurança alimentar. Quando o alimento é de baixa acidez, como a água de coco, e será mantida à temperatura ambiente, esta avaliação torna-se ainda mais rigorosa. Portanto, é preciso garantir a perfeita funcionalidade de equipamentos e procedimentos desde a esterilização das embalagens, passando pelo tratamento térmico mínimo para esterilização do produto, até a garantia da esterilidade do ambiente de acondicionamento. Esta etapa pode ser caracterizada como a de qualificação e quantificação de fatores críticos descritos por Bernard et al. (1990), que precedem os testes biológicos de esterilidade, e para verificação das recomendações das normas de boas práticas de fabricação elaboradas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), codificada como 21 CFR 113 (*Title 21 part 113 do Code of Federal Regulation*), na seção referente aos “*Sistemas de Processamento e Embalagem Assépticos*”.

Alimentos produzidos assepticamente podem não alcançar a esterilidade devido às falhas que podem ocorrer durante o processo, tais como, a contaminação de embalagens, linha, ar do ambiente de acondicionamento, pessoal e sub-processamento térmico (Ahvenainen, 1988; von Bockelman, 1988; Cerf 1988). Os procedimentos utilizados para o controle de cada etapa do processo também precisam ser capazes de detectar e acusar eventuais problemas durante a produção, devendo também passar por uma avaliação. Entretanto, isto é possível somente mediante uma situação real de produção.

Para obtenção de grandes volumes de água de coco, assim como na indústria, que requer uma maior infra-estrutura de pessoal, espaço físico e equipamentos, em escala piloto também se torna necessário o desenvolvimento e

avaliação de equipamentos e procedimentos adequados para que a etapa de extração seja menos exaustiva e prejudicial à qualidade do produto.

Este estudo permitiu avaliar o sistema asséptico piloto desenvolvido por Faria (2003) e conhecer a logística de produção da água de coco, já que as informações fornecidas pelas indústrias do setor são insuficientes, e na grande maioria, são patenteadas ou são de acesso restrito. Também foi possível entender as dificuldades do processamento sem conservadores como o metabissulfito, utilizados hoje na indústria de água de coco esterilizada. Contudo, o metabissulfito além de auxiliar na conservação, altera o sabor natural da água de coco e é considerado tóxico para algumas pessoas, devido, principalmente, ao desenvolvimento de reações alérgicas (Campos, 1993; Sapers, 1993).

Para realização deste estudo foram executadas duas etapas distintas: uma para desenvolver uma formulação padrão para a água de coco a ser utilizada nos processamentos e outra para avaliação do desempenho do sistema asséptico na sua conformação original e após algumas modificações, estabelecendo também as melhores condições de tempo e temperatura de processo. O estudo da estabilidade da água de coco dos lotes produzidos fez parte da avaliação da eficiência do sistema.

Os objetivos desta pesquisa foram:

- ↳ Escolher uma formulação com base na adição de ácidos e açúcares, visando a padronização da água de coco para os processamentos;
- ↳ Avaliar o desempenho da linha de processamento piloto quanto a sua eficiência em produzir água de coco comercialmente estéril e realizar as adaptações possíveis e necessárias;
- ↳ Estudar a estabilidade da água de coco acondicionada em garrafa plástica e gerar dados relacionados às suas características físico-químicos microbiológicas e sensoriais, estabelecendo também sua vida útil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SISTEMA ASSÉPTICO

O sistema asséptico pode ser resumido como o processo capaz de obter e acondicionar um produto comercialmente estéril, em uma embalagem pré-esterilizada, sendo que este acondicionamento é realizado em um ambiente controlado ou áreas limpas, seguido de um fechamento asséptico e hermético. Assim, ao final do processo, é alcançada a "esterilidade comercial", ou seja, a esterilidade necessária para que o produto esteja em condições de estocagem e distribuição sem refrigeração (Reuter, 1988; Holdsworth, 1992; Buchner, 1993; Faria, 1993).

O sistema asséptico é utilizado para obtenção de produtos que se destinam à estocagem e comercialização à temperatura ambiente, ou quando se quer uma maior preservação das qualidades naturais do produto. É aplicado aos produtos esterilizados por processos térmicos e não-térmicos. Para os produtos não-esterilizados é necessária uma cadeia de frio ou a utilização de conservadores para auxiliar no controle da proliferação de microrganismos e outras alterações indesejáveis (Reuter, 1988).

O processamento asséptico consiste basicamente das seguintes etapas, segundo Buchner (1993):

- esterilização do produto antes do acondicionamento;
- esterilização do material de embalagem ou recipiente, e das tampas antes do acondicionamento;
- esterilização das instalações assépticas antes das operações (unidades térmicas, linha para produtos, ar e gases estéreis, acondicionadora e zona de máquinas);
- manutenção da esterilidade do sistema durante sua operação;
- esterilização de todas as partes que constituem o sistema como ar, gases e água estéreis e;
- produção de embalagens hermeticamente fechadas.

Como todos os processamentos, o sistema asséptico tem suas vantagens e desvantagens, a saber (Reuter, 1988; Buchner, 1993; Faria, 1993; Grimm, 1998; Romano *et al.*, 1998):

*Vantagens:*

- por estarem livres de contaminação, é possível a estocagem dos produtos sem refrigeração por um longo período de tempo;
- uma grande variedade de tipos de material de embalagem pode ser utilizada, pois esta não necessita ser submetida aos mesmos tratamentos aplicados aos alimentos, como altas temperaturas, por exemplo;
- possibilita o processamento e acondicionamento contínuo mais rápido;
- reduz o consumo de energia durante as etapas de esterilização do produto, da embalagem e durante o armazenamento, já que não necessita de uma cadeia de frio.

*Desvantagens:*

- a sua maior complexidade requer um alto capital de investimento, assim como um treinamento especializado de pessoal;
- produtos não homogêneos necessitam ser esterilizados separadamente;
- alimentos particulados não são facilmente manuseados;
- produtos sólidos são de difícil processamento, portanto, esse sistema tem sido mais utilizado para produtos líquidos (leites, sucos, vinhos, etc), pastosos (produtos de leite, iogurtes, queijos, produtos de tomate, purê de frutas) e ainda produtos particulados (purê de frutas com pedaços e outros).

Os componentes principais de um sistema asséptico podem ser divididos em acondicionamento asséptico, esterilização de embalagens e processamento asséptico, que estão detalhados nos itens a seguir.

### 2.1.1 Acondicionamento Asséptico

A contaminação de alimentos produzidos assepticamente por microrganismos do ambiente, no momento do acondicionamento, é um dos fatores mais importantes na sua deterioração. A contaminação do ar não pode ser visualmente detectada devido ao tamanho das partículas na atmosfera. Pela sedimentação, partículas maiores que 10 $\mu$ m dificilmente são encontradas na atmosfera, e as menores partículas detectadas visualmente são maiores que 30 $\mu$ m. Entretanto, os microrganismos aderidos às partículas suspensas no ar variam entre 1 e 5 $\mu$ m (Roland, 1996).

Em 1967, a definição de ar limpo foi gerada pela *Federal Standard 209*. Esta norma classificou o grau de limpeza do ar em áreas limpas, tomando como base as partículas com tamanho de 0,5 $\mu$ m. Assim sendo, quando se falava que uma determinada área era Classe 10.000, estava-se definindo que nesta área a quantidade de partículas de 0,5 $\mu$ m/ft<sup>3</sup> de ar, era igual ou inferior a 10.000. Este documento revisado gerou a última versão (E), sendo introduzido no Sistema Internacional (SI) de medidas. Entretanto, em 2001 esta norma foi cancelada e substituída pela ISO 14644-1, mantendo os mesmos princípios, contudo com notações diferentes (Bennett, 2001 e 2002). Na Tabela 1, está apresentada a correlação entre as duas normas.

Portanto, segundo a Tabela 1, uma sala limpa antes denominada pela FS 209E de Classe 10.000, agora é denominada de ISO classe 7. Essa é a classe mais utilizada na indústria de alimentos, entretanto, existem configurações onde o ambiente de acondicionamento é ISO 7 e o ponto de enchimento de produtos é ISO 5, as chamadas “ilhas”, que proporcionam flexibilidade e custos operacionais menores (Moia, 2001, Petrus *et al.* 2003; Petrus e Faria, 2003).

**Tabela 1. Correlação entre normas para classificação de salas limpas e ambientes controlados.**

CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE PARTÍCULAS EM SUSPENSÃO NO AR							
ISO 14644-1			FEDERAL STANDARD 209E				
Classe	$\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$	$\geq 5,0\mu\text{m}/\text{m}^3$	Classe	$\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$	$\geq 5,0\mu\text{m}/\text{m}^3$	$\geq 0,5\mu\text{m}/\text{ft}^3$	$\geq 5,0\mu\text{m}/\text{ft}^3$
ISO classe 1	-	-	-	-	-	-	-
ISO classe 2	4	-	-	-	-	-	-
ISO classe 3	35	-	<b>Classe 1</b>	35	-	1	-
ISO classe 4	352	-	<b>Classe 10</b>	353	-	10	-
ISO classe 5	3 520	29	<b>Classe 100</b>	3 530	-	100	-
ISO classe 6	35 200	293	<b>Classe 1 000</b>	35 300	247	1 000	7
ISO classe 7	352 000	2 930	<b>Classe 10 000</b>	353 000	2 470	10 000	70
ISO classe 8	3 520 000	29 300	<b>Classe 100 000</b>	3 530 000	24 700	100 000	700
ISO classe 9	35 200 000	293 000	-	-	-	-	-

Fonte: Petrus e Faria (2003) adaptado de Bennett (2002).

O sistema de fluxo de ar para salas limpas é formado por um dispositivo equipado com um pré-filtro, um circulador de ar de velocidade variável, um sistema de distribuição de ar e um filtro do tipo *High Efficiency Particulate Air* (HEPA), para remover partículas de  $0,3\mu\text{m}$ , microrganismos e seus esporos (Sveum *et al.*, 1992; Faria, 1993; Chevroton, 1996; Rammert, 1996; Roland, 1996).

Para que uma sala limpa esteja pronta para operação, previamente é necessário que seja feita a sua certificação. A certificação consiste em uma série de testes realizados para a caracterização do desempenho deste ambiente, atestando sua conformidade com as especificações requeridas (Bennet, 1997).

Segundo as Recomendações Normativas da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC-RN-005-97), os testes de certificação devem ser realizados no ambiente como construído, em repouso e em operação. Dependendo do tipo de sala limpa, alguns testes são específicos, para cada tipo de sala e situação.

Existem três tipos distintos de salas limpas:

- Com fluxo unidirecional (laminar);
- Com fluxo não unidirecional (turbulento);
- Com fluxo misto.

Os testes de certificação são divididos em testes primários, opcionais e ambientais. Os dois últimos tipos são ditos como opcionais, contudo, os primeiros são exclusivamente relacionados a classificação do ar quanto às partículas em suspensão, conforme requerimento da norma ISO 14644-1.

Os testes primários compreendem:

- Testes de velocidade, volume e uniformidade do fluxo de ar;
- Testes de vazamento no sistema de filtragem;
- Contagens de partículas totais em suspensão no ar;
- Contagem de partículas viáveis;
- Testes de pressurização da sala.

Os testes opcionais compreendem:

- Testes de paralelismo do fluxo de ar;
- Testes de infiltração por indução;
- Testes de recuperação;
- Contagem de partículas sedimentadas.

Os testes ambientais compreendem:

- Testes do nível e uniformidade de iluminação;
- Testes de ruído;
- Testes de uniformidade de temperatura;
- Testes de vibração.

As células vegetativas, normalmente, estão presentes em maior número que os esporos bacterianos e de bolores. Em geral, aerossóis gerados em

ambientes têm primeiramente esporos de bactérias, depois bolores e leveduras. Quando a fonte de contaminação é humana, o tipo predominante é de células vegetativas, especialmente *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e outros organismos associados com o trato respiratório, cabelo e pele (Sveum *et al.*, 1992).

A *Federal Standard 209E* e a ISO 14644-1 estabeleceram padrões baseados somente na enumeração de partículas que não são necessariamente viáveis. Favero *et al.* (1984) citado por Sveum *et al.* (1992), recomendam o uso dos padrões de ar em áreas limpas da *National Aeronautics and Space Administration (NASA)* como ponto de referência para determinação da qualidade do ar de uma planta de acondicionamento asséptico.

O “*Standards for Clean Rooms and Work Stations for the Microbiology Controlled Environment*” da NASA define que áreas limpas classe ISO 5, 7 e 8 devem ter um máximo de 3,5, 17,6 e 88,4 UFC/m<sup>3</sup> de ar, respectivamente (Sveum *et al.*, 1992).

### **2.1.2 Esterilização de Embalagens**

A superfície da embalagem, que entra em contato com alimentos acondicionados assepticamente, é outra fonte de contaminação que contribui para deterioração dos mesmos. Muitas embalagens podem ser estéreis logo após a fabricação, como as plásticas, devido às altas temperaturas de extrusão, entretanto, podem ser facilmente recontaminadas durante o manuseio e estocagem, devido à deposição de poeira e microrganismos do ar. Vários processos vêm sendo desenvolvidos para esterilização da embalagem, previamente ao acondicionamento do alimento, visando a esterilidade comercial (Joyce, 1993; Holdsworth, 1992).

Em geral, os níveis de contaminação variam entre 1-10 microrganismos por  $\text{cm}^2$  de superfície do material que não tenha sido manuseado. Contudo, o material que foi manuseado, em geral, apresenta alta contagem de gram negativos (Joyce, 1993). Petrus *et al.* (2001) detectaram uma contagem total de  $1,9 \times 10^1$  a  $2,1 \times 10^2$  UFC por garrafa de PET de 500mL. Abreu (2001) detectou uma contaminação média de  $1,32 \times 10^2$  UFC/garrafa de PET de 500mL. Chevroton (1996) recomenda que a contaminação inicial de garrafas seja controlada, devendo esta ser inferior a 20UFC por garrafa.

A *Food and Drug Administration (FDA)*, usualmente recomenda um total de 5 reduções decimais na contaminação de embalagens de 100-1000 $\text{cm}^2$ . Para o *C. botulinum* são requeridas 10 reduções decimais no material de embalagem, segundo o *FDA*. Contudo, esse microrganismo é 2,5 vezes menos resistente ao peróxido de hidrogênio que o *B. subtilis* var. *globigii*, que é considerado o mais resistente aos agentes químicos de esterilização de material de embalagem. Quando utilizado o peróxido de hidrogênio, são requeridas 4 reduções decimais de *B. subtilis* var. *globigii* (von Bockelmann, 1991; Buchner, 1993).

Os processos de esterilização de embalagens podem ser divididos em físicos e químicos. Os físicos utilizam calor (ar quente, vapor, calor de extrusão e gases aquecidos), ação mecânica (jatos de água e enxágüe) e irradiação (ionizante, ultravioleta e infravermelho), enquanto que os químicos, utilizam agentes com ação biocida como o peróxido de hidrogênio, ácido peracético, etanol, óxido de etileno, ozônio e cloro. A combinação de métodos físicos e químicos, em geral, é mais eficiente, sendo assim mais utilizado pela indústria. Destaca-se entre eles o uso de peróxido de hidrogênio a 30-35% combinado ao calor (ar quente) e/ou à irradiação ultravioleta (Reuter, 1988; Holdsworth, 1992).

Devido à baixa resistência térmica dos plásticos, o método químico que utiliza a combinação de peróxido de hidrogênio e ácido peracético (0,1 a 1,2%) para esterilização deste material, está sendo bastante pesquisado, pois este ácido

apresenta boa atividade esterilizante em temperaturas próximas à ambiente (Toledo, 1975; Baldry, 1983; Leaper, 1984abc; Reuter, 1988; Oliveira e Padula, 1988; Block, 1991; Willoft, 1993; Roland, 1996; Sagripanti e Bonifacino, 1996; Blakstone *et al*, 1999; Petrus, 2000; Abreu, 2001; Abreu e Faria, 2004).

#### 2.1.2.1 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é o esporicida químico mais utilizado para esterilização de cartonados e foi regulamentado pelo FDA nos EUA em 1981, mas já estava em uso na Europa há vários anos.

Soluções de peróxido de hidrogênio em concentrações não superiores a 35%, em contato com a superfície aderida ao alimento, podem ser utilizadas para esterilização de plásticos poliolefínicos (FDA, 1981 citado por Brown, 1992).

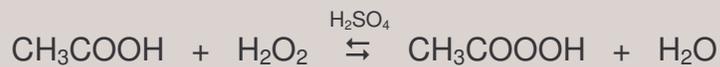
Uma das propostas de mecanismo para explicar a participação do peróxido de hidrogênio na destruição de microrganismos, envolvem a reação do íon superóxido ( $O_2^-$ ) com o peróxido de hidrogênio para a produção do radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ). O radical hidroxil é dito como o mais forte oxidante conhecido, a saber (Block, 1991):



O radical hidroxil é altamente reativo e pode atacar a membrana lipídica, o ácido desoxirribonucléico (DNA) e outros componentes essenciais da célula. Estudos também indicam um aumento da formação de radicais hidroxil e da eficiência biocida do peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição. O peróxido de hidrogênio pode ser facilmente eliminado por aquecimento ou pela ação da enzima catalase, dando como produto final água e oxigênio (Block, 1991).

### 2.1.2.2 Ácido Peracético

É um produto químico com os atributos do peróxido de hidrogênio, como a efetiva capacidade germicida e esterilizante, sem produtos de decomposição e alta solubilidade em água, grande solubilidade lipídica e livre da desativação por catalase e peroxidase. É também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético. É obtido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com o peróxido de hidrogênio, na presença de ácido sulfúrico como catalisador, como descrito na reação a seguir (Block, 1991):

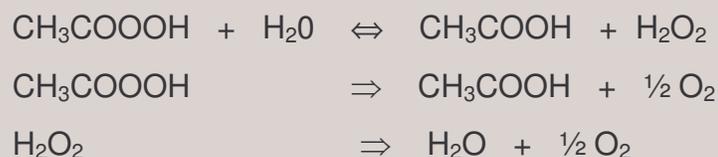


Além de ser um efetivo biocida sem residual tóxico, o ácido peracético é um agente antimicrobiano mais potente que o peróxido de hidrogênio, tendo uma rápida ação, a baixas concentrações, sobre um amplo espectro de microrganismos. É esporicida em baixas temperaturas, e continua efetivo na presença de material orgânico (Baldry, 1983).

O ácido peracético é de especial interesse para a indústria de alimentos por deixar um residual constituído de ácido acético, oxigênio, água e peróxido de hidrogênio. Uma formulação de ácido peracético (P-3-oxônia ativa) foi autorizada pelo FDA em 1986, permitindo a utilização de seus ingredientes como aditivos indiretos de alimentos em soluções sanificantes (Block, 1991).

Em testes de sanificação feitos com embalagens de polietileno, com uma solução contendo 0,1% de ácido peracético e 20% de peróxido de hidrogênio, fazendo-se aplicação na forma de *spray* e ativação com ar quente, esporos de *B. subtilis* foram eliminados após um tratamento de 12 segundos a 65°C (Dallyn, 1980 citado por Block, 1991).

Os compostos peroxigenados são, em geral, termodinamicamente instáveis. Para reduzir este efeito a solução é enriquecida com ácido acético e peróxido de hidrogênio, adicionando-se ainda um estabilizante. O aumento da temperatura também pode acelerar a sua decomposição (Block, 1991). A rota de decomposição do ácido peracético pode ser observada, em três etapas, conforme abaixo (Fraser, 1986):



Há poucos estudos sobre o mecanismo de ação do ácido peracético, mas esses confirmam sua ação como a de um poderoso agente oxidante assim como outros peróxidos. Ataca as ligações sulfidríla (-SH) e dissulfeto (S-S) de enzimas, outros metabólitos são oxidados e duplas ligações são quebradas. Sugere-se que o ácido peracético destrói a função quimiosmótica da membrana citoplasmática lipoprotéica, provocando a saída de substâncias através da membrana e a ruptura da célula. Esta ação desnaturadora de proteínas pode explicar sua ação como um potente esporicida (Fraser, 1986; Baldry e Fraser, 1988 citado por Block, 1991).

O ácido peracético causa a morte de bactérias, bolores e leveduras em 5 minutos ou menos, em concentrações menores que 100 mg/L (0,01%). Esporos de bactérias necessitam de 500 a 30.000 mg/L (0,05 a 3%) para uma inativação de 15 minutos a 15 segundos, em temperatura ambiente. Assim como o peróxido de hidrogênio, o ácido peracético tem sua ação biocida influenciada pela concentração, temperatura e tipo de microrganismo (Greenspan e MacKellar, 1951; Han *et al.*, 1980; Baldry, 1983; Leaper, 1984<sup>abc</sup>; Block, 1991; Sagripanti e Bonifacino, 1996).

Faria (2001) desenvolveu um sistema de esterilização química de garrafas onde o agente sanificante é aplicado por aspersão e pode ser utilizado à

temperatura ambiente ou aquecido (28 a 50°C). O residual de sanificante é reduzido através de aspersão com água estéril, aquecida ou não. Petrus (2000) e Abreu (2001) utilizaram este sistema para sanificar garrafas de PET com solução comercial de ácido peracético enriquecida com peróxido de hidrogênio (Proxitane 1512<sup>®</sup>), obtendo resultados satisfatórios quanto ao número de reduções decimais e à estabilidade dos produtos acondicionados em garrafas sanificadas.

### 2.1.2.3 Embalagens para sistemas assépticos

O acondicionamento à temperatura ambiente ou abaixo desta, geralmente é praticado em sistemas assépticos, e o desenvolvimento de processos de esterilização de embalagens em temperaturas moderadas, possibilitou o uso de novos tipos de material de embalagem, entre eles os cartonados e os termossensíveis como os plásticos. As embalagens plásticas apresentam-se em vários formatos e tamanhos, podendo ser cilíndricas, ovais, quadradas, lisas ou com outros formatos especiais. Em particular, os frascos e garrafas podem ser fabricados por extrusão-sopro ou por injeção-estiramento-sopro. Muitas garrafas são feitas apenas de uma resina (monocamada), mas um crescente número de embalagens do tipo multicamadas está encontrando uso como embalagens de alta barreira e de elevada resistência térmica e mecânica, para aumentar a vida útil de alimentos (Brown, 1992; Romano *et al.*, 1998).

As embalagens cartonadas são as mais utilizadas em sistemas assépticos, contudo as embalagens plásticas vêm conquistando crescente espaço neste setor, por apresentarem características convenientes, e algumas vantagens frente aos cartonados, segundo levantamento feito por Romano *et al.*(1998), como: várias opções de volume e *design*; produção verticalizada; fácil reciclagem; transparência; possibilidade de serem esterilizadas durante a extrusão (*blow/fill/seal*) e facilidade de manuseio e fechamento depois de abertas.

Contudo, segundo Romano e Faria (1996) e Romano *et al.* (1998), a utilização de embalagens plásticas pode apresentar algumas desvantagens, como: deformação por formação de vácuo e baixa barreira aos gases, aromas,

vapores de água e à radiação. Entretanto, já existem tecnologias disponíveis para minimizar essas desvantagens.

Se forem considerados os problemas que os cartonados apresentam de trincas e microfuros na folha de alumínio, e os defeitos nas regiões de solda, essa embalagem termina por ter uma permeabilidade maior do que as plásticas.

Os materiais de embalagem, para garrafas, mais utilizados na indústria de alimentos são: polietileno de alta densidade, monocamada ou multicamada (PEAD), policloreto de vinila (PVC) e polietileno tereftalato (PET) na forma de copolímero e PET termofixado ou heat set (Turtle,1993).

#### 2.1.2.3.1 Embalagens para água de coco

As embalagens plásticas utilizadas pela indústria de água de coco pasteurizada/refrigerada e congeladas são garrafas de polietileno tereftalato (PET) com pigmentação verde (Leber, 2001). Esta pigmentação, além de relacionar esta cor ao coco, aumenta a barreira da embalagem à radiação uv e visível. Contudo, não foram encontrados estudos sobre o efeito da radiação sobre a qualidade da água de coco. Entretanto, a água de coco possui lipídios e vitaminas como o ácido ascórbico, sendo que a ação da radiação pode acelerar a oxidação dos lipídios e causar a fotoxidação de suas vitaminas (Leber e Faria, 2004).

Há também a comercialização da água de coco *in natura* em garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD) e copos de polipropileno (PP), entretanto, estas águas se destinam ao consumo imediato ou de no máximo três dias, mantidas sob refrigeração. Ou seja, estas duas embalagens têm somente a função de contenção do produto, mas com pouco efeito sobre a estabilidade. Entretanto, devido à opacidade dessas embalagens, elas também oferecem proteção à penetração de radiação.

Outro tipo de embalagem, comum no mercado, são as caixas cartonadas, tipo TetraBrik<sup>®</sup>, que têm uma ótima barreira à penetração de luz, entretanto,

apresentam maior permeabilidade ao oxigênio, pelos motivos mencionados anteriormente, ou seja, problemas de microfuros e trincas na folha de alumínio (Leber e Faria, 2004).

### **2.1.3 Processamento Asséptico**

A esterilização comercial de líquidos para sistemas assépticos é caracterizada pela utilização de processos que preservam ao máximo as características naturais do produto, ou utilizando altas temperaturas por um curto espaço de tempo (HTST e UHT) ou sem aquecimento, como ocorre nos métodos não convencionais como pulso elétrico, alta-pressão e membranas (Buchner, 1993). Entretanto, os métodos térmicos de pasteurização e esterilização ainda são os mais utilizados, testados e seguros atualmente.

Para a esterilização comercial de alimentos líquidos de alta acidez ( $\text{pH} < 4,5$ ), como muitos sucos e néctares, a pasteurização por alta-temperatura e curto-tempo (HTST), é suficiente para evitar a deterioração por esporos mesófilos, incluindo *C. botulinum*. São utilizadas em geral, temperaturas entre 75 e 95°C por 10 a 60 segundos (Dryer e Deibel, 1992; Komorowski e Early, 1992; Buchner, 1993).

Para atingir a esterilidade comercial de alimentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ), como o leite ( $\text{pH} > 6,0$ ) e água de coco ( $\text{pH} \cong 5,00$ ), é necessário um tratamento térmico mais intenso, ou seja, a esterilização. Os processos de esterilização que utilizam ultra-alta temperatura (UAT) tornaram-se tradicionais no tratamento de leite fluido, cujos binômios variam de 135 a 150°C entre 1 e 10 segundos, tornando o leite comercialmente estéril com poucas alterações físico-químicas e sensoriais. Estes tratamentos eliminam microrganismos deteriorantes e patogênicos, sendo o *Clostridium botulinum* o microrganismo alvo desse tipo de tratamento térmico em alimentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ) (Dryer e Deibel, 1992; Komorowski e Early, 1992; Buchner, 1993).

O processamento UAT pode utilizar sistemas de aquecimento direto, pela injeção do líquido no vapor ou vice-versa, ou aquecimento indireto, através de trocadores de calor tipo placas ou tubulares, utilizando água ou vapor, sendo considerados mais práticos e econômicos (Reuter, 1998; Holdsworth, 1992).

Os trocadores de calor mais utilizados estão descritos a seguir:

- *Trocador de calor tipo placas*: quando aplicado no sistema asséptico serve tanto para aquecimento como para resfriamento. Tem um grande poder de troca devido à larga superfície de contato e a geração de fluxo turbulento com baixo custo. Como desvantagem ele apresenta curvas e junções que não suportam o aumento de pressão geralmente causada pela presença de pequenas partículas como fibras, sendo mais recomendado para produtos não particulados.

- *Injeção de vapor*: é o mais rápido método de aquecimento de produtos líquidos. Em frações de segundo a temperatura de esterilização desejada é obtida. Combinado a um rápido resfriamento, pela injeção do produto aquecido em uma câmara a vácuo, e à evaporação de uma equivalente quantidade de água, obtém-se um alto nível de qualidade do produto.

- *Infusão do líquido no vapor*: a infusão de um fino filme do líquido em uma atmosfera de vapor promove um rápido aquecimento. O rápido resfriamento por infusão do líquido aquecido em uma câmara a vácuo e evaporação da água, fornece um produto de qualidade similar ao obtido por injeção de vapor.

- *Aquecimento por fricção*: o líquido é aquecido pela rotação entre um disco móvel e outro estático, combinando aquecimento e homogeneização.

Os métodos de esterilização mencionados são perfeitamente aplicáveis aos produtos líquidos, livres de partículas. Os líquidos particulados exigem processos

de esterilização mais específicos, devido à falta de homogeneidade na distribuição do calor (Buchner, 1993).

#### 2.1.4 Binômios de tempo e temperatura de esterilização

Segundo Quast (1976), a base científica para avaliar a intensidade de esterilização, para preservação de alimentos de baixa acidez, pode ser descrita pela Equação 1, que é uma representação do modelo de Bigelow (1921).

$$\log \left( \frac{N_0}{N} \right) = \left( \frac{t}{D_{ref}} \right) \times 10^{\frac{(T - T_{ref})}{z}} \quad (1)$$

onde:

$N_0$  é a população inicial de microrganismos por grama de alimento;

$N$  é a população final de microrganismos por grama de alimento;

$t$  é o tempo do tratamento térmico em minutos;

$D_{ref}$  é o tempo em minutos, na temperatura de referência, requerido para reduzir a população microbiana a um décimo de seu valor;

$T$  é a temperatura do tratamento térmico aplicado;

$T_{ref}$  é a temperatura de referência;

$z$  é a variação de temperatura requerida para reduzir o valor  $D$  a um décimo de seu valor.

Para a destruição de esporos de microrganismos, normalmente, a temperatura de referência é 121,1 °C. Para avaliar a intensidade de cozimento ou da esterilização, em relação aos microrganismos pouco resistentes, emprega-se a temperatura de 100 °C. Por exemplo, para a destruição de células vegetativas em alimentos ácidos poder-se-ia empregar temperaturas de referência mais baixas (Quast, 1976).

Considerando que o número de reduções decimais (RD) é calculado pela Equação 2 (Pflug, 1987a).

$$RD = \log \left( \frac{N_0}{N} \right) \quad (2)$$

Então, a Equação 1, pode ser reescrita conforme a Equação 3.

$$RD = \left( \frac{t}{D_{ref}} \right) \times 10^{\frac{(T - T_{ref})}{z}} \quad (3)$$

A partir dessa equação, pode-se calcular o número de RD atingidas por diferentes tratamentos térmicos, em relação a uma temperatura de referência.

Uma outra grandeza muito utilizada para avaliar o efeito do tratamento térmico é o valor F. O valor F é o tempo em minutos, ou equivalente em minutos, requerido para causar uma determinada destruição de um microrganismo a uma temperatura T. Segundo Pflug (1978) e Pflug (1987a), o valor F pode ser definido pelas Equações 4 e 5.

$$F_T = D_T (\log N_0 - \log N) \quad (4)$$

$$F_T = D_T \cdot RD \quad (5)$$

Colocam-se, freqüentemente, dois índices juntos ao valor F, que são o valor z e a temperatura de referência (T), ou seja,  $F_T^z$ .

O valor  $F_0$  é o tempo, em minutos, a 121°C para causar uma determinada destruição de esporos de *C. botulinum*, considerando  $z=10^\circ\text{C}$ , ou seja,  $F_0 = F_{121}^{10}$ . Para efeito de segurança alimentar, é requerido para produtos enlatados de baixa acidez, um  $F_0$  de 3 minutos, ou equivalente, para causar 12 reduções decimais em esporos de *C. botulinum*, considerando seu  $D_{121^\circ\text{C}} = 0,25$  minutos (Pflug *et al.*, 1985). Entretanto, Pflug *et al.* (1985) relacionam diferentes valores F com diferentes valores de pH entre 4,6 e 6,0, sendo que, para pH próximo de 5,0 (como o da água de coco), um valor F mínimo de 1,6 minutos seria considerado seguro e equivalente, para destruição de 12D de esporos de *C. botulinum*.

#### 2.1.4.1 Binômios de esterilização da água de coco

A literatura sobre água de coco processada termicamente é muito limitada, principalmente, tratando-se de processamento térmico por ultra-alta temperatura, portanto, grande parte das informações é obtida por meio de entrevistas com profissionais do ramo, ou extrapolações de resultados de pasteurização e/ou comparação com dados de outros produtos.

A indústria Amacoco aplica o binômio de tempo e temperatura de 135°C por 4 segundos na água de cocos da variedade híbrida maduros (11 meses). Entretanto, esta água é adicionada de metabissulfito (concentração não revelada) para conter as reações tanto enzimáticas quanto oxidativas, atingindo uma vida útil de oito meses à temperatura ambiente (Custódio, 2004).

#### 2.1.5 Regulamentação e avaliação da eficiência de sistemas de processamento e acondicionamento assépticos

Nos EUA, devido ao relato de incidentes causadores de surtos de botulismo, entre os anos de 1963 e 1971, a indústria foi levada a solicitar normas para o processamento térmico de alimentos enlatados comercialmente. O FDA elaborou um plano que foi redigido como uma norma de boas práticas de manufatura, recodificada como 21 CFR 113 (*Title 21 Part 113 do Code of Federal Regulations*) e intitulada “Alimentos de baixa acidez processados termicamente e

embalados em recipientes fechados hermeticamente”. Este plano se tornou efetivo em 1973 e foi modificado em 1979 (ITAL, 1990). Na seção 113.40 (item g) estão detalhadas as normas para equipamentos e procedimentos de sistemas de processamento e embalagem assépticos (ITAL, 1990).

Bernard et al. (1990) resumem perfeitamente as etapas que compõem o processo de avaliação e validação de um novo equipamento de processamento e acondicionamento asséptico.

Antes do funcionamento comercial de um novo equipamento de processamento e acondicionamento asséptico são necessários testes de avaliação e validação. Primeiramente, o equipamento deve ser colocado em condições ideais de operação. Isto é feito em conjunto pelo operador, pelo fabricante do equipamento e por uma autoridade técnica no assunto. O fabricante melhora a performance do sistema, o operador fornece informações sobre as exigências do sistema e a autoridade técnica providencia conhecimentos específicos sobre o sistema de esterilização, seus controles e requerimentos legais. O trabalho em conjunto irá identificar e quantificar os fatores críticos associados com cada fase da operação do equipamento. O estabelecimento dos fatores críticos vem, então, ser a base para conduzir os testes biológicos de esterilidade e estabelecer um guia operacional para o equipamento. Dependendo do resultado dos testes biológicos, os fatores críticos podem ser alterados.

Depois do equipamento estar em condições de operação, serão realizados os testes biológicos de esterilidade, utilizando-se microrganismos indicadores, que dependem do tipo de método ou agente de esterilização adotado. Estes testes são conduzidos nas linhas de esterilização de produto, acondicionamento e esterilização das embalagens. Os microrganismos teste mais usados são o *B. stearothermophilus* e *B. polymyxa*, quando o agente de esterilização for o calor, e o *B. subtilis* A ou var. *globigii*, quando o agente for à base de peróxido de hidrogênio.

A validação do equipamento será feita depois que todos os fatores críticos forem controlados com a ajuda dos testes biológicos. Então, procede-se o processamento de uma batelada de produto inoculado com microrganismos teste. Geralmente, são testadas cinco diferentes temperaturas, ou seja, cinco diferentes níveis de destruição térmica. Cerca de 100 unidades são coletadas, de cada temperatura, incubadas e observadas. Para que o sistema seja considerado validado, o número de reduções decimais deve ser equivalente ao que foi definido teoricamente, com base no desempenho esperado.

#### 2.1.5.1 Controle de qualidade de sistemas assépticos

Segundo von Bockelmann (1988), a proporção de defeitos aceitáveis para um sistema asséptico é de 1 unidade defeituosa em 1.000 produzidas (1:1000), sendo que a proporção de 1:10.000 já é considerada ambiciosa.

Quão grande deve ser uma amostra para que seja detectado um possível risco, tão pequeno quanto 1:10.000? Segundo von Bockelmann (1974) citado por Ahvenainen (1988), a segurança na avaliação desta amostra depende somente do seu tamanho. Um plano de amostragem não pode ser baseado na porcentagem que esta amostra representa, mas somente no número fixo de amostras. Existem linhas assépticas com capacidade de produzir milhares de unidades por hora, como é o caso da TBA22, que produz 20.000 unidades/hora (Tetra Pak, 2005), portanto, a análise de uma porcentagem representativa desta linha de produção seria um procedimento antieconômico. Segundo Ahvenainen (1988), um número de 500 a 600 unidades é recomendado para realização de testes com novas linhas assépticas, com 95% de confiança. Para equipamentos em escala piloto, ou seja, com capacidade de produção de centenas de unidades por hora, é necessária a adaptação das recomendações de von Bockelman e Ahvenainen.

Para avaliações microbiológicas, alguns cientistas têm recomendado uma amostragem de cerca de 0,1 a 1% do lote, com ênfase para que a coleta seja realizada em diferentes momentos, como no início e no final da produção, ou

antes e depois de intervenções operacionais, como por exemplo, a mudança de material de embalagem (Farahnik, 1982). Devem ser levados em conta a qualidade dos métodos de controle, custos do produto e da amostragem, as conseqüências que possíveis defeitos causariam ao consumidor, o nível de defeitos desejados e os pontos críticos da produção (von Bockelmann, 1974 citado por Ahvenainen, 1988).

Normalmente as amostras para avaliação microbiológica são incubadas a 30-33°C por 4-7 dias e inoculadas em placas para enumeração das colônias. De acordo com a *IDF Standart nº 48 (International Dairy Federation)*, recomenda-se que não sejam encontradas mais do que 100 colônias por mL de leite UHT. A presença de uma ou duas colônias poderia ser atribuída à contaminação atmosférica ou erro humano durante as análises (Farahnik, 1982).

Segundo Custódio (2004), a indústria Amacoco retira aleatoriamente cinco unidades para incubação por cinco dias a 35°C, e posteriormente, realiza inoculação em placas com meios específicos para observar a presença ou não de bolores, leveduras e bactérias.

Apenas a análise do produto final não é suficiente para garantir a segurança microbiológica de um sistema asséptico. Outras medidas de controle têm que ser utilizadas como complemento (Ahvenainen, 1988; von Bockelman, 1988). Segundo von Bockelmann (1988) e Cerf (1988), os riscos microbiológicos de uma linha de processamento e acondicionamento asséptico podem vir da matéria-prima, preparação (formulação), esterilização insuficiente, tubulações, tanques, equipamento de acondicionamento, embalagens e ar do ambiente de acondicionamento. Portanto, são necessários controles de todos esses componentes do sistema juntamente ao controle do produto final.

Para realizar a avaliação da contaminação de superfícies e ambientes existem metodologias específicas que são aplicadas conforme a característica de

cada linha de processamento. Para superfícies grandes ou de difícil acesso como tanques, tubulações e embalagens, normalmente é utilizado o método da solução de enxágüe descrito por Sveum et al. (1992). Água ou solução salina estéril é colocada no interior do recipiente, e este é agitado, ou a solução é recirculada de forma padronizada para a mais completa remoção de possíveis sobreviventes (Joyce, 1993). Tais soluções de enxágüe devem conter um neutralizante no caso de haver resíduos de detergentes ou sanificantes. Em alguns casos, durante a própria realização do método ocorre a diluição dessas substâncias a níveis sub-inibitórios (Creminiux e Fleurette, 1991; Egushi e Massaguer, 1995; Sutton, 1996).

Para avaliação de superfícies de paredes, teto, mesas e de alguns utensílios podem ser utilizados os métodos do *swab*, da esponja e placas de *RODAC* (*Replicate Organisms Direct Agar Contact*). O *swab* é mais recomendado para amostragem de pequenas áreas e superfícies irregulares. O método da esponja é recomendado para áreas maiores e a superfície pode apresentar irregularidades. Já as placas de *RODAC* são recomendadas para superfícies lisas e planas, como mesas, paredes e teto. Destaca-se por ser um método rápido e prático, muito útil para avaliações simultâneas ao processamento (Sveum et al., 1992; Andrade e Macedo, 1996).

Para avaliação da contaminação do ar ambiente as duas técnicas mais utilizadas, dentre outras, são a amostragem de ar por sedimentação passiva e sedimentação ativa, essa também chamada de impactação. A sedimentação passiva é fácil e de baixo custo e deposita as partículas em seu estado original, por ação da gravidade em agar seletivo ou não. O método de impactação tem a vantagem de amostrar uma maior quantidade de ar em menos tempo (Sveum et al., 1992; Andrade e Macedo, 1996).

### **2.1.6 Alterações em alimentos produzidos assepticamente**

O uso de altas temperaturas em curto espaço de tempo minimiza as reações químicas responsáveis por sabor e aroma estranho, alterações de cor e perda de valor nutricional. Valores equivalentes de  $F_0$  do processamento asséptico dão uma garantia de alta qualidade comparada aos tratamentos térmicos convencionais (Chambers e Nelson, 1993). A literatura destaca as diferenças entre a qualidade do leite pasteurizado e do esterilizado, sendo que a abordagem sobre outros produtos é limitada. Entretanto, para produtos de origem vegetal como sucos de frutas, bebidas, extratos e purês, certas alterações são características.

Alterações de cor, aroma, sabor, textura e nutricionais podem ocorrer simultaneamente durante o processamento e a estocagem de alimentos. Para todos os processamentos térmicos, os três primeiros agentes que causam perda de qualidade são o abuso térmico, a degradação enzimática e a oxidação. O escurecimento pode ocorrer como uma consequência do abuso térmico e/ou oxidação. Podem ocorrer ainda os fenômenos de hidrólise (de compostos de aroma) e complexação (quelação de metais por polifenóis), entretanto, de menor importância. A atividade residual de enzimas pode causar problemas durante a estocagem. A ação de enzimas, em produtos processados por altas temperaturas e curto tempo, está relacionada à incompleta inativação e/ou a reativação das mesmas durante a estocagem. A peroxidase é uma enzima conhecida por apresentar reativação, a qual é atribuída às frações de suas isoenzimas termoestáveis (Chambers e Nelson, 1993; Goddard, 1996; Adams, 1978).

O residual, ou a presença de oxigênio, pode causar danos ao produto durante o processamento ou acondicionamento asséptico (Toledo, 1986; Chambers e Nelson, 1993; Goddard, 1996). O oxigênio pode causar inúmeras reações indesejáveis como o escurecimento por oxidação do ácido ascórbico e de lipídios. As fontes de oxigênio em alimentos processados assepticamente são o oxigênio dissolvido, o oxigênio incorporado e o oxigênio presente no espaço vazio.

Este último é o mais facilmente controlado. Os demais podem ser retirados por desaeração. O oxigênio pode ainda difundir-se pela embalagem, principalmente nas de origem polimérica (Toledo, 1986; Chambers e Nelson, 1993).

## 2.2 ÁGUA DE COCO

### 2.2.1 Mercado do coco e da água de coco no Brasil

O panorama da cultura do coco no Brasil, em meados de 1986 a 1991, era semelhante a do restante do mundo, ou seja, uma cultura de subsistência, dispersa nas mãos de pequenos produtores. O setor enfrentava vários problemas, como os baixos níveis de produção e produtividade, resultantes principalmente da idade elevada dos coqueiros e da pouca utilização de insumos. Também, a transferência de tecnologia era lenta e onerosa, típica de um setor produtivo de grande potencial, mas de baixo rendimento e pouco retorno (Bliska *et al.*, 1995).

A produção brasileira neste período foi crescente e contínua, porém insuficiente para suprir a demanda interna de coco. Cerca de 80% da produção era comercializada na forma seca e 20% destinava-se ao consumo da água. Deste total produzido, apenas 5% era comercializado nas centrais de abastecimento, nas formas verde e seca com casca. Destacavam-se a CEASA (BA) e a CEAGESP (SP), na comercialização de coco verde, e a CEAGESP e a CEASA (RJ), na comercialização de coco seco (Bliska *et al.*, 1995).

Com o aumento da demanda, pela indústria de alimentos, e insuficiência do mercado interno, em 1989 iniciou-se a importação de coco ralado integral, o que levou ao encerramento das exportações dos cocos com casca e sem casca, até então itens constantes na pauta das exportações brasileiras (Bliska *et al.*, 1995).

Com a abertura do mercado brasileiro para a importação, em meados de 1990, ocorreu a perda do mercado de produtos de coco maduro, para os

produtores asiáticos e africanos, obrigando os pequenos produtores brasileiros, principalmente do Nordeste, a comercializarem o coco verde *in natura* nas regiões praianas e urbanas de outras regiões, para o aproveitamento da água de coco (Abreu, 1999a). Era previsto um crescimento do consumo de água de coco, mas não se acreditava que a demanda atingiria níveis elevados de consumo (Bliska *et al.*, 1995). Entretanto, por ser um produto altamente apreciado por grande parcela da população, este mercado surgiu como promissor (Ranieri, 2000).

O levantamento da Secex (Secretaria de Comércio Exterior) mostra que o Brasil importou mais do que exportou, cerca de 42,3 milhões contra 982 mil dólares, entre os anos de 1996 e 1999. Desde 1995, o país decidiu sobretaxar a importação de coco seco e ralado e estabeleceu, em 1998, barreiras sanitárias à entrada do produto, visando limitar as importações e evitar doenças. A sobretaxa atingiu o Sri Lanka, Indonésia, Malásia, Costa do Marfim e Filipinas (Ripardo, 2000).

Em 1998, o quadro do mercado de coco no Brasil já havia se alterado, o mercado do coco verde cresceu nos últimos anos com o aumento do consumo da água de coco, e com o crescimento das indústrias de acondicionamento, que disponibilizavam o produto vigorosamente no varejo, principalmente, para supermercados, restaurantes e lanchonetes. A água de coco concorre no mercado de refrigerantes e bebidas isotônicas, representando 1,4% desse consumo, que é estimado em cerca de 10 bilhões de litros/ano (FruitSéries 3, 1998).

O Brasil é o oitavo maior produtor mundial de coco, sendo a região Nordeste a maior produtora, seguida das regiões Norte e Sudeste, onde os estados de Minas Gerais e São Paulo estão substituindo algumas plantações de café e laranja por coqueiros, o que aumenta a oferta de água de coco no mercado, podendo o excedente seguir para exportação (FIBGE, 1997; Ranieri, 2000; Oliveira, 2000).

O Brasil produz, por ano, 500 milhões de litros de água de coco e cerca de 7% desse total são destinados à exportação. Outros países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai, são compradores da água de coco brasileira. Agora os Estados Unidos e alguns países da Europa também estão conhecendo o produto. A Embrapa aposta que o consumo da água de coco no exterior pode representar grande fonte de divisas para o país, ressaltando que o maior problema enfrentado pelas empresas que exportam água de coco para a Europa é a conservação do produto até chegar ao seu destino. Normalmente, resíduos da casca da fruta deixam a água rosada depois de alguns dias (Agência Brasil, 2004).

No Brasil, o coco verde representa garantia de emprego e geração de renda para os produtores. É a segunda maior atividade produtiva do Nordeste, depois da cana de açúcar, e emprega cerca de 400 mil pessoas entre plantio, colheita e distribuição do produto. Para o nordestino, o coco é básico, desde a sua cultura, agricultura e hábito alimentar, e a exportação representa uma alternativa de mercado para o agricultor (Agência Brasil, 2004).

O coco é a terceira fruta mais cultivada no país, depois da laranja e da banana. Mas o consumo *per capita* de água de coco ainda é muito pequeno. O volume médio anual consumido pelo brasileiro (130ml) se iguala ao do uísque, segundo pesquisa divulgada pela Amacoco, maior produtora nacional do produto em caixinha. A caixinha de 200mL, que chega a ser mais cara do que uma latinha de 350mL de refrigerante, é um dos motivos para o baixo consumo. Segundo a direção comercial da Amacoco, não se compara o custo de produção do refrigerante com o da água de coco, pois existem as dependências quanto ao clima, nível de chuvas e da colheita. Portanto, uma agroindústria tem dificuldades de reduzir seus custos. A unidade do coco *in natura* custa, no varejo, de 1,5 a 2 reais (Ripardo, 2004).

A região Sudeste é o principal mercado consumidor de coco verde do Brasil. Só no Estado do Rio de Janeiro, podemos encontrar na orla marítima cerca

de 250 quiosques, que chegam a vender cerca de 100.000 cocos por semana durante o verão. Sem levar em conta o consumo em restaurantes, hotéis, academias, bares, lanchonetes e feiras livres, e a crescente indústria de carrocinhas e empresas engarrafadoras de água de coco para o consumo doméstico (Cenpa, 2004).

Atualmente, o consumo de água de coco verde ocorre principalmente nos meses mais quentes do ano nas regiões Sul e Sudeste. Este segmento do mercado está em franca ascensão, com uma faixa de consumo de 3,6 milhões de litros/ano, o que justifica o desenvolvimento tecnológico em engenharia e controle de processos (Datamark, 2002).

## **2.2.2 Variedades de coco para extração da água**

Atualmente, existem três variedades de coqueiro sendo cultivados em diferentes partes do Brasil. São as variedades gigante, híbrida e anã. A diferença básica entre elas, e de importância nesta pesquisa, refere-se a sua melhor utilização em termos de rendimento de produtos, ou seja, água de coco e copra (amêndoa).

### **2.2.2.1 Variedade Gigante**

A variedade gigante é a mais extensivamente cultivada em escala comercial em todos os países produtores do mundo. É a variedade mais importante para a obtenção de produtos da copra, por ter uma amêndoa mais firme e com maior rendimento de óleo e leite de coco, para industrialização. Entretanto, o rendimento de água de coco, de 14,4%, é menor do que o da variedade anã. Os frutos são grandes e água de coco tem um sabor menos atrativo. Outra desvantagem para a indústria de água de coco é o seu elevado tempo de início de produção, que é de 6 a 9 anos (Medina et al., 1980).

#### 2.2.2.2 Variedade Híbrida

Os cocos da variedade híbrida (PB 121), cultivados no Brasil pelas agroindústrias Sococo e Ducoco, são originários do cruzamento entre a variedade gigante do Oeste africano (Costa do Marfim) e a anã amarela da Malásia (Aragão et al., 2002). O coqueiro híbrido obtido tem uma maior capacidade produtiva, de até 120 cocos/ano, e uma altura intermediária entre o anão e o gigante, bem como uma elevada resistência às doenças e uma precoce frutificação de quatro anos após o plantio (Sococo, 1997). Entretanto, esta variedade também tem um rendimento intermediário, tanto em termos de copra quanto de água de coco. A ocorrência de rachaduras durante o transporte deve-se a menor resistência dos frutos desta variedade (Medina et al., 1980).

#### 2.2.2.3 Variedade Anã

A variedade anã tem um maior rendimento em água em relação à variedade gigante, de cerca de 27,5%, possuindo uma água mais saborosa e adocicada, mesmo estando verde. Tem um tempo de início de produção mais curto, de aproximadamente 2 a 3 anos (Aragão et al., 2002). Entretanto, não é uma variedade recomendada para a obtenção da copra, pois esta é de baixo rendimento e pouco firme.

Os tipos encontrados de coqueiro anão no Brasil são o verde, amarelo e vermelho. Entretanto, o tipo predominante e comercialmente cultivado é o verde (Siqueira et al. 1994; Coco, 1997; Aragão et al., 2002).

O coqueiro anão foi introduzido no país, através da Bahia, em 1924, trazida de Java do Oriente. Até o ano 2000 foram plantados 57 mil hectares com esse cultivar, com perspectivas de serem ampliados para 601 mil hectares nos próximos 5 anos. Com tal área os produtores visam aumentar o consumo de água de coco, de 1% para 4 ou 5% em relação ao consumo de refrigerantes, que é de aproximadamente 10 bilhões de litros (Aragão et al., 2002). Em 2000, já havia cerca de 80 indústrias de pequeno porte e três de grande porte acondicionando

água de coco, colaborando ainda mais para a ampliação de coqueirais do tipo anão (Ripardo, 2000).

Devido ao bom rendimento, características sensoriais, maior facilidade de manuseio e disponibilidade no mercado, o coco anão verde, com seis e sete meses de maturação, vem sendo bastante utilizado e recomendado para uso em escala comercial e realização de pesquisas relacionadas ao aproveitamento de sua água (Campos *et al.*, 1993; Maciel *et al.*, 1992; David e Fernandes, 1998; Abreu, 2000).

### **2.2.3 Características físico-químicas da água de coco**

A água de coco, denominada de endosperma líquido do *Cocos nucifera* L., é relativamente ácida com pH 5,5, pouco turva ou transparente, incolor, não viscosa e com sabor levemente adocicado, sendo constituída principalmente por minerais e açúcares, substâncias nitrogenadas e gorduras em menor quantidade, além de vitaminas e fatores de crescimento, como o hormônio auxina (Medina *et al.*, 1980; Maciel *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 1996; Wosiacki *et al.*, 1996; Srebernich, 1998; Aragão *et al.*, 2002; Coco, 2004). Essas características tornam a água de coco um ótimo substrato para o desenvolvimento microbiano, ou seja, um alimento de fácil e rápida deterioração.

As características da água de coco variam conforme o tempo de maturação (Fagundes Neto *et al.*, 1989). Na Tabela 2 estão relacionadas algumas características físico-químicas da água de coco da variedade anã de diferentes cultivares e relativas a cinco períodos de maturação, segundo Tavares *et al.* (1998) citado por Aragão *et al.* (2002).

**Tabela 2. Características físico-químicas da água de coco da variedade anã em diferentes tempos de maturação.**

<b>Característica</b>	<b>5 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>7 meses</b>	<b>8 meses</b>	<b>10 meses</b>
Volume (mL)	125 a 247	153 a 290	212 a 310	140 a 246	54 a 152
pH	4,7 a 4,8	4,7 a 4,8	4,7 a 4,9	4,7 a 5,7	5,4 a 6,7
Acidez <sup>1</sup>	1,0 a 1,5	1,0 a 1,5	0,8 a 1,2	0,6 a 1,5	0,3 a 0,5
Brix	4,5 a 5,7	3,4 a 8,9	5,2 a 8,9	5,2 a 9,2	3,1 a 7,1
Glicídios Redut. <sup>2</sup>	3,1 a 4,5	2,2 a 3,6	1,9 a 5,5	2,2 a 6,4	0,3 a 0,7
Ferro <sup>3</sup>	0,03 a 0,04	0,03 a 0,05	0,06 a 0,09	0,04 a 0,07	0,03 a 0,08
Cálcio <sup>3</sup>	13 a 15	9,9 a 16	10 a 24	12 a 25	10 a 21
Potássio <sup>3</sup>	148 a 231	102 a 192	143 a 191	189 a 248	127 a 269
Magnésio <sup>3</sup>	6,1 a 14	8,3 a 14	3,8 a 12	3,7 a 11	3 a 15
Sódio <sup>3</sup>	5,1 a 6,9	8,7 a 12	4,7 a 9	5,8 a 17	15 a 55
Fósforo <sup>3</sup>	1,2 a 4,8	4,6 a 7,9	2,5 a 5,2	4,1 a 7,5	5,1 a 9,2
Vitamina C <sup>4</sup>	1,7 a 3,9	19,7 a 94,3	N.E.	1,8 a 4,8	N.E.

1-mL NaOH 1N/100mL; 2-em glicose g/100mL; 3-mg/100mL; 4-mg/100g; N.E.-não encontrado.

Fonte: Adaptado de Tavares et al. (1998) citado por Aragão et al. (2002).

Na Tabela 2 observa-se que os maiores volumes de água são obtidos durante o sexto e o sétimo mês de maturação, que os maiores valores de Brix ocorrem entre o sexto e o oitavo mês, e que os teores de minerais não apresentam grandes variações com o tempo. Aos seis meses de maturação, foi observado o maior teor de vitamina C, de 19,7 a 94,3 mg/ 100mL, o qual pode ser considerado alto. Mantena et al. (2003) encontrou valores de vitamina C da ordem de 2,71 mg/100mL. Estes valores retratam a variação das características da água de coco, mesmo quando se considera o mesmo período de maturação.

Segundo Aragão et al. (1998), os frutos de coqueiro anão devem ser colhidos, preferencialmente, entre o 6º e o 7º mês, devido aos maiores rendimentos em água e melhores características sensoriais. Alguns preferem a água de cocos com 5 meses por causa do baixo teor de gordura. Na Tabela 3 estão relacionadas as características físico-químicas da água de coco da variedade anã verde com 7 meses de maturação, segundo Rosa e Abreu (2000).

**Tabela 3. Caracterização físico-química das águas de coco anão verdes com 7 meses de maturação.**

Acidez (% v/p)	1,11	Vitamina C (mg/100mL)	1,2
pH	4,91	Proteína (mg/100g)	370
°Brix	5,00	P (mg/100g)	7,40
Sólidos Totais (g/100g)	5,84	Ca (mg/100g)	7,10
Glicídios Totais (g/100g)	3,46	Na (mg/100g)	7,05
Sacarose (mg/100mL)	280	Mg (mg/100g)	4,77
Glicose (mg/100mL)	2378	Mn (mg/100g)	0,52
Frutose (mg/100mL)	2400	Fe (mg/100g)	0,04
Valor calórico (cal/100g)	27,51	K (mg/100g)	156,86

Fonte: Rosa e Abreu, 2000.

Por ser atualmente a cultivar mais utilizada para industrialização da água de coco, as características da água do coco anão, descritas na Tabela 3, podem ser consideradas como as mais comuns entre os cocos comercializados no Brasil.

Devido a sua composição rica em sais, a água de coco é considerada como um isotônico natural, com uma osmolalidade de 255 a 304 miliosmolal, muito próxima a do plasma sangüíneo humano, de 285 a 295 miliosmolal (Kuberski, 1979). Esta propriedade é amplamente explorada pelas empresas acondicionadoras de água de coco, como apelo mercadológico. A osmolalidade é a concentração de solutos osmoticamente ativos, ou número de moléculas ou de íons de um soluto por quilograma de solvente e é medida em mosm/kg ou mosmol/L H<sub>2</sub>O (miliosmol por quilograma ou litro de água).

Por definição, uma bebida isotônica é aquela que apresenta concentração de substâncias ou minerais semelhante à encontrada nos fluidos orgânicos. O balanço entre eletrólitos evita a desidratação durante a prática esportiva, permitindo que a bebida seja rapidamente absorvida após o consumo (Petrus e Faria, 2000).

Soluções isotônicas têm entre 280 e 300 mosmol/L (Guyton, 1976; Harrison, 1994; Ford, 1995). Sucos de frutas e refrigerantes são tipicamente

hipertônicos com 600 a 700 mosmol/L (Ford, 1995). Osmolalidade menor que 500 mosmol/L evita a demora do esvaziamento gástrico e menor que 400 mosmol/L facilita a absorção da solução (Brouns e Kovacs, 1997).

#### **2.2.4 Produtos comerciais de água de coco**

Atualmente, além da tradicional venda em barracas de água de coco no próprio coco, existem no mercado diferentes produtos de água de coco, tais como gelo de água de coco, água de coco engarrafada e congelada, água de coco pasteurizada e refrigerada, água de coco tipo longa vida, cocos recobertos com parafina e água de coco *in natura* refrigerada.

Entretanto, dentre estes, os produtos considerados de maior expressão em termos comerciais, atualmente, são as águas de coco acondicionadas em garrafas de PET congeladas ou refrigeradas e as esterilizadas ou do tipo “longa vida”, acondicionadas em caixas cartonadas multicamadas, utilizando-se ultra – alta temperatura (UAT) e acondicionamento asséptico. As primeiras, em sua maioria, são provenientes de cocos verdes da variedade anã, sendo acondicionadas por pequenas e médias indústrias. A última é proveniente, geralmente, de cocos da variedade híbrida PB-121, aproveitada, particularmente, por empresas de grande porte, devido aos altos custos do processo, sendo a água um subproduto do processamento de cocos maduros, como ocorre nas maiores acondicionadoras do país, a Sococo, Amacoco e Ducoco (Sococo, 1997; Ranieri, 2000; Aragão et al., 2002).

#### **2.2.5 Características sensoriais da água de coco**

Srebernish (1998) para elaborar uma bebida com características sensoriais semelhantes a da água de coco, estudou a preferência dos provadores entre águas de duas variedades, gigante e híbrida, em diferentes estágios de maturação (6 a 10 meses), e determinou que as águas provenientes de cocos com 7 meses,

foram as mais preferidas, sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as duas variedades. Essas amostras de água de coco apresentaram pH entre 5,14 e 5,48, acidez titulável entre 6,17 e 9,55mLNaOH0,1 N/100mL, sólidos totais entre 4,45 e 6,56; teores de frutose entre 1,07 e 2,80%, de glicose entre 1,59 e 2,87% e de sacarose entre 0,26 e 1,02%. As médias sensoriais das formulações preparadas variaram entre 5,18 e 8,35.

Campos (1993) verificou que valores de pH abaixo de 4,5, provocavam rejeição da água de coco entre os provadores, quando utilizado ácido cítrico. Adição de até 200 mg/L de ácido ascórbico não causou alterações significativas no sabor. O binômio de pasteurização, de maior temperatura, que não causou prejuízos à qualidade sensorial da água de coco foi de 90 °C/100 segundos.

Abreu *et al.* (2003) determinaram o perfil sensorial de amostras comerciais de água de coco obtidas por diferentes processamentos (pasteurização, esterilização UAT e congelamento), utilizando a metodologia de análise descritiva quantitativa e teste de aceitação. Dentre os resultados da análise descritiva quantitativa foram encontrados, termos como, coloração encardida e aroma de água tônica para a água de coco pasteurizada, aroma pútrido e sabor de coco passado para a água de coco esterilizada e sabor e aroma de ferrugem para a água de coco congelada. Essas características foram atribuídas tanto aos métodos de extração e de conservação, quanto ao tempo de maturação dos frutos utilizados. As médias de aceitação dessas amostras foram 6,1, 4,8 e 4,3 para a amostra pasteurizada, esterilizada e congelada, respectivamente. Esses resultados demonstram como os atuais tratamentos aplicados à água de coco estão depreciando suas características sensoriais naturais.

Frasseti *et al.* (2000) também encontraram baixos valores de aceitação para amostras de água de coco congeladas e tratadas termicamente (tratamento não especificado) comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. A água de coco congelada teve média 2,87, e as duas amostras tratadas termicamente tiveram

média 4,27 e 3,63. A água de coco *in natura*, neste estudo, teve média de aceitação 7,5. Amostras de água de coco pasteurizadas, comercializadas no Estado do Rio de Janeiro, obtiveram média seis (Araújo *et al.*, 2000).

### **2.2.6 Aspectos importantes na industrialização da água de coco**

O contato da água de coco com a casca do fruto rica em compostos fenólicos é um aspecto importante, pois, acredita-se que nesta etapa são arrastadas substâncias que podem atuar como substrato para o escurecimento enzimático, além do arraste de microrganismos deteriorantes quando a extração e a higienização externa são ineficientes. O manuseio após a extração e o tempo decorrido entre a abertura do coco e o seu resfriamento, ou processamento térmico, pode melhorar ou prejudicar a qualidade do produto final (Cursino *et al.*, 1996; Abreu, 1999ab).

Pode-se considerar que os principais problemas de conservação da água de coco são o aparecimento de turvação, formação de uma coloração rosada e alteração de sabor, ambos creditados às alterações microbiológicas, atividade enzimática ou reações não-enzimáticas, além da incorporação de oxigênio durante o processamento (Cursino *et al.*, 1996; Abreu, 1999ab; Cabral, 2002). As boas práticas de fabricação, as etapas de extração e a prevenção do escurecimento da água de coco merecem especial atenção.

#### **2.2.6.1 Boas práticas de fabricação (BPF)**

A água de coco é uma solução pouco ácida e estéril, que contém sais minerais e vários nutrientes, sendo sua microbiota inicial, ainda na palmeira, caracterizada pela presença de poucos microrganismos viáveis. Contudo, durante as etapas de colheita, estocagem no solo (em contato com areia e possivelmente esterco), carregamento, transporte e descarregamento, é possível que a

contaminação seja disseminada (Teixeira, 1986 citado por David e Fernandes, 1998; Rosa e Abreu, 2002).

Portanto, a contaminação inicial da água de coco pode ser atribuída, principalmente, ao seu contato com a casca no momento da extração. A flora contaminante desse produto será variada e dependente do ambiente e condições de colheita e transporte. São de extrema importância medidas de higiene e sanificação dos frutos antes da extração e manutenção das boas práticas no decorrer de seu processamento, para que não haja incorporação de microrganismos provenientes de pessoal, utensílios e equipamentos.

O uso de solução clorada, a partir de hipoclorito de sódio, para desinfecção de frutos e utensílios, é bastante difundido na industrialização de alimentos, em concentrações que variam de 50 a 300 mg/L, com distintos tempos de contato (Andrade e Macedo, 1996; Egushii e Massaguer, 1991; Nascimento e Silva, 2003).

Soluções à base de cloro são bastante utilizadas em estudos com água de coco, onde alguns autores mencionam diferentes concentrações de uso, variando com o tempo de contato. David e Fernandes (1998) utilizaram imersão por 30 minutos em solução de hipoclorito com 20 mg/L de cloro livre. Rosa e Abreu (2002) recomendam o uso de soluções com 50 a 100 mg/L de cloro ativo, por 15 a 20 minutos, sendo necessária a retirada do excesso utilizando-se solução clorada a 0,5 mg/L. Segundo Troller (1993) soluções de hipoclorito para lavagem e resfriamento podem ter entre 2 e 7 mg/L de cloro. O FDA recomenda que a máxima concentração de cloro em soluções, para sanificação de superfícies que não sofrerão posterior enxágüe, seja de 200 mg/L (ICMSF, 1988).

Recentemente, Schmidt et al. (2004) avaliaram as boas práticas de fabricação e aplicaram a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) aos diferentes processos de obtenção da água de coco. No processo de obtenção de água de coco esterilizada por UAT, a esterilização da embalagem foi

considerada um PCC (ponto crítico de controle), sendo controlado pela concentração do sanificante e tempo de contato.

#### 2.2.6.2 Extração da água de coco

Os métodos tradicionais de extração, tanto em pequenos estabelecimentos como em algumas indústrias de médio porte, eram ou ainda são de forma manual, onde a água é escoada através de um orifício no coco de cerca de 15mm a 20mm, feito por furadores, que são tubos de aço inoxidável com diferentes formatos de pontas perfurantes, que podem ser totalmente manuais ou adaptados a um sistema de alavancas (Abreu, 1999a). Esta operação também é realizada ou acompanhada pelo uso de instrumentos de corte como facas e facões. A operação de extração manual pode aumentar o teor de substratos que propiciam a atividade enzimática, e o número de microrganismos patogênicos e deterioradores, devido ao intenso manuseio.

Abreu (1999a) desenvolveu um equipamento de extração de água de coco que teve o objetivo de reduzir estes problemas, além de aumentar o volume de extração com o tempo. Este equipamento baseia-se no princípio de corte ao meio dos cocos, onde o coco é projetado contra uma lâmina fixa de aço inoxidável, por dispositivo eletromecânico, processando cerca de 2.600 cocos por hora equivalente a uma vazão de 800 a 900 litros por hora.

As duas linhas de extração da empresa Amacoco são totalmente inertizadas com gás nitrogênio, para evitar as reações de oxidação. Mesmo assim é feito o uso do conservador metabissulfito que, segundo Custódio (2004), tem a principal função de evitar as oxidações lipídicas, já que a água de coco maduro é mais rica neste componente. Em uma das unidades da Amacoco ocorre a mistura da água de cocos verdes com a água de cocos maduros, sendo eventualmente observada a ocorrência de escurecimento, o que não ocorre quando é utilizada somente a água de cocos maduros. Nesse caso a função do metabissulfito

também é de evitar o escurecimento enzimático. A empresa testou a utilização do ácido ascórbico (concentração não revelada), entretanto, foi observado um intenso escurecimento durante a estocagem.

### 2.2.6.3 Escurecimento da água de coco

É comum a observação, por parte de processadores e vendedores de água de coco, da formação de uma coloração levemente rosada, ou avermelhada, na água de coco horas após a extração, mesmo quando mantida sob refrigeração. Essa alteração de cor vem sendo atribuída à atividade enzimática, entretanto, não foram encontrados estudos que confirmassem esta hipótese. Também não se sabe qual enzima seria responsável pela formação desta coloração e se o diferencial seria o substrato fenólico da água de coco, ou ainda, se o escurecimento seria não enzimático (David e Fernandes, 1998; Abreu, 1999; Cursino *et al.* 1996; FAO, 2000; Cabral, 2002).

#### 2.2.6.3.1 Fundamentos para o escurecimento enzimático da água de coco

O escurecimento enzimático ocorre em frutas e hortaliças após a quebra de sua integridade celular por meios mecânicos, no ato do descascamento ou corte, por exemplo (Eskin *et al.*, 1971). Além de alterações aparentes no alimento, o escurecimento enzimático pode provocar também perda de sabor, aroma e valor nutritivo (Galeazzi, 1984).

Duarte *et al.* (1999) e Duarte (2000) caracterizaram e detectaram as enzimas peroxidase e tirosinase (polifenoloxidase) em água de coco verde por cromatografia líquida (FPLC) e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). Foi verificada uma atividade de 0,3 U/mL para a peroxidase e de 5,0 U/mL para a tirosinase.

Tadini e Murasaki (2002) realizaram ensaios de inativação térmica da água de coco por processo descontínuo a 80, 85 e 90°C em tempos de 0 a 500 segundos, encontrando atividade residual das enzimas, sugerindo que ocorrem pelo menos duas isoenzimas de resistências térmicas diferentes. Não revelaram os dados da pesquisa, contudo, observou-se atividade enzimática residual.

Águas de coco processadas a 95°C por 15 segundos, com adição de 100mg/L de ácido ascórbico, com pH 4,4 e engarrafadas em garrafas de vidro por acondicionamento a quente e asséptico apresentaram, respectivamente, amarelamento e/ou formação de coloração rosada, durante a sua estocagem (Malpelli e Faria, 2002). O estudo da inativação enzimática destes processos acusou a presença de atividade residual tanto da enzima peroxidase quanto da enzima polifenoloxidase (Gonçalves e Faria, 2003). Estes resultados sugeriram a necessidade do uso de temperaturas mais altas para processamento térmico por poucos segundos, como o processamento por ultra-alta temperatura (UAT), por exemplo.

Marcas comerciais de água de coco tipo longa-vida (Ducoco, Tropicoco, Extra, Danone, Sococo e outras) processadas por ultra-alta temperatura e acondicionamento asséptico, tem em seus rótulos declarado o uso do conservador INS 223, que é o código de identificação do metabissulfito de sódio. A marca Ducoco é a única que tem especificado em seu rótulo que a adição do metabissulfito tem a finalidade de evitar o escurecimento enzimático, indicando, então, que somente o uso de ultra-alta temperatura não é suficiente para a inativação das enzimas da água de coco.

O método de ultrafiltração, desenvolvido pela FAO, recomenda a adição de 0,015% (150mg/L) de ácido L-ascórbico para a estabilização da cor da água de coco (FAO, 2000).

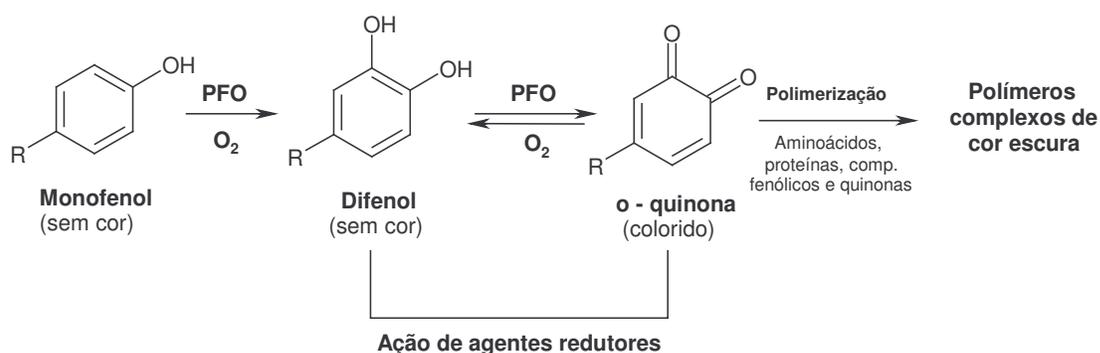
Campos (1993) inativou as enzimas da água de coco através de tratamento térmico a 90°C, nos tempos de 310 e 550 segundos, respectivamente. Provocando, contudo, prejuízos à sua qualidade sensorial. Apenas com a adição de 100mg/L de ácido L-ascórbico, conseguiram reduzir em 99,1% a atividade da enzima polifenoloxidase e em 73,7%, da enzima peroxidase. Com adição de 200mg/L de ácido ascórbico, conseguiram a inativação de 100% de ambas as enzimas.

#### *2.2.6.3.1.1 Enzima Polifenoloxidase (PFO)*

É uma enzima do grupo das oxirredutases, contendo cobre como grupo prostético, que oxida difenóis em presença de oxigênio molecular. O nome polifenoloxidase compreende duas enzimas distintas, cuja diferença diz respeito à especificidade aos substratos.

A primeira hidroxila monofenóis a o-dihidroxifenóis (atividade cresolase), oxidando-os a o-quinonas (atividade catecolase), e é a enzima mais importante para o escurecimento oxidativo de frutas e hortaliças, sendo denominada de tirosinase, polifenoloxidase ou catecol oxidase. A segunda oxida orto e para difenóis às quinonas correspondentes, não possuindo a capacidade de hidroxilar monofenóis como a primeira, sendo denominada de lacase (Vamos-Vigyázó, 1981; Mayer e Harel, 1990; Mendonça e Guerra, 2003).

Embora ambas as formas de atividade possam ocorrer, a atividade catecolase é a mais evidente no escurecimento de alimentos visto que a maioria dos substratos fenólicos são orto-dihidroxifenóis. A reação do escurecimento prossegue através da condensação das quinonas que reagem, não-enzimaticamente, com outros compostos fenólicos e aminoácidos, por exemplo, para produzir pigmentos escuros de estrutura indeterminada (Vamos-Vigyázó, 1981; Mayer e Harel, 1990; Mendonça e Guerra, 2003). As etapas deste mecanismo estão representadas, resumidamente, na Figura 1.



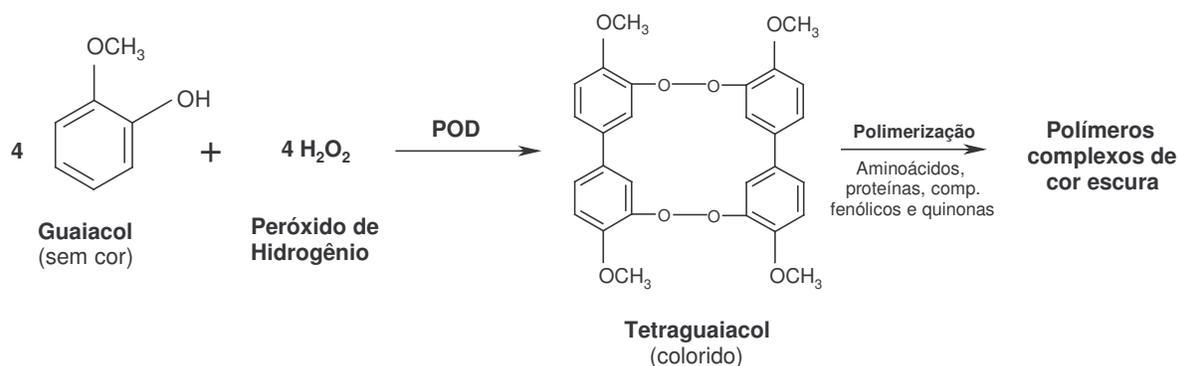
**Figura 1. Reação de escurecimento enzimático a partir da polifenoloxidase (PFO). Adaptado de Walker (1995) e Sapers (1993).**

De maneira geral, na literatura, a polifenoloxidase é considerada termolábil, sendo que os processos de branqueamento e pasteurização funcionam muito bem para sua inativação (Svensson, 1977; Vamos-Vigyázó, 1981; Mayer e Harel, 1990). Entretanto, Campos (1993) verificou que a polifenoloxidase foi a enzima que apresentou maior resistência térmica, quando aplicados diferentes tratamentos de pasteurização.

#### 2.2.6.3.1.2 Enzima Peroxidase (POD)

São enzimas semelhantes a PFO, também membro do grupo das oxirredutases. Decompõem o peróxido de hidrogênio na presença de um doador de hidrogênio. São bastante difundidas na natureza e podem estar presentes em plantas superiores, animais e microrganismos (Vamos-Vigyázó, 1981; Robinson, 1991).

A Figura 2 descreve o mecanismo de escurecimento enzimático da peroxidase, utilizando como doador de hidrogênio o guaiacol, bastante utilizado nos métodos de detecção de atividade enzimática da POD (Fatibello-Filho e Vieira, 2002).



**Figura 2. Mecanismo do escurecimento enzimático a partir da peroxidase (PDO). Adaptado de Fatibello-Filho e Vieira (2002).**

A POD é uma enzima termorresistente, que pode apresentar regeneração após tratamento térmico insuficiente. Os fatores externos que governam a inativação térmica da POD, em um determinado pH, são o tempo e a temperatura de tratamento. A uma dada temperatura, e por longa exposição a sua destruição é mais efetiva. Em altas temperaturas e curto tempo, o efeito é ameno, podendo causar rápida inativação, entretanto, causando uma maior regeneração da sua atividade (Adams, 1978; Nebesk et al., 1950). Há controvérsia entre os resultados de regeneração, que são atribuídos à diferença de sensibilidade dos métodos utilizados e até hoje disponíveis (Vamos-Vigyazó, 1981).

Normalmente, essas enzimas são inativadas pelo processo de pasteurização comum, que dura cerca de minutos a temperaturas de 75 a 95°C, entretanto, a peroxidase apresenta a característica de regeneração, principalmente quando se trata de um tratamento térmico por ultra-alta temperatura (Yamamoto *et al.*, 1962; Ferhrmann et al., 1967; Lu e Whitaker, 1974; McLellan e Robinson, 1981; Naveh *et al.*, 1982; McLellan e Robinson, 1987; Nielsen *et al.*, 1993; Bucheli e Robinson, 1994; Adams, 1997; Chilaka *et al.*, 2002; Mendonça e Guerra, 2003).

Na Tabela 4 estão relacionados alguns dos parâmetros que indicam as características de resistência térmica da POD, encontrados em alguns trabalhos de pesquisa.

**Tabela 4. Valores D e Z da enzima peroxidase.**

Sistema	T ref	D (s)	Z (°C)	Referência
milho	100	600	33	Naveh <i>et al.</i> , 1982
milho	93	13	30,5	Yamamoto <i>et al.</i> , 1962
milho	143	45	18,3	Yamamoto <i>et al.</i> , 1962
Tampão acetato (pH = 5,6)	121	783	27,87	Adams, 1978*
Purê de pêra (pH = 5,6)	121	209	34,44	Adams, 1978*
Purê de feijão verde (pH = 5,6)	121	304	30,59	Adams, 1978*
Purê de batata	120	70	35	Svensson, 1977

\*Inativação irreversível, sem regeneração.

Segundo Duarte (2000), a peroxidase da água de coco utilizada em seu estudo apresentou peso molecular de 49,2kDa, quando analisada por cromatografia por gel filtração, e de 44,63kDa, quando analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os vegetais que apresentam isoenzimas da peroxidase de peso molecular semelhante ao da água de coco são o kiwi (43 e 45kDa), a batata (48kDa) e o tomate (43kDa). O kiwi mostrou uma baixa atividade enzimática, quando a sua concentração natural de ácido ascórbico foi de 84mg/100g (Préstamo e Manzano, 1993).

Préstamo e Manzano (1993) estudaram extratos de vegetais que continham isoenzimas da peroxidase com pesos moleculares entre 36 e 120kDa, sendo que a adição de ácido ascórbico em concentrações de 2 a 170µM foi capaz de inativá-las. Através desses resultados postularam que, produtos com alta atividade da enzima peroxidase devem ser branqueados ou tratados com antioxidantes para reduzir a atividade das isoenzimas. Enquanto que, frutas e vegetais que apresentam baixa atividade da enzima peroxidase e contêm isoenzimas de baixo peso molecular, não precisam de branqueamento, contudo, podem ser tratadas com antioxidantes se necessário.

Adams (1997) investigou a causa da não linearidade da cinética de primeira ordem da inativação da peroxidase de *horseradish* altamente pura, que segundo Préstamo e Manzano (1993), contém cerca de onze isoenzimas com pesos moleculares de 36 a 130 kDa. Adams (1997) observou forte regeneração após aquecimento a 70°C por até uma hora, em pH 5,6, e baixa regeneração após aquecimento por mais de duas horas. Este fenômeno de regeneração foi apontado como a causa da não linearidade. Em condições de neutralidade não foi observada regeneração. Por eletroforese constatou-se que a enzima foi restabelecida na regeneração, e que outros elementos protéicos foram formados quando não houve a regeneração.

Adams (1978) estudando a inativação irreversível da peroxidase por HTST em purês de pêra e feijão verde, utilizando temperaturas de 60 a 160°C, encontrou valores  $D_{121,1^\circ\text{C}}$  e  $z$  de 3,49 e 5,07 minutos e de 34,44 e 30, 59°C, respectivamente.

A diferença de resistência térmica das isoenzimas pode ser explicada pela ocorrência de diferentes estados de agregação, além da formação de agregados de enzimas, aumentando assim a sua estabilidade térmica (Robinson, 1991). A agregação de isoenzimas também pode explicar os cálculos de Naveh et al. (1982) que indicam que a fração termoestável representa apenas 7% da atividade enzimática inicial ( $D_{100^\circ\text{C}}=10\text{min}$ ;  $z=33^\circ\text{C}$ ), assim como Yamamoto et al. (1962), que determinou o valor de 5% ( $D_{95^\circ\text{C}}=10\text{ min}$ ,  $z=12^\circ\text{C}$ ), sendo que ambos trabalharam com peroxidase de milho.

#### 2.2.6.3.2 Fundamentos para o escurecimento não-enzimático da água de coco

Considerando-se as características naturais da água de coco, o escurecimento não-enzimático, na sua forma *in natura*, poderia ser atribuído à oxidação do ácido ascórbico. Já na água de coco processada termicamente, a oxidação do ácido ascórbico também seria favorecida, além das reações de

caramelização e de Maillard, já que a água de coco é rica em aminoácidos e açúcares redutores como a frutose.

Mantena et al. (2003) observaram que a água de coco verde *in natura* foi capaz de seqüestrar radicais livres e radicais superóxidos, mas promoveu a produção de radicais hidroxil e aumentou a peroxidação lipídica. Estas propriedades foram reduzidas drasticamente quando a água de coco foi aquecida por 60 minutos em água fervente. A água de coco maduro apresentou redução na capacidade de seqüestrar radicais livres e superóxidos. Concluiu-se que estas propriedades poderiam ser parcialmente atribuídas ao ácido ascórbico nela contido, além da ação de mais de um princípio ativo, pela água de coco ser rica em vitaminas, aminoácidos, enzimas e outros componentes. A concentração de ácido ascórbico na água de coco verde *in natura* foi de 2,71mg/100mL e nas demais foi de 0,28 a 0,58mg/100mL.

#### 2.2.6.3.3 Inibidores de escurecimento enzimático e não-enzimático

Existem vários inibidores de escurecimento enzimático e não-enzimático amplamente utilizados pela indústria de alimentos e especificamente de bebidas, além do uso de métodos combinados de preservação. O escurecimento enzimático pode ser controlado por branqueamento, exclusão do oxigênio e fenóis e/ou pelo uso de inibidores (Sapers, 1993; Vamos-Vigyázó, 1995).

O escurecimento não-enzimático pode ser controlado por refrigeração, controle de atividade de água, diminuição de açúcares redutores, tratamento com glicose-oxidase, redução de fontes de nitrogênio, embalagens com absorvedores de oxigênio e o uso de inibidores à base de sulfitos. Outros inibidores alternativos aos sulfitos vêm sendo amplamente estudados, como o uso do ácido ascórbico (Sapers, 1993).

#### 2.2.6.3.3.1 Sulfitos

Os sulfitos são altamente efetivos no controle do escurecimento, mas são sujeitos às restrições regulamentares devido aos efeitos adversos sobre a saúde (Sapers, 1993; Taylor, 1993; Vamos-Vigyázó, 1995).

Os agentes sulfitantes (dióxido de enxofre, sulfito de sódio, bissulfito e metabissulfito de sódio e potássio) são adicionados aos alimentos, desde a antiguidade, para prevenir o escurecimento enzimático e não-enzimático, controlar o crescimento de microrganismos, agir como agente branqueador, antioxidante ou redutor, além de outras funções tecnológicas (Sapers, 1993; Vamos-Vigyázó, 1995).

Os níveis de tratamento com sulfitos em alimentos dependem da finalidade. Níveis residuais usualmente não ultrapassam centenas de miligramas por litro, mas podem chegar a 1000mg/L no caso de algumas frutas e vegetais (Taylor et al., 1986). O FDA propõe um residual máximo de dióxido de enxofre de 300, 500 e 2000mg/L em sucos de frutas, batatas desidratadas e frutas secas, respectivamente (FDA, 1988 citado por Sapers, 1993).

Pinto et al. (2004) verificaram os efeitos do dióxido de enxofre adicionado à água de coco, sobre o crescimento de *B. subtilis* e *S. cerevisiae*, intencionalmente inoculados. Observaram que, respeitando os limites permitidos pela legislação de adição de 15mg/L, o dióxido de enxofre foi capaz de inibir apenas 3,6% de *B. subtilis* e 5,7% de *S. cerevisiae*.

#### 2.2.6.3.3.2 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico é considerado uma das melhores alternativas ao uso dos sulfitos. É um composto altamente efetivo contra o escurecimento enzimático, primeiramente, devido a sua habilidade de reduzir as quinonas, geradas pela PFO, retornando ao composto fenólico antes que eles possam iniciar as futuras reações formadoras de pigmentos. Entretanto, ao mesmo tempo, o ácido ascórbico está

sendo oxidado ao ácido dehidroascórbico (DHAA), e quinonas podem acumular e causar o escurecimento. O DHAA também pode causar o escurecimento não-enzimático (Henshall, 1981; Sapers, 1993; Vamos-Vigyázó, 1995).

Altas concentrações de ácido ascórbico podem inibir diretamente a PFO (Vamos-Vigyazo, 1981). O ácido ascórbico não é mais efetivo que os sulfitos devido a maior estabilidade e penetração deste último. Derivados mais estáveis do ácido ascórbico vêm sendo utilizados para substituí-lo em formulações experimentais, mas na maioria, seu uso ainda não é permitido (Sapers, 1993).

Abreu (1999b) recomenda que a estabilização química da água de coco pode ser atingida com a adição de ácido ascórbico, atuando como antioxidante. Contudo, há processos onde o metabissulfito de sódio, o ácido sórbico e o ácido benzóico também são utilizados (Rosa e Abreu, 2002). Atualmente, não existem águas de coco sendo comercializadas que utilizem somente o ácido ascórbico para estabilização. Segundo Joslyn (1961), a redução do oxigênio pelo ácido ascórbico não é instantânea, ocorrendo uma distinta fase lag na reação.

### **2.2.7 Resíduos provenientes da extração da água de coco**

Em grandes centros urbanos, como o Rio de Janeiro, por exemplo, são geradas 600 toneladas de resíduo por dia com o consumo do coco verde. Para que uma tonelada deste material seja recolhida, encaminhada e mantida em aterro sanitário, são gastos, em média U\$ 43,00. Além disso, a decomposição da casca leva cerca de dez anos (Notícias, 2000).

O aproveitamento da casca de coco verde também vem sendo estudado pela Embrapa Agroindústria Tropical, de Fortaleza (CE), para substituir a samambaiçu (xaxim) na fabricação de vasos e para ser utilizada como substrato para plantas, a partir da sua conversão em adubo orgânico (Aragão et al., 2002; Gazeta Mercantil, 2003).

A fibra da casca do coco ainda pode ser aproveitada para confecção de fios, escovas, painéis, cordas, colchões, estofamento de carros e almofadas, e isolante térmico, sendo diferenciado o seu uso pelo comprimento das fibras e qualidade. Já é utilizada como fonte alternativa de combustível, semelhante ao carvão vegetal (Nunes, 2002).

### **2.2.8 Legislação para água de coco**

Em 29 de Maio de 2002, foi criada a Instrução Normativa nº. 39, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAA-IN39), para fixação de identidade e qualidade da água de coco (Brasil, 2002). Foram determinados algumas características e limites para a comercialização do produto e aqui serão destacados apenas aqueles de interesse para esta pesquisa.

A MAA-IN39 definiu a água de coco esterilizada, como bebida obtida da parte líquida do fruto do coqueiro, por meio de processo tecnológico adequado, não diluído e não fermentado, e que foi submetido a um processo adequado de esterilização “comercial”.

Quanto ao uso de ingredientes opcionais, podem ser adicionados açúcares exclusivamente para correção de Brix do produto, em quantidade não superior a 1g/100mL. Podendo ser adicionadas vitaminas conforme legislação específica. Quanto aos requisitos, deve ter acidez em ácido cítrico entre 0,03 e 0,18 g/100mL, pH mínimo de 4,3 e Brix máximo de 7,0% a 20°C.

Quanto ao uso de aditivos, podem ser adicionados conservadores, antioxidantes e acidulantes químicos, conforme aprovados para sucos de frutas, até a publicação de tabela de aditivos específica para água de coco. De acordo com a ABIA (1992), a maior concentração de aditivos permitidos para refrigerantes e sucos de frutas são de 300ppm de ácido ascórbico, 200mg/L de metabissulfito de potássio e ácido cítrico na quantidade necessária.

A RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), definiu os critérios e padrões microbiológicos para água de coco (ANVISA, 2001). A água de coco *in natura* pode apresentar contaminação de 10 a 10<sup>2</sup>UFC (a 45°C de incubação), e a pasteurizada de 5 a 10UFC de coliformes por mL. E ambas devem apresentar ausência de *Salmonella* sp em 25 mL.

Ainda segundo a RDC nº12, alimentos processados em embalagens herméticas, estáveis a temperatura ambiente, exceto leite e derivados UAT (UHT), com pH maior que 4,5, após 10 dias de incubação a 35-37°C, de embalagem fechada, não devem apresentar nenhuma alteração, ou seja, não devem existir sinais de alteração das embalagens, nem quaisquer modificações físicas, químicas ou organolépticas do produto, que evidenciem deterioração e não podem revelar variação de pH maior que 0,2. Quando necessário deve ser verificada a esterilidade comercial conforme metodologia específica.

### 3 MATERIAL E METODOLOGIA

Esta pesquisa foi dividida em duas etapas distintas:

- Desenvolvimento de formulação de água de coco;
- Avaliação de desempenho do sistema asséptico piloto.

#### - Desenvolvimento de formulação de água de coco

Para o desenvolvimento de uma formulação de água de coco, foram realizados testes sensoriais com o objetivo de padronizar a matéria-prima a ser utilizada na avaliação do sistema asséptico.

#### - Avaliação de desempenho do sistema asséptico piloto

Utilizando-se a formulação definida no estudo anterior, foram processados 10 lotes de água de coco, 5 em escala piloto e 5 em pequena escala, com o objetivo de avaliar o desempenho do sistema asséptico, realizar e testar adaptações necessárias e definir o melhor binômio de tempo e temperatura para estabilização da água de coco. Os lotes foram produzidos em três diferentes experimentos, a saber:

**Experimento 1:** Foram processados quatro lotes, de 300 unidades cada, para avaliar o sistema asséptico quanto aos procedimentos de esterilização, controle e a sua eficiência em produzir água de coco “comercialmente estéril”. Foram utilizadas temperaturas de 135 a 144 °C por 10 segundos.

**Experimento 2:** Foram processados cinco lotes, de 21 litros cada, para avaliar as adaptações feitas em equipamentos e procedimentos que se tornaram necessários devido aos resultados apresentados no Experimento 1. Este experimento possibilitou também o estudo dos efeitos da temperatura e de diferentes concentrações de ácido ascórbico na estabilidade da água de coco.

Foram utilizadas temperaturas de 138 a 144 °C por 10 segundos, conforme os resultados apresentados no Experimento 1.

**Experimento 3:** Foi processado um lote de 200 unidades com o sistema adaptado, utilizando-se o melhor tratamento térmico definido no Experimento 2.

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Água de coco verde (*Cocos nucifera* L.)

A água de coco foi extraída de cocos da variedade anã verde, com seis a sete meses de maturação. Os cocos utilizados para o desenvolvimento da formulação e para os Experimentos 2 e 3, foram obtidos da Central de Abastecimento (Ceasa) de Campinas-SP, provenientes do Estado do Espírito Santo. Os cocos utilizados no Experimento 1 foram obtidos em uma plantação do Estado do Piauí e transportados à cidade de Campinas (SP), em caminhão lonado, por três dias.

#### 3.1.2 Ingredientes de formulação

Durante o desenvolvimento da formulação, utilizou-se como fonte de sacarose, açúcar refinado da marca União, adquirido em supermercados de Campinas-SP. No desenvolvimento da formulação da água de coco e durante os testes de avaliação foram utilizados ácido cítrico, ácido L-ascórbico e frutose (em substituição à sacarose) do tipo p.a granulados e da marca Synth, obtidos de distribuidor de Campinas-SP.

#### 3.1.3 Embalagens

Nos Experimentos 1 e 3, foram utilizadas garrafas de polietileno tereftalato (PET) transparente, de 330mL, do tipo monocamada da Braspet. No Experimento 1, foram utilizadas tampas de polipropileno (PP) de 28mm com *liner*, fornecidas

pela Tapon Corona Ltda. (São Paulo-SP), e no Experimento 3, foram utilizadas tampas de polietileno de alta densidade (PEAD) de 28mm sem liner, fornecidas pela Bericap Ltda.(Sorocaba-SP).

No Experimento 2, diferentes embalagens foram utilizadas visando aumentar o número de unidades acondicionadas, para realização das análises. Foram utilizados tubos de vidro de 70mL, de tampa e rosca, marca Pirex, e garrafas de vidro de 318mL, marca Cisper (Owens-Illinois do Brasil S/A-São Paulo-SP), com tampas metálicas de 38mm da Amcor White Cap Ltda.(São Paulo-SP).

### **3.1.4 Extratores de água de coco**

Para o desenvolvimento da formulação, a água de coco foi extraída com o auxílio de um furador manual, previamente higienizado. Depois de perfurados, os cocos foram invertidos em um funil com tela fina, e a água de coco foi acondicionada em recipiente isotérmico.

Para o Experimento 1, foi desenvolvido e instalado na planta piloto do DTA/FEA/Unicamp, por Faria (2003), um extrator de da água de coco, em que seu princípio de funcionamento consistiu da perfuração do coco e posterior drenagem da sua água. A perfuração foi feita por um dispositivo acionado por ar comprimido, que impulsionou um tubo cilíndrico pontiagudo contra a superfície lateral do coco, abrindo um orifício de, aproximadamente, 20mm de diâmetro. O coco foi então invertido sobre uma espécie de “canaleta” de aço inoxidável, até a drenagem total da água. O detalhamento do sistema de extração está apresentado na Figura 3.

Para os Experimentos 2 e 3, foi utilizado um extrator de água de coco idealizado e construído por Faria (2003). O seu funcionamento foi baseado na utilização de sistema pneumático, utilizando-se a pressão com a dupla função de projetar o bico perfurador para o interior do coco e, ao mesmo tempo, de injetar ar comprimido filtrado no mesmo, expulsando assim a água de coco sob pressão e por escoamento através de orifícios contidos no próprio bico (Figura 4).

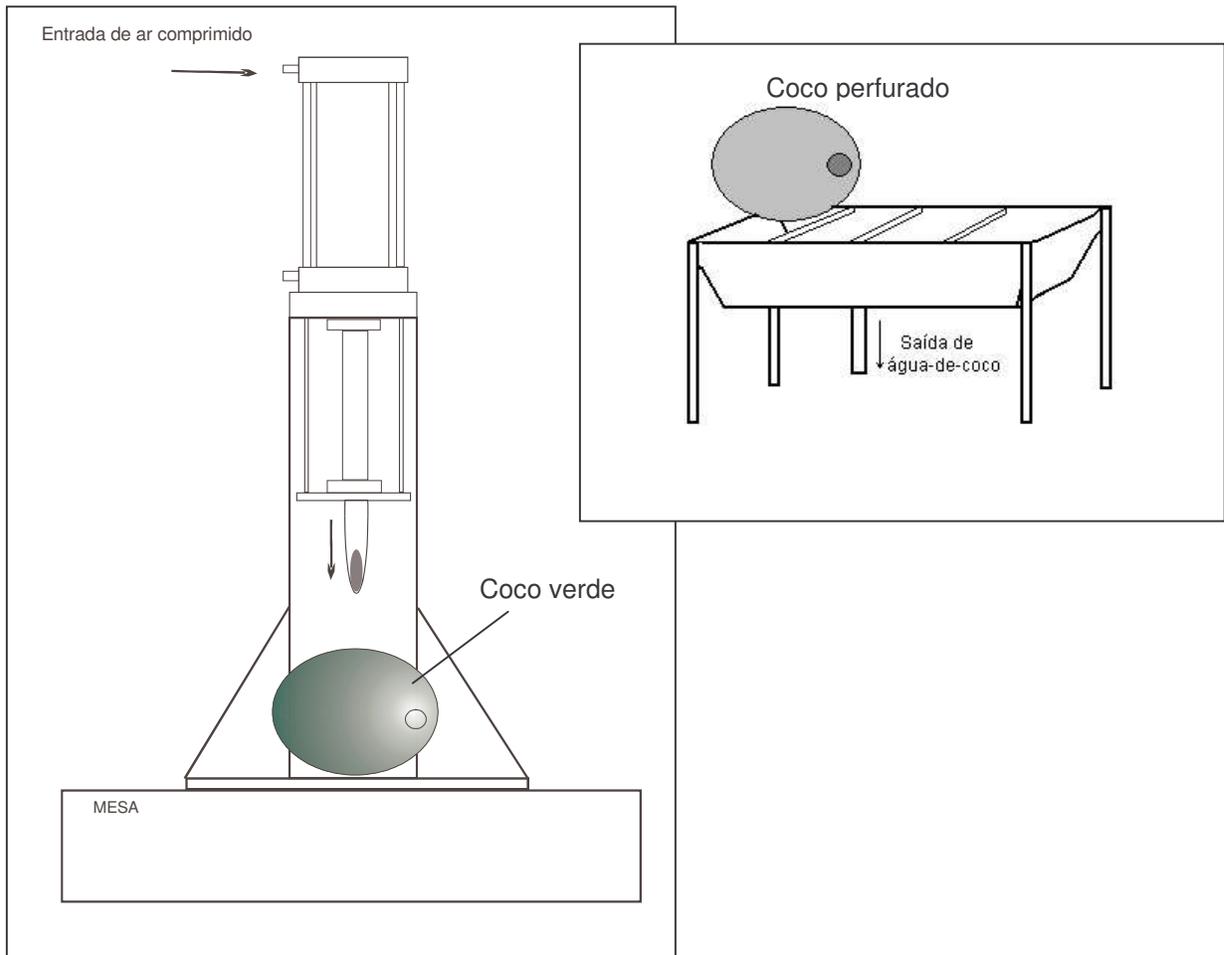
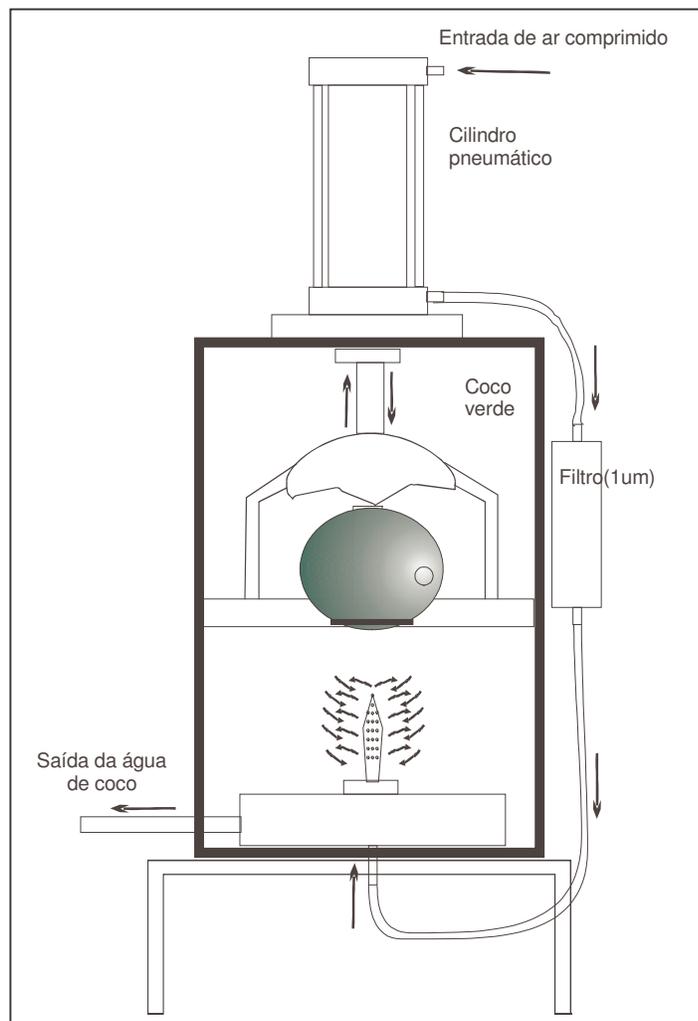


Figura 3. Detalhamento do extrator de água de coco e da canaleta de escoamento utilizados no Experimento 1.



**Figura 4. Detalhamento do extrator de água de coco utilizado nos Experimentos 2 e 3.**

### **3.1.5 Esterilizador de embalagens**

Nos Experimentos 1 e 3, foi utilizado o esterilizador de embalagens idealizado e construído por Faria (2001), representado na Figura 5. Seu princípio de funcionamento baseia-se na aspersão de sanificante à base de ácido peracético e posterior enxágüe com água estéril. A água de enxágüe das embalagens foi esterilizada por dois pré-filtros de  $1\mu\text{m}$ , e um filtro microbiológico de  $0,22\mu\text{m}$  de diâmetro de poro, montados em série.



**Figura 5. Esterilizador de embalagens.**

Utilizou-se o sanificante comercial Proxitane 1512<sup>®</sup>, constituído de uma mistura estabilizada de ácido peracético (15%) e peróxido de hidrogênio (23%), da Peróxidos do Brasil Ltda., da cidade de São Paulo. As condições de uso basearam-se nos estudos realizados por Abreu (2001), a partir dos quais foi gerada uma equação representativa do processo de esterilização deste sistema, conforme Equação 6.

$$\gamma = -11,5621 + 0,2587 \cdot T + 19,8417 \cdot \text{APA} - 4,3377 \cdot (\text{APA})^2 - 0,1167 \cdot t \cdot \text{APA} - 0,2176 \cdot T \cdot \text{APA} + 0,3641 \cdot t - 0,008 \cdot (t)^2 \quad (6)$$

Onde,  $\gamma$  é o número de reduções decimais ( $-\log N/N_0$ ),  $t$  é o tempo de contato do sanificante, em segundos,  $T$  é a temperatura do sanificante em  $^{\circ}\text{C}$  e  $\text{APA}$  é a concentração de ácido peracético em %. Foi estabelecido o tempo de 10 segundos de aspersão com ácido peracético 0,5%, à temperatura de 30-35 $^{\circ}\text{C}$ , a qual, segundo a Equação 6, possibilita entre 4 e 4,8 reduções decimais de

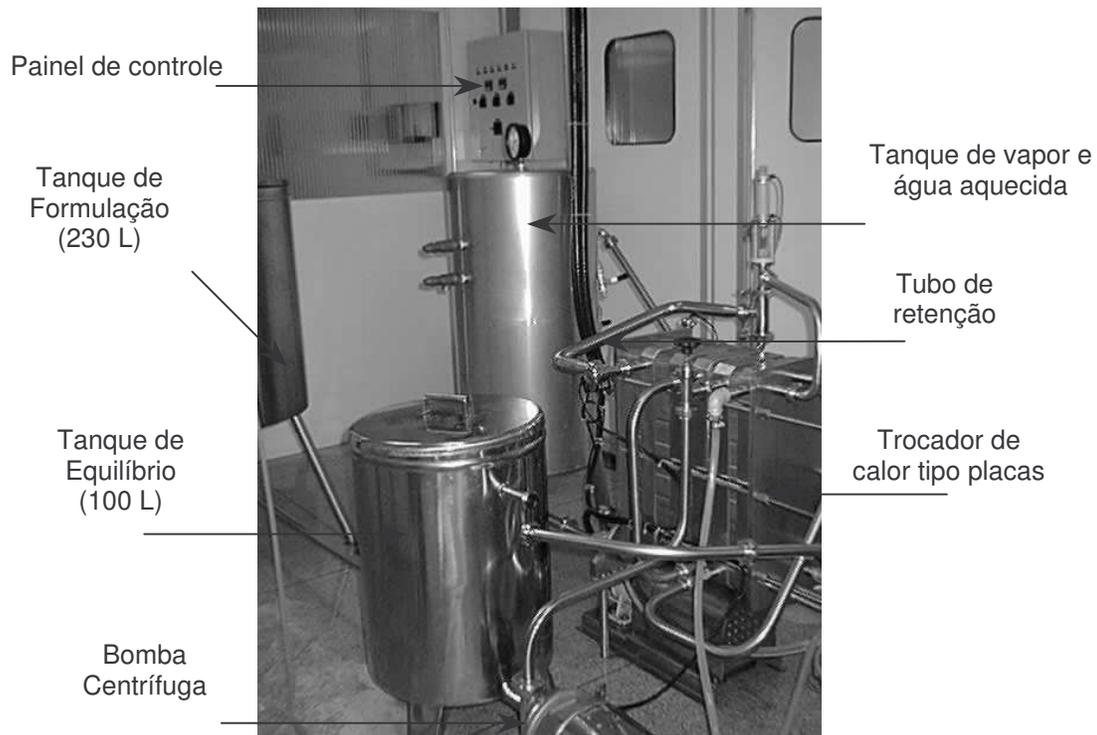
esporos de *B. subtilis* var. *globigii* ATCC 9372. Este procedimento garante o atendimento às recomendações da US-Food Drug Administration – FDA (Buchner, 1993).

### 3.1.6 Esterilizador UAT

O esterilizador utilizado possuía um trocador de calor de ultra-alta temperatura (UAT), do tipo placas, com vazão nominal de 300 L/h, fabricado por SUMÁ Indústria e Comércio Ltda. (Campinas-SP), ilustrado na Figura 6. O trocador foi composto pelas seções de regeneração, aquecimento do produto, aquecimento da água (meio de aquecimento), retenção, resfriamento do produto final (opção de água refrigerada) e resfriamento do produto retornado. Atinge uma temperatura máxima de 150°C por 4, 7 e 11 segundos, através do uso de três diferentes tubos de retenção e pelo ajuste manual de controle de vazão. O equipamento possui válvula de retorno pneumática, para o produto não esterilizado e um painel de controle onde são visualizadas as temperaturas do produto (na saída da seção de retenção) e da água de aquecimento, com graduação de  $\pm 1,0^\circ\text{C}$ . O produto foi impulsionado utilizando-se bomba centrífuga.

Para os Experimentos 1 e 3 o sistema foi equipado com um tanque de formulação de 220 litros, um tanque de equilíbrio de 76 litros, ambos em aço inoxidável, e um tanque para produção de água de aquecimento, através da injeção direta de vapor. A disposição da unidade de esterilização dentro da planta de processamento, para cada um dos experimentos, pode ser visualizada nas Figuras 7 e 8.

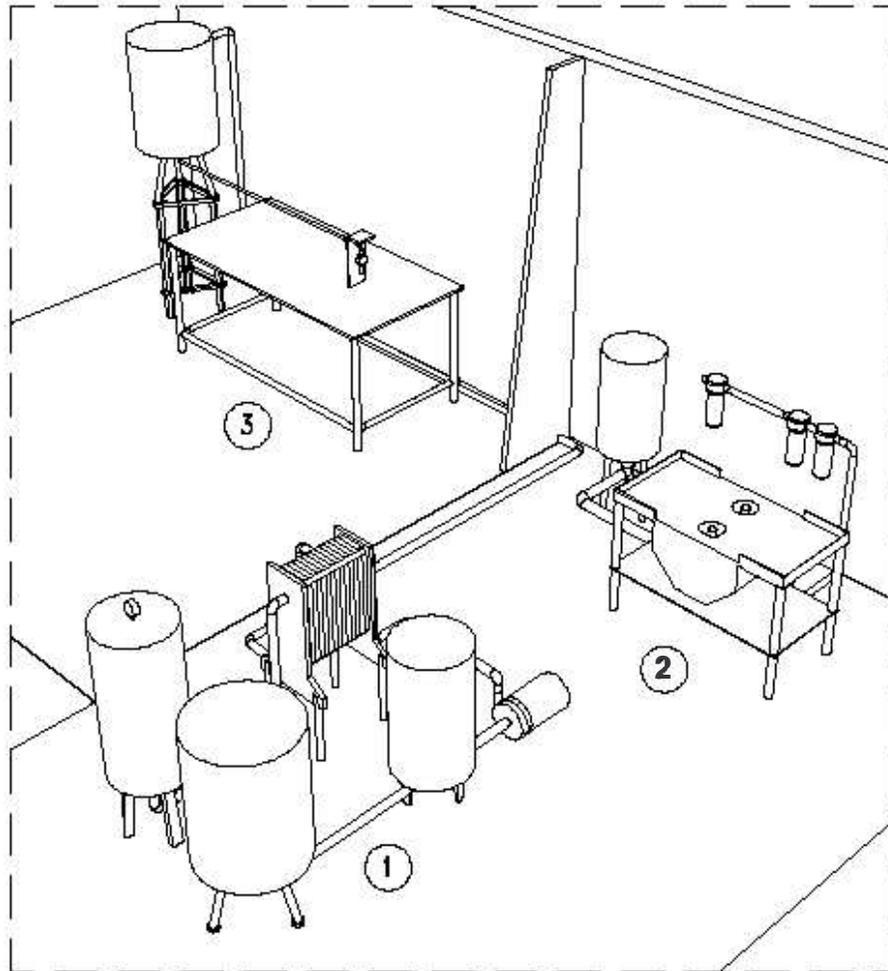
Para o Experimento 2, foi utilizado um tanque de 50 litros com fundo funilado. Com esta conformação, foi possível operar o sistema com um volume reduzido de 21 litros. A disposição da unidade de esterilização, dentro da planta de processamento, para o Experimento 2, pode ser visualizada na Figura 9.



**Figura 6. Visualização do esterilizador UAT.**

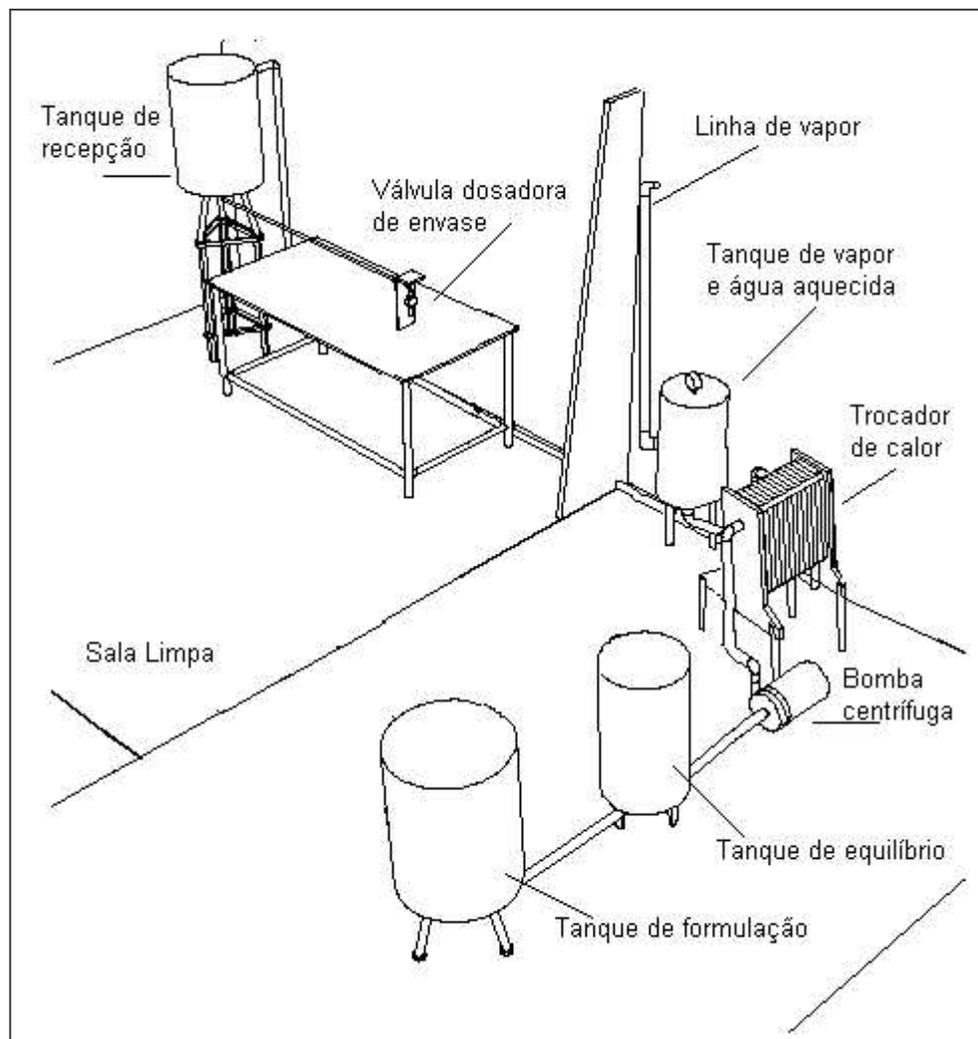
### **3.1.7 Sistema de acondicionamento asséptico (Sala limpa)**

Nos Experimentos 1 e 3, o sistema de acondicionamento asséptico foi composto por um tanque de recepção de 220 litros, que recebeu o produto esterilizado, e por uma válvula dosadora de acondicionamento, que acionada manualmente, liberou o produto por ação da gravidade, para o interior das embalagens. O sistema de acondicionamento estava situado dentro de uma sala limpa certificada do tipo ISO classe 7 ( $\geq 352.000$  partículas de  $0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$  de ar). A certificação foi feita conforme as normas e padrões internacionais, controlando-se a pressão positiva, temperatura, umidade relativa, número de renovações de ar por hora e contagem de microrganismos e partículas em suspensão (Petrus et al., 2003b). A disposição dos componentes do sistema de acondicionamento, nos Experimentos 1 e 3, pode ser visualizada nas Figuras 7 e 8, respectivamente.



1. Esterilizador de ultra-alta temperatura.
2. Esterilizador de embalagens.
3. Sistema de acondicionamento asséptico (Sala Limpa).

**Figura 7. Disposição dos equipamentos dentro da planta de processamento para o Experimento 1.**

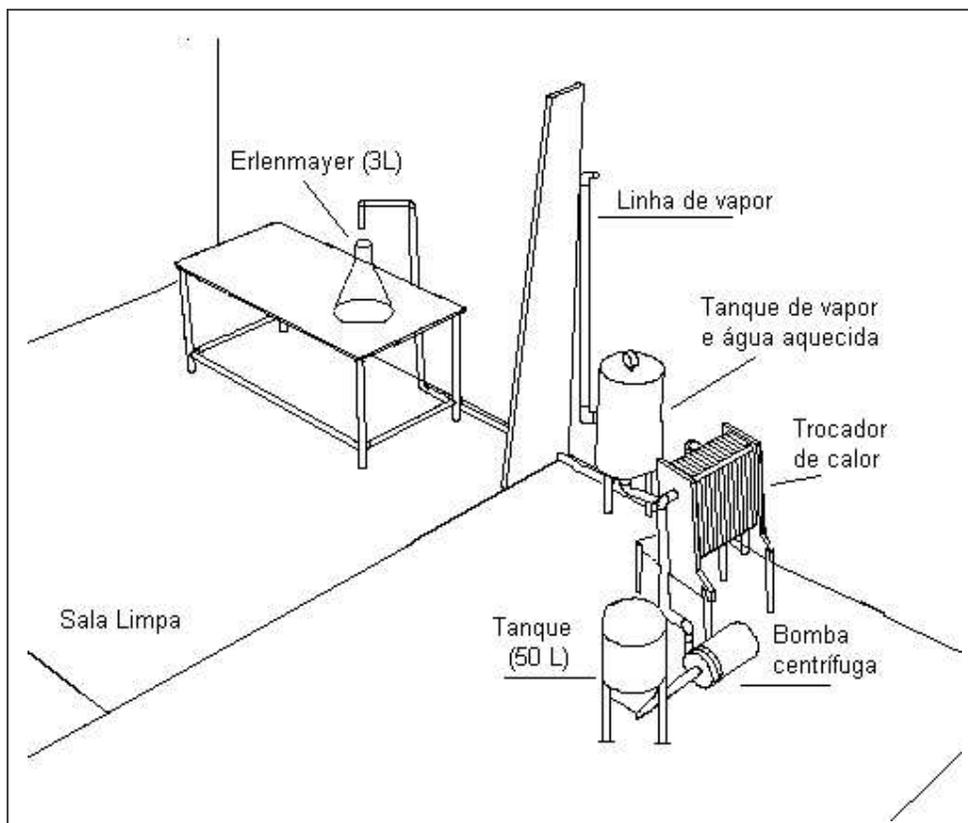


**Figura 8. Disposição dos equipamentos dentro da planta de processamento para o Experimento 3.**

No Experimento 2, para coleta dos cinco lotes processados, utilizou-se *erlenmeyers* de vidro de 3 litros de capacidade, previamente esterilizados em estufa a 140°C por 2 horas. Os frascos foram selados com tampas confeccionadas de folha de alumínio e previamente esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para que fosse garantida a esterilidade do sistema entre os processos, e retirado qualquer resíduo do processo anterior, foi circulada água esterilizada (na mesma temperatura de cada processo) por 20 minutos pela linha, antes da entrada do produto. Também foi realizada a flambagem do bico de acondicionamento no início do processamento de cada lote.

### Teste de monitoramento de fluxo

Para garantir a coleta de água de coco sem contaminação com água de enxágüe, previamente, foi realizado um teste utilizando azul de metileno. O teste consistiu na injeção, com seringa descartável, de 20mL de uma solução aquosa de azul de metileno 10%, na linha adaptada, seguido da injeção de 20L de água. Fez-se o acompanhamento, até que o corante azul deixasse de colorir a água coletada, relacionando-se então este volume ao tempo de vazão, para prever em que momento haveria somente a coleta de água de coco. Em complementação ao teste citado, fez-se uma simulação de coleta utilizando-se uma solução de frutose, com Brix semelhante ao do produto (6,0%).



**Figura 9. Disposição dos equipamentos dentro da planta de processamento para o Experimento 2.**

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Desenvolvimento de formulação de água de coco

#### 3.2.1.1 Recepção, higienização e resfriamento dos cocos

Os cocos foram higienizados por lavagem manual com água potável, para eliminar as sujidades mais grosseiras, e depois, por imersão em solução de hipoclorito, com 200 mg/L de cloro ativo, por 10 minutos, e enxaguados com solução a 5 mg/L (Egushii e Massagüer, 1998). Os cocos sanificados foram embalados em sacos de polietileno e armazenados em câmara fria (-18°C) por 24 horas.

#### 3.2.1.2 Planejamento fatorial

Para definir as formulações, foi realizado um planejamento fatorial completo do tipo  $2^2$ , onde as variáveis independentes foram pH e Brix (Box *et al.*, 1978; Barros Neto *et al.*, 1996). Segundo Norris *et al.* (1984), sensorialmente, o parâmetro que determina o efeito do gosto ácido é a acidez titulável, e não o pH. Entretanto, o pH foi escolhido como variável independente para atender às exigências de segurança alimentar, visto que, para que um produto seja considerado comercialmente estéril, após um processo de pasteurização, o pH deve ser menor ou igual a 4,5, independente de sua acidez titulável. Portanto, nesta fase da pesquisa, a acidez titulável das formulações de água de coco foi apenas monitorada.

Os valores de pH foram fixados entre 4,3 e 5, e os de Brix entre 5,3 e 6,7%. Estes limites foram baseados em valores encontrados por Campos (1993) e Tavares *et al.* (1998), na caracterização de água de cocos da variedade anã, e por Srebernich (1998) para água de cocos das variedades híbrida e gigante.

O planejamento fatorial teve cinco níveis (-1,41; -1; 0; +1; +1,41), sendo, três pontos centrais e quatro axiais, totalizando 11 formulações. A relação entre os códigos de cada nível e os valores das variáveis independentes está apresentada

no delineamento experimental da Tabela 5. O planejamento fatorial completo, com as 11 combinações de pH e Brix, está detalhado na Tabela 6.

**Tabela 5. Delineamento experimental das variáveis independentes codificadas e não codificadas.**

Variável/Código	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	4,3	4,4	4,65	4,9	5,0
Brix (%)	5,3	5,5	6,0	6,5	6,7

**Tabela 6. Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com pontos centrais (0) e axiais ( $\pm 1,41$ ).**

Formulação	Codificado		Não Codificado	
	pH	Brix	pH	Brix
1	-1	-1	4,40	5,5
2	+1	-1	4,90	5,5
3	-1	+1	4,40	6,5
4	+1	+1	4,90	6,5
5	-1,41	0	4,30	6,0
6	+1,41	0	5,00	6,0
7	0	-1,41	4,65	5,3
8	0	+1,41	4,65	6,7
9	0	0	4,65	6,0
10	0	0	4,65	6,0
11	0	0	4,65	6,0

### 3.2.1.3 Análise sensorial

Foram realizados dois diferentes estudos sensoriais para definir a melhor formulação de água de coco, os quais estão descritos nos itens a seguir.

#### 3.2.1.3.1 Percepção dos gostos ácido e doce das formulações de água de coco

Este teste teve o objetivo de avaliar a percepção sensorial dos gostos ácido e doce nas diferentes formulações de água de coco, em função da variação de pH e Brix. Para o teste, foi realizada uma seleção de provadores em função de suas

sensibilidades à percepção dos gostos ácido e doce, utilizando-se metodologia descrita por Ferreira et al. (2000).

Inicialmente, 20 provadores voluntários foram treinados a avaliar a intensidade dos gostos ácido e doce das formulações descritas na Tabela 7, as quais serviram como referências ao gosto ácido forte e ao gosto doce forte.

**Tabela 7. Formulações de água de coco utilizadas como referências durante a seleção de provadores.**

Formulações	pH	Brix (%)
Gosto ácido forte	4,30	5,5
Gosto doce forte	5,00	6,7

Posteriormente, uma seleção foi realizada, em três sessões, onde os 20 provadores foram solicitados a quantificar as intensidades dos gostos ácido e doce em três diferentes formulações de água de coco (Formulações 2, 3 e 9 da Tabela 6), utilizando a ficha apresentada na Figura 10.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_.

Você está recebendo três amostras codificadas de ÁGUA DE COCO. Prove as amostras da esquerda para a direita e avalie, de acordo com a escala abaixo, a intensidade de gosto ácido e gosto doce.

Gosto Ácido		
Amostra	Fraco	Forte
_____	_____	
_____	_____	
_____	_____	

Gosto Doce		
Amostra	Fraco	Forte
_____	_____	
_____	_____	
_____	_____	

**Figura 10. Ficha do teste de escala para seleção dos provadores.**

Dos vinte provadores foram selecionados doze, tendo-se como critérios os valores de p de F da variável amostra ( $P_{F_{amostra}} \leq 0,07$ ), p de F da repetição ( $P_{F_{rep}} > 0,11$ ) e o grau de consenso com os demais provadores. Esta equipe de doze provadores avaliou, através das escalas estruturadas mostradas na Figura 10, as intensidades de gostos ácido e doce nas onze formulações de água de coco descritas na Tabela 6. Os provadores avaliaram as onze amostras em duas sessões de repetição. Seis amostras foram avaliadas na primeira sessão e cinco na segunda. As formulações foram servidas monadicamente aos provadores e a ordem de apresentação das mesmas foi balanceada para efeitos *first-order-carry-over*, segundo delineamento para 11 amostras descrito por Wakeling e MacFie (1995).

#### 3.2.1.3.2 Otimização da acidez e da doçura da água de coco

Este teste teve o objetivo de determinar, entre as onze formulações de água de coco relacionadas na Tabela 6, aquelas que apresentavam intensidades de acidez e doçura mais próximas do ideal.

Para avaliar as onze formulações, foram recrutados 33 consumidores de água de coco entre estudantes e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), todos apreciadores de água de coco e bem familiarizados com os testes sensoriais. Foi aplicado um teste afetivo utilizando-se a escala do ideal estruturada de nove pontos, variando de -4 (extremamente menos ácida/menos doce que o ideal) a +4 (extremamente mais ácida/mais doce que o ideal), onde os consumidores indicaram o quão ideal apresentava-se a intensidade de gosto ácido e doce nas amostras. As amostras foram avaliadas pelos consumidores em três sessões degustativas: quatro amostras foram servidas na primeira sessão, quatro na segunda e três na terceira. As formulações foram servidas monadicamente aos provadores e a ordem de apresentação das mesmas foi balanceada para efeitos

*first-order-carry-over*, segundo delineamento para 11 amostras descrito por Wakeling e MacFie (1995).

Finalmente, depois de selecionada a melhor formulação, foram recrutados 60 consumidores de água de coco, entre estudantes e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), todos apreciadores de água de coco e bem familiarizados com os testes sensoriais. Foi aplicado um teste de aceitação, com escala hedônica de nove pontos (de 1=desgostei extremamente a 9=gostei extremamente), e os 60 consumidores indicaram o quanto gostaram ou desgostaram da amostra, utilizando a ficha de avaliação apresentada na Figura 12.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Avalie as amostras codificadas de água de coco e indique, utilizando as escalas abaixo, o quão próximo do ideal encontram-se os gostos ácido e doce de cada uma das amostras.

Gosto Ácido	Gosto Doce
-4 – extremamente menos ácida que o ideal	-4 – extremamente menos doce que o ideal
-3 – muito menos ácida que o ideal	-3 – muito menos doce que o ideal
-2 – moderadamente menos ácida que o ideal	-2 – moderadamente menos doce que o ideal
-1 – ligeiramente menos ácida que o ideal	-1 – ligeiramente menos doce que o ideal
0 – ideal	0 – ideal
+1 – ligeiramente mais ácida que o ideal	+1 – ligeiramente mais doce que o ideal
+2 – moderadamente mais ácida que o ideal	+2 – moderadamente mais doce que o ideal
+3 – muito mais ácida que o ideal	+3 – muito mais doce que o ideal
+4 – extremamente mais ácida que o ideal	+4 – extremamente mais doce que o ideal

Amostra	Nota Acidez	Nota Doçura
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Comentários: \_\_\_\_\_.

**Figura 11. Ficha do teste escala do ideal.**

<p>Nome: _____ Data: _____</p> <p>Prove a amostra de água de coco e indique na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou da amostra.</p> <p>Amostra: _____</p> <p>9. gostei extremamente 8. gostei muito 7. gostei moderadamente 6. gostei ligeiramente 5. nem gostei / nem desgostei 4. desgostei ligeiramente 3. desgostei moderadamente 2. desgostei muito 1. desgostei extremamente</p> <p>Comentários: _____</p>
---

**Figura 12. Ficha do teste de aceitação.**

### 3.2.1.4 Análise estatística dos resultados

Os resultados dos dois testes citados anteriormente foram analisados através da metodologia de superfície de resposta (RSM). Para cada tratamento, as variáveis dependentes foram avaliadas e os dados submetidos a uma análise de regressão multivariada de acordo com a equação quadrática polinomial geral apresentada na Equação 7 (Box et al., 1978; Barros Neto et al., 1996).

$$Y = \beta_0 + \beta_1P + \beta_2B + \beta_{11}P^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{12}PB + \varepsilon \quad (7)$$

Na Equação 7, Y corresponde às respostas dos testes de intensidade e escala do ideal,  $\beta_0, \dots, \beta_{12}$  são estimativas dos parâmetros do modelo, P e B representam os níveis codificados das variáveis independentes pH e Brix, respectivamente, e  $\varepsilon$  representa o erro experimental.

Para obtenção dos modelos ajustados e suas respectivas superfícies, foram considerados somente os parâmetros com nível de probabilidade menores ou iguais a 10% ( $p \leq 0,1$ ). A validade dos modelos foi avaliada como uma função dos

seus respectivos coeficientes de determinação bem como pela análise de falta de ajuste. A significância da falta de ajuste foi avaliada aplicando-se a análise de variância (ANOVA) através do teste de distribuição F. Os modelos que apresentaram baixos níveis de probabilidade para seus parâmetros e, conseqüentemente, elevados valores F, coeficientes de determinação elevados ( $R^2$ ) e falta de ajuste não significativa ( $p \leq 0,05$ ), foram considerados eficientes para prever a percepção sensorial de formulações de água de coco quanto à acidez e doçura. Os dados foram processados utilizando-se o programa *STATISTICA*<sup>®</sup>, versão 6.0.

#### 3.2.1.5 Formulação de água de coco com frutose

A água de coco tipo longa vida, comercializada atualmente, é proveniente de cocos maduros e a sacarose é o principal açúcar presente na sua composição, contudo, a indústria utiliza a frutose como adoçante para a correção do Brix (Custódio, 2004; Srebernish, 1998; Ranieri, 2000).

As vantagens da utilização da frutose devem-se ao fato de ser o açúcar que se apresenta em maior quantidade na água de coco verde, por não ser prejudicial à saúde de diabéticos, como a sacarose, e por apresentar um poder adoçante maior do que a sacarose. Contudo, a frutose apresenta a desvantagem de ter um custo maior do que o da sacarose e, por ser um açúcar redutor, participa das reações de oxidação e de escurecimento.

Portanto, apesar de ter sido utilizada a sacarose nos testes sensoriais de otimização da formulação de água de coco, no decorrer desta pesquisa, o uso da frutose começou a ser considerado para utilização nas formulações que passariam pelo processamento térmico, por ser o açúcar utilizado pelas indústrias do setor. Surgiu então a necessidade de um teste que auxiliasse na substituição da sacarose pela frutose, de tal maneira que causasse percepção sensorial semelhante à determinada nos testes citados anteriormente.

Pelo exposto, depois de determinada a melhor combinação de pH e Brix, utilizando-se sacarose como adoçante, foi realizado um teste sensorial para a substituição da sacarose por frutose. Para tanto, aplicou-se o teste de similaridade descrito por Meilgaard et al. (1987).

As formulações de água de coco preparadas com frutose foram comparadas com formulações de igual pH, preparadas com sacarose. Foram realizadas duas sessões, sendo uma para comparação das formulações de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ) e outra para comparação das formulações de alta acidez ( $\text{pH} < 4,5$ ). Em cada sessão, foram comparadas três amostras de água de coco, sendo duas iguais e uma diferente, e foi solicitado a 33 provadores que identificassem a amostra diferente, utilizando-se a ficha apresentada na Figura 13 (Silva, 2001). A apresentação das amostras foi feita de forma balanceada.

Foi estipulado que uma proporção de não mais que 25% da população seria capaz de perceber a diferença entre as duas formulações, com 95% de confiança. Portanto, segundo a tabela do teste triangular de similaridade (Silva, 2001), para um número de 33 provadores, seria necessário um número de acertos menor ou igual a 11, para determinar que a troca de um açúcar pelo outro não seria percebido pelos consumidores na proporção acima citada.

Nome: _____	Data: _____	
Por favor, prove da esquerda para a direita as amostras codificadas de água de coco. Duas amostras são iguais e a outra é diferente. Faça um círculo no código da amostra diferente.		
724	907	568
Comentários: _____		

**Figura 13. Ficha do teste de similaridade.**

### 3.2.2 Testes de avaliação da eficiência do sistema asséptico

#### 3.2.2.1 Higienização de superfícies

Os planos de higienização descritos foram fundamentados nas recomendações técnicas de Andrade e Macedo (1996) e SUMÁ Indústria e Comércio Ltda. (Campinas-SP).

##### 3.2.2.1.1 Extrator de água de coco

O extrator de água de coco e seus componentes foram limpos manualmente com detergente neutro. As partes fixas foram sanificadas por aspersão com solução de hipoclorito (200 mg/L de cloro) e as partes removíveis, por imersão, em igual solução, por cerca de 12 horas.

##### 3.2.2.1.2 Esterilizador de embalagens

Realizou-se a limpeza manual, com detergente neutro, em todos os compartimentos e componentes do equipamento. Os bicos aspersores foram desconectados e mergulhados em solução de ácido peracético 0,05% por 30 minutos à temperatura ambiente. Para sanificação das tubulações e da bomba de água, recirculou-se ácido peracético 0,05% por 10 minutos, deixando-se o sanificante em contato por mais 30 minutos. Os filtros de esterilização da água de enxágüe foram higienizados através da recirculação de solução 0,05% de ácido peracético por 30 minutos.

##### 3.2.2.1.3 Esterilizador UAT e linha de acondicionamento

###### a) Limpeza CIP (*clean in place*)

A limpeza teve início no tanque de formulação e terminou na válvula dosadora de acondicionamento, realizada antes e depois de cada processamento. Os detergentes e a água de enxágüe foram colocados no tanque de formulação e então recirculados através do tanque de equilíbrio, da bomba, placas e demais componentes do esterilizador UAT, tanque de recepção e válvula dosadora de

acondicionamento. O sistema CIP foi possível através da recirculação utilizando-se o regulador de vazão aberto (900L/h) com retorno contínuo para o tanque de formulação, envolvendo as etapas que se seguem.

- Pré-lavagem

Foi realizado o enxágüe da linha com água morna (40-45°C) por cerca de 5 minutos. A pré-lavagem visou a redução da quantidade de resíduos presentes na superfície do equipamento.

- Limpeza ácida

Foi circulada uma solução de detergente ácido com 1% de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), na temperatura de 60 a 65°C por 20 minutos. Estas temperaturas foram as mínimas atingidas em todo o sistema, sendo que nas placas do esterilizador chegaram a 75°C. Por motivos operacionais a limpeza ácida foi realizada antes da limpeza alcalina. Gilbert et al. (1979) realizaram estudos efetuando inicialmente a limpeza ácida, encontrando resultados satisfatórios quanto à sua eficiência.

- Enxágüe 1

Foi circulada água à temperatura ambiente (25°C), por cerca de 5 minutos, para retirar resíduos suspensos e traços dos componentes de limpeza. A total remoção dos resíduos do detergente ácido foi avaliada utilizando-se fita indicadora de pH, até que esta indicasse um pH não inferior a seis.

- Limpeza alcalina

Foi circulada uma solução de detergente alcalino com 1% de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), a 75°C por 20 minutos. Assim como descrito para a limpeza ácida, esta foi a temperatura mínima atingida em todo o processo, sendo que a temperatura máxima atingida foi da ordem de 85°C. A limpeza alcalina foi empregada para remoção de resíduos orgânicos protéicos e gordurosos, das superfícies.

- Enxágüe 2

Foi similar ao primeiro enxágüe, sendo que a total remoção dos resíduos do detergente alcalino foi avaliada utilizando-se fita indicadora de pH, até que esta indicasse um pH não superior a oito.

b) Limpeza manual do tanque de recepção

Após a execução dos procedimentos da limpeza CIP descritos, o tanque de recepção instalado no interior da sala limpa foi desconectado para limpeza manual com detergente neutro. Após a limpeza manual, o tanque foi enxaguado e, novamente, conectado à linha. Esta limpeza foi realizada somente nos Experimentos 1 e 3.

c) Limpeza manual da válvula dosadora

A válvula dosadora de acondicionamento foi desconectada da linha e totalmente desmontada para limpeza manual com detergente neutro. Após a limpeza a válvula foi novamente montada e conectada à linha de acondicionamento. Esta limpeza foi realizada somente nos Experimentos 1 e 3.

d) Esterilização SIP (*sterilisation in place*)

A esterilização SIP foi iniciada nos dias anteriores aos de cada processamento. O tanque de formulação e o tanque de equilíbrio foram preenchidos com uma solução 0,05% de ácido peracético (300 litros), sendo transportada para o tanque de recepção até o seu total preenchimento. A solução permaneceu no sistema por cerca de 15 horas (de um dia para o outro), sendo posteriormente drenada por gravidade. Para a retirada do residual de ácido peracético a linha foi enxaguada com água processada na mesma temperatura de cada processo, sendo que o tanque de recepção foi totalmente preenchido. A água foi drenada imediatamente antes da entrada de produto.

#### 3.2.2.1.4 Sala Limpa

As paredes, caixa de passagem, portas e teto da sala limpa foram sanificados manualmente com solução de ácido peracético 0,01% e auxílio de lenços especiais (com baixa emissão de partículas). O piso foi sanificado com solução 400mg/L de hipoclorito de sódio, por 20 minutos. O sistema de insuflamento e climatização do ar na área limpa foi acionado, aproximadamente, 12 horas antes do acondicionamento, para que entrasse em regime.

#### 3.2.2.2 Avaliação da contaminação de superfícies e da eficiência dos procedimentos de esterilização

As análises de avaliação da contaminação de superfícies e da eficiência dos procedimentos de esterilização foram realizadas somente nos Experimentos 1 e 3.

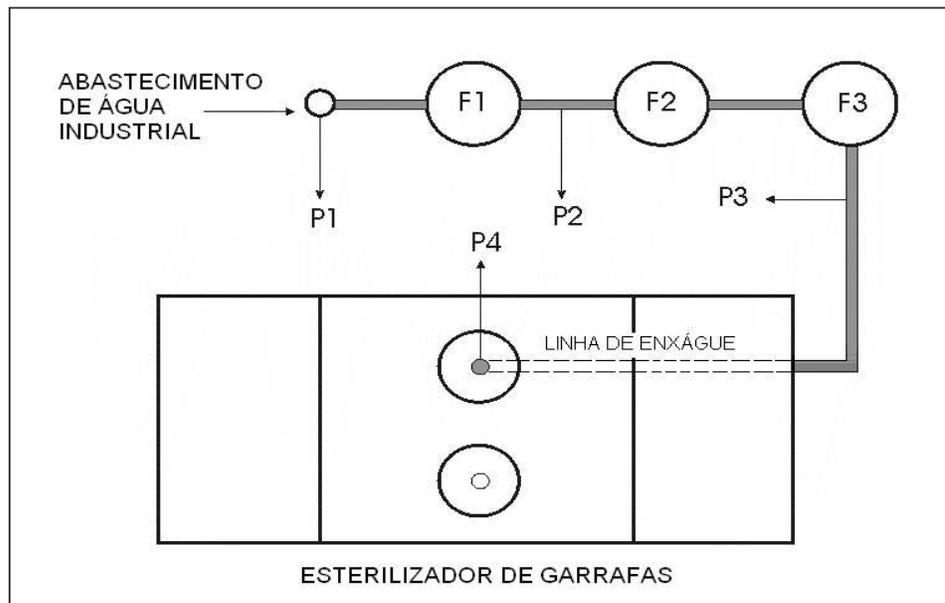
##### 3.2.2.2.1 Água de enxágüe das garrafas

Utilizando-se frascos esterilizados, foram coletadas amostras em quatro diferentes pontos do sistema de esterilização de água de enxágüe, conforme esquema da Figura 14, sendo: P1 - na linha de abastecimento de água da planta piloto; P2 - após o primeiro pré-filtro de 1 $\mu$ m (F1); P3 - após o filtro microbiológico de 0,22 $\mu$ m (F3) e P4 - no bico aspersor de água de enxágüe, durante o início, meio e fim da esterilização das garrafas.

Uma alíquota de 30mL de cada amostra, foi inoculada, em profundidade, em 30mL de meio PCA com concentração duas vezes maior do que a usual. Foi utilizada solução de tiosulfato para neutralizar o residual de ácido peracético, não excedendo 0,5% de concentração na amostra, o que inibiria o crescimento microbiano (Egushi e Massaguer, 1995; Sutton, 1996). As placas foram incubadas a 35°C em estufa por 48 horas.

### 3.2.2.2.2 Análise microbiológica das garrafas

A contagem de microrganismos nas embalagens, realizada antes e após sua esterilização, foi feita de acordo com a metodologia da solução de enxágüe descrita por Sveum et al (1992) e adaptada por Petrus (2000) e Abreu (2001).



**Figura 14. Esquema de coleta da avaliação de contaminação da água de enxágüe das garrafas (F - filtros; P - pontos de coleta).**

### 3.2.2.2.3 Determinação de $H_2O_2$ residual nas garrafas

O residual de  $H_2O_2$  nas embalagens foi determinado através de fitas indicadoras de concentração de peróxido de hidrogênio Merckoquant, da Merck, adquirida em distribuidora da cidade de São Paulo. Essas fitas tinham uma escala de concentração que variava de 0 a 25 mg/L, com intervalos de 0,5 mg/L. Com uma escala padrão de cores variando do branco (zero) ao verde escuro (25mg/L).

### 3.2.2.2.4 Avaliação da contaminação das superfícies da sala limpa

Foi utilizada a metodologia de placas de RODAC<sup>®</sup>, para avaliar a contaminação das superfícies dentro da sala limpa, sendo aplicadas seis placas na superfície da mesa e seis placas na caixa de passagem.

#### 3.2.2.2.5 Contagem de microrganismos e partículas presentes no ar da sala limpa

A contagem de microrganismos, no ar do ambiente de acondicionamento da água de coco, foi feita utilizando-se o equipamento de amostragem de ar por impactação, MAS-100 da MERCK®. Foram utilizadas placas de petri com meio PCA, para contagem padrão, e de PDA para contagem de bolores e leveduras. O equipamento foi regulado para amostrar 100 litros de ar por minuto durante 5 minutos, totalizando 500 litros de ar.

A contagem de partículas na sala de acondicionamento foi feita utilizando-se um contador de partículas APC BIOTEST® modelo C1299 –1020. O equipamento foi regulado para fazer a amostragem durante 5 minutos, sendo acionado simultaneamente ao equipamento citado anteriormente. Os equipamentos foram posicionados na altura da válvula de acondicionamento, ao lado do operador, sendo acionados no início, meio e fim da operação de acondicionamento (Petrus et al., 2003).

#### 3.2.2.2.6 Avaliação da contaminação da linha de processamento

Foram recolhidas, na válvula de acondicionamento, três amostras de, aproximadamente, 450mL da água do enxágüe final da linha de processamento. Alíquotas de 30mL de cada amostra foram inoculadas nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.2.1.

### 3.2.3 Processamento da água de coco

Foram produzidos quatro lotes de água de coco no Experimento 1 (lotes 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4), cinco lotes no Experimento 2 (lotes 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5) e um lote no Experimento 3 (lote 3.1). O processamento dos lotes seguiu o esquema do fluxograma da Figura 15, com as devidas alterações referentes a cada um dos experimentos. Cada etapa do fluxograma está detalhada nos itens a seguir.

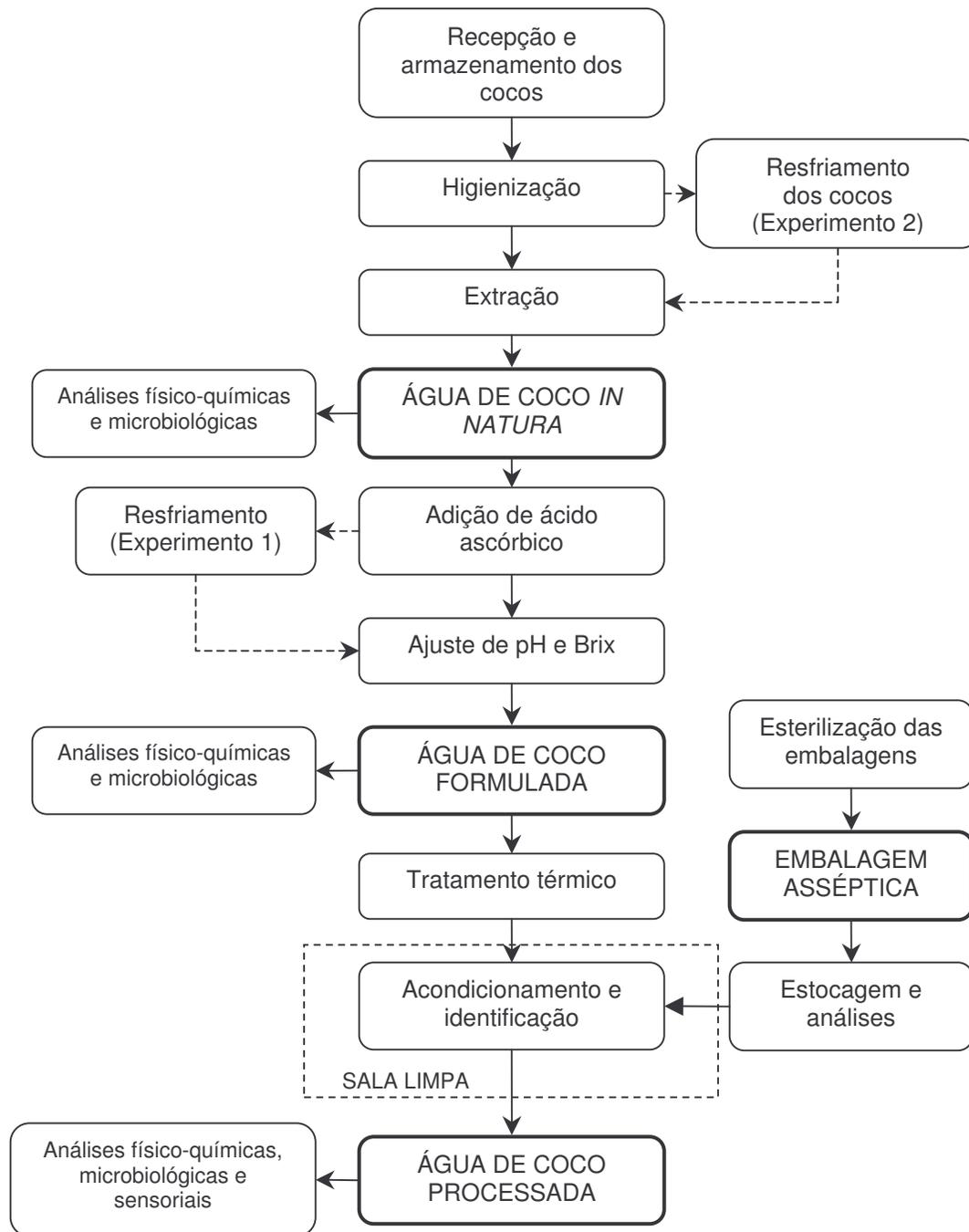


Figura 15. Fluxograma do processamento e acondicionamento da água de coco nos Experimentos 1, 2 e 3.

### 3.2.3.1 Recepção e armazenamento dos cocos

Os cocos foram descarregados manualmente e depositados na Planta Piloto de Frutas do Departamento de Tecnologia de Alimentos /Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp.

### 3.2.3.2 Higienização dos cocos

Os cocos foram enxaguados, unitariamente, com água potável para retirada das sujidades maiores, utilizando-se escova quando necessário. E, posteriormente, foram imersos em dois tanques de aço inoxidável contendo solução de hipoclorito de sódio com 200mg/L de cloro ativo, permanecendo imersos de 10 a 20 minutos. Para a retirada do excesso de sanificante, os cocos foram enxaguados por imersão em uma solução de hipoclorito com 5mg/L de cloro. Em seguida, foram depositados em cestos sanitizados de aço inoxidável para secagem até o momento da extração.

Este procedimento foi executado com base em testes preliminares de sanitização, seguido de contagem padrão utilizando-se a técnica do *swab*. Foram alcançadas duas reduções decimais na contaminação inicial da superfície dos cocos, que foi de  $5,52 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>. A determinação da variação da concentração de cloro residual também foi realizada durante os mesmos testes preliminares, através do teste iodométrico descrito por Kuaye e Leitão (1998), onde a redução do teor de cloro não ultrapassou 70 mg/L com pH 9,2.

### 3.2.3.3 Extração

No Experimento 1, para cada um dos quatro lotes, foram extraídos 150 litros de água de coco. As extrações foram realizadas ao final de cada dia que antecedeu o tratamento térmico, ocorrendo duas extrações por semana. Este procedimento foi adotado por serem operacionalmente inviáveis as etapas de extração, processamento e acondicionamento no mesmo dia. A água de coco, de cada lote, foi filtrada e acondicionada em três recipientes sanitizados de polietileno. A extração teve um tempo de duração de, aproximadamente, 2,5 horas, sem considerar o tempo de higienização dos cocos.

No Experimento 2, 300 cocos higienizados foram previamente refrigerados em câmara fria a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por 16 horas. Foram extraídos 110 litros de água de coco, divididos em cinco lotes de 21 litros e acondicionados em recipientes sanificados de polietileno. A água de coco depois de extraída continuou sob refrigeração até o processamento térmico, por cerca de uma hora.

No Experimento 3, 120 litros de água de coco foram extraídos de 300 cocos e mantidos à temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C}$ ) até o processamento térmico, por cerca de 30 minutos. A extração foi realizada em 35 minutos.

#### 3.2.3.4 Adição de ácido ascórbico

No Experimento 1, foram adicionados 200mg/L de ácido ascórbico, imediatamente após a extração. A adição do ácido ascórbico teve o objetivo de evitar o escurecimento enzimático pelas enzimas polifenoloxidase e peroxidase da água de coco, durante o armazenamento sob refrigeração, com base nos resultados de inativação apresentados por Campos (1996), e também para reduzir o teor de oxigênio dissolvido, conforme relatado por Joslyn (1961).

No Experimento 2, o ácido ascórbico foi adicionado imediatamente antes do tratamento térmico de cada lote. A quantidade de ácido ascórbico adicionada foi determinada segundo planejamento experimental detalhado a seguir.

No Experimento 3, 200mg/L de ácido ascórbico foram adicionados à água de coco no início da extração.

#### 3.2.3.5 Resfriamento da água de coco

O resfriamento da água de coco após a extração foi realizado somente no Experimento 1. Os recipientes com água de coco foram armazenados na sessão de congelamento de uma câmara fria mantida a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por cerca de 18 horas, até o momento do processamento térmico. No momento da extração, a temperatura

da água de coco foi de 19°C. O aumento da contaminação foi estudado, fazendo-se contagem padrão e de bolores e leveduras logo após a extração e imediatamente antes do processamento térmico. Foram utilizadas as metodologias descritas por Silva et al. (2001).

#### 3.2.3.6 Ajuste de pH e Brix

O pH de uma alíquota de 200mL de água de coco foi ajustado adicionando-se uma solução 1% de ácido cítrico, até que a água de coco atingisse pH entre 4,9 e 5 ou acidez titulável entre 9 e 10mL de NaOH 0,1N/100mL. A quantidade de ácido cítrico, consumida no ajuste, foi extrapolada para o volume a ser processado. Da mesma maneira, adicionou-se frutose na quantidade estipulada pelo cálculo de balanço de massa, para que fosse atingido Brix 6,0%, como foi determinado pelos testes de formulação.

#### 3.2.3.7 Tratamento térmico

Para estipular os binômios de tempo e temperatura de processamento dos quatro lotes do Experimento 1, foi considerada uma contaminação inicial média ( $N_0$ ), de esporos mesófilos aeróbios, de  $10^3$ UFC/mL, extrapolando cerca de 10 vezes a maior contaminação por esporos mesófilos observada em análises preliminares de águas de coco, que foi de  $7,2 \cdot 10^1$  UFC/mL. Foi estipulada uma probabilidade de unidades não esterilizadas (PUNE), ou contaminação final (N), de  $10^{-6}$ , em termos de esporos mesófilos mais resistentes que o *C. botulinum*, conforme Pflug (1987<sup>ab</sup>) e Massaguer (2002). Portanto, foi pretendido um tratamento térmico que atingisse, teoricamente, um total de nove RD, conforme Equação 2 ( $RD = \log(N_0/N)$ ).

A enzima peroxidase (POD) foi o segundo alvo do tratamento térmico, considerada termoestável e apresentando um valor z de 18 a 35°C (Tabela 4). Segundo a literatura (Yamamoto et al., 1962; Naveh et al., 1982; Robinson, 1991), a fração da enzima POD, ou seja, as isoenzimas mais termorresistentes representam em média de 5 a 10% da sua atividade total. Portanto, optou-se por um tratamento térmico que reduzisse a atividade desta enzima de 5% para cerca

de 1%, com valor D de 1 minuto (Tabela 4), o que equivale a 0,70 reduções decimais da fração termorresistente.

Com base nas considerações apresentadas, e após algumas extrapolações de valores D de mesófilos e para o *C. botulinum*, escolheu-se os binômios de tempo e temperatura de 135°C/10segundos, para atender ao tratamento mínimo equivalente ao 12D, e de 140°C/10segundos, visando uma relativa inativação da fração termorresistente da enzima POD. Desta forma, utilizando-se a Equação 3 ( $RD = (t / D_{ref}) \times 10^{(T-T_{ref})/z}$ ), teoricamente, estes binômios causariam nos alvos da esterilização as reduções decimais (RD) apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8. Estimativa de RD de microrganismos e enzimas da água de coco para o Experimento 1.**

Valores D	RD	
	135°C/10segundos	140°C/10segundos
Esporos Mesófilos <sup>1</sup>		
$D_{121}^{10} = 0,25\text{min}$ ( <i>C. botulinum</i> )	16,78	53,06
$D_{121}^{10} = 0,5\text{min}$	8,39	26,53
$D_{121}^{10} = 1,0\text{min}$	4,19	13,26
$D_{121}^{10} = 1,5\text{min}$	2,80	8,88
Enzima		
Peroxidase <sup>2</sup>	0,45	0,62 <sup>3</sup>
$D_{120}^{35} = 1\text{min}$		

$N_0 = 10^3$  e  $N = 10^6$  (Pflug, 1987ab); 1-Massaguer, 2002; 2-Svensson, 1977; 3-Isoenzima termorresistente.

No Experimento 2, a influência da temperatura de processo, juntamente com a concentração de ácido ascórbico, foi avaliada executando-se o planejamento experimental descrito na Tabela 9. Como os cinco lotes foram processados consecutivamente, a ordem de processamento obedeceu ao aumento gradativo da temperatura do esterilizador UAT. A avaliação foi realizada analisando-se a atividade enzimática, a variação de cor e turbidez, teor de oxigênio dissolvido e a variação da concentração de ácido ascórbico durante a estocagem, conforme metodologias que estão descritas a seguir.

**Tabela 9. Ordem de processamento dos lotes da água de coco no Experimento 2.**

Lote	Temperatura (°C)*	Ac. Ascórbico (mg/L)
2.1	138	0
2.2	138	200
2.3	141	100
2.4	144	0
2.5	144	200

\* com 10 segundos de retenção.

No Experimento 3, o binômio de tempo e temperatura utilizado para produção do lote 3.1 foi determinado a partir dos resultados obtidos no Experimento 2, sendo fixado em 139°C por 10 segundos.

Além das simulações teóricas, nos três experimentos o tempo de 10 segundos de retenção foi fixado devido às limitações operacionais do esterilizador UAT, que após experimentos anteriores não apresentou estabilidade de temperatura em tempos de 4 e 15 segundos. Com o tempo de 10 segundos, conseguiu-se um bom desempenho e estabilidade do equipamento, além do equipamento trabalhar próximo de sua vazão ótima de 300 litros/hora.

Após o tratamento térmico, nos três experimentos, a água de coco foi resfriada no próprio trocador de calor UAT, através da passagem de água fria pelas placas da sessão de resfriamento. A água de coco foi mantida no tanque de recepção, dentro da sala limpa, para imediato acondicionamento nas embalagens.

### 3.2.3.8 Acondicionamento asséptico e identificação

Nos Experimentos 1 e 3, a água de coco foi acondicionada no ambiente da sala limpa (Classe ISO 7), e cada garrafa recebeu uma identificação referente a sua ordem de acondicionamento, binômio utilizado e data de processo.

No Experimento 2, de cada lote de água de coco, foram coletados 6 litros em *erlenmeyers* com tampas estéreis, que foram posteriormente mantidos em câmara fria a -18°C, até o acondicionamento em 25 tubos de 70mL e 12 garrafas

de vidro de 318mL. O acondicionamento foi realizado de maneira asséptica em fluxo de ar unidirecional, com auxílio de *beckers* esterilizados.

Durante os três experimentos, os operadores na sala limpa estavam devidamente paramentados com roupas especiais, luvas, toucas e máscaras, para evitar o contato com o produto e contaminação do ambiente de acondicionamento.

#### 3.2.3.9 Esterilização das embalagens

Nos Experimentos 1 e 3, as garrafas foram sanificadas externamente por imersão em solução de ácido peracético 0,05% por no mínimo 15 minutos. Internamente, foram esterilizadas utilizando-se solução de ácido peracético 0,5% por 10 segundos à temperatura de 30 a 35°C e enxágüe com água estéril por 10 segundos. As tampas foram imersas em solução de ácido peracético 0,05%, por no mínimo 30 minutos. Após a esterilização de cada garrafa, a tampa foi retirada manualmente da solução, agitada para retirada do excesso de sanificante, e colocada na respectiva garrafa, sem o rompimento do lacre de segurança (Ver ANEXO I).

No Experimento 2, os tubos e as garrafas de vidro, com as respectivas tampas, foram esterilizados em autoclave a 121,1°C/15 minutos.

#### 3.2.3.10 Estocagem e análise das embalagens esterilizadas

Nos Experimentos 1 e 3, as embalagens esterilizadas foram colocadas em sacos de polietileno sanificados (imersão em ácido peracético 0,05%/30min.). Os sacos contendo as embalagens foram fechados e colocados na ante-sala da sala limpa em funcionamento, permanecendo até o dia do processamento, ou seja, por cerca de 24 horas. Pelo fato das embalagens não terem sido utilizadas imediatamente após a esterilização, três amostras foram analisadas no dia da esterilização e outras três no dia do acondicionamento.

### 3.2.4 Metodologias de análise da água de coco

#### 3.2.4.1 Potencial de hidrogênio (pH)

O potencial de hidrogênio foi medido a 25 °C, utilizando-se potenciômetro da marca DIGIMED, modelo DM-20, com duas casas decimais de precisão.

#### 3.2.4.2 Acidez titulável

Para análise de acidez titulável, foi utilizado o método 22.060 da AOAC (1975). Os resultados foram expressos em mililitros de NaOH 0,1N por 100mL de água de coco (mLNaOH0,1N/100mL).

#### 3.2.4.3 Ácido ascórbico

A concentração de ácido ascórbico foi determinada segundo metodologia da AOAC, adaptada por Silva (1999). Foram misturados 10mL de amostra a 50mL de ácido oxálico 1%, seguido de titulação com solução de dicloroindofenol (DCF) 2g/L, até coloração rosa permanente. A concentração foi expressa em mg/L.

A solução de DCFI foi padronizada por titulação com solução de ácido ascórbico, recentemente preparada, de concentração conhecida de, aproximadamente, 300mg/L. Este método determinou somente o teor de ácido ascórbico não oxidado (Hoare e Lindsay, 1993).

#### 3.2.4.4 Sólidos solúveis (Brix)

A concentração de sólidos solúveis foi determinada a 20 °C, utilizando-se refratômetro portátil da OPPTTECH, modelo RCZ, com escala de 0 a 32% e resolução de 0,2%.

#### 3.2.4.5 Cor e turbidez

As medidas de cor e turbidez foram realizadas em Colorímetro HunterLab, modelo *ColorQUEST*<sup>®</sup>.

Utilizou-se o sistema de cor CIELAB, com iluminante D65, ângulo do observador de 10°, calibração do tipo TTRAN e com medida de HAZE (turbidez).

As amostras foram analisadas em três repetições, sendo colocadas em cubeta de quartzo de 10mm de caminho óptico.

Para as medidas de cor, foram determinados os seguintes parâmetros:

L\* - Luminosidade, que varia de 0 (preto) a 100 (branco).

a\* - cromaticidade, que varia de +a\* (vermelho) a -a\* (verde).

b\* - cromaticidade, que varia de +b\* (amarelo) a -b\* (azul).

A partir destes parâmetros foi calculada a variação de cor  $\Delta E$  com o tempo de estocagem. Utilizou-se como o padrão de cor inicial a água de coco *in natura*. A variável  $\Delta E$  foi calculada utilizando-se a Equação 8 (Minolta, 1994):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2} \quad (8)$$

Para a medida de turbidez, foram obtidos os valores de HAZE. A variação da turbidez com o tempo foi determinada utilizando-se também como padrão a água de coco *in natura*.

#### 3.2.4.6 Osmolalidade

A osmolalidade foi determinada segundo metodologia utilizada por Petrus (2000), em osmômetro de pressão de vapor KNAUER, modelo A0280, calibrado com sensibilidade 32, e a 40°C. Para calibração do equipamento, foi construída uma curva padrão de soluções de cloreto de sódio (NaCl) de osmolalidades conhecidas. A osmolalidade destas soluções foi relacionada aos valores dos sinais emitidos pelo equipamento, obtendo-se assim a equação de conversão dos sinais para valores de osmolalidade. Assim, utilizando-se a equação, os sinais obtidos para cada amostra de água de coco foram convertidos para os respectivos valores de osmolalidade, que foram expressas em osmol/L.

#### 3.2.4.7 Análise de O<sub>2</sub> dissolvido

O oxigênio dissolvido na água de coco foi determinado com medidor de O<sub>2</sub> dissolvido, TOLEDO METTLER<sup>®</sup>, modelo MO128. O sensor foi mergulhado acima do centro de cada garrafa e, após estabilização eletrônica, foi determinado o teor de oxigênio, em triplicata, de três amostras. Os resultados foram expressos em porcentagem (%), em relação à fração de oxigênio no ar atmosférico de, aproximadamente, 21%.

#### 3.2.4.8 Atividade enzimática

No Experimento 1, a atividade da enzima polifenoloxidase foi analisada de acordo com a metodologia de Ponting e Joslyn (1948) adaptada por Campos (1993). Em tubo de ensaio, foram adicionados 5,5mL de tampão fosfato (0,2M) com pH 6,0, 1,5mL de catecol (0,2M) e 1mL de amostra de água de coco, à temperatura ambiente (25°C), seguido de leitura de absorvância em espectrofotômetro a 425nm.

A atividade da enzima peroxidase foi analisada de acordo com a metodologia de Ferhrmann e Diamond (1967) adaptada por Campos (1993). Em tubo de ensaio, foram adicionados 7mL de tampão fosfato (0,2M) com pH 5,5 e 1,5mL de solução alcoólica de guaiacol (0,5%), colocando-se em banho-maria até atingir 35°C, por cerca de cinco minutos. Posteriormente, adicionou-se 0,5mL de peróxido de hidrogênio (0,1%) e 1mL da amostra. Agitou-se e fez-se leitura imediata em espectrofotômetro a 470nm.

As leituras foram feitas no tempo zero e no intervalo de 1 minuto por 5 minutos em triplicata. Como branco, utilizou-se a mistura de todos os reagentes, sendo que no lugar da água de coco utilizou-se água destilada.

Nos Experimentos 2 e 3, as metodologias utilizadas por Campos (1993), para a análise das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, foram adaptadas como sugerido por Sato (2004). Para análise da atividade da enzima polifenoloxidase, em uma cubeta foram adicionados 2,3mL de tampão fosfato (pH 6,0), 0,7mL de

catecol (0,2M) e 1mL de amostra de água de coco, à temperatura ambiente (25°C), seguido de leitura de absorvância em espectrofotômetro a 425nm, no tempo zero e após 10 minutos.

Para análise da atividade da enzima peroxidase, em uma cubeta foram adicionados 2,3mL de tampão fosfato (0,2M) com pH 5,5, levando-se ao banho-maria até atingir 35°C. Posteriormente, adicionou-se 1mL de água de coco, 0,2mL de peróxido de hidrogênio (0,1%) e 0,5mL de solução alcoólica de guaiacol (0,5%), agitou-se e fez-se leitura imediata em espectrofotômetro a 470nm, no tempo zero e após 10 minutos.

Para a enzima peroxidase, a cubeta retornou ao banho-maria até completar o tempo de reação. Como branco, utilizou-se a mistura de todos os reagentes, substituindo-se a água de coco por água destilada. Foram utilizadas cubetas descartáveis de poliestireno de 4mL e 10mm de caminho óptico.

A atividade foi expressa em unidades/mL/minuto. Uma unidade equivale à uma variação de 0,001 na absorvância por minuto por mL de amostra. Para o cálculo de atividade, utilizou-se a Equação 9.

$$Atividade(U / mL) = \frac{(AF_{amostra} - AI_{amostra}) - (AF_{branco} - AI_{branco})}{0,001 \times t} \quad (9)$$

Onde,  $AF_{amostra}$  é a absorvância final da amostra,  $AI_{amostra}$  é a absorvância inicial da amostra,  $AF_{branco}$  é a absorvância final do branco,  $AI_{branco}$  é a absorvância inicial do branco e  $t$  é o tempo em minutos.

#### 3.2.4.9 Análises microbiológicas

Foram realizadas a contagem padrão, contagem de bolores e leveduras e a contagem de esporos mesófilos aeróbios ou anaeróbios facultativos e de esporos termófilos, utilizando-se as metodologias descritas por Silva et al. (2001).

#### 3.2.4.10 Teste de esterilidade comercial

Nos Experimentos 1 e 3, o número de amostras submetidas ao teste de esterilidade comercial foi adaptado das recomendações de von Bockelmann (1988) e Ahvenainen (1988) e considerando a capacidade diária de produção do sistema asséptico piloto. Desta forma, de cada um dos lotes do Experimento 1 e do Experimento 3, foram selecionadas 60 unidades para serem submetidas ao teste de esterilidade comercial, sendo recolhidas no início, no meio e no final do processamento. Foi seguida a metodologia descrita por Dryer e Deibel (1992). Resumidamente, as etapas do teste compreenderam a pré-incubação, a observação visual e a medida de pH, a saber:

##### -Pré-incubação

As 60 garrafas de cada lote foram incubadas por 10 dias a 35°C, como prescrito para alimentos de baixa acidez (pH>4,5).

##### -Observação visual

Após o período de incubação, as garrafas foram analisadas visualmente para detecção de estufamento e/ou turvação, característicos de desenvolvimento microbiano.

##### -Medida de pH

Foi medido o pH da água de coco pré-incubada, para verificar alteração no seu valor acima de 0,2, que seria o indicativo de contaminação microbiológica.

No Experimento 2, não foi um dos objetivos a avaliação da esterilidade comercial da água de coco obtida, visto que o sistema não foi utilizado em sua conformação original. Entretanto, realizou-se a pré-incubação (35°C) de dois tubos e de duas garrafas de cada porção, por 10 dias, para observação da ocorrência de contaminação visível e variação de pH, conforme o *Teste de Esterilidade Comercial* descrito por Dryer e Deibel, (1992). Após a pré-incubação, inoculou-se, em profundidade, 1mL de cada amostra em meio PCA, incubando-se por 48 horas

a 35°C. Portanto, no Experimento 2, partiu-se da condição de que haveriam unidades contaminadas, ou seja, somente aquelas embalagens que não apresentaram alteração de pH e turbidez, prosseguiram para as análises de oxigênio dissolvido, cor e ácido ascórbico. Portanto, foram tomados os devidos cuidados para que fossem analisadas somente amostras não contaminadas.

#### 3.2.4.11 Marcha de detecção de contaminantes

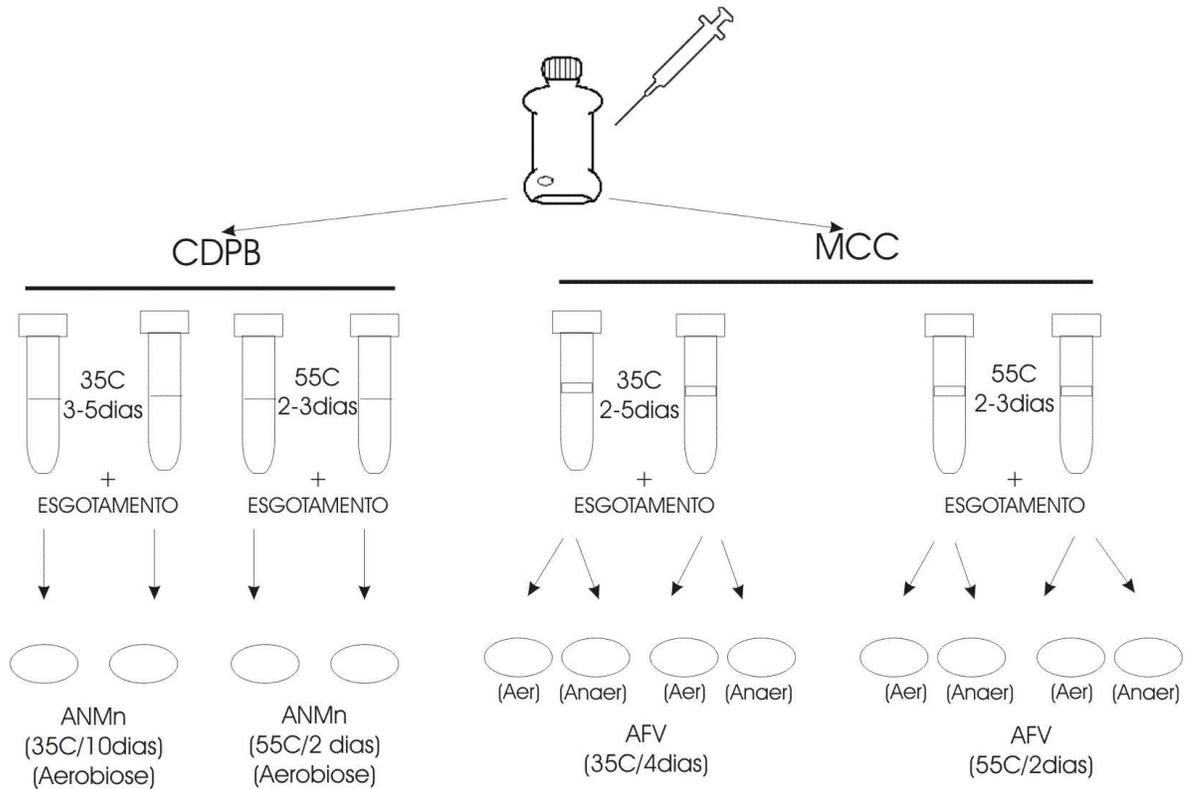
Foram escolhidas três unidades, das 60 incubadas de cada lote dos Experimentos 1 e 3, para realizar os procedimentos da marcha de detecção, que seguiram a metodologia descrita por Denny e Corlett (1992). Quando a contaminação não foi evidenciada no teste de esterilidade comercial, as garrafas foram escolhidas ao acaso, sendo uma do início, meio e final do processo. Na Figura 16 está apresentado um esquema detalhado da marcha de detecção.

Para retirar a água de coco, sem o risco de contaminação, as garrafas foram imersas em solução de ácido peracético 0,3% e secas em repouso sob fluxo laminar utilizando-se gaze estéril. Com o uso de seringa graduada de 5mL e agulha, ambas esterilizadas, a lateral das garrafas foi perfurada para retirada da alíquota a ser analisada.

Alíquotas de 2mL de cada garrafa foram distribuídas em tubos de tampa e rosca contendo caldo dextrose púrpura de bromocresol (CDPB), para teste de microrganismos aeróbios, e meio de carne cozida (MCC), para teste de microrganismos anaeróbios. Estes últimos foram selados com vaspar (parafina+vaselina). Após o tempo de incubação, observou-se a ocorrência ou não de turvação e amarelamento dos tubos de CDPB, que caracterizam o crescimento de microrganismos e formação de ácido, respectivamente. Nos tubos de MCC, observou-se a ocorrência ou não de turvação e de formação de gás.

A não ocorrência destas características nos tubos inoculados determinou que foi atingida a esterilidade comercial. Mas quando alguns tubos apresentaram uma das características descritas anteriormente, foi realizada a confirmação e identificação do grupo do microrganismo contaminante. Para a confirmação, foi realizado esgotamento de uma alçada, do conteúdo de cada tubo, no meio

correspondente. O meio ágar nutriente manganês (ANMn) foi utilizado para inoculação do CDPB, e o meio ágar fígado de vitelo (AFV), para inoculação do MCC.



**Figura 16. Esquema da marcha de detecção de contaminantes.**

Os lotes que alcançaram a esterilidade comercial foram analisados sensorialmente para determinar a sua vida útil. Entretanto, os lotes que não foram considerados comercialmente estéreis, foram avaliados somente quanto à aceitação sensorial pós-processamento térmico, através da análise de amostras mantidas sob congelamento. Considerou-se que estas amostras não apresentavam riscos à saúde dos provadores, por serem equivalentes a um produto recentemente produzido, ou água de coco *in natura* recentemente extraída.

### **3.2.5 Determinação da vida útil dos lotes de água de coco dos Experimentos 1 e 3**

Para determinar a vida útil dos lotes de água de coco dos Experimentos 1 (Lotes 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4) e 3 (Lote 3.1), foi delineado um teste sensorial com uma duração prevista para quatro meses. O painel de consumidores foi composto por alunos e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), apreciadores de água de coco e familiarizados com os testes sensoriais. Foi aplicado um teste afetivo de aceitação, utilizando-se uma escala hedônica estruturada de nove pontos (1=desgostei muitíssimo; 5=nem gostei/nem desgostei; 9=gostei muitíssimo). Em cada sessão, cerca de 30 consumidores indicaram o quanto gostaram ou desgostaram de cada uma das amostras quanto aos atributos de aparência, aroma, sabor e impressão global e quanto à intenção de compra, utilizando-se o modelo de ficha da Figura 17 (Stone e Sidel, 1985; Silva, 2001).

As análises foram programadas para serem realizadas com intervalos de 15 dias de estocagem. Foi estipulado que quando um lote obtivesse média abaixo de seis (6=gostei ligeiramente) em qualquer um dos atributos avaliados, seria considerado o fim da vida útil do referido lote. A análise sensorial dos lotes produzidos foi iniciada após o resultado do testes de esterilidade comercial, ou seja, cerca de 15 dias. As amostras recém-processadas, de cada lote, foram mantidas congeladas, sendo analisadas juntamente às amostras estocadas à temperatura ambiente, servindo como amostras-controle de cada lote. Este procedimento teve o objetivo de determinar a partir de que período de estocagem, à temperatura ambiente, a água de coco apresentaria aceitação diferente da amostra recém-processada mantida sob congelamento.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

1. Por favor, avalie a amostra codificada de água de coco tipo longa vida e indique, utilizando a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou em relação aos atributos apresentados.

9. Gostei muitíssimo

8. Gostei muito

7. Gostei moderadamente

6. Gostei ligeiramente

5. Nem gostei/Nem desgostei

4. Desgostei ligeiramente

3. Desgostei moderadamente

2. Desgostei muito

1. Desgostei muitíssimo

	Amostra	_____
	Aparência	_____
	Aroma	_____
	Sabor	_____
	Impressão Global	_____

2. Se encontrasse este produto no mercado você:

( ) certamente compraria

( ) provavelmente compraria

( ) talvez compraria/ talvez não compraria

( ) provavelmente não compraria

( ) certamente não compraria

Comentários: \_\_\_\_\_.

**Figura 17. Ficha do teste afetivo de aceitação utilizado na determinação da vida útil da água de coco.**

Para o Experimento 1, as análises foram realizadas de dois em dois lotes, já que estes foram produzidos com intervalo de uma semana.

Especificamente, para análise do lote 3.1 produzido no Experimento 3, além da amostra controle, introduziu-se uma amostra de água de coco comercial, acondicionada em embalagem cartonada. A amostra comercial foi selecionada dentre três marcas de diferentes fabricantes, utilizando-se um teste de preferência. Como não foi observada diferença significativa entre as três marcas, foi selecionada aquela que obteve a maior média de preferência. O uso da amostra

comercial teve o objetivo de avaliar a água de coco do Lote 3.1 em relação às águas de coco tipo UHT disponíveis no mercado.

As amostras foram servidas monadicamente aos provadores e a ordem de apresentação das mesmas foi balanceada para efeitos *first-order-carry-over*, segundo delineamento descrito por Wakeling e MacFie (1995). As amostras foram servidas em copos descartáveis, com temperatura entre 7-10°C. Os testes foram realizados em cabines individuais iluminadas com luz branca (Stone e Sidel, 1985). As amostras de água de coco estocadas à temperatura ambiente foram previamente analisadas quanto à ocorrência de turbidez aparente, presença de bolores visíveis, odor e alteração no pH.

#### 3.2.5.1 Análise estatística dos resultados sensoriais do teste de determinação de vida útil

Os resultados dos testes sensoriais foram processados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para comparação entre as médias de aceitação referente a cada período de estocagem, de cada um dos atributos, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), visando a determinação do tempo de vida útil. Desta forma, os mesmos testes serviram para determinar a diferença entre as amostras analisadas em uma mesma sessão. As análises foram processadas utilizando-se o programa SAS, versão 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

### 3.2.6 Caracterização das embalagens

A caracterização das embalagens seguiu as normas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), conforme descrito por Alves et al. (1998).

#### 3.2.6.1 Dimensionamento das embalagens

O dimensionamento das garrafas foi realizado utilizando-se paquímetro, régua e medidor de espessura Mitutoyo Absolut modelo ID-C112B.

Determinou-se a altura, o diâmetro do corpo, em três pontos (topo, meio e base), o diâmetro da base e o diâmetro externo da terminação das garrafas. A distribuição de espessura foi determinada em dois pontos do ombro, do corpo e da base. Todas as medidas foram expressas em milímetros.

#### 3.2.6.2 Peso das embalagens

O peso das embalagens foi medido em balança semi-analítica da marca QUIMIS modelo BG 2000, expresso em gramas, com duas casas decimais.

#### 3.2.6.3 Capacidade volumétrica

Foram determinados os volumes total e útil das embalagens utilizando-se provetas de 100 e 500mL e água destilada a 25 °C, e por diferença foi determinado o volume do espaço vazio, ambos em mililitros (mL).

#### 3.2.6.4 Eficiência do fechamento das garrafas

A avaliação do fechamento das garrafas de PET foi realizada através do método de emissão de bolhas (ASTM). Devido à diferença de pressão entre o meio externo e interno da garrafa, seria observada a formação de bolhas no ambiente de menor pressão (ambiente externo), caso houvesse vazamentos ou um fechamento ineficiente.

#### 3.2.6.5 Determinação da permeabilidade do sistema de embalagem ao oxigênio

A taxa de permeabilidade ao oxigênio foi determinada coulometricamente, utilizando-se o aparelho OX-TRAN<sup>®</sup> 2/20 da MOCON<sup>®</sup> (ASTM). Foram realizadas medidas tanto da garrafa sem tampa, quanto da garrafa com tampa, para avaliar a sua influência na taxa de permeabilidade ao oxigênio. As análises foram realizadas em duplicata e simultaneamente.

#### 3.2.6.6 Medida de transmitância

A transmitância da embalagem foi medida utilizando-se um espectrofotômetro da marca Beckman modelo DU-70. Foi obtido o espectro de transmitância em um intervalo de comprimento de onda de 200 a 780nm. Foi feita uma análise comparativa com garrafas de água de coco disponíveis no mercado.

#### 3.2.6.7 Torque de fechamento e abertura

Foi medido o torque de fechamento e abertura com torquímetro da marca Regmed, modelo TT – 170/a, com escala de 0 a 3N.m. O teste foi realizado em triplicata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE ÁGUA DE COCO

#### 4.1.1 Percepção dos gostos ácido e doce nas formulações de água de coco

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados do teste de escala, relacionando as médias dos valores obtidos para a intensidade de gosto ácido e gosto doce, de cada formulação de água de coco, com seus respectivos pH, Brix e acidez titulável.

**Tabela 10. Medidas das intensidades de gostos ácido e doce das formulações de água de coco.**

Formulação	pH	Brix	Acidez <sup>1</sup>	Gosto Ácido <sup>2</sup>	Gosto Doce <sup>2</sup>
1	4,4	5,5	22,50	5,1 <sup>ab</sup>	1,6 <sup>d</sup>
2	4,9	5,5	9,80	1,5 <sup>d</sup>	3,1 <sup>bcd</sup>
3	4,4	6,5	22,50	4,9 <sup>abc</sup>	4,2 <sup>abc</sup>
4	4,9	6,5	9,80	1,9 <sup>d</sup>	3,9 <sup>abc</sup>
5	4,3	6,0	27,50	6,4 <sup>a</sup>	2,0 <sup>cd</sup>
6	5,0	6,0	9,00	1,8 <sup>d</sup>	4,3 <sup>ab</sup>
7	4,65	5,3	15,10	3,2 <sup>bcd</sup>	2,2 <sup>bcd</sup>
8	4,65	6,7	15,50	1,9 <sup>d</sup>	5,8 <sup>a</sup>
9	4,65	6,0	15,30	3,3 <sup>bcd</sup>	3,5 <sup>bcd</sup>
10	4,65	6,0	14,90	2,8 <sup>cd</sup>	3,6 <sup>abcd</sup>
11	4,65	6,0	14,70	2,3 <sup>d</sup>	4,0 <sup>abc</sup>

1- mL de NaOH 0,1N/100mL; 2 - Letras em comum na mesma coluna, indicam que não houve diferença significativa entre as formulações, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

A partir dos valores apresentados na Tabela 10, foram avaliados os efeitos das variáveis pH e Brix sobre a intensidade dos gostos ácido e doce nas formulações, os quais estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11. Efeitos estimados das variáveis independentes sobre a intensidade dos gostos ácido e doce nas formulações de água de coco.**

Fator	Intensidade de gosto ácido		Intensidade de gosto doce	
	Efeito	Erro padrão	Efeito	Erro padrão
pH	-3,28	0,35	1,11	0,19
Brix	-		2,12	0,19

Efeitos com nível de significância menor que 10% ( $p < 0,1$ ).

Observou-se que apenas a variável pH influenciou, significativamente ( $p < 0,1$ ), na percepção de gosto ácido, apresentando um efeito negativo, ou seja, quanto maior o pH menor a intensidade de gosto ácido. A percepção de gosto doce foi influenciada positivamente pelas variáveis pH e Brix, ou seja, quanto maior o pH e maior o Brix maior a percepção de gosto doce. A variável Brix apresentou, aproximadamente, o dobro do efeito da variável pH, na percepção de gosto doce.

Na Tabela 12 estão apresentados os coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( $p$ ) e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dos modelos ajustados, obtidos para a percepção da intensidade dos gostos ácido e doce.

Observa-se na Tabela 12 que os modelos de intensidade de gosto ácido e gosto doce, representados pelas Equações 10 e 11, apresentaram coeficientes de determinação maiores que 90%, demonstrando a validade de cada regressão, e falta de ajuste não-significativa ( $p > 0,05$ ). Portanto, com estes resultados os modelos foram considerados preditivos.

A matéria-prima utilizada nestes experimentos apresentou pH 5,02, acidez titulável igual a 9 mLNaOH0,1N/100ml e Brix 5,2%, ou seja, aquela que mais se aproximou das características da água de coco *in natura* foi a formulação seis. Portanto, os resultados deste experimento indicaram que a formulação que mais se aproximou das características sensoriais da água de coco natural apresenta

uma intensidade de gosto ácido menor ou igual a 1,8, e uma intensidade de gosto doce menor ou igual a 4,3.

**Tabela 12. Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( $p$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) dos modelos de intensidade de gosto ácido e gosto doce da água de coco.**

Parâmetro	Coef. de Regressão	F	$p$
<b>Modelo ajustado de Intensidade de gosto ácido<sup>1</sup></b>			
Média ( $\beta_0$ )	2,69	-	0,0060
pH (P)	-1,64	85,88	0,0114
pH <sup>2</sup> (P <sup>2</sup> )	0,69	11,81	0,0752
Equação (10) <b>GA = 2,69 - 1,64.P + 0,69.P<sup>2</sup></b>		$R^2=0,9411$ F=64,26	
Falta de ajuste	F=0,685 $p=0,6956$		
<b>Modelo ajustado de Intensidade de gosto doce<sup>1</sup></b>			
Média ( $\beta_0$ )	3,75	-	0,0009
pH (P)	0,56	35,36	0,0271
pH <sup>2</sup> (P <sup>2</sup> )	-0,39	13,15	0,0683
Brix (B)	1,06	128,67	0,0077
pH x Brix (PB)	-0,45	11,57	0,0766
Equação (11) <b>GD = 3,75 + 0,56P - 0,39P<sup>2</sup> + 1,06B - 0,45PB</b>		$R^2=0,9086$ F=15	
Falta de ajuste	F=4,25 $p=0,1996$		

1-Modelos obtidos com valores codificados das variáveis independentes.

Considerando-se GA=1,8, na Equação 10, e GD=4,3, na Equação 11, os valores codificados de pH e Brix correspondem a 0,84 e 0,52. Decodificando estes valores, obtemos que a formulação de água de coco com intensidade de gosto ácido e gosto doce que mais se aproxima do natural, segundo os modelos de regressão, tem pH  $\geq 4,86$  e Brix  $\leq 6,26\%$ . Entretanto, para determinar a formulação final, são necessários os dados sensoriais do teste de escala do ideal para confirmar se as intensidades de acidez e doçura semelhantes a da água de

coco natural, utilizada como matéria-prima neste experimento, são consideradas ideais pelos consumidores.

Para os modelos descritos nas Equações 10 e 11, foram construídas as respectivas superfícies de resposta, apresentadas nas Figuras 18 e 19.

Segundo o comportamento da superfície de resposta da Figura 18 observou-se que águas de coco com pH entre 4,65 e 5,0 apresentam semelhante intensidade de gosto ácido fraco, entre 0 e 3 (nível verde escuro). Isto é confirmado pelos resultados do teste de Tukey, apresentados na Tabela 10, onde apenas as formulações 1, 3 e 5, com pH 4,4, 4,4 e 4,3, respectivamente, apresentaram intensidade de gosto ácido forte, maiores ou iguais a cinco. Portanto, apesar do modelo de regressão indicar um valor ótimo de pH, pode-se utilizar uma faixa de pH de 4,65 a 5,0, sem causar diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) na percepção de gosto ácido em relação à água de coco natural.

Contudo, analisando-se o comportamento da superfície da Figura 19, observou-se que são possíveis mais de uma combinação de pH e Brix para se atingir a mesma percepção de doçura. Tomando como base o valor 4,3 de intensidade de gosto doce (nível vermelho), reportado anteriormente, e substituindo-se na Equação 11, observou-se que valores próximos a este tanto são obtidos por uma formulação com pH 4,9 e Brix 6,0, quanto por uma com pH 4,4 e Brix 6,5, ou ainda por outra com pH 4,65 e Brix 6,3, por exemplo.

Estas observações também foram confirmadas pelos resultados do teste de Tukey, apresentados na Tabela 10, onde a maioria das formulações não diferem significativamente entre si. Portanto, formulações que apresentam pH baixos ( $\leq 4,4$ ) combinados a baixos valores de Brix ( $\leq 5,5$ ) e pH altos ( $\geq 5,0$ ) combinados a altos valores de Brix ( $\geq 6,5$ ), podem ser consideradas muito ácidas e pouco doces ou pouco ácidas e muito doces, respectivamente.

Portanto, com base na percepção de acidez e doçura de provadores treinados, formulações de água de coco com pH entre 4,65 e 5,0, acidez titulável entre 9 e 15,5mL de NaOH0,1N/100mL e Brix entre 6,0 e 6,5%, não causam alterações significativas na percepção de acidez e doçura em relação à água de coco natural.

#### 4.1.2 Otimização da acidez e da doçura da água de coco

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados do teste de escala do ideal, relacionando as médias dos valores obtidos para gosto ácido e gosto doce ideal, de cada formulação de água de coco, com seus respectivos pH, Brix e acidez titulável.

**Tabela 13. Medidas de gosto ácido e gosto doce ideais das formulações de água de coco.**

Formulação	pH	Brix	Acidez <sup>1</sup>	Gosto Ácido <sup>2:3</sup>	Gosto Doce <sup>2:3</sup>
1	4,4	5,5	21,00	1,61 <sup>ab</sup>	-1,27 <sup>de</sup>
2	4,9	5,5	9,85	-0,30 <sup>e</sup>	-0,88 <sup>cd</sup>
3	4,4	6,5	20,95	1,03 <sup>bc</sup>	-0,30 <sup>abc</sup>
4	4,9	6,5	9,90	-0,30 <sup>e</sup>	0,39 <sup>a</sup>
5	4,3	6,0	27,00	1,97 <sup>a</sup>	-0,91 <sup>cde</sup>
6	5,0	6,0	9,00	-0,03 <sup>de</sup>	-0,06 <sup>ab</sup>
7	4,65	5,3	15,00	0,82 <sup>c</sup>	-1,67 <sup>e</sup>
8	4,65	6,7	15,05	0,54 <sup>cd</sup>	0,39 <sup>a</sup>
9	4,65	6,0	15,00	0,88 <sup>c</sup>	-0,15 <sup>abc</sup>
10	4,65	6,0	15,05	0,56 <sup>cd</sup>	-0,21 <sup>abc</sup>
11	4,65	6,0	15,00	0,91 <sup>bc</sup>	-0,51 <sup>bcd</sup>

1-mL de NaOH 0,1N/100mL; 2-Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as formulações, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ); 3-Escala do Ideal: +4=extremamente mais ácida/mais doce que o ideal; 0=ideal; -4=extremamente menos ácida/menos doce que o ideal.

A partir dos valores apresentados na Tabela 13, foram avaliados os efeitos das variáveis pH e Brix sobre os gostos ácido e doce ideais nas formulações, os quais estão apresentados na Tabela 14.

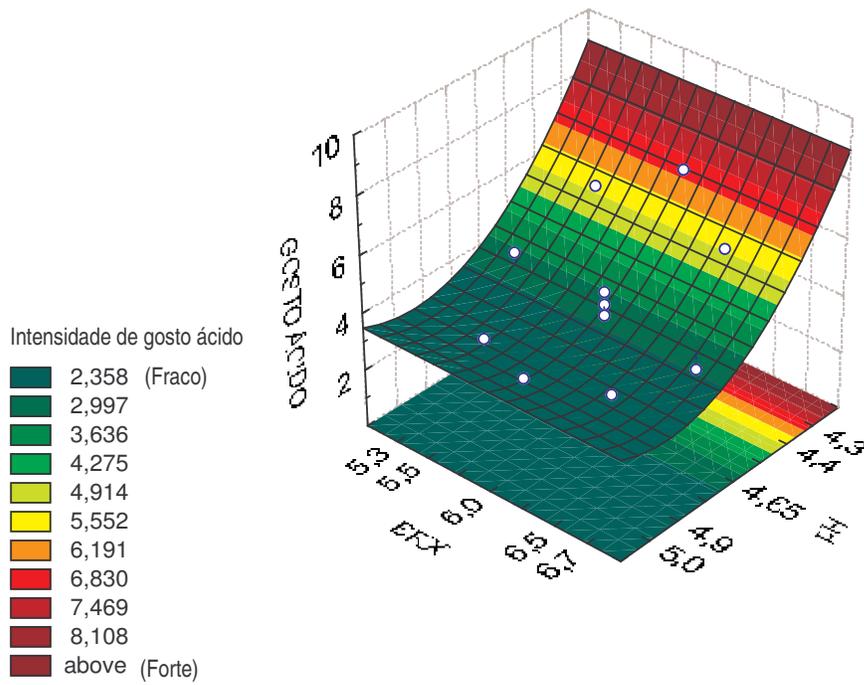


Figura 18. Superfície de resposta da intensidade de gosto ácido da água de coco.

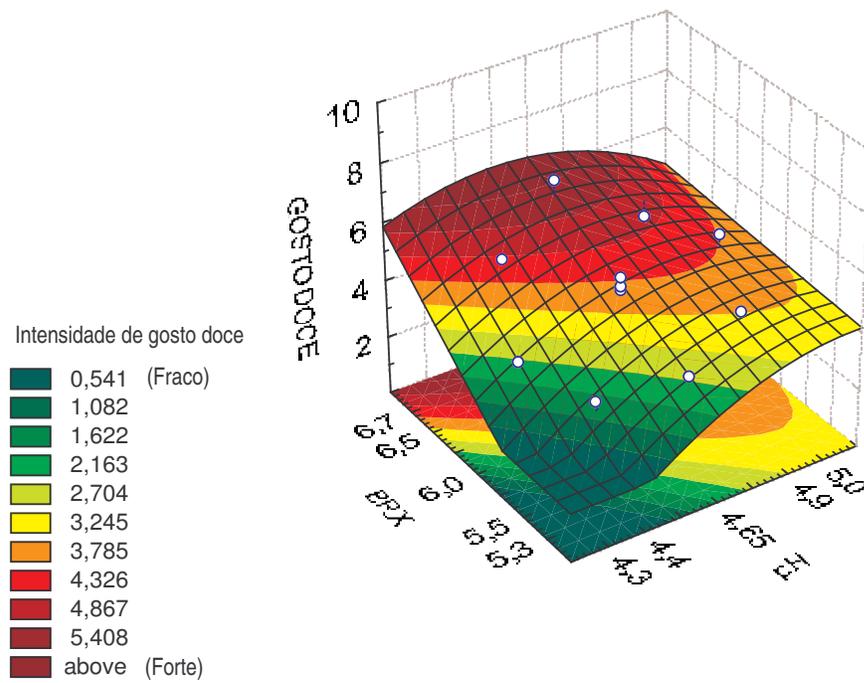


Figura 19. Superfície de resposta da intensidade de gosto doce da água de coco.

**Tabela 14. Efeitos estimados das variáveis independentes sobre os gostos ácido e doce ideais nas formulações de água de coco.**

Fator	Gosto ácido ideal		Gosto doce ideal	
	Efeito	Erro padrão	Efeito	Erro padrão
<b>pH</b>	-1,52	0,14	0,57	0,14
<b>Brix</b>	-	-	1,29	0,14

Efeitos com nível de significância menor que 10% ( $p < 0,1$ ).

Observou-se que o gosto ácido ideal da água de coco foi determinado somente pela variável pH, a qual causou um efeito negativo, enquanto o gosto doce ideal foi influenciado pelas duas variáveis, pH e Brix, que causaram efeitos positivos. Estes resultados confirmaram os que foram observados no teste de escala anterior. Neste teste a variável Brix também apresentou o dobro do efeito da variável pH, sobre a percepção de gosto doce ideal. Estes resultados demonstram uma boa correlação entre os testes sensoriais realizados com provadores treinados e não treinados.

Na Tabela 15 estão apresentados os coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( $p$ ) e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dos modelos ajustados, obtidos para a percepção dos gostos ácido e doce ideais.

Observou-se na Tabela 15 que os modelos de gosto ácido ideal e gosto doce ideal, representados pelas Equações 12 e 13, apresentaram coeficientes de determinação próximos de 90%, demonstrando a validade de cada regressão, e falta de ajuste não-significativa ( $p > 0,05$ ). Portanto, com estes resultados os modelos foram considerados preditivos.

Considerando-se que no teste de escala do ideal o gosto ácido ideal (GAI) e o gosto doce ideal (GDI) são equivalentes ao valor zero, ao substituir este valor nas Equações 12 e 13, obtém-se valores codificados de pH e Brix iguais a 0,92 e 0,32, respectivamente. Decodificando estes valores, a formulação ideal de água de coco, em relação aos gostos ácido e doce, tem pH e Brix iguais a 4,9 e 6,2%, respectivamente. Portanto, é uma formação de alta acidez ( $pH > 4,5$ ) que requer um tratamento térmico de esterilização.

**Tabela 15. Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( $p$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) dos modelos de gosto ácido e gosto doce ideais da água de coco.**

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	F	$p$
<b>Modelo ajustado de gosto ácido ideal<sup>1</sup></b>			
Média ( $\beta_0$ )	0,70	-	0,0069
pH (P)	-0,76	122,34	0,0081
Equação (12) <b>GAI = 0,70 – 0,76.P</b> $R^2=0,8822$ F=65,71			
Falta de ajuste	F=2,05 $p=0,3669$		
<b>Modelo ajustado de gosto doce ideal<sup>1</sup></b>			
Média ( $\beta_0$ )	-0,47	-	0,0149
pH (P)	0,29	17,50	0,0527
Brix (B)	0,64	89,20	0,0110
Equação (13) <b>GDI = -0,47 + 0,29P + 0,64B</b> $R^2=0,9253$ F=49,75			
Falta de ajuste	F=1,10 $p=0,5474$		

1-Modelos obtidos com valores codificados das variáveis independentes.

Estes valores confirmaram o que foi observado na formulação seis (Tabela 13), que se apresentou aproximadamente ideal (valores próximos de zero), tanto no que se refere ao gosto ácido como ao gosto doce. Estes resultados também são coerentes com as observações feitas no teste anterior no que se refere à intensidade de gosto ácido e gosto doce em relação à água de coco natural. Ou seja, para os consumidores a formulação ideal é ligeiramente mais ácida e mais doce do que a água de coco natural que foi utilizada como matéria-prima neste experimento, que apresentou pH e Brix iguais a 5,02 e 5,2%, respectivamente.

Para os modelos descritos nas Equações 12 e 13, foram construídas as respectivas superfícies de resposta, apresentadas nas Figuras 20 e 21.

Observa-se na Figura 20 que a percepção de gosto ácido ideal está localizada na região de cor verde referente aos valores de pH próximos de 4,9, podendo ser adotados todos os níveis de Brix utilizados neste experimento, que vão de 5,3 a 6,7%.

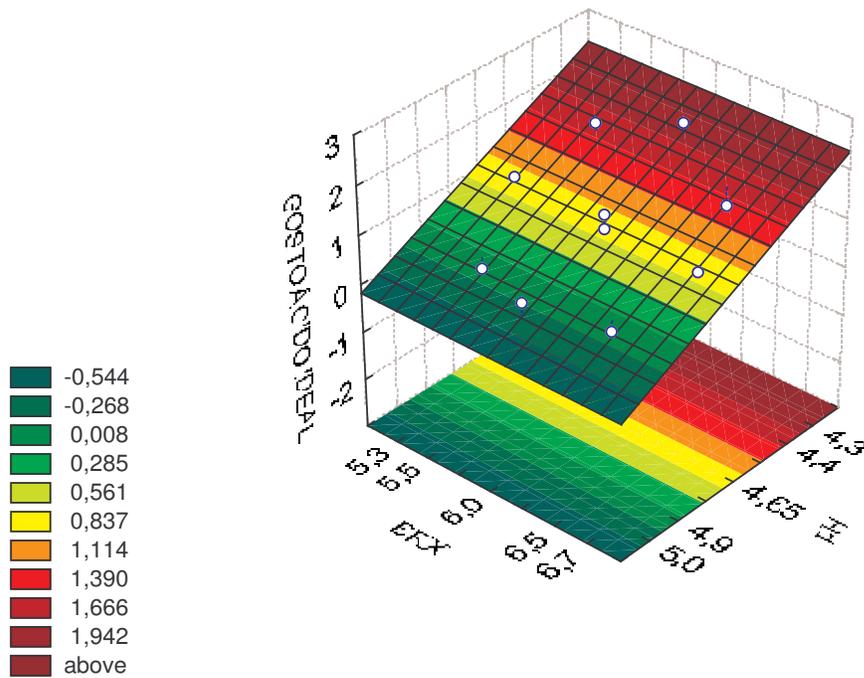
Entretanto, analisando-se a superfície da Figura 21, a percepção de gosto doce ideal está localizada na região laranja e é referente a mais de uma combinação de pH e Brix, como: 5,0 e 6%, 4,65 e 6,5% ou 4,4 e 6,5%, por exemplo.

Assim como foi observado, no teste de escala anterior, a maior parte das formulações não diferem completamente entre si a um nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), conforme resultados do teste de Tukey. De uma maneira geral as únicas que mais se afastaram da região do ideal foram as formulações 1, 5 e 7, as quais tinham ou pH mais baixo (4,4 e 4,3) ou Brix mais baixo (5,3%), sendo consideradas ligeiramente mais ácidas e menos doces que o ideal, respectivamente. Conforme a Instrução Normativa nº39 do Ministério da Agricultura, o pH mínimo e o Brix máximo permitidos para água de coco são de 4,3 e 7%, respectivamente (Brasil, 2002).

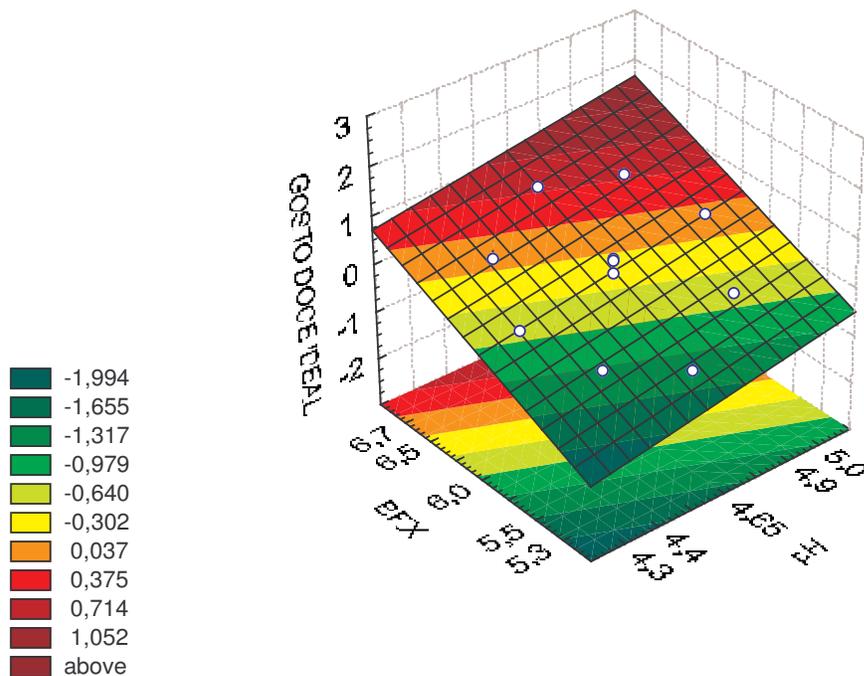
Considerando-se o uso dos resultados deste estudo, para formulação de água de coco de alta acidez ( $\text{pH} < 4,5$ ), visando um processo de pasteurização, observou-se que os valores de pH e Brix que mais se aproximaram do ideal, foram 4,4 e 6,5%, respectivamente, que é referente à formulação 3, na Tabela 13.

Como citado anteriormente, a acidez titulável das formulações de água de coco foi monitorada para ser utilizada depois de definidas as melhores formulações (de baixa e de alta acidez). Portanto, a acidez titulável da água de coco de baixa acidez, conforme os resultados apresentados, situa-se entre 9 e 10mL NaOH 0,1N/100mL, e da de alta acidez, menor ou igual a 21mL NaOH 0,1N/100mL.

Fazendo-se um rearranjo da matriz de planejamento, substituindo-se o pH pela acidez titulável, é possível obter os modelos de gosto ácido ideal e gosto doce ideal utilizando-se acidez titulável e Brix como variáveis independentes. Entretanto, os valores teóricos dos pontos axiais ( $\pm 1,41$ ) referentes à acidez titulável não são representados exatamente pelos valores experimentais, mesmo assim foi realizado o rearranjo da matriz, o qual está apresentado na Tabela 16.



**Figura 20. Superfície de resposta de gosto ácido ideal da água de coco.** Escala: -4 =extremamente menos ácido que o ideal; 0=ideal; +4=extremamente mais ácido que o ideal.



**Figura 21. Superfície de resposta do gosto doce ideal da água de coco.** Escala: -4 =extremamente menos doce que o ideal; 0=ideal; +4=extremamente mais doce que o ideal.

**Tabela 16. Rearranjo da matriz de planejamento das medidas de gosto ácido e gosto doce ideais das formulações de água de coco, utilizando a acidez titulável como variável independente.**

Formulação	Acidez titulável <sup>1</sup>	Brix	Gosto Ácido <sup>2,3</sup>	Gosto Doce <sup>2,3</sup>
2	9,85	5,5	-0,30 <sup>e</sup>	-0,88 <sup>cd</sup>
1	21,00	5,5	1,61 <sup>ab</sup>	-1,27 <sup>de</sup>
4	9,90	6,5	-0,30 <sup>e</sup>	0,39 <sup>a</sup>
3	20,95	6,5	1,03 <sup>bc</sup>	-0,30 <sup>abc</sup>
6	9,00	6,0	-0,03 <sup>de</sup>	-0,06 <sup>ab</sup>
5	27,00	6,0	1,97 <sup>a</sup>	-0,91 <sup>cde</sup>
7	15,00	5,3	0,82 <sup>c</sup>	-1,67 <sup>e</sup>
8	15,05	6,7	0,54 <sup>cd</sup>	0,39 <sup>a</sup>
9	15,00	6,0	0,88 <sup>c</sup>	-0,15 <sup>abc</sup>
10	15,05	6,0	0,56 <sup>cd</sup>	-0,21 <sup>abc</sup>
11	15,00	6,0	0,91 <sup>bc</sup>	-0,51 <sup>bcd</sup>

1-mL de NaOH 0,1N/100mL; 2-Letras em comum na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as formulações, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ); 3-Escala do Ideal: +4=extremamente mais ácida/mais doce que o ideal; 0=ideal; -4=extremamente menos ácida/menos doce que o ideal.

A partir dos valores apresentados na Tabela 16, foram avaliados os efeitos das variáveis independente, acidez titulável e Brix, sobre os gostos ácido e doce ideais nas formulações, os quais estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17. Efeitos estimados das variáveis independentes, acidez titulável e Brix, sobre os gostos ácido e doce ideais nas formulações de água de coco.**

Fator	Gosto ácido ideal		Gosto doce ideal	
	Efeito	Erro padrão	Efeito	Erro padrão
<b>Acidez titulável</b>	1,52	0,14	-0,38	0,14
<b>Brix</b>	-	-	1,09	0,14

Efeitos com nível de significância menor que 10% ( $p < 0,1$ ).

Observou-se que a acidez titulável teve um efeito positivo sobre a percepção de gosto ácido e negativo sobre a percepção de gosto doce. O Brix não teve efeito significativo sobre o gosto ácido, mas foi positivo e cerca de três vezes maior do que a acidez titulável sobre a percepção de gosto doce ideal. Estes resultados são equivalentes aos encontrados quando utilizou-se o pH como variável independente.

Na Tabela 18 estão apresentados os coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( $p$ ) e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dos modelos ajustados, obtidos para a percepção dos gostos ácido e doce ideais, utilizando-se a acidez titulável como variável independente.

**Tabela 18. Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros ( $p$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) dos modelos de gosto ácido e gosto doce ideais da água de coco, utilizando-se a acidez titulável como variável independente.**

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	F	$p$
<b>Modelo ajustado de gosto ácido ideal<sup>1</sup></b>			
Média ( $\beta_0$ )	0,70	-	0,0069
Acidez titulável (A)	0,76	122,34	0,0081
Equação (14) <b>GAI = 0,70 + 0,76.A</b> $R^2=0,8822$ $F=65,71$			
Falta de ajuste $F=2,05$ $p=0,3669$			
<b>Modelo ajustado de gosto doce ideal<sup>1</sup></b>			
Média ( $\beta_0$ )	-0,42	-	0,0356
Acidez titulável (A)	-0,19	7,56	0,1106
Brix (B)	0,55	64,20	0,0152
Brix <sup>2</sup> ( $B^2$ )	-0,17	4,96	0,1557
Equação (15) <b>GDI = -0,42 - 0,19A + 0,55B - 0,17B<sup>2</sup></b> $R^2=0,8157$ $F=10,31$			
Falta de ajuste $F=3,07$ $p=0,2639$			

<sup>1</sup>-Modelos obtidos com valores codificados das variáveis independentes.

Observou-se na Tabela 18 que os modelos de gosto ácido ideal e gosto doce ideal, representados pelas Equações 14 e 15, apresentaram coeficientes de determinação entre 80 e 90%, demonstrando a validade de cada regressão, e falta de ajuste não-significativa ( $p>0,05$ ). Portanto, com estes resultados os modelos foram considerados preditivos. Para os modelos descritos nas Equações 14 e 15, foram construídas as respectivas superfícies de resposta, apresentadas nas Figuras 22 e 23.

Observa-se na Figura 22 que o gosto ácido ideal situa-se na região de cor verde escuro que é referente a uma acidez titulável próxima de 10mLNaOH0,1N/100mL, em todos os níveis de Brix utilizados. Enquanto que o gosto doce ideal situa-se na região de cor vermelho escuro, delimitada por uma acidez titulável menor ou igual a 15mLNaOH0,1N/100mL e Brix maior que 6%.

Utilizando-se as Equações 14 e 15, determinou-se que os valores de acidez titulável e Brix de uma formulação ideal, em termos de acidez e doçura, são equivalentes a 9,42mLNaOH0,1N/100mL e 6,26%, respectivamente. Estes valores confirmaram os que foram determinados pelos modelos anteriores, quando foram utilizados pH e Brix como variáveis independentes.

#### 4.1.3 Formulação de água de coco com frutose

Quando um teste de similaridade foi aplicado para avaliar o impacto da substituição da sacarose por frutose, os resultados que estão apresentados na Tabela 19, indicaram que, ao nível de 5% de significância, não mais que 25% dos provadores seriam capazes de notar a diferença entre uma formulação com sacarose e outra com frutose.

**Tabela 19. Resultado do teste de similaridade entre as formulações de água de coco com sacarose e frutose.**

Formulações			Nº Consumidores <sup>4,5</sup>	
pH	Acidez Titulável <sup>3</sup>	Brix (%)	Erros	Acertos <sup>6</sup>
4,44 <sup>1</sup>	19,00	6,5 (sacarose)	25	8
4,44 <sup>1</sup>	19,00	6,2 (frutose)		
4,90 <sup>2</sup>	9,60	6,2 (sacarose)	24	9
4,90 <sup>2</sup>	9,60	6,0 (frutose)		

1- alta acidez; 2-baixa acidez; 3- mL de NaOH 0,1N/100mL; 4- 33 provadores; 5- Nº de provadores que acertaram e erraram qual a amostra diferente; 6-O valor mínimo tabelado é de 11 acertos, ao nível de 5% de significância.

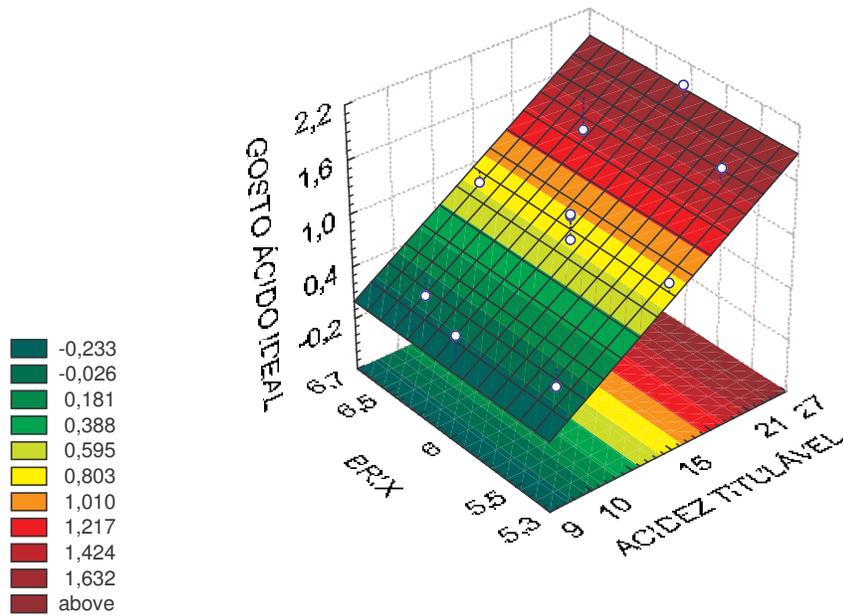


Figura 22. Superfície de resposta de gosto ácido ideal da água de coco, utilizando acidez titulável como variável independente. Escala: -4 =extremamente menos ácido que o ideal; 0=ideal; +4=extremamente mais ácido que o ideal.

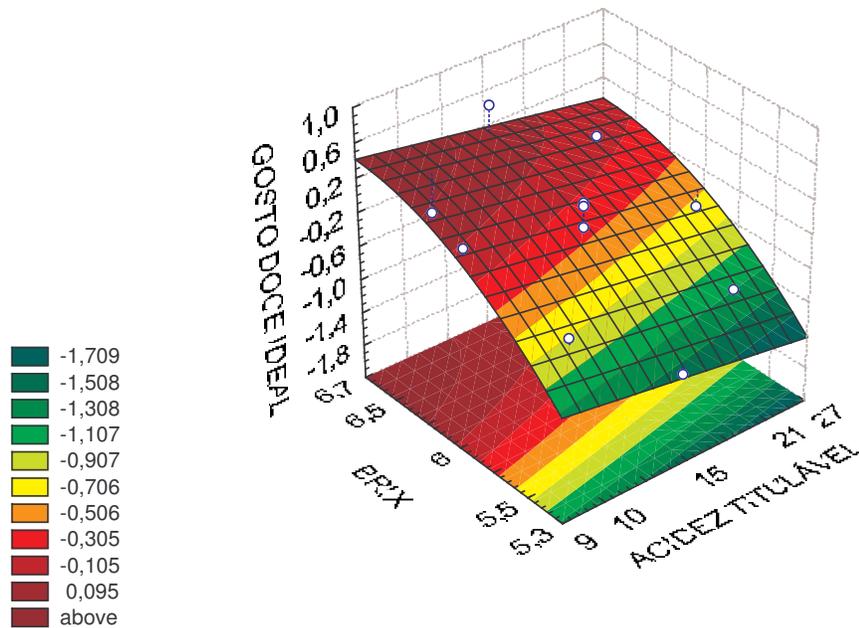
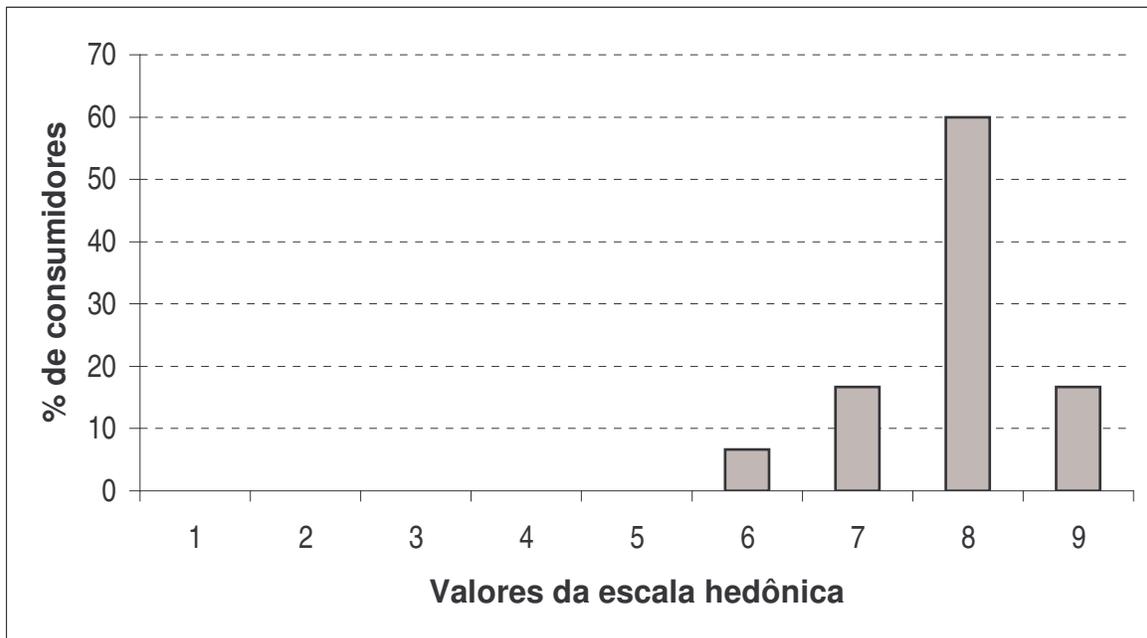


Figura 23. Superfície de resposta do gosto doce ideal de água de coco, utilizando acidez titulável como variável independente. Escala: -4 =extremamente menos doce que o ideal; 0=ideal; +4=extremamente mais doce que o ideal.

Portanto, atendendo-se às proporções apresentadas na Tabela 19, pode-se optar pelo açúcar de menor custo comercial (sacarose), ou de maior interesse nutricional (frutose), sem prejudicar a qualidade sensorial da água de coco a ser formulada.

#### 4.1.4 Aceitação da formulação otimizada de água de coco com frutose

Quando um teste afetivo de aceitação, da formulação otimizada, com pH 4,97, acidez titulável de 9,7 mL de NaOH 0,1N/100mL e Brix 6,0%, corrigido com frutose, foi realizado, utilizando-se 60 provadores, verificou-se que esta formulação obteve média de aceitação igual a oito, correspondente a categoria “gostei muito” de uma escala hedônica de nove pontos. O resultado do teste de aceitação está ilustrado no histograma de distribuição da Figura 24.



**Figura 24. Histograma das médias de aceitação atribuídas à formulação otimizada de água de coco (Escala hedônica: 1 = desgostei extremamente; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei extremamente).**

Observou-se no histograma que 60% dos provadores gostaram muito da água de coco, 17% gostaram extremamente, 17% gostaram moderadamente, e 6% gostaram ligeiramente.

O pH da formulação otimizada (4,97) foi maior do que aquele determinado pelos modelos de regressão (4,9), entretanto, como determinado anteriormente foi mantido o valor de acidez titulável próximo de 9,42, o qual estava relacionado ao pH considerado ideal pelos consumidores no teste de escala do ideal.

Estes resultados estão de acordo com a afirmativa de Rosa e Abreu (2002), de que valores de Brix entre 6,0 e 6,5% são recomendados como mais aceitos para água de coco. Já os resultados de Srebernish (1998) indicaram que a melhor água de coco (variedade gigante) obteve média de aceitação 8,35 (dentro de uma escala hedônica de nove pontos) apresentando pH 5,14 e Brix 6% (valor aproximado obtido a partir do teor de sólidos totais) e acidez titulável de 8,7mL de NaOH 01N/100mL, ou seja, uma água de coco ligeiramente menos ácida e menos doce do que a formulação ideal encontrada neste experimento. Esta diferença pode ser explicada pelas diferentes matérias-primas utilizadas tanto em termos de variedade como de região de cultivo, visto que a intensidade de sabor característico de coco influencia nos resultados.

Este estudo de padronização foi importante para definir qual a relação ideal de acidez e doçura na água de coco em termos sensoriais. Contudo, a formulação será útil somente para aquelas águas de coco que apresentarem características sensoriais extremamente diferentes das que foram aqui observadas. Isto pode acontecer quando forem utilizadas águas de coco com maturação diferente da recomendada (de seis a sete meses), ou por serem provenientes de cocos de cultivares que não propiciem uma boa relação de doçura e acidez, devido alguma deficiência durante o cultivo, como por exemplo, períodos de seca ou de chuvas intensas. A falta de sabor característico de coco também pode influenciar nos resultados.

## 4.2 AVALIAÇÃO DO SISTEMA ASSÉPTICO

## 4.2.1 Avaliação dos componentes do processo nos Experimentos 1 e 3

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados da avaliação das embalagens, linha de processamento e sala limpa durante o processamento dos lotes dos Experimentos 1 e 3.

**Tabela 20. Avaliação dos componentes do processamento asséptico de água de coco dos lotes dos Experimentos 1 e 3.**

Lotes	Experimento 1					Experimento 3
	1.1	1.2	1.3	1.4	Média	3.1
<b>Pontos de avaliação/Lotes</b>						
<b>Água de enxágüe das embalagens</b>	<b>Contagem total de mesófilos (UFC /mL)</b>					
Torneira	0	0	0,23	0,23	0,12	0,1
Pré-Filtro 1µm	0,1	0,1	0,17	0,17	0,14	0,1
Filtro 0,22 µm	0	0	0,07	0,07	0,04	0,07
Bico (início)	0,03	0,03	0	0	0,02	1,1
Bico (meio)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,5
Bico (fim)	0	0	0,03	0,03	0,02	0,6
<b>Embalagens</b>	<b>Contagem total de mesófilos (UFC/garrafa)</b>					
Não esterilizadas	0	0	7,67	7,67	3,84	53
Esterilizadas <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0,66
Esterilizadas <sup>2</sup>	0	0	1	0	0,25	4
<b>Superfícies da sala limpa</b>	<b>Contagem total de mesófilos (UFC/cm<sup>2</sup>)</b>					
Mesa	0,02	0	0,01	0,09	0,03	0
Caixa de passagem	0,02	0	0	0,65	0,17	0,02
<b>Ar da sala limpa</b>	<b>Partículas 0,5µ/m<sup>3</sup> ar (x1.000)</b>					
Início	30	26	25	32	28,25	63
Meio	56	25	34	41	39	33
Fim	46	20	46	33	36,25	44
Média/processo	44	23,667	35	35,333	34,5	46,7
<b>Ar da sala limpa</b>	<b>Contagem total de mesófilos (UFC/m<sup>3</sup> de ar)</b>					
Meio PCA	0	0	0,67	2	0,67	5,3
Meio PDA	2,67	2,67	2	0	1,84	1,3
<b>Água de enxágüe da linha</b>	<b>Contagem total de mesófilos (UFC/mL)</b>					
Início	0	0	0	0	0	0
Meio	0	0	0	0	0	0
Fim	0	0	0	0	0	0

1-analisadas após a esterilização; 2-analisadas no dia do acondicionamento.

Não foram encontrados padrões microbiológicos para água de enxágüe especificamente para esterilização química de garrafas, portanto, tomou-se como base de comparação os limites de contagem padrão de mesófilos recomendados na indústria farmacêutica para a água purificada, menor que 100 UFC/mL, e destinada à produção de injetáveis e equivalentes, menor que 10UFC/100mL ou 0,1 UFC/mL (Jönck, 2002). Relativamente a estes padrões, a água de enxágüe (referente à amostra recolhida dos bicos) utilizada no processamento dos lotes do Experimento 1, apresentou qualidade microbiológica satisfatória, enquanto que a água do lote do Experimento 3 excedeu os limites destinados à produção de injetáveis (0,1UFC/mL), demonstrando perda de eficiência na esterilização da água de enxágüe de um experimento para o outro. O intervalo entre os experimentos foi de, aproximadamente, sete meses, sendo levantada a hipótese de que o acúmulo de resíduos nas membranas dos filtros, durante este tempo, tenha influenciado na sua eficiência.

Segundo Schimdt et al. (2004), a etapa de esterilização de embalagens é um ponto crítico de controle para a produção de água de coco UHT. Nesta pesquisa, especificamente para esterilização química de embalagens, a esterilização da água de enxágüe foi considerada um ponto crítico de controle, por ser uma fonte potencial de contaminação do produto final.

No Experimento 1, a contagem total de mesófilos inicial ( $N_0$ ) encontrada nas garrafas foi de 7,67 UFC/garrafa (Lotes 1.3 e 1.4), portanto, as garrafas utilizadas estavam dentro do padrão exigido para utilização em sistemas assépticos, que é de um máximo de 20 UFC/garrafa (Chevroton, 1996). Apenas uma garrafa esterilizada do Lote 1.3, das três analisadas, apresentou contaminação de 3 UFC/garrafa, resultando em uma média de 1UFC/garrafa. Esta média foi atingida nas amostras que foram coletadas no momento do acondicionamento. Existe a possibilidade de que este tipo de contaminação seja detectado no produto durante a estocagem, contudo, não de maneira uniforme em todo o lote.

No Experimento 3, observou-se que a contaminação das garrafas não esterilizadas foi de 53 UFC/garrafa, maior do que o máximo recomendado por Chevroton (1996), de 20 UFC/garrafa. Considerando-se que estas garrafas faziam parte do mesmo lote das garrafas que apresentaram baixa contaminação inicial no Experimento 1, atribuiu-se esta maior contaminação ao acúmulo de poeira no local onde estas embalagens foram armazenadas durante sete meses. Apesar de não atenderem às recomendações de Chevroton (1996) outros trabalhos detectaram níveis de contaminação semelhantes em garrafas de PET de 500mL, da ordem de 19 a 210 UFC/garrafa (Petrus *et al.*, 2001; Abreu, 2001).

Esta contaminação pode comprometer a qualidade do Lote 3.1, pois, apesar de ter sido comprovado por Abreu (2001) que o sistema de esterilização utilizado tem capacidade de atingir até sete reduções decimais de esporos de *B. subtilis*, o ácido peracético pode ter sua ação prejudicada pela presença de barreiras físicas entre ele e a superfície a ser esterilizada. Segundo Baldry (1983) o ácido peracético continua ativo na presença de material orgânico, entretanto, é recomendado o uso de sanificantes em superfícies limpas. Camadas de poeira podem ter impedido a ação do ácido peracético resultando na contaminação média de mesófilos de 4UFC/garrafa. Contudo, a contaminação não foi uniforme entre as amostras, sendo detectadas colônias de diferentes aspectos e constituídas de uma mistura de bolores e bactérias. Com estes resultados, foi esperada a ocorrência de uma contaminação composta por uma microbiota mista no Lote 3.1.

Considerou-se também que, tratando-se de acúmulo de poeira, a contaminação externa da garrafa deveria estar maior do que a interna, podendo resultar na contaminação cruzada dos bicos aspersores, principalmente do bico de água de enxágüe. Como as garrafas estavam úmidas, devido à imersão em ácido peracético, pode ter ocorrido o escoamento durante as etapas da esterilização, para os bicos. Isto explicaria a contaminação observada nas três amostras de água de enxágüe do Lote 3.1 recolhidas no bico aspersor, que foi maior do que a

água de enxágüe recolhida na torneira e após os filtros.

Neste estudo a contaminação externa da embalagem não foi monitorada, contudo, em estudos posteriores recomenda-se a inclusão de mais esta avaliação, para evitar a ocorrência de contaminação cruzada. O aumento do número de amostras analisadas para 10 unidades, por exemplo, seria recomendado. O aumento do tempo de incubação para 5 dias, visando a recuperação de microrganismos extremamente injuriados e a inclusão do teste de detecção de esporos, aumentaria o rigor das análises. É importante também a adoção de métodos mais rápidos, para que possam ser tomadas medidas corretivas antes do acondicionamento. Considera-se necessário tornar a esterilização das embalagens mais funcional e menos exaustiva para que possa ser realizada simultaneamente ao acondicionamento e com maior eficiência.

As garrafas dos cinco lotes não apresentaram quantidades de peróxido de hidrogênio residual superiores a 0,5ppm. Abreu (2001), analisou a quantidade de peróxido de hidrogênio residual em garrafas sanificadas com ácido peracético nas concentrações de 0,8% a 40°C por 6 segundos e 0,4% a 36°C por 11 segundos, utilizando método espectrofotométrico (Afsar, 1990), encontrando 0,13ppm e 0,08ppm de peróxido de hidrogênio residual, respectivamente. Petrus (2000) não detectou peróxido de hidrogênio residual ( $<19\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), em garrafas sanificadas com Proxitane<sup>®</sup>, e posterior enxágüe com água estéril. Portanto, o procedimento de enxágüe utilizado mostrou-se eficiente na redução de peróxido de hidrogênio do residual nas garrafas sanificadas, durante todo o processo de esterilização.

A contaminação média encontrada nas superfícies da caixa de passagem e da mesa do ambiente de acondicionamento da sala limpa, para cada lote, encontrou-se dentro dos padrões internacionais recomendados pela *ICMSF* (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*) e APHA

(*American Public Health Association*), que são  $<10\text{UFC}/\text{cm}^2$  e  $<2\text{UFC}/\text{cm}^2$ , respectivamente.

Observou-se que a média das contagens de partículas do ar do ambiente da sala limpa, durante o acondicionamento dos cinco lotes, obedeceu aos limites estabelecidos pelo padrão ISO 14644-1, para salas limpas ISO classe 7, de um máximo de 352.000 partículas de  $0,5\mu\text{m}$  por metro cúbico de ar e de 2.930 partículas de  $5,0\mu\text{m}$  por metro cúbico de ar, já que esta última foi sempre menor que  $1.000/\text{m}^3$  de ar.

Segundo recomendações da NASA, o número máximo de partículas viáveis (microrganismos) em uma sala limpa ISO classe 7 é de  $17,6\text{UFC}/\text{m}^3$  de ar (Sveum *et al.*, 1992). Portanto, a qualidade do ar da sala limpa durante o processamento dos lotes dos dois experimentos encontrou-se dentro do limite de contaminação recomendado. Pode-se acrescentar que, em média, a sala limpa utilizada neste estudo atendeu até mesmo às exigências de uma sala ISO classe 5, que segundo a NASA, deve ter uma contaminação máxima de  $3,5\text{UFC}/\text{m}^3$  de ar.

Observou-se que a contaminação por bolores na sala limpa foi maior, no Experimento 1. Segundo Chacra (2002a e 2002b), a detecção de bolores em áreas limpas é considerada uma falha grave no sistema, devido ao perigo de dispersão de seus esporos pelo ar. Ainda, segundo dados apresentados pela autora, os microrganismos mais freqüentes, em ordem decrescente, são: *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp. e *Pseudomonas* sp. Entretanto, não foram encontrados na literatura limites de contaminação, especificamente de bolores em áreas limpas.

Não foi detectada contaminação, em nenhuma das amostras de água de enxágüe, coletadas da linha de processamento e acondicionamento, após os procedimentos de limpeza e esterilização, segundo a metodologia utilizada.

Entretanto, recomenda-se também um aumento no rigor das análises, assim como recomendado para as garrafas, principalmente quanto a detecção de esporos.

Pôde-se então, considerar que os procedimentos de limpeza, sanificação e esterilização, aqui executados, atingiram o objetivo de alcançar a esterilidade de todos os componentes do sistema antes e durante o processamento dos lotes, podendo ser adotados como padrão para a operação desta linha de processamento, especificamente. Contudo, é necessário analisar a parte externa das embalagens, para garantir a ausência de contaminação cruzada e de contaminação do ar e das superfícies da sala limpa, além de determinar a presença de esporos, itens que não foram testados devido ao grande número de análises, que tinham como maior objetivo a identificação de falhas grosseiras de esterilização. Contudo, a detecção de esporos em alimentos tratados por UAT é de grande importância.

## 4.2.2 Avaliação do processamento da água de coco

### 4.2.2.1 Parâmetros reais e desvios de processo do Experimento 1

Durante o processamento de cada um dos quatro lotes de água de coco, os parâmetros de processo diferiram daqueles previamente estabelecidos, devido problemas operacionais. A seguir estão relacionados os parâmetros teóricos e reais de cada um dos processamentos (Tabelas 21 e 22).

**Tabela 21. Parâmetros teóricos de processo dos lotes de água de coco do Experimento 1.**

Temperatura (°C)	Binômio 1 (135°C/10s)	Binômio 2 (140°C/10s)
<b>Produto*</b>	135	140
<b>Mínima</b>	135	140
<b>Máxima</b>	137	142
<b>Água de aquecimento</b>	137	142
<b>Na entrada do UAT</b>	Máximo de 10	Máximo de 10
<b>Na saída do UAT</b>	Máximo de 25	Máximo de 25

\* temperatura na retenção.

**Tabela 22. Parâmetros reais de processo dos lotes de água de coco do Experimento 1.**

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Lote 1.1</b>	<b>Lote 1.2</b>	<b>Lote 1.3</b>	<b>Lote 1.4</b>
<b>Produto*</b>	138-140	135 -137	141- 144	135 - 141
<b>Mínima</b>	135	135	141	135
<b>Máxima</b>	140	137	144	141
<b>Água de aquecimento</b>	139	137	143	141
<b>Na entrada do UAT</b>	7,2	12	9,0	18
<b>Na saída do UAT</b>	11	17	7,5	20

\*Temperaturas na maior parte do processo na retenção.

Observou-se que ocorreram constantes oscilações de temperatura durante o processamento dos quatro lotes de água de coco. Tais variações decorreram da dificuldade de estabilizar o equipamento nas temperaturas previamente estipuladas, descritas na Tabela 21. O tipo de desvio, constante nos processos, foi a queda de temperatura logo após a entrada do produto no esterilizador UAT, requerendo medidas de emergência para evitar o excessivo reprocessamento de produto, ocasionado pelo acionamento da válvula de retorno automático. A medida adotada foi a liberação do produto para o tanque de recepção assim que a temperatura mínima de 135°C fosse atingida. O Lote 1.3 foi o único a não ter parte da água de coco reprocessada, contudo, a temperatura teórica estipulada foi excedida em 4°C.

Inicialmente, a falta de estabilidade térmica do equipamento foi atribuída ao fato da matéria-prima ser refrigerada, contudo, no Lote 1.3 o produto entrou a 9°C e não houve retorno, e no Lote 1.4 o produto entrou a 18°C e houve retorno, o que descarta, em parte, essa hipótese. Outro motivo poderia ser a perda de calor na tubulação que leva vapor da linha até o tanque de água aquecida, devido à falta de isolamento térmico e comprimento (cerca de 2m), o que acarretaria acúmulo de água condensada no interior da mesma, dificultando a chegada do vapor ao tanque de água aquecida e, conseqüentemente, causando as constantes oscilações de temperatura.

A alternativa para solucionar este problema foi de reduzir a distância entre a linha de vapor e o tanque de água aquecida evitando o contato da tubulação com o piso. Portanto depois destas observações foram realizadas modificações estruturais e adaptações no esterilizador UAT, que foram previamente testadas em pequena escala durante o Experimento 2, para posteriormente ser realizado um novo processamento em escala piloto, ou seja, o Experimento 3.

Para análise dos resultados relacionados à microbiologia, e por segurança, foi considerada a menor temperatura atingida em cada processo, para avaliar a extensão do tratamento térmico. Entretanto, para as observações relacionadas à estabilidade físico-química e sensorial, as variações de temperatura foram consideradas. Os tratamentos térmicos pelos quais a água de coco, dos quatro lotes, foi submetida, em geral, situaram-se entre as faixas de temperatura de 135°C a 144°C. Portanto, em termos de segurança microbiológica, em nenhum momento houve sub-processamento, e sim super-processamento em alguns lotes, superando as estimativas de número de reduções decimais estipuladas na Tabela 8 do item de *Material e Metodologia*.

#### 4.2.2.2 Parâmetros de processo do Experimento 2

Na Tabela 23 estão apresentados os parâmetros medidos durante o processamento dos cinco lotes do Experimento 2, após algumas adaptações realizadas no sistema asséptico e no processo.

**Tabela 23. Parâmetros de processo dos lotes de água de coco do Experimento 2.**

Temperatura (°C)	Lote 2.1	Lote 2.2	Lote 2.3	Lote 2.4	Lote 2.5
<b>Produto</b>	138	139	141	144	144
<b>Água de aquecimento</b>	140	140	143	145,5 ± 1,5	144 ± 1,0
<b>Na entrada do UAT</b>	9,1	10,3	11,2	10,6	8,3
<b>Na saída do UAT</b>	15,4	16,3	17,7	21,5	25,9

Observou-se que o esterilizador UAT, na sua nova conformação, apresentou estabilidade na manutenção da temperatura. E não ocorreu nenhuma queda de temperatura durante os cinco processamentos. O fato da água de coco estar refrigerada, também não influenciou na estabilidade do equipamento. Estes resultados indicaram que as modificações realizadas no equipamento, quanto à redução da distância entre a linha de vapor e o tanque de água aquecida, solucionaram o problema de falta de estabilidade do equipamento. Isso permite maior confiabilidade no tratamento térmico e melhor qualidade do produto.

#### 4.2.2.3 Parâmetros de processo do Experimento 3

Na Tabela 24 estão apresentados os parâmetros de processo da água de coco do lote do Experimento 3.

**Tabela 24. Parâmetros de processo do lote de água de coco do Experimento 3.**

Temperatura (°C)	Lote 3.1
Produto	139
Água de aquecimento	140
Água de coco na entrada do UAT	25
Água de coco na saída do UAT	20,2

Observou-se que o esterilizador alcançou as temperaturas pré-estabelecidas, mantendo-as constantes durante todo o processo, sem variações. Estes resultados vêm confirmar, agora em escala piloto, que o sistema de esterilização está adequadamente ajustado, depois das modificações realizadas.

### 4.2.3 Características físico-químicas da água de coco processada dos lotes do Experimento 1

Na Tabela 25 estão apresentadas as características físico-químicas das águas de coco de cada um dos quatro lotes do Experimento 1.

Observou-se que a água de coco do Lote 1.3 foi a que apresentou maior pH (5,14), entretanto, a água formulada apresentou pH 5,09. Este aumento pode ter ocorrido devido a maior degradação do ácido ascórbico, em consequência da maior temperatura de processo atingida (144 °C). As perdas de ácido ascórbico estão discutidas detalhadamente em itens posteriores.

**Tabela 25. Características físico-químicas da água de coco processada dos lotes do Experimento 1\*.**

Características	Lote 1.1	Lote 1.2	Lote 1.3	Lote 1.4
pH	5,04	5,05	5,14	5,08
Brix (%)	6,0	6,0	6,0	6,0
Acidez Titulável (mLNaOH 0,1N/100mL)	9,68	9,35	7,68	9,11
Ac. Ascórbico (mg/L)	159,65	130,29	137,62	128,45
O <sub>2</sub> dissolvido (%)	3,89	3,05	0	2,75

\* Média de três amostras.

Contudo, a acidez titulável do Lote 1.3 foi bem menor do que estipulada pelos testes anteriores de otimização, que indicavam valores em torno de 9,4 mL de NaOH 0,1N/100mL.

A água de coco do Lote 1.3 também foi a única a não apresentar oxigênio dissolvido após o tratamento térmico. Pode-se atribuir este fato a uma menor incorporação de oxigênio durante a extração e o acondicionamento, uma maior interação do ácido ascórbico ou uma carga microbiana aeróbia maior na água de coco *in natura*, que pode ter auxiliado na remoção do oxigênio do meio. Ou a maior temperatura de processo (144 °C) pode ter causado maior consumo do oxigênio nas reações oxidativas da água de coco. Na presença de oxigênio o ácido ascórbico é oxidado ao ácido dehidroascórbico (Gregory, 1996).

## 4.2.3.1 Osmolalidade da água de coco dos lotes do Experimento 1

Na Tabela 26 estão relacionados os valores de osmolalidade da água de coco dos quatro lotes produzidos, referentes aos respectivos sinais emitidos pelo osmômetro.

**Tabela 26. Valores de osmolalidade da água de coco dos lotes processados, referentes aos seus respectivos sinais.**

Lote	Sinal <i>In natura</i>	Osmolalidade (osmol/L)	Sinal Processada	Osmolalidade (osmol/L)
1.1	51,65	0,4524	49,93	0,4632
1.2	51,93	0,4800	53,37	0,4921
1.3	50,88	0,4712	52,13	0,4817
1.4	49,87	0,4627	52,88	0,4880

A osmolalidade da água de coco *in natura* obtida neste estudo foi semelhante aos valores obtidos por Collares e Souza (1985), que variaram entre 0,4 e 0,470 osmol/L. Kuberski *et al.* (1979) encontraram valores de 0,255 a 0,340 osmol/L e Fagundes Neto *et al.* (1989) entre 0,326 e 0,402 osmol/L. Segundo Brouns e Kovacs (1997), bebidas com osmolalidade menor que 0,500 osmol/L evitam a demora do esvaziamento gástrico.

Para comparação, analisou-se uma amostra de água de coco comercial e uma amostra de isotônico comercial, obtendo-se valores de osmolalidade de 0,4790 e 0,4872 osmol/L, respectivamente. Portanto, a água de coco obtida neste estudo, não apresenta osmolalidade diferente dos produtos comerciais.

Com esses valores, observou-se que a água de coco utilizada neste estudo, bem como os produtos comerciais analisados, são hipertônicos em relação ao plasma sanguíneo, que tem osmolalidade próxima de 0,300 osmol/L. Portanto, seria interessante a escolha de uma formulação com o menor teor de açúcar, não só por questões sensoriais e econômicas, mas também para não tornar a água de coco mais hipertônica, sob pena de perder ainda mais o seu equivocado apelo mercadológico de isotonicidade.

#### 4.2.4 Características físico-químicas da água de coco processada do Experimento 3

Na Tabela 27 estão apresentadas as características físico-químicas da água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3.

**Tabela 27. Características físico-químicas da água de coco do lote 3.1 do Experimento 3\*.**

Características	Lote 3.1
pH	4,77
Brix (%)	6,0
Acidez Titulável (mLNaOH 0,1N/100mL)	11,89
Ac. Ascórbico (mg/L)	194,21
O <sub>2</sub> dissolvido (%)	4,4

\* Média de três amostras.

Observou-se que a água de coco apresentou um pH menor do que as dos lotes do Experimento 1. Este menor valor deveu-se ao fato da água de coco in natura apresentar um pH 4,88, ou seja, quando foi adicionado o ácido ascórbico este foi reduzido a 4,77. Esta observação indica que a água de coco utilizada foi extraída de cocos com menos de seis meses de maturação. Segundo Tavares et al. (1998) águas de cocos com maturação entre 5 e 7 meses apresentam pH entre 4,7 e 4,9.

O teor de oxigênio dissolvido da água de coco do Lote 3.1 também foi ligeiramente maior do que o observado para os lotes do Experimento 1.

#### 4.2.5 Análises microbiológicas da água de coco dos lotes do Experimento 1

Na Tabela 28 estão relacionados os resultados das análises microbiológicas da água de coco *in natura* dos lotes do Experimento 1. E está

sendo feita uma comparação com os resultados de análises preliminares de outras amostras de água de coco *in natura*, extraídas de diferentes formas.

**Tabela 28. Análises microbiológicas da água de coco *in natura* do Experimento 1, e de outras amostras de água de coco.**

ANÁLISE	LOTE				Média	Outras amostras
	1.1	1.2	1.3	1.4		
Contagem padrão (UFC/mL)	$4,5 \times 10^3$	$1,9 \times 10^2$	$1,9 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	$6,8 \times 10^3$	$1,86 \times 10^4$ - $5,6 \times 10^4$
Bolores e leveduras (UFC/mL)	$5,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$ - $7,5 \times 10^2$
Esporos mesófilos (esp./mL)	0,7	0,4	0,5	0,4	0,5	1 - $7,2 \times 10^1$
Esporos termófilos (esp./10mL)	0	0	0	0	0	0 - 20
Esporos "flat-sour" (esp./10mL)	0	0	0	0	0	0 - 10

Observou-se na água de coco utilizada no Experimento 1, teve uma contagem padrão de mesófilos menor do que das águas que foram obtidas por outros métodos de extração, e teve uma contaminação equivalente em termos de bolores e leveduras. Contudo, a contaminação por esporos foi menor.

Na Tabela 29 estão apresentados os resultados da análise da contaminação da água de coco formulada imediatamente antes do processamento térmico dos lotes do Experimento 1. Comparando-se com os resultados da Tabela 28, observou-se o aumento da contaminação da água de coco formulada em relação à água de coco *in natura*, sendo de cerca de dois ciclos decimais para os mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos e de um ciclo para bolores e leveduras. Entretanto, não apresentou alteração quanto à quantidade de esporos, tanto mesófilos quanto termófilos. Este aumento pode ser associado ao tempo em que a água de coco ficou armazenada sob refrigeração antes do tratamento térmico, além da contaminação devido ao manuseio durante a formulação.

**Tabela 29. Análises microbiológicas da água de coco formulada do Experimento 1.**

ANÁLISE	LOTE				Média
	1.1	1.2	1.3	1.4	
Contagem padrão (UFC/mL)	$2,1 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
Bolores e leveduras (UFC/mL)	$2,0 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$
Esporos mesófilos (esp./mL)	0,2	0,8	0,6	0,6	0,55
Esporos termófilos (esp./10mL)	0	0	0	0	0
Esporos “flat sour” (esp./10mL)	0	0	0	0	0

A contaminação devido aos ingredientes pode ter contribuído, entretanto, muito menos do que o fator tempo de armazenamento, considerando-se o baixo nível de contaminação da frutose, que foi de 30 UFC/10g para aeróbios totais e de 20 UFC/10g para bolores e leveduras, e sem contaminação por esporos. A contaminação devido à adição do ácido ascórbico e do ácido cítrico não foi determinada. Contudo, possivelmente, a maior contaminação poderá ter ocorrido na etapa de manuseio dos aditivos da formulação da água de coco. O procedimento ideal para evitar a contaminação por manuseio excessivo, seria a transferência direta do extrator para o tanque de formulação e imediato processamento térmico.

Estes resultados demonstraram que o procedimento de refrigeração da água de coco, por cerca de 18 horas antes do processamento, causou o aumento da contaminação da água de coco por células vegetativas. Entretanto, entende-se que este não é um procedimento recomendado. Foi utilizado apenas para tornar estes processamentos viáveis dentro das condições físicas e de mão-de-obra disponíveis para a realização desta pesquisa.

A atividade microbiana na matéria-prima, antes do processamento térmico, acarreta o aumento de células mortas no produto final, favorecendo reações indesejáveis para sua estabilidade físico-química e sensorial, bem como a possível produção de CO<sub>2</sub> (Denny e Corlett, 1992).

Este procedimento seria recomendado para que houvesse tempo para a atuação do ácido ascórbico como seqüestrador de oxigênio, pois segundo Joslyn (1961), a redução do oxigênio pelo ácido ascórbico não é instantânea, ocorrendo uma distinta fase lag na reação. Contudo, o fato das enzimas PFO e POD ainda estarem ativas, pode causar problemas posteriores de escurecimento não-enzimático, além do enzimático, pois estas enzimas têm a capacidade de oxidar o próprio ácido ascórbico, mesmo sob refrigeração, mas em menor velocidade (Henshall, 1981; Davídek et al., 1990).

#### 4.2.6 Análises microbiológicas da água de coco dos lotes do Experimento 2

Na Tabela 30 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas das águas de coco *in natura*, formulada e processada, dos cinco lotes do Experimento 2.

**Tabela 30. Análises microbiológicas da água de coco *in natura*, formulada e processada dos lotes do Experimento 2.**

Amostra	LOTES				
	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5
	<b>Contagem Padrão (UFC/mL)</b>				
<i>In natura</i>	3,25x10 <sup>3</sup>	3,25x10 <sup>3</sup>	3,25x10 <sup>3</sup>	3,25x10 <sup>3</sup>	3,25x10 <sup>3</sup>
Formulada	4,35x10 <sup>3</sup>	4,75x10 <sup>3</sup>	4,65x10 <sup>3</sup>	3,40x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>
Processada	0	0	0	0,3*	0
	<b>Esporos mesófilos (esp./mL)</b>				
<i>In natura</i>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Formulada	0	0	0	0,3	0,4
Processada	0,1	0	0	0	0

\*Em uma das repetições foi detectado 1 UFC de bolor.

Observou-se que o novo extrator de água de coco forneceu uma matéria-prima com contaminação total por mesófilos aeróbios, de 3,25x10<sup>3</sup>, próxima à obtida nos lotes do Experimento 1, que foi de 6,80x10<sup>3</sup>. A contaminação por esporos mesófilos foi baixa, e não foi detectada contaminação por esporos termófilos.

Não foram observadas grandes alterações entre a qualidade microbiológica da água de coco *in natura* e a água de coco formulada. Portanto, o prévio resfriamento dos cocos foi eficaz para manter a qualidade da água de coco *in natura*.

De maneira geral, os tratamentos térmicos formulados foram eficientes para eliminar a contaminação das águas de coco, entretanto, em uma das amostras de um dos lotes foi detectada a presença de bolores. Esta contaminação pode ter sido proveniente das operações de acondicionamento manual. Segundo Farahnik (1982), a presença de uma ou duas colônias pode ser atribuída à contaminação atmosférica ou erros de análise. Estes resultados indicam que o novo extrator forneceu uma matéria-prima de boa qualidade, em menor tempo (300 cocos/35minutos).

A injeção de ar comprimido na água de coco pode causar a incorporação de sujidades grosseiras e, simultaneamente, de microrganismos na mesma. Segundo Nicolósi (2003) e Adissi (2003), a presença de partículas, água condensada e óleo residual são alguns dos problemas que podem advir do sistema de ar comprimido. Neste experimento, utilizou-se um filtro de cerâmica (tipicamente utilizado para água) para reter sujidades maiores provenientes do ar comprimido, contudo, a utilização de um filtro microbiológico de 0,22 $\mu$ m seria mais recomendada, pois a incorporação de esporos é mais favorecida por este mecanismo de extração.

#### **4.2.7 Análises microbiológicas da água de coco do lote do Experimento 3**

Na Tabela 31 estão relacionados os resultados das análises microbiológicas da água de coco *in natura* e formulada, do Lote 3.1 do Experimento 3.

**Tabela 31. Análises microbiológicas da água de coco *in natura* e formulada do Lote 3.1 do Experimento 3.**

Análise	<i>In natura</i>	Formulada
Contagem padrão (UFC/mL)	52	61
Bolores e leveduras (UFC/mL)	≤10	<10
Esporos mesófilos (esp./mL)	0	0
Esporos termófilos (esp./10mL)	0	0
Esporos “flat-sour” (esp./10mL)	0	0

Foi observada uma baixa contagem padrão na água de coco *in natura* de 52UFC/mL. Foi detectada apenas 1 UFC/mL de bolor. Não foi detectada a presença de esporos mesófilos e nem termófilos. A adaptação de um filtro microbiológico, durante a extração da água do Lote 3.1, pode ter contribuído para a menor incorporação de microrganismos provenientes do ar comprimido utilizado no extrator.

Comparando-se a contaminação da água de coco do Experimento 3 com a do Experimento 1, observou-se que houve uma menor contaminação durante a extração e uma menor alteração entre a água *in natura* e a formulada, mesmo trabalhando-se a temperatura ambiente. Contudo, a extração deve ser seguida de imediato processamento térmico. Em caso de extrações que demandem algumas horas, a matéria-prima tem que sofrer imediato resfriamento, sob pena de causar o aumento das atividades microbiológicas, como verificado no Experimento 1, além das enzimáticas.

Estes resultados confirmaram a eficiência do extrator, que já havia sido observada no Experimento 2, pela sua velocidade de extração (1 coco/7segundos) e menor nível de contaminação. Em estudos posteriores recomenda-se a manutenção do filtro microbiológico do ar comprimido e/ou a substituição do ar comprimido por nitrogênio.

Na literatura não foram encontrados resultados de análises de contagem de esporos em água de coco, apenas de células vegetativas. David e Fernandes (1998), analisando amostras de água de coco *in natura*, que foram extraídas após desinfecção do coco com solução de hipoclorito com 20ppm de cloro livre por 30 minutos, encontraram contaminação de  $1,6 \times 10^2$  e  $6 \times 10^1$  UFC/mL, para contagem padrão e de bolores e leveduras, respectivamente. Leite *et al.* (2000), analisando amostras de água de coco refrigerada comercializadas na cidade de Salvador, encontraram uma contaminação variando de 10 a  $2,5 \times 10^5$  UFC/mL para bolores e leveduras. Hoffmann *et al.* (2002), analisando amostras de água de coco *in natura* refrigerada comercializadas na cidade de São José do Rio Preto – SP, encontraram uma média de  $4 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  UFC/mL, para bactérias aeróbias totais e bolores e leveduras, respectivamente. A ANVISA (2001), determina limites apenas para coliformes e salmonela, em água de coco *in natura*, de 10 a  $10^2$  UFC/mL e ausência em 25 mL, respectivamente.

#### **4.2.8 Esterilidade comercial e marcha de detecção de contaminantes da água de coco dos lotes do Experimento 1**

##### 4.2.8.1 Observação visual

Visualmente não foram observadas turvação nem estufamento das garrafas. Observou-se que os quatro lotes processados apresentaram alteração de cor. Entretanto, no Lote 1.3 foi observada a alteração de cor em apenas algumas unidades, mais precisamente em oito garrafas. Enquanto que, nos demais lotes, a totalidade das garrafas apresentou uma coloração de amarelo a castanho, sendo de intensidade diferente em algumas.

Observou-se, também, a formação de uma espécie de precipitado em todos os lotes, o qual, a princípio foi relacionado à contaminação microbiológica ou às alterações físicas devido à ação de enzimas, ou floculação de algum componente da água de coco, o que também foi observado por Campos (1993). Segundo

Joslyn (1961), a formação de sedimentos em sucos pode ser devido ao processo de oxidação que envolve o oxigênio dissolvido e um acceptor de oxigênio como os taninos. Segundo Nunes (2002), a casca do coco é uma fonte natural de tanino para a produção de adesivos para madeira, tendo um teor de 8% desse componente.

#### 4.2.8.2 Determinação de pH

Na Tabela 32 estão relacionadas as médias das leituras de pH, em triplicata, das amostras de água de coco incubadas a 35°C por 10 dias.

Não foi observada variação de pH maior que 0,2 em nenhuma das 60 amostras de água de coco, dos quatro lotes incubados, indicando ausência de microrganismos mesófilos produtores de ácido.

De acordo com a interpretação dos resultados descrita na metodologia de Dryer e Deibel (1992), a ausência de turvação, estufamento e alteração de pH acima de 0,2 define os lotes do Experimento 1 como comercialmente estéreis.

Após os dez dias de incubação observou-se que no Lote 1.3 havia oito unidades com coloração diferente das demais. Estas unidades, em destaque na Tabela 32, estavam mais escuras que as do restante do lote. Portanto, observando-se os valores de pH do Lote 1.3, verifica-se que valores menores ou iguais a 5,07 estão relacionados ao escurecimento. Isto pode ser confirmado pelos outros lotes onde todas as unidades estavam escuras e com pH entre 5,01 e 5,04. Estas observações podem ser úteis para a determinação da causa do escurecimento da água de coco durante a incubação.

Segundo Gregory (1996), durante a estocagem pode haver uma diminuição do pH devido aos efeitos do tratamento térmico. Este efeito pôde ser observado nos quatro lotes, conforme apresentado na Tabela 32, onde o pH de todas as amostras foi menor do que o seu pH inicial.

Tabela 32. Valores de pH\* de 60 amostras de água de coco dos lotes do Experimento 1, após 10 dias de incubação a 35°C.

Amostra	pH			
	Lote 1.1	Lote 1.2	Lote 1.3	Lote 1.4
Inicial	5,04	5,05	5,14	5,08
1	5,02	5,01	5,10	5,02
2	5,02	5,01	5,10	5,02
3	5,03	5,01	5,12	5,02
4	5,02	5,01	5,10	5,02
5	5,02	5,01	5,10	5,04
6	5,03	5,01	5,11	5,01
7	5,03	5,01	5,10	5,01
8	5,03	5,02	5,10	5,01
9	5,03	5,01	5,10	5,02
10	5,03	5,01	5,09	5,02
11	5,03	5,01	5,11	5,02
12	5,03	5,02	5,10	5,01
13	5,03	5,01	5,10	5,04
14	5,03	5,03	5,11	5,02
15	5,03	5,01	5,10	5,03
16	5,03	5,01	5,09	5,04
17	5,03	5,01	5,06	5,02
18	5,03	5,01	5,10	5,01
19	5,03	5,01	5,10	5,01
20	5,03	5,01	5,10	5,02
21	5,03	5,02	5,10	5,01
22	5,03	5,02	5,10	5,02
23	5,03	5,03	5,06	5,01
24	5,03	5,02	5,11	5,02
25	5,03	5,02	5,10	5,03
26	5,03	5,02	5,10	5,03
27	5,03	5,02	5,10	5,04
28	5,03	5,01	5,10	5,01
29	5,03	5,01	5,10	5,02
30	5,03	5,01	5,06	5,01
31	5,03	5,01	5,10	5,01
32	5,04	5,01	5,10	5,02
33	5,04	5,02	5,10	5,01
34	5,03	5,02	5,11	5,02
35	5,04	5,01	5,06	5,01
36	5,03	5,01	5,07	5,01
37	5,03	5,01	5,10	5,01
38	5,03	5,01	5,11	5,01
39	5,03	5,01	5,11	5,01
40	5,03	5,02	5,10	5,02
41	5,03	5,01	5,05	5,02
42	5,03	5,01	5,05	5,01
43	5,03	5,01	5,10	5,01
44	5,03	5,01	5,10	5,02
45	5,03	5,01	5,10	5,02
46	5,03	5,02	5,10	5,02
47	5,03	5,01	5,10	5,02
48	5,03	5,01	5,06	5,02
49	5,03	5,01	5,11	5,01
50	5,03	5,01	5,10	5,01
51	5,03	5,01	5,10	5,01
52	5,03	5,01	5,10	5,01
53	5,03	5,03	5,10	5,01
54	5,03	5,02	5,10	5,01
55	5,03	5,02	5,11	5,02
56	5,02	5,01	5,10	5,02
57	5,03	5,02	5,12	5,01
58	5,03	5,02	5,11	5,02
59	5,03	5,02	5,10	5,02
60	5,03	5,02	5,10	5,01

\* Média de três leituras.

## 4.2.8.3 Marcha de detecção de contaminantes

Após efetuar a marcha de detecção em três amostras pré-incubadas de cada lote, foram encontrados os resultados apresentados na Tabela 33. Para efeito de comparação, foram apresentadas as temperaturas, mínima e máxima, de cada processo.

**Tabela 33. Classificação dos lotes de água de coco do Experimento 1, quanto à marcha de detecção de contaminantes.**

LOTE	T (°C)	Amostras	Contaminação	Classificação do lote
1.1	135 – 140	A	n.d.	Comercialmente estéril
		B	n.d.	Comercialmente estéril
		C	n.d.	Comercialmente estéril
1.2	135 – 137	A	n.d.	Comercialmente estéril
		B	Espero termófilo <i>flat sour</i>	Comercialmente estéril
		C	n.d.	Comercialmente estéril
1.3	141 – 144	A	Aeróbio mesófilo esporulado	Não comercialmente estéril
		B	n.d.	Comercialmente estéril
		C	Aeróbio mesófilo esporulado	Não comercialmente estéril
1.4	135 – 141	A	n.d.	Comercialmente estéril
		B	n.d.	Comercialmente estéril
		C	n.d.	Comercialmente estéril

A marcha de detecção determinou que dos quatro lotes produzidos, apenas um não alcançou a esterilidade comercial. Foi detectada contaminação na água de coco do Lote 1.3, por esporos mesófilos aeróbios estritos. Esta contaminação caracterizou a água de coco deste lote como “não comercialmente estéril”.

Entretanto, não foram observadas alterações nas amostras incubadas do Lote 1.3, não sendo detectadas no teste de esterilidade comercial. E, esta contaminação, também não causou alterações na água de coco estocada à temperatura ambiente. Segundo a ANVISA, o Lote 1.3 seria considerado comercialmente estéril, pois não apresentou nenhuma alteração após os 10 dias de incubação a 35°C. Observações ao microscópio, de colônias coletadas do meio agar nutriente manganês, acusaram a presença exclusivamente de bacilos gram-positivos com esporo terminal.

Segundo Denny e Corlett (1992) e Silva et al. (2002), estes resultados indicam sub-processamento ou recontaminação. Contudo, as temperaturas de processo do Lote 1.3 foram as maiores atingidas, colocando em dúvida a hipótese de sub-processamento, a menos que o microrganismo detectado fosse um mesófilo termorresistente, como o *B. sporotermoturans*. Segundo Pettersson et al. (1996), o *B. sporotermoturans* é um bacilo de esporo terminal e não produtor de ácidos a partir de açúcar. Contudo, são necessários testes de identificação para confirmar o microrganismo. Vale destacar, que a amostra que não apresentou contaminação, foi uma das que apresentou maior escurecimento (Amostra 30 da Tabela 32).

Para confirmação desses resultados, realizou-se contagem padrão em 10 garrafas de cada lote. Apenas nas garrafas do Lote 1.3 foi detectada contaminação, sendo em média de  $2,08 \times 10^2$  UFC/mL. No momento da realização das análises as amostras tinham um mês de estocagem à temperatura ambiente e não apresentavam nenhuma alteração aparente. Estes resultados indicaram que a contaminação foi uniforme em todo o lote. Seriam necessárias maiores investigações, mas tudo indica que houve sub-processamento, pois a recontaminação seria caracterizada por uma flora mista (Silva et al., 2002).

Segundo von Bockelmann (1988) e Cerf (1988), os riscos microbiológicos de uma linha de processamento e acondicionamento asséptico podem vir da

matéria-prima, preparação (formulação), esterilização insuficiente, tubulações, trocador de calor, tanques, equipamento de acondicionamento, embalagens e ar do ambiente de acondicionamento. Contudo, os procedimentos de avaliação de contaminação adotados não detectaram a contaminação acusada pela marcha de detecção das amostras do Lote 1.3, sugerindo que estes devem ser intensificados.

Tomando como referência o leite UHT, a *IDF Standart nº 48 (International Dairy Federation)*, recomenda que não sejam encontradas mais do que 100 colônias por mililitro de leite. A presença de uma ou duas colônias poderia ser atribuída à contaminação atmosférica ou ao erro humano durante as análises (Farahnik, 1982).

#### **4.2.9 Pré-incubação da água de coco dos lotes do Experimento 2**

Após 10 dias de incubação, nenhuma das amostras dos cinco lotes do Experimento 2 apresentou turvação, produção de gás ou variação de pH acima de 0,2, nem foi detectado crescimento nas placas de PCA. Estes resultados indicaram que os tratamentos térmicos foram eficientes na esterilização da água de coco, contudo, não garantiam a esterilidade comercial dos lotes produzidos, devido às condições em que o acondicionamento foi efetuado, e pelo número reduzido de amostras analisadas (quatro de cada lote). Algumas unidades poderiam apresentar contaminação, entretanto, de maneira não generalizada.

Visualmente foi observada a presença de sedimentação nas amostras incubadas. Observou-se, também, a alteração de cor das amostras, que foi um indicativo prévio de que a estabilização da cor não foi atingida. Sendo que no Lote 2.2 o escurecimento foi menor.

#### 4.2.10 Esterilidade comercial e marcha de detecção de contaminantes da água de coco do Experimento 3

##### 4.2.10.1 Observação visual

Visualmente não foram observadas turvação nem estufamento das garrafas. O lote 3.1 não apresentou alteração de cor aparente, indicando que havia sido alcançada a estabilização de cor da água de coco.

##### 4.2.10.2 Determinação de pH

Na Tabela 34 estão relacionadas as médias das leituras de pH, em triplicata, das amostras de água de coco do Experimento 3, incubadas por 10 dias a 35°C.

**Tabela 34. Valores de pH\* de 60 amostras de água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3, após 10 dias de incubação a 35°C (pH<sub>inicial</sub> = 4,77).**

Amostra	pH	Amostra	pH	Amostra	pH
1	4,72	21	4,70	41	4,71
2	4,71	22	4,70	42	4,71
3	4,71	23	4,70	43	4,71
4	4,71	24	4,70	44	4,71
5	4,71	25	4,71	45	4,71
6	4,72	26	4,71	46	4,71
7	4,71	27	4,71	47	4,71
8	4,71	28	4,71	48	4,71
9	4,71	29	4,70	49	4,71
10	4,70	30	4,72	50	4,71
11	4,70	31	4,71	51	4,71
12	4,70	32	4,70	52	4,71
13	4,70	33	4,70	53	4,71
14	4,70	34	4,71	54	4,71
15	4,70	35	4,70	55	4,71
16	4,70	36	4,70	56	4,71
17	4,71	37	4,70	57	4,71
18	4,71	38	4,70	58	4,70
19	4,70	39	4,70	59	4,70
20	4,71	40	4,71	60	4,71

\*Média de três leituras.

Não foram detectadas unidades com variação de pH acima de 0,2, indicando que não houve contaminação por microrganismos produtores de ácido (Dryer e Deibel, 1992). Segundo estes resultados a água de coco poderia ser considerada comercialmente estéril.

Devido à contaminação detectada no Lote 1.3 do Experimento 1, que não causou alteração aparente, imediatamente antes de efetuar a medida de pH e da marcha de detecção, realizou-se uma contagem padrão em 45 das 60 garrafas incubadas do teste de esterilidade comercial, para verificação rápida da presença de contaminação. Inoculou-se 1mL, em profundidade, em meio PCA e incubou-se a 35°C por 48 horas.

Na Tabela 35 estão apresentados os resultados da contagem total das 45 garrafas de água de coco do Lote 3.1, após 10 dias de incubação a 35°C.

**Tabela 35. Contagem total de 45 garrafas de água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3, após 10 dias de incubação a 35°C.**

Amostra	UFC/mL	Amostra	UFC/mL	Amostra	UFC/mL
1	17	16	5	31	1
2	0	17	0	32	6,5x10 <sup>2</sup>
3	0	18	0	33	0
4	0	19	0	34	1
5	52	20	0	35	13
6	0	21	0	36	2,1x10 <sup>2</sup>
7	0	22	0	37	23
8	0	23	0	38	1
9	0	24	0	39	2
10	0	25	0	40	4,4x10 <sup>2</sup>
11	0	26	*1,5x10 <sup>3</sup>	41	0
12	0	27	0	42	0
13	0	28	0	43	0
14	0	29	*2,4x10 <sup>3</sup>	44	0
15	0	30	*2,4x10 <sup>3</sup>	45	18

\* valor estimado

Observou-se, pelos resultados apresentados na Tabela 35, a presença de contaminação no Lote 3.1. Também foi possível observar que a contaminação não foi formada por uma microbiota homogênea, o que foi constatado pelos diferentes

formatos das colônias que se desenvolveram nas placas, sendo predominantemente de formatos arredondados e de colorações branco leitosa, parda e amarelada. Algumas colônias apresentaram bordas irregulares e coloração branca leitosa.

Como a contaminação foi composta por uma microbiota mista e ausente em 29 das 45 garrafas analisadas (64,4%), há indícios de que a contaminação possa ter sido proveniente de uma das etapas do processo (Ahvenainen, 1988; von Bockelman, 1988; Cerf, 1988). Entretanto, conforme os resultados dos testes de avaliação das embalagens do Lote 3.1, que foram apresentados anteriormente na Tabela 20, uma contaminação proveniente das garrafas é mais provável, já que estas apresentaram uma média de 4UFC/garrafa depois de esterilizadas. Atribuindo-se esta contagem elevada a possível ocorrência de contaminação cruzada causada pela parte externa das embalagens.

O Lote 3.1 teria então uma taxa de não esterilidade de 35,6%, muito acima das recomendações de von Bockelman (1988), de 0,1% (1:1.000).

Na marcha de detecção uma amostra, das três analisadas, acusou a presença de mesófilos aeróbios, por apresentar turvação nos tubos de caldo púrpura de bromocresol a 35°C (CPBC/35°C), sem alteração de cor. A partir das colônias isoladas no meio agar nutriente manganês a 35°C (ANMn/35°C), observou-se ao microscópio a presença de dois tipos de cocos (um com arranjo tétrede) e de bacilos com esporo terminal, havendo poucos esporos.

Portanto, dos cinco lotes de água de coco, processados em escala piloto, pelo sistema asséptico, foram obtidos três lotes comercialmente estéreis (Lotes 1.1, 1.2 e 1.4). Os lotes que não apresentaram esterilidade apresentaram uma microbiota homogênea (Lote 1.3), característica de sub-processamento, ou uma microbiota mista (Lote 3.1), característica de recontaminação, que foi atribuída à contaminação cruzada devido à parte externa das garrafas. Essas contaminações

não provocaram alterações na aparência e nem variação de pH na água de coco destes lotes.

#### **4.2.11 Estabilidade da água de coco dos lotes do Experimento 1**

Na Tabela 36 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas das amostras dos quatro lotes de água de coco do Experimento 1, em relação ao tempo de estocagem. Estão relacionados apenas os resultados das características que apresentaram variação durante 120 dias, que foram: pH, acidez titulável (AT), ácido ascórbico (AA), oxigênio dissolvido ( $O_2$ ), variação de cor ( $\Delta E$ ) e turbidez.

A água de coco dos quatro lotes do Experimento 1 apresentaram valor constante de Brix igual a 6%, durante 120 dias de estocagem.

A característica mais marcante, durante a estocagem dos quatro lotes de água de coco, foi o aparecimento progressivo de uma coloração castanho-amarelada nos Lotes 1.1, 1.2 e 1.4, enquanto o Lote 1.3, manteve sua coloração praticamente inalterada. Essas observações puderam ser confirmadas através dos resultados de variação de cor ( $\Delta E$ ), apresentados na Tabela 36. O aumento do parâmetro  $b^*$ , que caracteriza o deslocamento da cor para o amarelo (+b), foi o que mais influenciou na alteração de cor da água de coco dos três referidos lotes, seguido pela redução da luminosidade ( $L^*$ ), que caracteriza o escurecimento.

Este escurecimento pode estar relacionado à degradação do ácido ascórbico, pois nos Lotes 1.1, 1.2 e 1.4, após 120 dias de estocagem, foi detectada a constante redução de sua concentração, até os limites de detecção do método, que foi de 1,84 mg/L.

Tabela 36. Estabilidade da água de coco dos lotes do Experimento 1.

LOTE	Tempo (dias)	pH	A. T.	A. A.	O <sub>2</sub>	ΔE	Turbidez <sup>3</sup>
1.1 135 – 140 <sup>1</sup> 139±1 <sup>2</sup>	In natura	5,22	7,07	7,34	10,44	0	29,77
	Formulada <sup>4</sup>	5,02	9,26	163,32	7,82	0,22	32,21
	Processada	5,04	9,68	146,80	3,7	0,22	32,21
	10	5,04	9,68	-	-	0,54	29,39
	30	5,03	9,75	95,60	-	3,80	28,90
	60	5,05	9,96	20,00	-	6,39	27,21
	90	5,06	9,97	5,00	-	11,99	27,05
	120	5,02	9,96	1,84	0	16,63	26,01
1.2 135 – 137 <sup>1</sup> 136±1 <sup>2</sup>	In natura	5,30	6,85	5,51	10,34	0	26,12
	Formulada	5,03	9,26	148,64	8,24	1,31	27,07
	Processada	5,05	9,35	130,29	2,9	1,15	27,90
	10	5,05	9,45	-	-	1,02	27,80
	30	5,05	9,65	18,00	-	4,18	27,56
	60	5,04	10,05	8,05	-	12,42	26,05
	90	5,03	10,10	1,84	-	13,42	25,36
	120	5,03	10,10	1,84	0	15,39	23,86
1.3 141 – 144 <sup>1</sup> 142,5±1,5 <sup>2</sup>	In natura	5,32	5,74	5,51	6,08	0	29,48
	Formulada	5,09	8,59	154,14	4,16	0,11	30,63
	Processada	5,14	7,68	137,62	0	0,27	39,20
	10	5,12	7,60	-	-	0,59	39,32
	30	5,15	7,55	136,78	-	1,21	39,19
	60	5,15	7,84	134,05	-	1,72	40,01
	90	5,14	7,98	132,00	-	2,81	38,65
	120	5,10	8,01	128,45	0	3,20	36,44
1.4 135 – 141 <sup>1</sup> 138±3 <sup>2</sup>	In natura	5,34	5,70	5,51	10,3	0	27,39
	Formulada	5,07	8,83	159,65	8,28	0,07	29,40
	Processada	5,08	9,11	128,45	2,62	0,19	27,55
	10	5,08	9,11	-	-	2,13	27,63
	30	5,07	9,20	10,00	-	7,30	27,56
	60	5,05	9,77	4,00	-	13,01	27,30
	90	5,07	9,80	1,84	-	14,57	27,45
	120	5,03	9,80	1,84	0	16,11	22,46

AT-acidez titulável (mL NaOH 0,1N/100mL); AA- ácido ascórbico (mg/L); O<sub>2</sub> – oxigênio dissolvido (%); ΔE – variação de cor; 1- temperatura mínima e máxima atingida no processo; 2 – temperatura média da maior parte do processo; 3 -%; 4 – antes do processamento térmico.

Contudo, a água de coco do Lote 1.3, foi a única a não apresentar tal escurecimento, e mantendo, após 120 dias, uma concentração de ácido ascórbico de 128,45mg/L. O não escurecimento da água de coco do Lote 1.3, pode ser explicado, pelo fato dela ter sido a única a apresentar ausência de oxigênio dissolvido, logo após o processamento térmico, enquanto as demais apresentavam cerca de 3%.

Segundo Nielsen et al. (1993), o ácido ascórbico é uma molécula estável, entretanto, na presença de oxigênio ocorre a formação do ácido dehidroascórbico, que é um composto termo-sensível. Durante a degradação do ácido dehidroascórbico há a formação de substâncias como dióxido de carbono, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido furóico, peróxido de hidrogênio e furfural, além dos compostos responsáveis pelo escurecimento (Henshall, 1981; Gregory, 1996). Portanto, durante as 18 horas de armazenamento da água de coco *in natura*, sob refrigeração, antes do tratamento térmico, pode ter ocorrido o acúmulo destes compostos, que posteriormente contribuíram para a formação da cor escura. A observação de uma leve redução do pH e aumento da acidez reforça a hipótese de degradação do ácido ascórbico, devido à formação dos compostos ácidos mencionados anteriormente.

Outra consideração a ser feita, é o fato das águas de coco dos Lotes 1.1, 1.2 e 1.4 terem sofrido sucessivos retornos no início do processamento térmico, devido às oscilações de temperatura, ocorrendo o re-processamento da alíquota inicial, o que pode ter aumentado, tanto a taxa de degradação térmica do ácido ascórbico, quanto à incorporação de oxigênio.

Portanto, devem ser tomadas medidas para diminuir a incorporação de oxigênio na água de coco processada, além de evitar a formação do ácido dehidroascórbico antes do processo. O perfeito funcionamento do esterilizador UAT também é necessário para que não ocorra o re-processamento do produto.

#### 4.2.11.1 Atividade enzimática da água de coco dos lotes do Experimento 1

Nos quatro lotes do Experimento 1, as atividades da enzima PFO, na água de coco *in natura*, foram de 12,2; 7,1; 8,8 e 9,2 unidades/mL, respectivamente, e da enzima POD foram de 4,8; 8,7; 6,7 e 4,6 unidades/mL. Campos (1993), encontrou uma atividade de 32,1 unidades/mL para PFO e de 114,3 unidades/mL para a POD em água de coco. Apesar de ter sido utilizada a mesma metodologia descrita por Campos, os valores de atividade encontrados foram bem menores. Isto pode ser explicado pelo uso de matérias-primas de cultivares diferentes.

As enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (PDO) não apresentaram atividade na água de coco formulada e nem durante o tempo de estocagem. Campos (1993), também não encontrou atividade para ambas as enzimas em água de coco com 200mg/L de ácido ascórbico.

Pode ter ocorrido regeneração da enzima peroxidase nos primeiros dias de estocagem, e que não foi detectada devido à sensibilidade do método adotado.

A regeneração dessa enzima é amplamente citada na literatura (Nebeski et al., 1950 citado por Vamos-Vigyázó, 1981; Adams, 1978; Nielsen et al., 1993; Adams, 1997). Segundo Vamos-Vigyázó (1981) há controvérsias entre os resultados de regeneração, que são atribuídos à diferença de sensibilidade dos métodos utilizados e até hoje disponíveis. O método aqui adotado, através do uso de guaiacol e peróxido de hidrogênio, com posterior leitura espectrofotométrica é largamente utilizado por outros pesquisadores, independente, da severidade do tratamento, a exemplo de Adams (1978), que fez estudos sobre a regeneração da peroxidase em purês tratados por UHT. Entretanto, Adams utilizou uma proporção maior de substrato:amostra.

Utilizou-se a metodologia de Campos (1993), por ela ter sido adaptada especificamente para água de coco. Contudo, na sua metodologia entende-se que ocorre uma grande diluição da amostra no substrato (1:10), que é apropriada para o produto *in natura*, mas pode não ser sensível às baixas concentrações de

enzima que ficam após o tratamento térmico UHT. Por este motivo, as análises foram realizadas após 24 horas do tratamento térmico e após 10 dias de estocagem, para que houvesse tempo suficiente para ocorrer uma possível regeneração. Talvez sejam necessárias análises em intervalos mais curtos como 2, 5 e 7 dias, por exemplo.

Naveh et al.(1982) estabeleceu uma relação linear entre a atividade enzimática residual e a uma subsequente regeneração da peroxidase, ilustrando que, aproximadamente, 2% de atividade residual pode resultar na regeneração de 8% da atividade inicial. Portanto, uma baixa atividade residual pode resultar em grandes alterações durante a estocagem. E estas baixas atividades podem ser de difícil detecção.

A regeneração da peroxidase explicaria o escurecimento observado nos Lotes 1.1, 1.2 e 1.4, pois no processamento térmico desses lotes foram atingidas as menores temperaturas, de 135°C, enquanto que o Lote 1.3, que não apresentou escurecimento, teve a temperatura mínima de processo de 140°C. Portanto, no lote sem escurecimento, a enzima teria sido inativada e nos demais não.

O rótulo de uma das marcas de água de coco UTH comercial, declara que a utilização do metabissulfito de sódio tem o objetivo de evitar o escurecimento enzimático, ou seja, o tratamento térmico UHT, por si só, não é capaz de cessar a atividade enzimática da água de coco, confirmando o que esta sendo observado neste estudo.

A fortificação de sucos com ácido ascórbico pode levar a alguns efeitos indesejáveis, como o escurecimento. A primeira causa da perda de ácido ascórbico é a oxidação sob condições aeróbicas, seguida pela presença de metais (como ferro e cobre). Peroxidases e ascorbato oxidases, podem causar a direta oxidação do ácido ascórbico. Pode ocorrer também uma oxidação indireta através da formação de quinonas altamente reativas, produzidas durante a ação de fenolases (polifenoloxidase, por exemplo) ou substratos fenólicos (Ponting e

Joslyn, 1961; Henshall, 1981). Portanto, nos lotes que apresentaram escurecimento pode ter ocorrido a oxidação do ácido ascórbico devido a ação de enzimas que não foram completamente inativadas.

#### 4.2.12 Estabilidade da água de coco dos lotes do Experimento 2

Na Tabela 37 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas dos cinco lotes de água de coco, com o tempo de estocagem, e nas Figuras 25, 26, 27 e 28, a representação gráfica e ilustração dos resultados considerados mais importantes.

A alteração mais marcante foi a variação de cor da água de coco. Observou-se que logo após a saída do trocador de calor, a água de coco dos Lotes 2.1 e 2.4, sem ácido ascórbico adicionado, apresentaram uma variação de cor superior à água de coco dos demais lotes, que possuíam ácido ascórbico na sua formulação. Foi observada uma coloração rosa intensa.

Estes resultados indicaram que, sem a adição de ácido ascórbico a água de coco apresenta coloração rosada (Figura 26) assim que passa por um tratamento térmico da magnitude dos aplicados neste experimento.

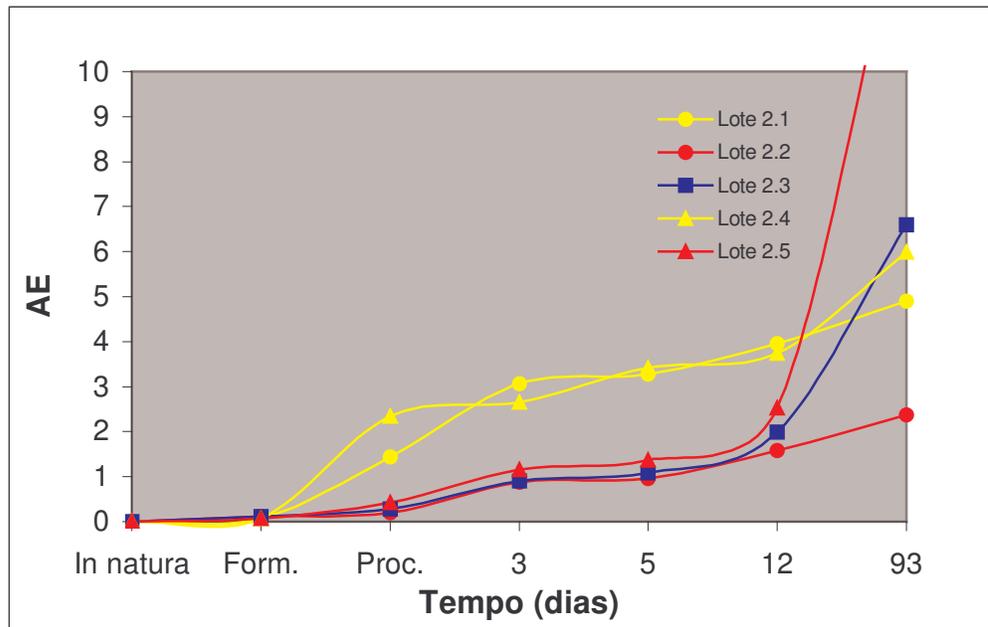
Esta coloração rosada é comum em águas de coco *in natura*, ou quando armazenadas por alguns dias sob refrigeração (David e Fernandes, 1998; Abreu, 1999; Cursino *et al.* 1999; FAO, 2000; Cabral, 2002; Agência Brasil, 2004). Esta coloração foi observada nos estudos realizados pela FAO, utilizando-se ultrafiltração, onde foi recomendado o uso de 150mg/L de ácido ascórbico para que esta alteração de cor não ocorresse (FAO, 2000). Portanto, um tratamento térmico intenso acelera as reações de alteração de cor natural da água de coco.

Tabela 37. Estabilidade da água de coco dos lotes do Experimento 2\*.

LOTE	Tempo (dias)	$\Delta E$	A. A.	O <sub>2</sub>	pH	Turbidez
2.1 (138 °C)	In natura	0	9,65	8,02	5,20	18,64
	Formulada	0,07	9,65	8,02	4,98	19,38
	Processada	1,44	7,02	4,85	4,98	27,97
	3	3,06	6,14	4,43	4,98	28,44
	5	3,28	3,51	4,59	4,95	28,08
	12	3,95	1,75	4,68	4,95	28,08
	93	4,90	1,24	3,62	4,93	21,34
2.2 (139 °C)	In natura	0	9,65	8,02	5,20	18,64
	Formulada	0,11	219,25	8,09	4,92	18,59
	Processada	0,20	184,17	3,65	4,91	26,78
	3	0,88	144,71	2,12	4,90	27,31
	5	0,96	135,94	0,86	4,86	26,82
	12	1,58	96,47	0,25	4,87	26,66
	93	2,37	91,60	0,21	4,87	20,90
2.3 (141 °C)	In natura	0	9,65	8,02	5,20	18,64
	Formulada	0,11	98,02	7,94	4,96	18,59
	Processada	0,28	83,32	3,13	4,96	27,25
	3	0,90	52,62	1,51	4,96	27,49
	5	1,09	48,24	0,61	4,90	28,30
	12	1,99	35,08	0,53	4,91	27,84
	93	6,60	9,88	0,42	4,92	19,88
2.4 (144 °C)	In natura	0	9,65	8,02	5,20	18,64
	Formulada	0,07	9,65	8,93	5,00	18,97
	Processada	2,35	6,14	4,79	5,00	27,02
	3	2,66	3,51	4,37	5,00	27,11
	5	3,42	1,75	4,39	4,94	26,84
	12	3,74	1,75	4,30	4,96	27,73
	93	5,99	1,24	1,20	4,93	23,98
2.5 (144 °C)	In natura	0	9,65	8,02	5,20	18,64
	Formulada	0,07	214,87	8,44	4,95	18,97
	Processada	0,43	157,86	3,61	4,93	24,23
	3	1,16	127,17	1,41	4,92	24,71
	5	1,37	122,78	0,44	4,88	25,19
	12	2,53	87,70	0,32	4,88	24,61
	93	14,27	6,80	0,00	4,86	18,54

\*Média de três amostras; AA- ácido ascórbico (mg/L); O<sub>2</sub> – oxigênio dissolvido (%);  $\Delta E$  – variação de cor.

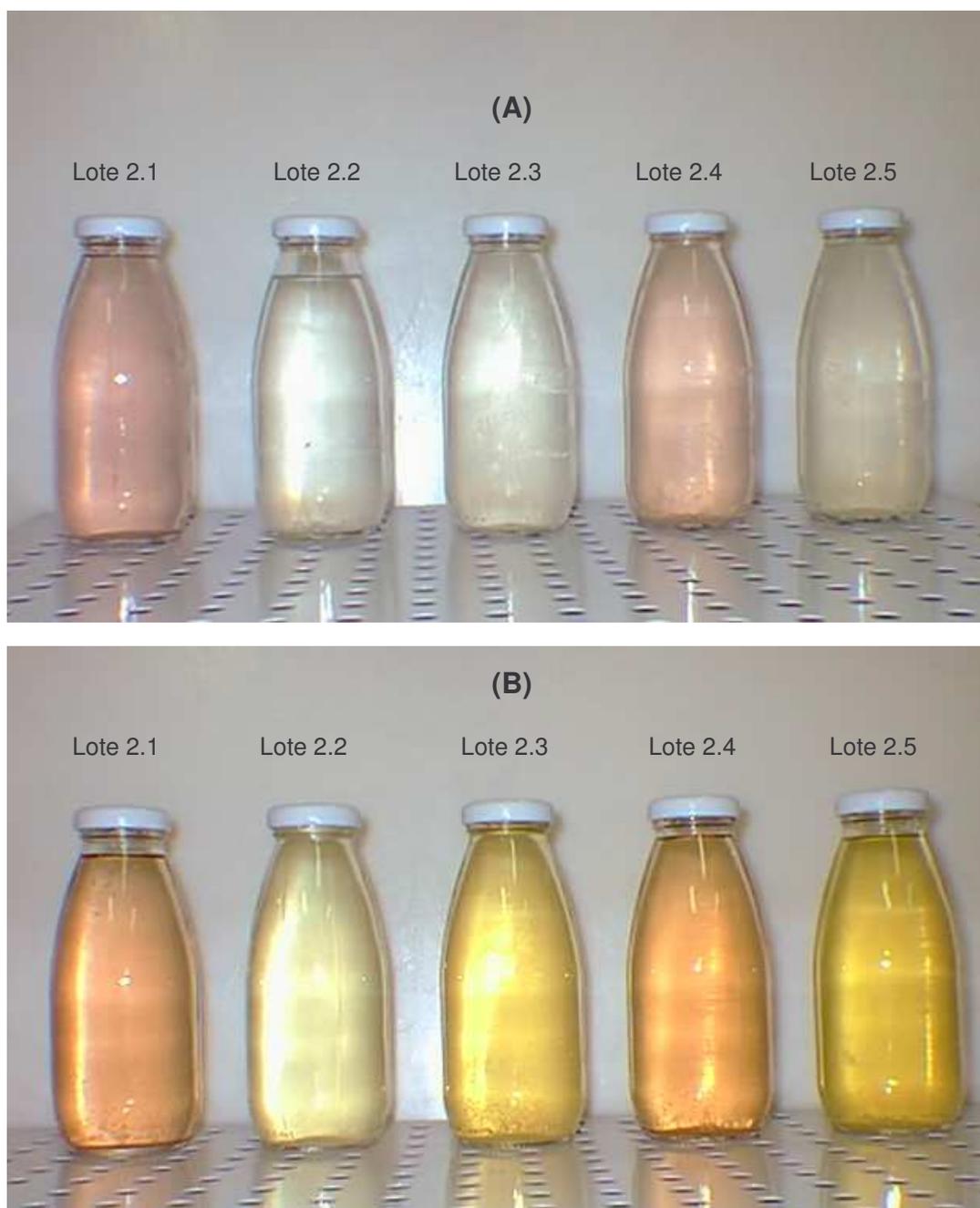
Durante a estocagem, observou-se que todas as águas de coco tiveram um escurecimento progressivo. Entretanto, a água de coco do lote 2.5 apresentou um escurecimento mais intenso. Como foi a água de coco processada na maior temperatura, de 144 °C, acredita-se que isto ocorreu devido à maior degradação do ácido ascórbico, acelerada pelo tratamento térmico intenso.



**Figura 25. Variação de cor ( $\Delta E$ ) com o tempo de estocagem dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2** (Lote 2.1 = 138°C/10s e sem adição de AA; Lote 2.2 = 139°C/10s e 200mg/L de AA; Lote 2.3 = 141°C/10s e 100mg/L de AA; Lote 2.4 = 144°C/10s e sem adição de AA; Lote 2.5 = 144°C/10s e 200mg/L de AA; AA = ácido ascórbico).

Observou-se, na Figura 27, que a degradação do ácido ascórbico, na água de coco de todos os lotes, apresentou-se relacionada ao comportamento de variação de cor  $\Delta E$ . Destacando-se o comportamento apresentado pela água de coco do Lote 2.2, onde a concentração de ácido ascórbico, praticamente estabilizou após o 12º dia de estocagem, em 90mg/L, assim como a variação de cor  $\Delta E$ , também estabilizou.

Estes resultados podem ser relacionados ao consumo de oxigênio dissolvido durante a estocagem, demonstrado na Figura 28. Nos lotes de água de coco em que houve adição de ácido ascórbico (Lotes 2.2, 2.3 e 2.5), a maior parte do oxigênio foi consumida após o 12º dia de estocagem.



**Figura 26. Garrafas de água de coco dos cinco lotes do Experimento 2, recém-processada (A) e após 93 dias (B) de estocagem à temperatura ambiente.**

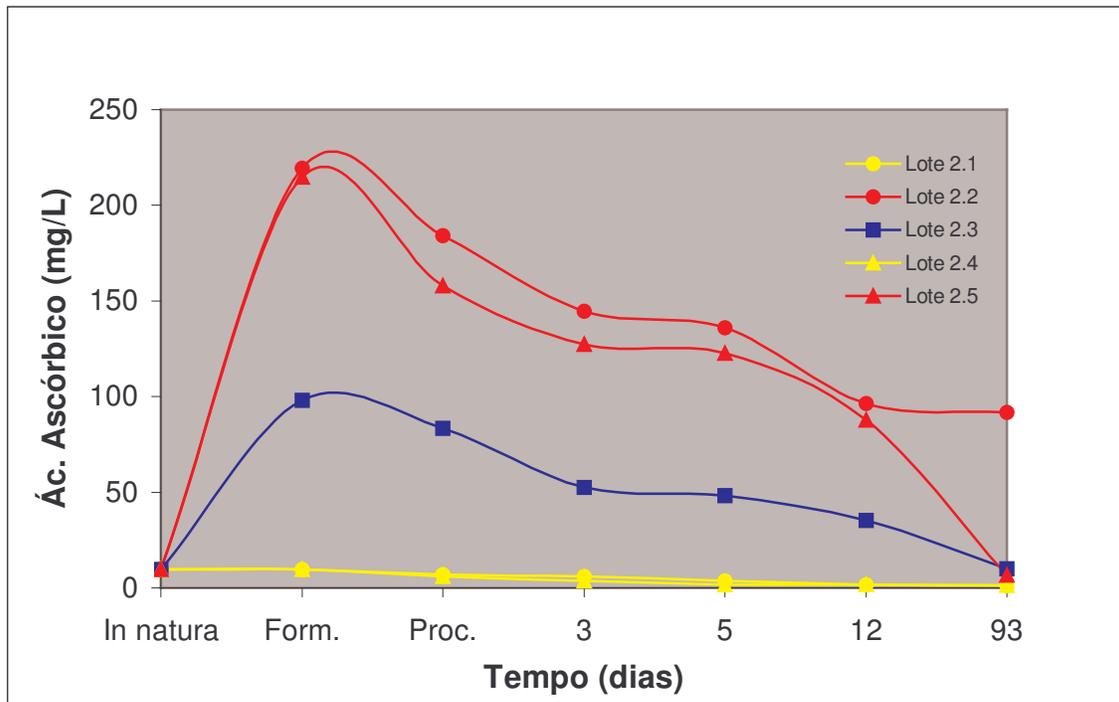
Lote 2.1 = Tratamento térmico de 138 °C/10s; sem adição de ácido ascórbico;

Lote 2.2 = Tratamento térmico de 139 °C/10s; 200 mg/L de ácido ascórbico;

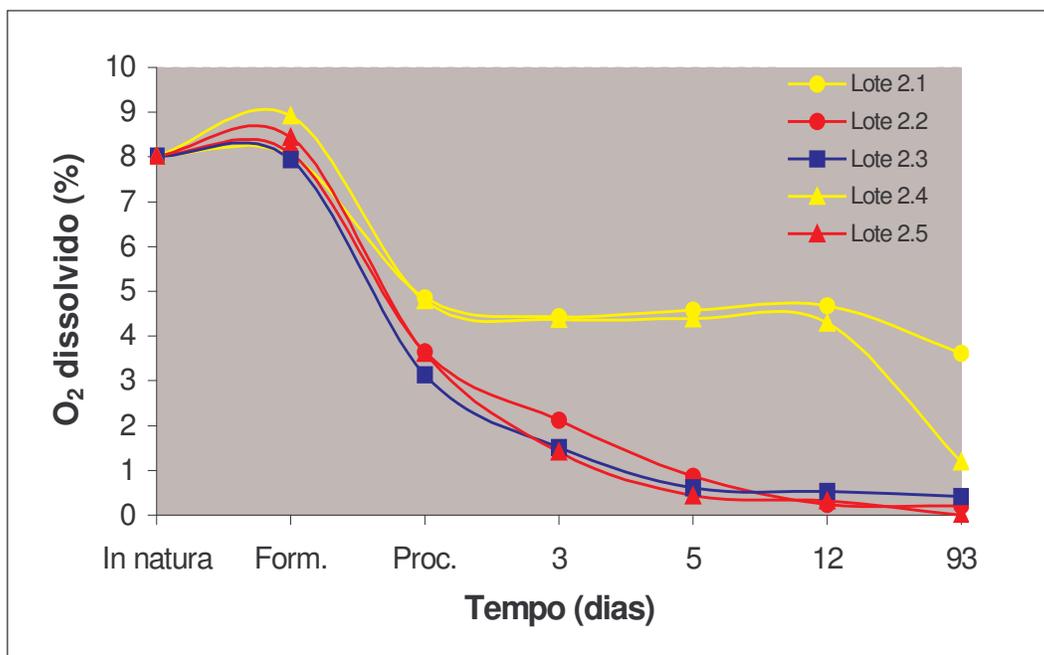
Lote 2.3 = Tratamento térmico de 141 °C/10s; 100 mg/L de ácido ascórbico;

Lote 2.4 = Tratamento térmico de 144 °C/10s; sem adição de ácido ascórbico;

Lote 2.5 = Tratamento térmico de 144 °C/10s; 200 mg/L de ácido ascórbico;



**Figura 27. Concentração de ácido ascórbico com o tempo de estocagem dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2** (Lote 2.1 = 138°C/10s e sem adição de AA; Lote 2.2 = 139°C/10s e 200mg/L de AA; Lote 2.3 = 141°C/10s e 100mg/L de AA; Lote 2.4 = 144°C/10s e sem adição de AA; Lote 2.5 = 144°C/10s e 200mg/L de AA; AA = ácido ascórbico).



**Figura 28. Oxigênio dissolvido com o tempo de estocagem dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2** (Lote 2.1 = 138°C/10s e sem adição de AA; Lote 2.2 = 139°C/10s e 200mg/L de AA; Lote 2.3 = 141°C/10s e 100mg/L de AA; Lote 2.4 = 144°C/10s e sem adição de AA; Lote 2.5 = 144°C/10s e 200mg/L de AA; AA = ácido ascórbico).

Foi observada uma pequena, mas progressiva, redução do pH com a estocagem, a qual foi relacionada à formação de compostos ácidos provenientes da reação de gradação do ácido ascórbico e escurecimento, como citado anteriormente para os lotes do Experimento 1 (Hanshall, 1981).

Após o tratamento térmico foi observado um aumento de turbidez em todos os lotes de 18 para 27%, aproximadamente. Durante a estocagem, houve um aumento máximo no 5° e 12° dias, e posterior redução após o 93° dia. Nos lotes do Experimento 1 também foi observado um aumento de turbidez.

#### 4.2.12.1 Atividade enzimática da água de coco dos lotes do Experimento 2

A água de coco *in natura* apresentou 2,33U/mL de polifenoloxidase. A água de coco formulada dos Lotes 2.2, 2.3 e 2.5, nas quais houve adição de ácido ascórbico, não apresentaram atividade de polifenoloxidase, enquanto que na água de coco formulada dos Lotes 2.1 e 2.4, em que foi adicionado somente ácido cítrico, observou-se 1,82U/mL e 1,39U/mL de polifenoloxidase, respectivamente. Ou seja, a adição de ácido ascórbico foi eficaz na inativação da polifenoloxidase antes do tratamento térmico. Após o tratamento térmico não foi detectada atividade em nenhum dos cinco lotes produzidos.

A adição de ácido cítrico causou na água de coco dos Lotes 2.1 e 2.4 uma redução de atividade de 21,89% e de 59,66%, respectivamente. Campos (1993) observou uma redução de 26,8% com 148mg/100mL de ácido cítrico (96 mg adicionados + 55mg da água de coco), apresentando pH 4,30. Em pH 4,90, que foi o utilizado neste experimento, Campos, observou uma redução de 7% na atividade, o que correspondeu a 62mg/100mL de ácido cítrico. Na água de coco dos Lotes 2.1 e 2.4 havia o equivalente a 66mg/100mL de ácido cítrico, contudo, encontrou-se uma inativação maior. Isto pode ser explicado pela baixa atividade de PFO encontrada na água de coco utilizada neste experimento de 2,33U/mL, contra 32,1U/mL encontrada por Campos (1993). Outra possibilidade é de que o

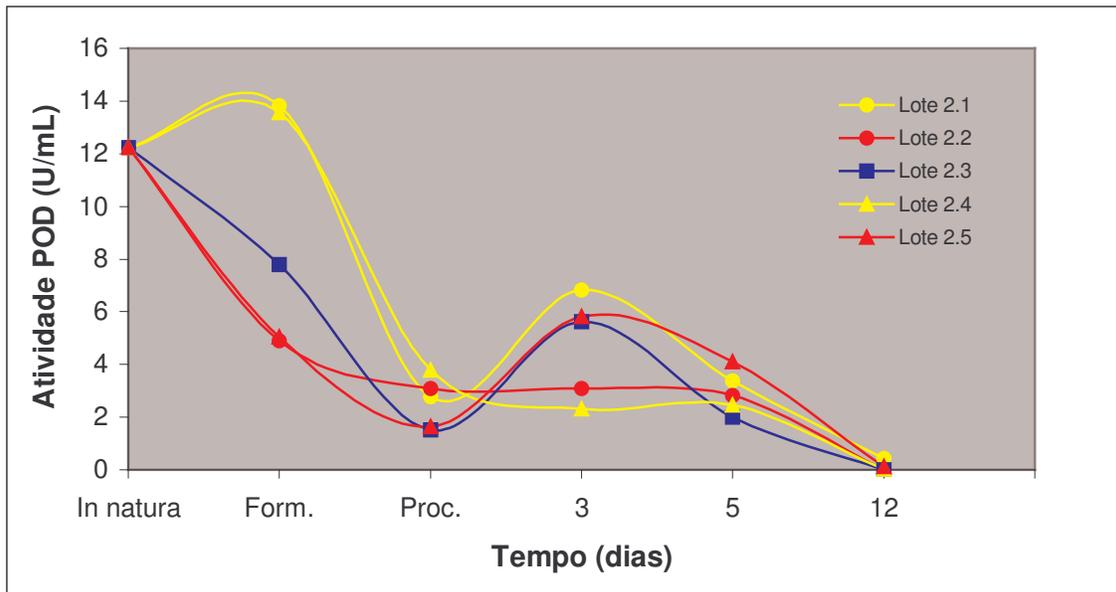
teor de ácido ascórbico na água de coco deste experimento tenha sido maior do que na utilizada por Campos (concentração não determinada).

Na Tabela 38 e na Figura 29 estão apresentados os resultados da análise de atividade enzimática da peroxidase dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2.

**Tabela 38. Atividade da enzima peroxidase em Unidades/mL dos lotes de água de coco do Experimento 2.**

Tempo (dias)	Lote 2.1	Lote 2.2	Lote 2.3	Lote 2.4	Lote 2.5
	Atividade Peroxidase (U/mL)				
<i>In natura</i>	12,23±1,27				
Formulada	13,83±0,63	4,89±2,23	7,80±1,22	13,57±2,58	5,05±1,02
Processada	2,77±2,76	3,09±1,37	1,53±0,63	3,80±2,56	1,64±1,26
3	6,83±0,94	3,10±1,65	5,62±1,00	2,31±1,35	5,82±2,79
5	3,38±1,82	2,82±0,71	2,91±0,16	2,46±1,23	4,11±1,57
12	0,43±0,25	0	0	0,03±0,08	0,13±0,00

Média de três leituras de três amostras.



**Figura 29. Atividade enzimática da Peroxidase (PDO) dos cinco lotes de água de coco do Experimento 2** (Lote 2.1 = 138 °C/10s e sem adição de AA; Lote 2.2 = 139 °C/10s e 200mg/L de AA; Lote 2.3 = 141 °C/10s e 100mg/L de AA; Lote 2.4 = 144 °C/10s e sem adição de AA; Lote 2.5 = 144 °C/10s e 200mg/L de AA; AA = ácido ascórbico).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 38, observou-se que a adição de 100mg/L de ácido ascórbico causou uma redução de 36% na atividade da peroxidase e a adição de 200mg/L causou cerca de 60% de redução. Campos (1993) observou que com a adição de 100mg/L de ácido ascórbico ocorria uma redução de 74% da atividade da peroxidase na água de coco, enquanto 200mg/L causavam 100% de redução. Ou seja, os resultados encontrados não estão de acordo com os resultados de Campos (1993). O aumento da sensibilidade do método e a baixa atividade enzimática da água de coco *in natura*, em relação a que foi encontrada por Campos (114,3U/mL), podem explicar esta diferença.

Observou-se atividade residual em todos os lotes e regeneração da enzima peroxidase na água de coco dos Lotes 2.1, 2.3 e 2.5. Nos Lotes 2.2 e 2.4, após o tratamento térmico, ocorreu uma gradual perda de atividade de peroxidase até o 12º dia de estocagem.

A metodologia adotada conseguiu detectar pequena atividade da peroxidase após o tratamento térmico devido à reativação da enzima.

No Lote 2.5 foi observada intensa regeneração da peroxidase. Por ter sido processada na maior temperatura (144°C), a água de coco deste lote deveria apresentar inativação maior do que a do Lote 2.2, por exemplo, que foi processado a 139°C. Entretanto, o Lote 2.2 foi o que apresentou a maior inativação. A degradação do ácido ascórbico pode ter sido acelerada pela alta temperatura de processo atingida no Lote 2.5, enquanto que no Lote 2.2 a temperatura menor pode ter possibilitado a maior estabilidade do ácido ascórbico, permitindo que ele revertesse as quinonas, formadas pela enzima residual, em hidroquinonas, até que a enzima perdesse a sua atividade durante a estocagem, conforme mecanismo descrito por Walker (1994).

De maneira geral, observou-se que ocorreu regeneração da peroxidase em todos os lotes e alguns apresentaram atividade residual. Entretanto, observou-se

uma acentuada regeneração em lotes com 100 e 200mg/L de ácido ascórbico e que foram processados nas temperaturas de 141 e 144°C (Lotes 2.3 e 2.5), contradizendo a lógica de que quanto maior a concentração de ácido ascórbico e maior a temperatura maior deveria ser a inativação enzimática. Com a exceção do Lote 2.1 que teve uma elevada regeneração, sem adição de ácido ascórbico e com a menor temperatura de processo de 138°C. Estes resultados sugerem que ocorre um certo sinergismo entre a ação destes dois parâmetros, ou seja, de que existe um limite de temperatura para que o ácido ascórbico desempenhe sua função de antioxidante e inibidor enzimático durante a estocagem.

Segundo Pontig e Joslyn (1948), o ácido ascórbico pode ser oxidado por quatro sistemas: oxidação direta por oxidase ascorbato; por o-quinonas; por flavonas na presença de peroxidase e peróxido; por o-quinonas formadas pela mistura de catecol e polifenoloxidasas e pelo sistema citocromo. Na presença de polifenóis a oxidação do ácido ascórbico por fenolases é muito mais rápida do que por ascorbato oxidases. Realizando testes com suco de maçã Pontig e Joslyn (1948), determinaram que a velocidade de degradação do ácido ascórbico na presença de peroxidase e suficiente peróxido de hidrogênio é de 0,72mg a cada 2 minutos, seguido de intenso escurecimento, tanto a pH 3,75 quanto a pH 6.

Considerando-se então as observações de Poting e Joslyn (1948), durante a determinação da atividade da peroxidase, nos lotes de água de coco que tinham um grande residual de ácido ascórbico, o escurecimento pode ter ocorrido mais lentamente, não sendo detectado nos 10 minutos de análise, e quando o lote apresentava baixo residual de ácido ascórbico o escurecimento foi detectado mais rapidamente. Entretanto, a concentração de ácido ascórbico nos Lotes 2.2 e 2.5 eram semelhantes até o 12º dia de estocagem. A menor estabilidade do ácido ascórbico, devido o intenso tratamento térmico do Lote 2.5, pode ter acelerado o seu escurecimento durante as análises.

Nicole et al. (1991) detectaram um aumento da atividade da enzima peroxidase em soluções com aproximadamente 3, 4, 6, 9 e até 30% de sacarose e glicose, e inibição em soluções de frutose. E observaram ativação da peroxidase em contato com produtos da caramelização e da reação de Maillard de soluções de glicose aquecidas. Então, outra hipótese é de que as altas temperaturas provocaram a produção de compostos provenientes da glicose presente na água de coco que aumentaram a atividade da peroxidase.

Portanto, temperaturas da ordem de 138 a 139°C, podem não ter desestabilizado o ácido ascórbico, então ele cumpriu a sua função de seqüestrar o oxigênio, não se degradando ao final. O ácido ascórbico residual no Lote 2.2 conseguiu manter a cor da água de coco mais estável, pois a atividade residual da peroxidase foi praticamente zero após o 12º dia de estocagem.

De acordo com os resultados obtidos, as melhores condições de processamento da água de coco, no sistema asséptico piloto, são: adição de 200mg/L de ácido ascórbico e tratamento térmico a 139°C por 10 segundos.

Houve indícios de que a atividade residual da enzima peroxidase também seja responsável pela degradação do ácido ascórbico além do oxigênio dissolvido e do espaço livre (*headspace*). Entretanto, a adoção de métodos mais precisos é necessária para determinação de atividades tão pequenas do produto recém-processado. Seria mais indicada a utilização de metodologias que determinassem o consumo dos substratos da reação, como oxigênio, peróxido ou fenóis, ou até mesmo do próprio ácido ascórbico.

As adaptações feitas no equipamento, para realização deste experimento, apresentaram-se como uma alternativa viável para obtenção rápida de pequenas amostras para análise, permitindo o uso de volumes reduzidos de matéria-prima.

#### 4.2.13 Estabilidade da água de coco do Experimento 3

Na Tabela 39 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas da água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3, com o tempo de estocagem.

**Tabela 39. Estabilidade da água de coco do Lote 3.1 do Experimento 3.**

LOTE	Tempo (dias)	pH	A. T.	Brix	A. A.	O <sub>2</sub>	ΔE	Turbidez <sup>1</sup>
	<i>In natura</i>	4,88	10,26	5,0	11,74	8,75	0	8,29
	Formulada <sup>2</sup>	4,75	12,00	6,0	214,98	8,60	0,03	7,95
5 (139°C)	Processada	4,77	11,89	6,0	194,21	4,42	0,12	9,65
	2	4,74	11,98	6,0	174,51	3,78	0,15	11,02
	10	4,72	11,96	6,0	170,58	1,17	0,20	13,36
	30	4,72	12,26	6,0	164,96	0,0	0,67	12,66
	60	4,72	12,32	6,0	150,43	0,0	0,79	12,86
	90	4,70	12,36	6,0	142,70	0,0	0,82	11,97
	120	4,70	12,62	6,0	141,72	0,0	1,52	14,19

AT-acidez titulável (mL NaOH 0,1N/100mL); AA- ácido ascórbico (mg/L); O<sub>2</sub> – oxigênio dissolvido (%); ΔE – variação de cor; 1 -%; 2 – antes do processamento térmico.

Observou-se que após 120 dias de estocagem a água de coco do Lote 3.1 manteve um teor de ácido ascórbico acima de 140mg/L, e teve uma variação de cor (ΔE) máxima de 1,52. Estes resultados indicaram que o tratamento térmico de 139°C/10segundos conseguiu evitar o escurecimento da água de coco, durante a estocagem à temperatura ambiente.

Observou-se que as maiores variações, tanto de ácido ascórbico quanto de oxigênio dissolvido, ocorreram após o tratamento térmico. Sendo que o teor de ácido ascórbico teve uma redução de 27% durante a estocagem, enquanto que o teor de oxigênio dissolvido foi eliminado entre 10 e 30 dias de estocagem, confirmando o que foi observado para o Lote 2.2 do Experimento 2. Estes resultados demonstraram que o ácido ascórbico foi eficiente em seqüestrar o oxigênio dissolvido no produto, sem apresentar uma degradação acentuada.

## 4.2.13.1 Atividade enzimática da água de coco do Experimento 3

Na Tabela 40 estão apresentados os resultados das medidas de atividade das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) da água de coco do Lote 3.1, com o tempo de estocagem.

Observou-se que a PFO apresentou uma baixa atividade na água de coco *in natura*, de  $0,15 \pm 0,04$  U/mL, o que pode ser mais um indicativo de que o coco estava demasiadamente verde. A PFO não apresentou atividade após a adição de 200mg/L de ácido ascórbico e após o tratamento térmico.

**Tabela 40. Atividade das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) na água de coco do lote 3.1 do Experimento 3.**

Tempo (dias)	Lote 3.1	
	PFO (U/mL)	POD (U/mL)
<i>In natura</i>	$0,15 \pm 0,04$	$11,55 \pm 0,37$
Formulada	0,0	$0,07 \pm 0,02$
Processada	0,0	0,0
2	0,0	0,0
7	0,0	0,0
10	0,0	-
15	0,0	$0,12 \pm 0,03$
30	0,0	$0,12 \pm 0,09$
60	0,0	0,0
90	0,0	0,0
120	0,0	0,0

Média e desvio padrão de três leituras de três amostras.

A peroxidase não foi completamente inativada após a formulação, mas foi inativada após o tratamento térmico e apresentou uma leve regeneração aos 15 dias, perdendo completamente a atividade após 30 dias. De um modo geral observou-se que ocorreu atividade enzimática residual e regeneração da enzima peroxidase, que foi detectada pelo método adaptado.

Devido aos resultados apresentados entende-se que são necessários mais estudos a cerca das reações enzimáticas da água de coco, e também do desenvolvimento de outras metodologias de análise, pois a metodologia empregada mede a intensidade de cor formada pelos compostos da ação da enzima sobre os fenóis, podendo ocorrer interferências de vários componentes presentes na água de coco. Um método alternativo seria o de medir o consumo dos substratos, como fenóis, peróxido de hidrogênio, oxigênio ou ácido ascórbico.

#### 4.2.14 Vida útil da água de coco dos lotes do Experimento 1

As médias de aceitação da água de coco dos quatro lotes do Experimento 1 estão apresentadas nas Tabelas 41, 42 e 43. Os resultados estão apresentados de acordo com as sessões que foram realizadas.

**Tabela 41. Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco dos Lotes 1.1 e 1.2, após 15 dias de estocagem.**

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global	Intenção de Compra
<b>Lote 1.1</b> (controle*)	7,7 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>
<b>Lote 1.1</b>	7,6 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>
<b>Lote 1.2</b> (controle*)	7,6 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a</sup>
<b>Lote 1.2</b>	7,2 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>	6,0 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	3,0 <sup>b</sup>

\*água de coco recém-processada mantida sob congelamento; letras em comum, na mesma coluna, indicam que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras. Escala hedônica: 1=desgostei muitíssimo; 5=nem gostei/nem desgostei; 9=gostei muitíssimo. Médias de 36 consumidores.

A água de coco recém-processada, dos quatro lotes, receberam média de impressão global de 5,9 a 6,6, situando-se na categoria entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. Estas médias foram menores do que a da formulação otimizada de água de coco sem tratamento térmico (ver item 4.1.5), que foi igual a 8,0 (8 = gostei muito). Demonstrando que houve perda de qualidade sensorial com o tratamento térmico aplicado aos quatro lotes do Experimento 1.

**Tabela 42. Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco do Lote 1.3 recém-processada\* e do Lote 1.4 após 15 dias de estocagem.**

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global	Intenção de Compra
Lote 1.3	7,7 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>	5,4 <sup>b</sup>	5,9 <sup>ab</sup>	3,0 <sup>b</sup>
Lote 1.4 (controle*)	8,0 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a</sup>	6,0 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>
Lote 1.4	6,3 <sup>b</sup>	6,1 <sup>b</sup>	4,9 <sup>b</sup>	5,1 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>

\*água de coco recém-processada mantida sob congelamento; letras em comum, na mesma coluna, indicam que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras. Escala hedônica: 1=desgostei muitíssimo; 5=nem gostei/nem desgostei; 9=gostei muitíssimo. Médias de 30 consumidores.

**Tabela 43. Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco dos lotes 1.1 e 1.2, após 30 dias de estocagem.**

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global	Intenção de Compra
Lote 1.1 (controle*)	7,7 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,0 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>
Lote 1.1	5,4 <sup>b</sup>	5,8 <sup>b</sup>	4,9 <sup>b</sup>	5,2 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>
Lote 1.2 (controle*)	7,4 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>
Lote 1.2	5,0 <sup>b</sup>	5,4 <sup>b</sup>	4,5 <sup>b</sup>	5,0 <sup>b</sup>	2,0 <sup>b</sup>

\*água de coco recém-processada mantida sob congelamento; letras em comum, na mesma coluna, indicam que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras. Escala hedônica: 1=desgostei muitíssimo; 5=nem gostei/nem desgostei; 9=gostei muitíssimo. Médias de 36 consumidores.

Após o 30<sup>o</sup> dia de estocagem a água de coco dos Lotes 1.1 e 1.2 obtiveram médias menores que seis em todos os atributos, sendo então considerado o final de sua vida útil dos referidos lotes. Neste período estes lotes também apresentaram médias significativamente menores do que as respectivas amostras-controle, ou seja, ocorreu perda de qualidade sensorial em relação à água de coco recém-processada.

A água de coco do Lote 1.3, devido aos resultados das análises microbiológicas, que acusaram contaminação, foi avaliada somente quanto aos efeitos do tratamento térmico (amostra mantida sob congelamento), obtendo médias menores que seis nos atributos sabor e impressão global. Esta baixa

aceitação inicial pode ser explicada pelas altas temperaturas atingidas durante o processo, de 141 a 144 °C.

A água de coco do Lote 1.4, teve uma vida útil de 15 dias por receber, neste período, médias abaixo de seis nos atributos sabor e impressão global. Além de receber médias de aceitação significativamente menores do que a amostra-controle, em todos os atributos avaliados. O tratamento térmico do Lote 1.4 foi o que apresentou a maior variação de temperatura, de 135 a 141 °C (6 °C de variação).

A intenção de compra dos consumidores, em relação aos quatro lotes recém processados, situou-se entre as médias 3,0 e 3,7, que correspondem às categorias “talvez compraria/talvez não compraria” e “provavelmente compraria”.

Portanto, de acordo com os critérios adotados, os lotes de água de coco produzidos no Experimento 1 não apresentaram vida útil superior a 30 dias.

As marcas comerciais disponíveis no mercado, para comercialização à temperatura ambiente, têm uma vida útil declarada de 6 a 8 meses, que é o grande diferencial dos processos UAT seguidos de acondicionamento asséptico, entretanto, com adição de metabissulfito. Estes resultados sugerem que são necessários mais testes para obtenção de uma água de coco com maior vida útil.

A patente de conservação de água de coco por métodos combinados da Embrapa (CE), que utiliza pasteurização e adição de ácido láctico, EDTA e ácido ascórbico, proporciona uma vida útil de 60 a 90 dias sob refrigeração entre 2 e 10 °C (INPI, 1999). Outro processo desenvolvido pela Embrapa (RJ), que é a conservação por ultrafiltração, proporciona uma vida útil de 28 dias, também sob refrigeração (Embrapa, 2004).

As temperaturas elevadas e os desvios ocorridos durante o processamento térmico, provavelmente, foram a causa do curto tempo de vida útil dos lotes. O

tratamento térmico contribuiu para a degradação do ácido ascórbico, causando o escurecimento, e, possivelmente, causou alterações em componentes como açúcares e compostos que conferem o sabor característico da água de coco. Outro fator que contribuiu para a redução das médias de aceitação, foi a aparência amarelada da água de coco, que foi bastante comentada pelos provadores, e equivalente a um  $\Delta E$  de 2,13 (Lote 1.4) a 4,18 (Lote 1.2), descritos na Tabela 36.

A degradação de ácido ascórbico resulta na formação de substâncias como hidroximetilfurfural (HMF), e outras que conferem sabor desagradável durante a estocagem (Henshall, 1981; Nielsen et al., 1993). O furfural é associado ao escurecimento devido ao ácido ascórbico, indicando que os defeitos de *flavor* e escurecimento têm uma origem comum (Nielsen, 1993). Em sucos de laranja há uma alta correlação entre *off-flavors* (sabores e odores estranhos) e formação de furfural (Nagy e Randall, 1973).

Quando açúcares redutores e não redutores são aquecidos a temperaturas elevadas, sabores caramelizados são formados. O aquecimento de 100 a 130 °C, libera a água ligada sem alteração da estrutura molecular, e a temperaturas entre 150 e 180 °C, começa a formação de furfural (Rodríguez-Amaia, 2004). Açúcares redutores como a frutose, e a frutose caramelizada aceleram a degradação anaeróbica do ácido ascórbico (Henshall, 1981).

Deste modo, concluiu-se que os tratamentos térmicos aplicados aos lotes do Experimento 1 foram sensorialmente excessivos para a água de coco, descaracterizando seu sabor.

Na indústria Amacoco é aplicado o binômio de 135 °C por 4 segundos, entretanto, é utilizada a adição de metabissulfito para auxiliar na inativação enzimática e para evitar a oxidação de lipídios, isto permite o uso de baixas temperaturas por pouco tempo (Custódio, 2004). Campos (1993), analisando sensorialmente água de coco pasteurizada adicionada de metabissulfito de

potássio, observou a perda de qualidade com o tempo, atribuindo esta perda à formação de composto de enxofre. Contudo, em estudos sensoriais realizados sobre águas de coco processadas termicamente, principalmente por pasteurização, observou-se a concordância de obtenção de baixas médias de aceitação, variando de 3,63 a 6,0 (Frasset et al., 2000; Araújo et al., 2000; Abreu et al., 2003).

#### 4.2.15 Vida útil da água de coco do Experimento 3

Nas Tabelas 44 e 45 estão apresentadas as médias de aceitação da água de coco do Lote 3.1 após 15 e 30 dias de estocagem, respectivamente.

**Tabela 44. Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco do lote 3.1, após 15 dias de estocagem.**

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global	Intenção de Compra
Lote 3.1 (controle*)	6,6 <sup>b</sup>	5,8 <sup>ab</sup>	5,4 <sup>b</sup>	5,5 <sup>b</sup>	2,8 <sup>b</sup>
Lote 3.1	6,8 <sup>ab</sup>	5,1 <sup>b</sup>	5,4 <sup>b</sup>	5,2 <sup>b</sup>	2,5 <sup>b</sup>
Marca comercial	7,5 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>

\*água de coco recém-processada mantida sob congelamento; letras em comum, na mesma coluna, indicam que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras. Escala hedônica: 1=desgostei muitíssimo; 5=nem gostei/nem desgostei; 9=gostei muitíssimo. Médias de 30 consumidores.

**Tabela 45. Médias de aceitação e intenção de compra da água de coco do lote 3.1, após 30 dias de estocagem.**

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global	Intenção de Compra
Lote 3.1 (controle*)	6,4 <sup>b</sup>	5,6 <sup>ab</sup>	5,3 <sup>b</sup>	5,5 <sup>b</sup>	2,8 <sup>b</sup>
Lote 3.1	6,6 <sup>b</sup>	5,2 <sup>b</sup>	5,6 <sup>ab</sup>	5,6 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>
Marca comercial	7,3 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>

\*água de coco recém-processada mantida sob congelamento; letras em comum, na mesma coluna, indicam que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras. Escala hedônica: 1=desgostei muitíssimo; 5=nem gostei/nem desgostei; 9=gostei muitíssimo. Médias de 30 consumidores.

As garrafas utilizadas na análise sensorial do Lote 3.1 foram analisadas dois dias antes quanto à contagem padrão, sendo mantidas sob refrigeração, até o momento da análise sensorial, caso o resultado fosse negativo. Estes cuidados foram tomados, devido à detecção de contaminação em 35,6% das garrafas incubadas por 10 dias a 35 °C (teste de esterilidade comercial).

Observou-se que logo após o tratamento térmico, a água de coco já apresentou média de aceitação inferior a seis e, significativamente, menor do que a da água de coco comercial nos atributos, aroma, sabor e impressão global, entretanto, prosseguiu-se com o teste. No 15º e 30º dia de estocagem, a água de coco não apresentou diferença significativa em relação à água de coco recém-processada, sendo que no 30º dia não foi significativamente diferente da marca comercial em relação ao atributo sabor. Os testes não prosseguiram devido à detecção de contaminação em algumas das garrafas previamente analisadas.

Observou-se, então, que a água de coco manteve seus atributos semelhantes aos da água recém-processada.

Considerando-se o Lote 1.1 (Experimento 1), que teve um tratamento térmico médio semelhante ao do lote 3.1, de  $139\pm 1$  °C, as médias iniciais foram todas maiores ou iguais a seis, contudo, no 30º dia de estocagem todos os atributos tiveram suas médias significativamente menores do que da água recém-processada. Comparando estes dois lotes, fica a dúvida se a baixa aceitação foi devido ao tratamento térmico.

Deste modo, atribuiu-se esta menor média inicial de aceitação ao estado de maturação dos cocos utilizados no Experimento 3. Fato que confirma estas observações foram os comentários dos provadores que, de maneira uniforme, destacaram a falta de aroma e sabor característico de água de coco, acidez acima do ideal e sem aparência de água de coco, devido a pouca turbidez. Estas características são comuns em águas provenientes de cocos demasiadamente verdes (Srebernish, 1998; Rosa e Abreu, 2002; Jackson et al, 2004). Entretanto, a partir destas observações, atribuiu-se a baixa aceitação somente à falta de sabor

e aroma característico, pois em testes anteriores (durante o desenvolvimento da formulação) foi constatado que formulações de água de coco mais ácidas, com pH 4,65 e acidez titulável de 15mL de NaOH 0,1N/mL, não apresentaram gosto ácido e gosto doce ideal estatisticamente diferente das formulações próximas do ideal (ver Tabela 13).

Deste modo, o tratamento térmico de 139°C por 10 segundos, foi considerado o melhor binômio para manter a estabilidade físico-química e sensorial da água de coco, durante a estocagem, sem a necessidade de conservadores como o metabissulfito. Contudo, são necessários outros processamentos utilizando-se uma matéria-prima com maior estado de maturação, entre 6 e 8 meses, para confirmar estes resultados.

Constatou-se, durante a realização deste estudo, uma certa dificuldade de obter matéria-prima uniforme, visto que os produtores começam a retirar os cocos assim que é atingido o volume de interesse comercial, sem se preocuparem com a qualidade sensorial da água. Portanto, é uma prática comum a comercialização de cocos com cinco meses de maturação nas centrais de abastecimento (Ceasas).

Em algumas indústrias de grande porte, utiliza-se a mistura da água do coco verde com a água do coco maduro (Rosa e Abreu, 2002). Em estudo posterior, seria interessante substituir a adição de ácido cítrico por água de coco mais verde, e a adição de frutose por água de coco mais madura.

### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DA EMBALAGEM DE ÁGUA DE COCO

#### 4.3.1 Dimensionamento da embalagem

Na Figura 30 está apresentada a caracterização dimensional da garrafa PET e ilustração das tampas utilizadas.

Observou-se que as garrafas de PET utilizadas neste experimento apresentaram uma distribuição de espessura bastante irregular, demonstrando que a espessura da parede da garrafa aumenta do topo para a base, variando de 0,26 a 0,71mm. Estas características indicam a possibilidade desta embalagem não oferecer uma barreira uniforme aos gases e à luz, podendo comprometer o seu desempenho.

#### 4.3.2 Peso e capacidade volumétrica das embalagens

Na Tabela 46 estão apresentadas as medidas de peso das garrafas de PET e das tampas e a capacidade volumétrica.

**Tabela 46. Peso e capacidade volumétrica das embalagens.**

Peso (g)	
Garrafa PET	27,66 ± 0,18
Tampa com liner	3,28 ± 0,02
Tampa sem liner	3,35 ± 0,03
Capacidade volumétrica (mL)	
Volume total	327,5 ± 2,6
Volume útil Experimento 1	294,5 ± 5,5
Espaço vazio Experimento 1	33 ± 5,9 (10%)
Volume útil Experimento 3	317 ± 2,6
Espaço vazio Experimento 3	10,5 (3,21%)

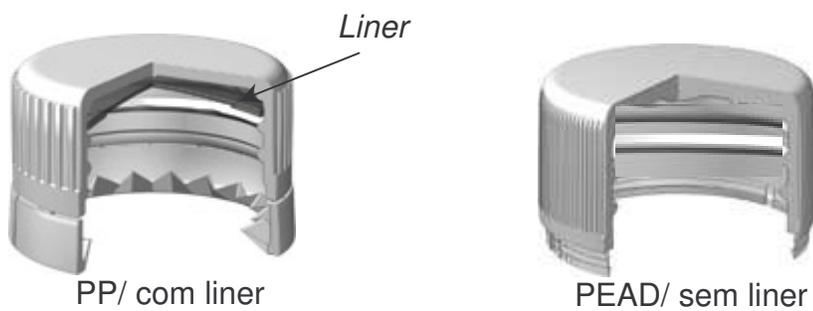
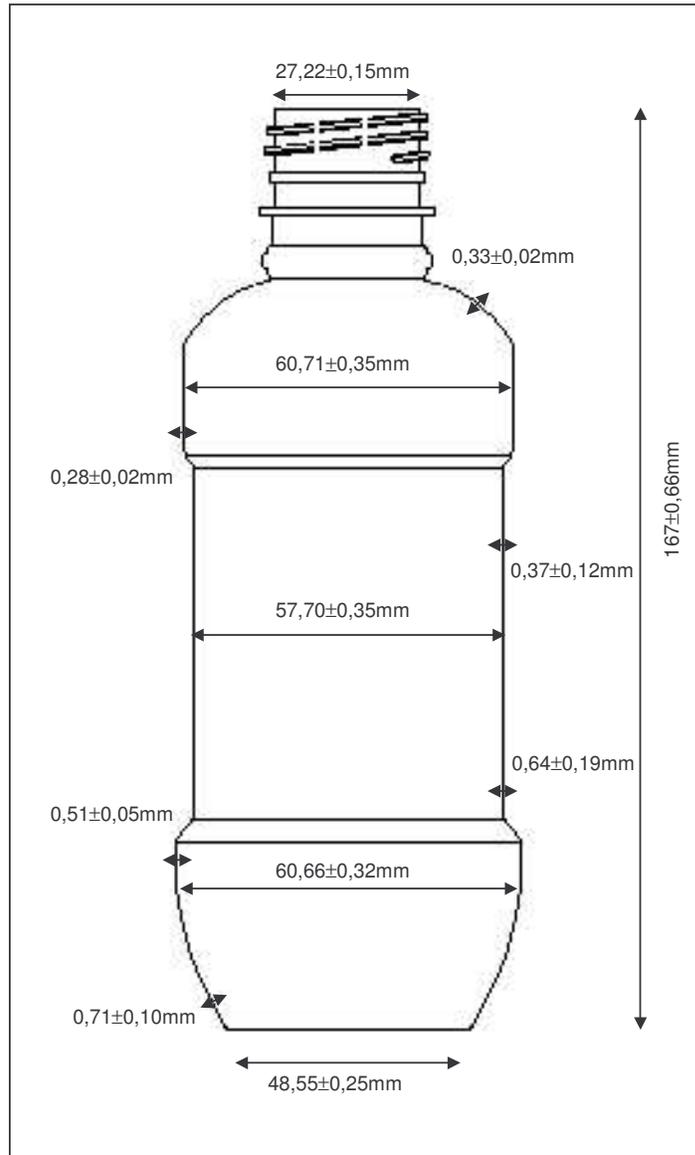


Figura 30. Caracterização dimensional da garrafa de PET e ilustração das tampas utilizadas no Experimento 1 e no Experimento 3.

O espaço vazio adotado para o acondicionamento da água de coco no Experimento 1 foi equivalente a 10% do volume total da embalagem, o que corresponde a cerca de 7mL de oxigênio. Segundo Toledo (1986) este é um espaço vazio considerável. O fato de a válvula dosadora ser acionada manualmente pode ter contribuído para a quantidade deste espaço vazio, além de uma certa falta de uniformidade, já que este variou de 27 a 39 mL, aproximadamente. Estas variações podem explicar, também, os diferentes graus de escurecimento observados nos lotes de água de coco, já que causaria diferentes níveis de degradação do ácido ascórbico. No Experimento 3, este espaço vazio foi reduzido de 10 para 3,2%, através do acionamento mais sensível da válvula, tornando, contudo, a etapa de acondicionamento mais demorada. Estas observações sugerem a necessidade de melhorias no sistema de acondicionamento.

#### 4.3.3 Taxa de permeabilidade ao oxigênio

Na Tabela 47 estão apresentados os resultados das medidas de permeabilidade ao oxigênio da embalagem utilizada. O teste foi realizado em ambiente com temperatura média de 25°C e 68% de umidade relativa do ar.

**Tabela 47. Taxa de permeabilidade ao oxigênio das embalagens.**

Amostra	Permeabilidade ao O <sub>2</sub> (cm <sup>3</sup> /embalagem.dia) <sup>1</sup>
Garrafa PET	0,035 – 0,090
Garrafa + tampa com <i>liner</i>	0,055 – 0,045
Garrafa + tampa sem <i>liner</i>	0,035 – 0,045

<sup>1</sup> - resultado de duas amostras.

Observou-se uma falta de uniformidade na taxa de permeabilidade entre as duas amostras, sendo que uma foi mais do que duas vezes mais permeável do que a outra. Esta característica pode ser explicada pela distribuição irregular de

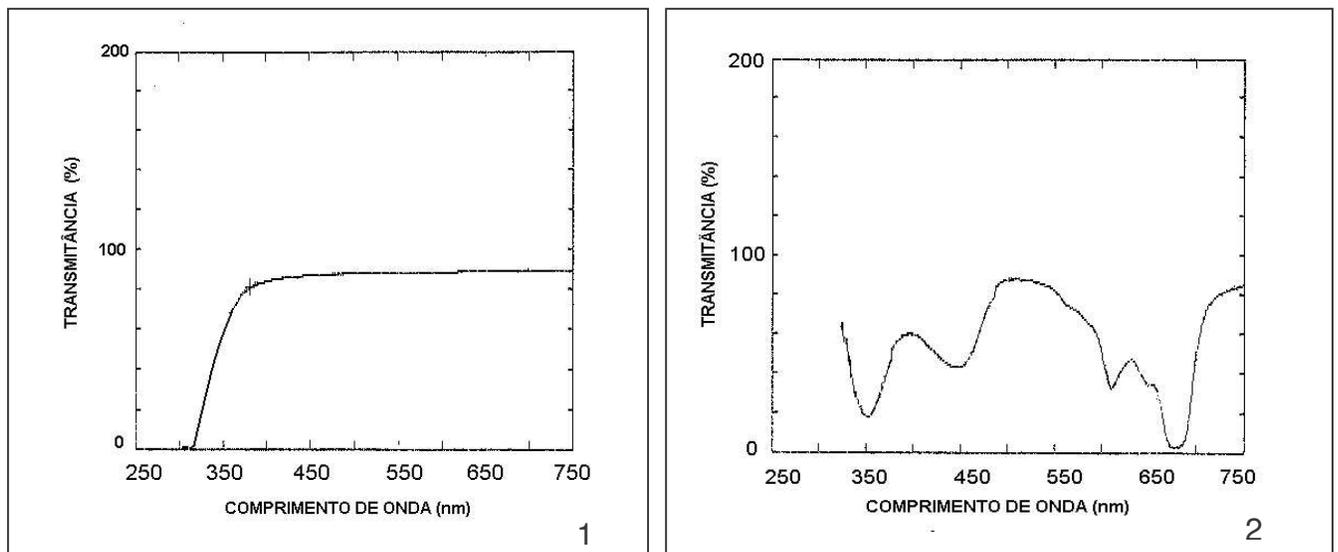
espessura da parede das garrafas, como citado anteriormente. Já as amostras analisadas com as tampas, apresentaram maior uniformidade. A tampa sem *liner* de PEAD proporcionou uma maior barreira à permeabilidade do oxigênio, para o sistema de embalagem. Leber (2001), encontrou uma taxa de permeabilidade de  $0,14\text{cm}^3\text{O}_2/\text{garrafa.dia.0,21atm.25}^\circ\text{C}$ , para garrafas de água de coco refrigerada e congelada. E de  $0,325\text{cm}^3\text{O}_2/\text{garrafa.dia.0,21atm.25}^\circ\text{C}$  para garrafas analisadas com as tampas (PP).

O fato de a embalagem ser de material polimérico (PET), ou seja, com uma determinada permeabilidade ao oxigênio, poderia contribuir para o progressivo escurecimento do produto pela oxidação do ácido ascórbico. Contudo, durante a estocagem, a permeabilidade da embalagem não teve papel marcante nas reações observadas. Pois, a concentração de ácido ascórbico, na água de coco do Lote 1.3, do Experimento 1, praticamente estabilizou entre o 30° e o 120° dia, não sendo observada a presença de oxigênio dissolvido, assim como a água de coco do Lote 3.1, do Experimento 3, que também manteve uma alta concentração de ácido ascórbico, de 140mg/L, até o 120° dia de estocagem.

Segundo Toledo (1986), o oxigênio permeado pelo sistema tampa-embalagem tem uma pequena influência sobre a degradação do ácido ascórbico quando existe um espaço livre considerável. Após 90 dias de estocagem a 38°C, foi observada a mesma variação no teor de ácido ascórbico em suco de laranja acondicionado assepticamente em garrafas de vidro, com espaço vazio de 12mL, e em laminado termoformado de PVdC/PS, com permeabilidade total de  $0,032\text{mLO}_2/\text{dia}$  (Toledo, 1986).

#### 4.3.4 Medida de transmitância

Na Figura 31 estão apresentados os espectros de transmitância da garrafa de PET transparente (1) e de uma garrafa de PET pigmentada de verde (2), utilizada para acondicionar marcas comerciais de água de coco.



**Figura 31. Espectros de transmitância das embalagens de água de coco (1-garrafa transparente; 2-garrafa verde).**

O espectro de emissão de radiação solar abrange a faixa de 300 a 1000nm e o espectro das diferentes lâmpadas comerciais fluorescentes a que os produtos podem ser expostos varia nesta faixa de comprimento de onda, dependendo do tipo de lâmpada. Dentro desta faixa, a radiação visível abrange comprimentos de onda de 380 a 780nm, e neste intervalo a radiação ultravioleta (UV), com maior energia, possui comprimentos de onda de 200 a 380nm (Silverstein,1987). Portanto, foi escolhido o comprimento de onda de 380nm para fazer uma comparação pontual dos valores de transmitância das garrafas de PET, que estão apresentadas na Tabela 48.

**Tabela 48. Medidas de transmitância das embalagens a 380nm.**

Amostra	% de Transmitância a 380nm	
	Corpo	Fundo
PET transparente	85,38	81,38
PET verde	54,81	34,61

Observou-se que a embalagem transparente utilizada permite uma maior transmissão de radiação do que as pigmentadas de verde, disponíveis no mercado. As embalagens também apresentaram barreira não uniforme, sendo maior no fundo das garrafas, chegando à redução de 20% no caso da garrafa pigmentada de verde.

Para reduzir os efeitos da radiação na água de coco, seria recomendada a utilização de embalagens pigmentadas ou com absorvedores de radiação ultravioleta, como as das marcas comerciais. Neste estudo, a utilização de embalagens transparentes forneceu a conveniência de poder observar rapidamente as alterações no produto, principalmente relativas à presença ou ausência de contaminação e alteração de cor. Entretanto, são necessários mais estudos, para verificar a influência da exposição à radiação sobre as características físico-químicas e sensoriais da água de coco.

#### **4.3.5 Eficiência do fechamento das garrafas**

Quando imersas em água, não foi observada a emissão de bolhas das garrafas analisadas, caracterizando um fechamento eficiente em todos os lotes.

#### **4.3.6 Torque de fechamento e de abertura**

O valor médio do torque de fechamento aplicado às garrafas dos lotes do Experimento 1 (Lotes 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4) foi igual a  $16 \pm 1,5$  lb.pol ( $1,85 \pm 0,2$  N.m). E o torque de abertura médio foi de  $16,5 \pm 3$  lb.pol ( $1,9 \pm 0,3$  N.m).

Os torques de fechamento foram determinados previamente, utilizando-se 4 garrafas como amostra, entretanto, no momento do acondicionamento diferentes operadores foram responsáveis pelo fechamento manual, o que explicaria a variação observada.

O valor médio do torque de fechamento do lote do Experimento 3 (Lote 3.1) foi igual a  $13 \pm 1$  lb.pol ( $1,5 \pm 0,1$  N.m) enquanto que o torque de abertura foi igual a  $7,5 \pm 0,5$  lb.pol ( $0,95 \pm 0,05$  N.m). Observou-se que os valores dos torques de fechamento e abertura do Lote 3.1 foram menores do que os dos lotes do Experimento 1. Este fato pode ser explicado pelo uso de tampas diferentes em cada experimento. A tampa utilizada no Experimento 3 foi considerada a mais apropriada para realização de futuros testes realizados com fechamento manual, visto que requer a aplicação de menos torque, tanto de fechamento, quanto de abertura.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com modelos de regressão, a formulação ideal de água de coco, em termos de acidez e doçura, tem pH 4,9, acidez titulável 9,4mLNaOH0,1N/100mL e Brix 6,2%, utilizando-se sacarose, e 6% utilizando-se frutose como adoçante.

O sistema asséptico não apresentou um bom desempenho na sua conformação original, devido à instabilidade térmica apresentada pelo trocador de calor UAT. Entretanto, após algumas modificações e testes de adaptação, o sistema foi estabilizado e considerado eficiente para realização de pesquisas em escala piloto.

Os procedimentos de limpeza e esterilização da linha de processamento e acondicionamento e da sala limpa foram considerados apropriados para alcançar e manter a esterilidade antes e durante os processamentos.

Dos cinco lotes produzidos, em escala piloto, apenas três alcançaram a esterilidade comercial. Nos dois lotes contaminados foram detectados microrganismos mesófilos aeróbios esporulados. Em um dos lotes, houve indicativa de sub-processamento e no outro, de contaminação cruzada oriunda da parte externa das embalagens. Portanto, é necessário que seja desenvolvida um procedimento mais eficiente de higienização da parte externa das embalagens e a inclusão da análise de detecção de esporos nos controles de contaminação, tanto de embalagens quanto de equipamentos.

A água de coco de três lotes apresentou escurecimento durante a estocagem, este escurecimento foi relacionado à degradação do ácido ascórbico, que pode ter sido favorecida pelo oxigênio presente no espaço vazio das embalagens ou pela presença de outros compostos produzidos durante os tratamentos térmicos, que também contribuem para o escurecimento.

Os testes em pequena escala indicaram que a degradação do ácido ascórbico ocorreu devido à atividade residual e regeneração da enzima peroxidase, e também ao excessivo aquecimento. Observou-se a necessidade do uso de outros métodos de determinação de atividade enzimática da água de coco, mais sensíveis e que sofram menos interferência dos constituintes da amostra.

O tratamento térmico em temperaturas de 138 e 144 °C, sem adição de ácido ascórbico, causou a formação instantânea de intensa coloração rosa na água de coco, sugerindo que temperaturas elevadas, em sistema fechado e na ausência de um antioxidante, aceleram as reações naturais de oxidação da água de coco.

Os cinco lotes de água de coco tiveram vida útil máxima de 30 dias. A baixa aceitação sensorial da água de coco neste período foi atribuída às altas temperaturas e às constantes oscilações térmicas que favoreceram a produção de compostos sensorialmente indesejáveis, como os produtos da degradação do ácido ascórbico. Em um dos lotes a baixa aceitação foi atribuída ao uso de matéria-prima obtida de frutos com menos de seis meses de maturação.

O tratamento térmico a 139 °C por 10 segundos foi considerado o mais apropriado para processamento da água de coco no sistema asséptico, visto que, durante a estocagem por 120 dias, não foi observado escurecimento e nem acentuada degradação do ácido ascórbico. Entretanto, mais testes são necessários visando uma maior aceitação sensorial e tempo de vida útil.

As embalagens utilizadas apresentaram baixa taxa de permeabilidade ao oxigênio, entretanto, são necessários procedimentos adicionais para reduzir o teor de oxigênio dissolvido e no espaço livre das embalagens, como por exemplo, inertização com nitrogênio e uso de tampas com absorvedores de oxigênio. O desenvolvimento de uma válvula dosadora de acondicionamento que incorpore menos oxigênio e tenha maior precisão de volume, também é recomendado.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos – **Compêndium da Legislação de Alimentos - Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos**, 5ª rev., São Paulo: ABIA, 1992.

ABREU, F.A.P. Extrator de água de coco verde. Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado Técnico**. n. 34, p. 1-5, jul., 1999a.

ABREU, F.A.P. Processo de conservação da água de coco por métodos combinados. **Patente** DEINPI/CE Nº 000129, Setembro, 1999b.

ABREU, L. F. **Avaliação de processo de sanificação química de garrafas plásticas para sistemas assépticos**. Campinas, 2001. 117p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

ABREU, L. F.; FARIA, J. A F. Evaluation of a System for Chemical Sterilization of Packages. **Packaging Technology and Science**, v. 17, p. 37-42, 2004.

ABREU, L.F.; ARAÚJO, A.V.C.; EL-AOUAR, A.A.; NEUMANN,D.; ARAÚJO, E.E.F.; MORAIS, M.M.; SILVA, M.A.A. Levantamento do perfil sensorial e da aceitabilidade de amostras de água de coco processadas com diferentes tratamentos. In: 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2003, Campinas – SP. **Anais** do 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2003. No prelo (Boletim CEPPA, 2005).

ADAMS, J. B. The inactivation and regeneration of peroxidase in relation to the high temperature – short time processing of vegetables. **Journal Food Technology**, v. 13, p. 281-297, 1978.

ADAMS, J. B. Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 201-206, 1997.

ADISSI, K. H. Utilidades. **Revista da SBCC**, n. 13, p. 4-7, 2003.

AFSAR, H; APAK, R.; TOR, I. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using tris(1,10-phenantroline)iron(II). **Analyst**. n. 115, p. 99-103, 1990.

Agência Brasil. **Água de coco do Brasil começa a ganhar o mundo**. Entrevista de 17/03/2004. <http://www.netbabillons.com.br/bolsa/bolsa246.htm>. 30 jul. 2004.

AHNENAINEN, R. Quality assurance and quality control of aseptic packaging. **Food Reviews International**, v. 4, n.1, p. 45-76, 1988.

ALVES, R.M.; OLIVEIRA, L.M.; COLTRO, L.; GARCIA, E.E.C.; SARANTOPÓULOS, C.I.G.L.; PADULA, M. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas rígidas**. Centro de Tecnologia de Alimentos – ITAL. Campinas, 1998. 224p.

ANDRADE, N.J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1996. 182p.

ANVISA. **RDC n. 12 de 2 de janeiro de 2001**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://www.anvisa.gov.br>. 28 set. 2004.

AOAC-**Association of Official Analytical Official Methods of Association of Official Analytical Chemists** Chemists, Washington, D.C., 1980, HORWITZ, W. (ed.), 13<sup>th</sup> Ed. p. 1044.

ANDRADE, N.J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1996. 182p.

ARAGÃO, W. M.; RESENDE, J. M.; CRUZ, E. M. O.; REIS, C. S.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; ALENCAR, J. A.; MAREIRA, W. A.; PAULA, F. R.; LIMA FILHO, J. M. P. Fruto do coqueiro para consumo natural. In: ARAGÃO, W.M. COCO – **Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2002. Cap.3, p. 19-25.

ARAGÃO, W. M.; CRUZ, E. M. O.; COSTA, A. S.; BONFIM, K. B. R. **Componentes dos frutos dos cultivares de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.)**. Aracajú: Embrapa-CPATC, 1998. 3p.

ARAÚJO, A. H.; FONTENELE, A. M. M.; MOTA, A. P. M.; DANTAS, F. F.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Análise sensorial de água de coco *in natura* em comparação à pasteurizada. In: XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000, Fortaleza. **Livro de Resumos**. Fortaleza: SBCTA, 2000. v. 1, p. 3.44.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, 2. Ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1996.

BALDRY, M. G. C. The bactericidal, fungicidal and esporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. **Journal of Applied Bacteriology**, v.54, n.3, p.417-423, 1983.

BALDRY, M.G.C.; FRASER, J.A.L. Disinfection with peroxygens. In: PAYNE, K.R.(Ed) **Industrial Biocides**. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 91-116.

BENNETT, E. S. F. **Testes em áreas limpas**. In: Seminário Projeto e Construção de Áreas Limpas. José dos Campos: Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC), 1997.

BENNETT, E. S. F. Cancelamento da U.S.Fed. Std. 209 – E. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC)**, n.5, p.32, 2001.

BENNETT, E. S. F. O fim de uma era. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC)**, n. 6, p. 28-30, jan./fev., 2002.

BERNARD, D.T.; III, A.G.; SCOTT, V.N.; SHAFER, B.D.; STEVENSON, K.E.; UNVERFERTH, J.A.; CHANDARANA, D.I. Validation of aseptic processing and packaging. **Food Technology**. v. 44, n.12, p. 119-122, 1990.

BLAKSTONE, B.; CHUYATE, R.; KAUTTER, JR., CHARBONNEAU, J.; SUIT, K. Efficacy of oxonia active against selected spore formers. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 3, p. 262-267, 1999.

BLISKA, F. M. M.; LEITE, R. S. S.; SAVICTCI, L. A. O coco no Brasil: aspectos econômicos de mercado. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 81-105, jan./jun., 1995.

BLOCHER, J. C.; BUSTA, F.F. Bacterial spore resistance to acid. **Food Technology**, vol. 37, n. 11, p. 87 – 99, nov., 1983.

BLOCK, S.S. Peroxygen compounds. In: BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**, Philadelphia: Lea Febiger, 1991. Chap.9, p.167-181.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for Experiments**. An introduction to design, data analysis and model building. Nova York: Wiley, 1978.

BRASIL. Instrução Normativa N° 39, de 29/05. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2002.

BROWN, W.E. **Plastics in food packaging**: properties, design, and fabrication. New York: Marcel Dekker, 1992. 539p.

BROUNS, F.; KOVACS, E. Functional drinks for athletes. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.12, p. 414-421,1997.

BUCHELI, C. S.; ROBINSON, S. P. Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. **J. Agric Food Chem**, vol. 42, p. 257-261, 1994.

BUCHNER, N. Aseptic processing and packaging of food particulates. In: WILLHOFT, E.M.A. **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1993. Chap.1, p.1-22.

CABRAL, L. M. C. Estabilização da água de coco verde por meio de filtração com membranas. IN: ARAGÃO, W.M. **COCO – Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. Cap. 7, p. 54-57.

CAMPOS, C. F. **Desenvolvimento de processos térmico e químico para inativação enzimática e preservação do sabor da água de coco verde (*Cocos nucifera* L.)**. Belo Horizonte, 1993. 140 p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

CAMPOS, C.F.; SOUZA, P.E.A.; COELHO, J.V.; GLÓRIA, M.B.A. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation of flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, n. 20. p.487-500, 1996.

CENPA – Centro de Pesquisas Ambientais. **Coco Verde**. <http://www.meumundo.americaonline.com.br/cenpads/Cocoverde.html>. 01 nov. 2004.

CERF, O. Statistical control of UHT milk. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1<sup>st</sup> ed. Hamburg: Technomic, 1988. Chap.6.2, p.244-257.

CHACRA, N. A. B. **Operadores em salas limpas**. Apostila do Seminário “Operadores em Salas Limpas”. São Paulo: Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação – SBCC, 2002a.

CHACRA, N. A. B. **Partículas viáveis**. Apostila do Seminário “Controle de contaminação microbiológica”. São Paulo: Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação – SBCC, 2002b.

CHAMBERS, J. V.; NELSON, P. E (Eds.). **Principles of aseptic processing and packaging**. Washington: The Food Processors Institute, 1993. 257p.

CHEVROTON, D. The aseptic filling of beverage in bottles. **Industrie delle Bevande**, v. 25, n. 142, p. 120-122, april., 1996.

CHILAKA, F.C.; EZE, S.; ANYADIEGWU, C.; UVERE, P. O. Browning in processed yams: peroxidase or polyphenol oxidase? **Journal of Science Food Agricultural**, v. 82, p. 899-903, 2002.

COCO: yes, nós importamos coco da Suíça. **Agroanalysis**, v.17, n.1, p. 25-28, 1997.

COCO – Água que vira pó. **Revista Globo Rural**, n. 226, ago., p. 75, 2004.

COLLARES, E. F.; SOUZA, N. M. Soluções alternativas para hidratação oral em pediatria. I – Composição de Refrigerantes, de Infusões e de água de coco. **Revista Paulista de Pediatria**, n. 3, p. 46-49, 1985.

CORRÊA NETO, R.S. e FARIA, J.A.F. Resultados de pesquisa evidenciam o potencial do PET para sucos. **Engarrador Moderno**. n. 68, p. 36-39, Ago., 1999.

CREMIEUX, A.; FLEURETTE, J. Methods of testing disinfectants. In: BLOCK, S.S. (Ed) **Desinfection, sterilization and preservation**, Philadelphia: Lea Febiger, 1991. Chap.57, p. 1009-1027.

CURSINO, M.M.; SABAA SRUR, A.; LOURENÇO, M.; PEREIRA, W. Contribuição à industrialização da água de coco (*Cocos nucifera*) verde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15, 1996, Poços de Caldas. **Anais...**Poços de Caldas: SBCTA, 1996.

CUSTÓDIO, S. Engenheiro da Indústria Amacoco (PA). **Comunicação Pessoal**. Pará: jul., 2004.

DALLYN, H. Sterilization of articles. **British Patent**, n. 6B – 1570492. 1980. In: BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**, ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1991. Cap.9, p.167-181.

DAVID, P.R.B.S.; FERNANDES, Z.F. Conservação de água de coco por refrigeração. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.16, n.1, p.1-12, jan/jun, 1998.

DATAMARK, Brazil Trend. **Pesquisas e tendência de mercado**, 2002.

DAVID, P.R.B.S.; FERNANDES, Z.F. Conservação de água de coco por refrigeração. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.16, n.1,p.1-12, jan/jun, 1998.

DAVÍDEK, J.; VELÍSEK, J.; POKORNÝ, J. **Chemical changes during food processing**. Czechoslovakia: Elsevier, 1990. Chap. 4. p.230-301.

DENNY, C. B.; CORLETT, D. A. Canned foods – tests for cause of spoilage. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Chap.61. p. 1051-1092.

DRYER, J. M.; DEIBEL, K. E. Canned foods – tests for commercial sterility. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Chap.60. p. 1037-1049.

DUARTE, A.C.P. **Caracterização das enzimas peroxidase e tirosinase presentes na água de coco verde**. Rio de Janeiro, 2000. Tese de Mestrado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

DUARTE, A.C.P.; RODRIGUES,S.L.C.; COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F. Separação das enzimas peroxidase e tirosinase na água de coco por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). In: III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 1999, Campinas - SP. **Anais** do III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. , 1999.

EGUSHI, S.Y.; MASSAGUER, P.R. Desinfecção e Esterilização. **Curso de Treinamento**. Fundação de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, 1995.

EMBRAPA. **Conservação de água de coco verde por ultrafiltração**. Resumo de 7 mai. 2004. <http://www.sct.embrapa.br/diacampo/2004/releases.htm>. 24 fev. 2005.

ESKIN, N. A. M.; HENDERSON, H. M.; TOWNSEND, R. J. **Biochemistry of foods**. London: Academic Press, 1971. 239p.

FAGUNDES NETO, U.; FRANCO, L.; TABACOW, K. M. B. D.; MACHADO, N. L. Água de coco. Variações de sua composição durante o processo de maturação. **Jornal de Pediatria**, v.65, n1/2, p. 17-21, 1989.

FAO, 2000. **La FAO consigue la primera patente para hacer del agua de coco una bebida energetica para los deportistas**. Comunicado de Imprensa 00/51. [http://www.fao.org/WAICENT/OIS/PRESS\\_NE/PRESSSPA/2000/prsp0051.htm](http://www.fao.org/WAICENT/OIS/PRESS_NE/PRESSSPA/2000/prsp0051.htm). 11 dez. 2003.

FARAHNIK, S. A quality control program recommendation for UHT processing and aseptic packing of milk and milk by products. **Dairy and Food Sanitation**, v. 2, n. 11, p. 454-457, 1982.

FARIA, J. A. F. **Vida-de-prateleira de alimentos processados assepticamente**. In: II SEMINÁRIO LATINO AMERICANO - AVANÇOS EM TECNOLOGIA PARA O PROCESSAMENTO E ENVASAMENTO ASSÉPTICO DE ALIMENTOS. Campinas, 1993. p.7-28.

FARIA, J. A.F. **Sistema de esterilização de embalagens**. BR. Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Pedido de Patente, Protocolo n. 1427, 2001.

FARIA, J. A. F. Processamento e envase asséptico. XII Prêmio Brasileiro de Embalagem – Troféu Embanews 2003. **Revista Embanews**, 152A, p. 30, mar., 2003.

FARIA, J. A.F. Professor Titular do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. **Extrator de água de coco**. Campinas: Unicamp, 2003.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

FERHRMANN, W.L.; DIAMOND, A.E. Peroxidase activity and phytopora resistance in different organs of potato plant. **Phytopatology**. n. 57, p. 69-72, 1967.

FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A.; PENTTINELLI, M. L. C. V.; SILVA, M. A. A. P.; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. M. **Análise sensorial: Testes discriminativos e afetivos**. Campinas: SBCTA, 2000, 127 p.

FIBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola** – Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento de safra. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – FIBGE, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 1-6, 29, fev., 1997.

FORD, M.A. The formulation of sport drinks. In: ASHURST, P.R. (Ed.). **Production and Packaging of Non-Carbonated Fruit Juices and Fruit Beverages**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1995. p. 300-330.

FRASER, J.A.L. Novel applications of peracetic acid in industrial disinfection. **Chemspec Bas Symposium**, 1986.

FRASSETTI, J.; TÓRTORA, J.C.O.; GREGÓRIO, S.R. Aceitação de água de coco *in natura* e processada. In: XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Fortaleza, 2000. **Livro de Resumos**. Vol. 1. p. 3.87.

FRUIT SÉRIES 3 - São Paulo. **Coco Verde**. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal – MMA. Secretaria de Recursos Hídricos – SRH. Departamento de Aproveitamento Hidroagrícola – DH. Brasília 1998. Disponível em: [http://www.irrigar.org.br/publicacoes/frutiseries/frutiseries\\_00-3-coco-sp.pdf](http://www.irrigar.org.br/publicacoes/frutiseries/frutiseries_00-3-coco-sp.pdf).

GALEAZZI, M. A. M. Comportamento das polifenoloxidasas em alimentos. **Arquivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 34, n. 2, p. 269-289, 1984.

GAZETA MERCANTIL. **Projeto que recicla casca de coco verde é premiado pelo BIRD**. Entrevista de 11/12/2003. <http://www.e-clip.com.br/gomateria.asp?cod=10608&nome=Abrelpe&cliente=Abrelpe>. 20 jan. 2004.

GILBERT, P.; BROWN, G.; SANDWITH, H. A novel method for cleaning high temperature short time pasteurizers. **South Africa Journal Dairy Technology**, v. 11, n. 2, p. 57-59, jun., 1979.

GREGORY, J. F. Vitamins. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**, 3 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. Chap. 8, p. 531-616.

GONÇALVES, R.A.T.; FARIA, J. A. F. **Avaliação da atividade enzimática de água de coco processada em sistema asséptico e por enchimento a quente**. In: XI Congresso interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2003, Campinas.

GODDARD, M. R. The storage of thermally processed foods in containers other than cans. In: MAN, C. M. D.; JONES A. A. **Shelf life evaluation of foods**. Black Academic & Professional. London, 1996. 320 p.

GREENSPAN, F.P.; MACKELLAR, D.G. The application of peracetic acid germicidal washes to mold control of tomatoes. **Food Technology**, v. 5, p. 95-97, 1951.

GRIMM, L. Beverage aseptic cold filling. **Fruit Processing**. v. 7, p.262-265, 1998.

GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1976.

HAN, B. H.; SCHORNICK, G.S.; LONCIN, M. Destruction of bacterial spores on solid surfaces. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.4, n. 1-2, p. 95-110, 1980.

HARRISON. **Medicina Interna**. 13.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1994.

HENSHALL, J. D. Ascorbic acid in fruit juices and beverages. IN: COUNSELL, J.N.; HORNING, D. H. **Vitamin C (Ascorbic Acid)**. London: Applied Science Publishers, 1981. Cap. 8, p. 123-137.

HOARE, M.; JONES, S.; LINDSAY, J. Total vitamin C analysis of orange juice. **Food Australia**, v. 45, n. 7, p. 341-345, 1993.

HOFFMANN, F. L.; COELHO, A. R.; MANSOR, A. P.; TAKAHASHI, C. M.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de amostras de água de coco vendidas por ambulantes na cidade de São José do Rio Preto – SP. **Revista Higiene Alimentar**, vol. 97, n. 16, p. 87-92.

HOLDSWORTH, S.D. **Aseptic processing and packaging of food products**. Elsevier Science Publisher Ltda. London, 1992, Chap. 9, p. 335-375.

ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*). **Microorganisms in foods** – Application of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality. Vol. 4, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1988, 357 p.

INPI - INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL, Fernando Abreu. **Conservação de água de coco por métodos combinados**. A23L 2/46; A23L 2/54. BR. n. PI9905617-8. 10 set., 1999. <http://www.inpi.gov.br>. 09 mar. 2005.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - ITAL - **Alimentos Enlatados:** Princípios de controle de processamento térmico, acidificação e avaliação de fechamento de recipientes. 4ª Ed. Campinas, 1990. 239 p.

JACKSON, J. C.; GORDON, A.; WIZZARD, G.; McCOOK, K.; ROLLE, R. Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. n. 84, p. 1049-1052, 2004.

JÖNCK, R. H. Treinamento para operadores em ambientes assépticos proporciona segurança e qualidade. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v. 5, n. 32, p. 12-19, dez, 2001.

JOSLYN, M. A. Physiological and enzymological aspects of juice production. In: Treseler, D.K.; Joslyn, M. A. **Fruit and vegetable juice – processing technology**. Connecticut : The Avi Publishing Company, Inc., 1961. Chap. 2, p. 65-77.

JOYCE, D. A. Microbiological aspects of aseptic processing and packaging. In: WHILLHOFT, E. M. A. **Aseptic Processing and Packaging of Particulate Foods**. First edition. London: Chapman & Hall, 1993. Chap.8, p.160-164.

KOMOROWSKI, E. S.; EARLY, R. Liquid milk and cream. In: EARLY, R. **The Technology of Dairy Products**. 1<sup>st</sup> ed. New York: VCH Publishers, Inc, 1992. Chap.1. p. 10-15.

KUAYE, A.Y.; LEITÃO, M. F. F. “TP-187 Limpeza e Sanitização”. Apostila da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Campinas, 1998, paginação irregular.

KUBERSKI, T.; ROBERTS, A.; LINEHAN, B.; BRYDEN, R. N.; TEBURAE, M. Coconut water as a rehydration fluid. **New Zealand Medical Journal**, n.8, p. 98-100, August, 1979.

LEAPER, S. Synergistic killing of spores of *Bacillus subtilis* by peracetic acid and alcohol. **Journal of Food Technology**. v. 19, p. 355-360, 1984a.

LEAPER, S. Comparison of the resistance to hydrogen peroxide of wet and dry spores of *Bacillus subtilis* SA22. **Journal of Food Technology**. v. 19, p. 695-702, 1984b.

LEAPER, S. Influence of temperature on the synergistic sporicidal effect of peracetic acid plus hydrogen peroxide on *Bacillus subtilis* (NCA 72-52). **Food Microbiology**, v.1, p. 199-203, 1984c.

LEBER, A. S. M. L. Avaliação da estabilidade de água de coco (*Cocos nucifera*) em garrafas de polietileno tereftalato (PET) entocadas congelada e refrigerada. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Campinas, 2001. 151p. Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

LEBER, A. S. L.; FARIA, J. A. F. Alterações microbiológicas em água de coco acondicionada em garrafas plásticas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, n., 119, Abr., p. 55-58, 2004.

LEITE, C. C.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; SANT'ANNA, M E. B.; SANTANA, I. R. R. Avaliação microbiológica da água de coco produzida e comercializada na cidade de Salvador – BA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 70, n. 14, p. 64-66.

LU, A. T.; WHITAKER, J. L. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 1173-1178, 1974.

MACIEL, M.I.; OLIVEIRA, S.L.; da SILVA, I.P. Effects of different storage conditions on preservation of coconut (*Cocos nucifera*) water. **Journal of Food Process and Preservation**, n.16, p. 13-22, 1992.

MALPELLI, D., FARIA, J. A. F. **Avaliação da qualidade de água de coco industrializada por pasteurização e enchimento a quente.** In: XI Congresso interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2003, Campinas.

MANTENA, S.K.; JAGADISH; BADDURI, S.R.; SIRIPURAPU, K.B.; UNNIKRISHNAN, M.K. *In vitro* evaluation of antioxidant properties of *Cocos nucifera* Linn. water. **Nahrung/Food**, v. 47, n. 2, p. 126-131, 2003.

MASSAGUER, P. R. **Apostila** de aula da disciplina TA 903 – Termobacteriologia. Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas, 2002.

MAYER A. M.; HAREL, E. Phenoloxidasas and their significance in fruit and vegetables. IN: FOX, P. F. **Food Enzymology**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. v. 1, Chap 9, p. 373-398.

McLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. Purification and heat stability of brussels sprout peroxidase isoenzymes. **Food Chemistry**, v. 23, p.305-319, 1987.

McLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. The effect of heat on cabbage and brussels sprout peroxidase enzymes. **Food Chemistry**, v. 7, p. 257-266, 1981.

MEDINA, J.C.; GARCIA, J.L.M.; DE MARTIN, Z.J.; KATO, K.; TERUO, P.; TURATTI, J.M.; SANTOS, L.C.; SILVA, M.T.C.; CANTO, W.L.; BICUDO NETO, L.C.; MORETTI, V.A. **Coco** – da cultura ao processamento e comercialização. Série Frutas Tropicais – 5, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas, Governo do Estado de São Paulo, 285p., 1980.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1988.

MENDONÇA, S. C.; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Bol. SBCTA**, v. 37, n. 2, p. 113-118, 2003.

MINOLTA. Precise color communication. **Manual**. Minolta Co., Ltd. Osaka, 1994. 49p.

MOIA, E. O guia ISPE e a sala limpa farmacêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São José dos Campos, n.4, p. 18-27, set./out. 2001.

NAGY, S.; RANDALL, V. Use of furfural as an index of storage temperature abuse in commercially processed orange juice. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, p. 272 - 280, 1973.

NAVEH, D.; MIZRAHI, S.; KOPELMAN, I. J. Kinetics of peroxidase deactivation in blanching of corn on the cob. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 967-970, 1982.

NEBESKY, E. A.; ESSELEN, W. B.; KAPLAN, A. M.; FELLERS, C. R. Thermal destruction and stability of peroxidase in acid foods, **Food Research**, n. 15, p.114, 1950.

NICOLÓSI, M. Sistema de ar comprimido inadequado pode contaminar ambientes industriais. **Controle de Contaminação**, n. 50, p. 12-15, 2003.

NIELSEN, S.S.; MARCY, J. E.; SADLER, G. D. Chemistry of aseptically processed foods. In: Chambers, J. V.; Nelson, P. E (Eds.). **Principles of aseptic processing and packaging**. Chap. 5. Washington: The Food Processors Institute., 1993. 257p.

NOTÍCIAS, 2000. **Reaproveitamento da casca de coco**. <http://www.responsabilidadesocial.com/noticias.asp?id=11>. 20 jan. 2004.

NORRIS, M. B.; NOBLE, A. C.; PANGBORN, R. M. Human saliva and taste responses to acids varying in anions, titrable acidity, and pH. **Physiology & Behavior**, v. 32, p. 237-244, 1984.

NUNES, M. U. C. Fibra e pó de casca de coco: produtos de grande importância para indústria e a agricultura. IN: ARAGÃO, W. M. **COCO - Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. Cap. 9, p. 66-71.

OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M. Embalagens assépticas. In: Centro de Tecnologia de Embalagem de Alimentos/Instituto de Tecnologia de Alimentos. **Novas Tecnologias de Acondicionamento de Alimentos**. Campinas: ITAL/SBCTA, Cap 6, p. 141-162, 1988.

OLIVEIRA, R. Coco muda a paisagem do interior. **Folha de São Paulo – Agrofolha**. 18/01/2000. p. 6.1. [http://www.agr.feis.unesp.br/coco\\_sp.htm](http://www.agr.feis.unesp.br/coco_sp.htm). 20 jan. 2004.

PETRUS, R. R. **Desenvolvimento de processo e avaliação de estabilidade de bebida isotônica acondicionada em garrafa plástica asséptica**. Campinas, 2000. 122p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PETRUS, R. R.; FARIA, J. A. F. Sistema de embalagem para bebidas isotônicas. **Revista Engarrafador Moderno**. Agosto, 2000. p. 40-41.

PETRUS, R. R.; CORRÊA NETO, R. S.; FARIA, J. A. F.; GÂNDARA, A. L. N. Sanificação química de garrafas plásticas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n.80/81, p. 80-90, jan./fev., 2001.

PETRUS, R.R.; FARIA, J. A. F. A importância da aplicação da tecnologia de salas limpas na indústria de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 37, n.1, p. 48-51, jan./jun., 2003.

PETRUS, R. R.; FARIA, J. A. F.; DELBEN, L. A. S. Avaliação de conformidade das condições operacionais de uma área limpa para envase asséptico. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 112, p. 22-30, set., 2003.

PETTERSSON, B.; LEMBKE, F.; HAMMER, P.; STACKEBRANDT, E.; PRIEST, F. P. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. **International Journal of Bacteriology**, p. 759-764, jul., 1996.

PFLUG, I.J.; ODLAUG, T.E. A review of z and F values used to ensure the safety of low-acid canned food. **Food Technology**. v. 5, p. 63-70, 1978.

PFLUG, I.J.; ODLAUG, T.E; CHRISTENSEN, R. Computing a minimum public health sterilizing value for food with pH values from 4,6 to 6,0. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 10, p. 848 – 850, sep., 1985.

PFLUG, I.J. Endpoint of a preservation process. **Journal of Food Protection**, vol. 50, n. 4, p. 347-351, june, 1987a.

PFLUG, I. J. Factors important in determining the heat process value,  $F_T$ , for low-acid canned foods. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 6, p. 528-533, june, 1987b.

PONTING, J.D.; JOSLYN, M.A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. **Arch. Biochem.** n. 19, p. 47-63, 1948.

PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F.; FERREIRA, M. L.; BRUNO, L. M.; BORGES, M. F. Adição de dióxido de enxofre à água de coco: avaliação do seu

efeito sobre o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 125, p. 44-47.

PRÉSTAMO, G.; MANZANO, P. Peroxidases of selected fruits and vegetables and the possible use of ascorbic acid as an antioxidant. **HortScience**, v. 28, n. 1, p. 48-50, 1993.

QUAST, D. G. Cálculo da intensidade de esterilização e de cozimento de alimentos. **Instruções Técnicas** – N° 10. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 1976. 59 p.

RAMMERT, M. Aseptis cold fill: experiences and developments. **Industrie delle Bevande**, v. 25, n. 142, p. 123-128, april., 1996.

RANIERI, M. Água de coco: um mercado em crescimento. **Engarrafador Moderno**, n. 74, p. 24-28, abr., 2000.

REUTER, H. Processes for packaging materials sterilization and system requirements. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1<sup>st</sup> ed. Hamburg: Technomic, 1988. Chap. 5, p155-165.

RIPARDO, S. Brasil importa mais do que exporta. **Folha de São Paulo – Agrofolha**. 18/01/2000. p. 6.3. [http://www.agr.feis.unesp.br/coco\\_sp.htm](http://www.agr.feis.unesp.br/coco_sp.htm). 20 jan. 2004.

RIPARDO, S. **Consumo brasileiro de água de coco em caixa se iguala ao do uísque**. Folha Online. 11/03/2004. <http://cf.bol.com.br/simpleRedirect.html?srv=clip&trg=http%3A%2F%2Fnoticias.bol.com.br%2Feconomia%2F2004%2F03%2F11%2Fult91u81792.jhtm>. 20 jan. 2004.

ROBINSON, D. S. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. IN: FOX, P. F. **Food Enzymology**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. vol. 1, Chap 9, p. 399-426.

ROLAND, N. (Serac). Aseptic packaging system for PET bottles. **Fruit Processing**, v.9, p. 367-371, 1996.

ROMANO, M.A.; FARIA, J.A.F. Influência do design de garrafas PET para óleos sobre a colapsagem. **Óleos e Grãos**, São Paulo, v.31, n.8, p. 26-29, 1996.

ROMANO, M.A.; FARIA, J.A.F.; ANJOS, C.A. Sistemas assépticos para alimentos em embalagens plásticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.32, n.2, p. 180-188, 1998.

ROSA, M. F.; ABREU, F.A.P. **ÁGUA-DE-COCO – Métodos de conservação**. Documentos nº 37. Fortaleza: Embrapa-CNPAT/SEBRAE/CE, 2000. 40p.

ROSA, M. F.; ABREU, F.A.P. Processos convencionais de conservação de água-de-coco. IN: ARAGÃO, W. M. COCO - **Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. Cap. 6, p. 42-53.

SAGRIPANTI, J.L.; BONIFACINO, A. Comparative sporocidal Effects of liquid chemical agents. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 545-551, feb., 1996.

SAPERS, G. M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. **Food Technology**, p. 75-84, oct., 1993.

SARANTOPÓULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis - Principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

SATO, H. H. Professora Doutora do Departamento de Ciência dos Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp. **Comunicação pessoal**. Campinas, Jan/Fev. 2004.

SCHMIDT, F. L.; CASTRO, M. F. P. M.; GUMERATO, H. F.; LEITÃO, M. F. F. Boas práticas de fabricação e aplicação da análise de perigos e pontos críticos de controle no processamento de água de coco. **Revista Higiene Alimentar**, vol. 18, n.121, p. 65-76, jun., 2004.

SILVA, M.A.P. **Análise Sensorial**. Apostila da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Campinas, 2001, paginação irregular.

SILVA, M. F. V. **Efeitos dos diferentes tratamentos e embalagens nas características da polpa de acerola e na determinação dos teores de ácido ascórbico e das antocianinas durante o armazenamento**. Campinas, 1999. 224p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. Campinas: Editora Varela, 2001. 317p.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; NORRILL, T. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Traduzido por ALENCASTRO, R. B. e FARIA, R. B. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 203-224, 1987. Tradução de: Spectrometric identification of organic compounds.

SIQUEIRA, E. R.; RIBEIRO, F. E.; ARAGÃO, W. M. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). **Cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa- SPI, 1994. p.87-120.

SOCÔCO S/A Indústrias Alimentícias (1997). [www.sococo.com.br](http://www.sococo.com.br). 25 fev. 2002.

SREBERNISH, S.M. **Caracterização física e química da água de fruto de coco (*Cocos nucifera*), variedades gigante e híbrido PB-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco.** Campinas,1998. 189p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

STONE, H; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices.** Orlando: Ed. Academic Press, 1985, 287p.

SUTTON, S.V.W. Neutralizer evaluations as control experiments for antimicrobial efficacy tests. In: ASCENZI, J.M.(Ed) **Handbook of disinfectants and antiseptics.** New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. Chap. 3, p.43-64.

SVENSSON, S. Inactivation of enzymes during thermal processing. IN: HOYEN, T.; KYALE, O. **Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing.** London: Aplied Science Publisher, 1977. Chap. 12, p. 203-217.

SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A.; FRANK, J. F. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 3<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Chap.3. p.51-62.

TADINI, C.C.; MURASAKI, N.C. Inativação da peroxidase e da polifenoloxidase no processo térmico descontínuo da água de coco verde (*Cocos nucifera* L.). In: 10<sup>o</sup> SIICUSP, 2002, São Carlos, **Anais** do 10<sup>o</sup> SIICUSP, v.1, p. 2438-2438, 2002.

TAVARES, M.; CAMPOS, N.C.; NAGATO, L.A.F.; LAMARDO, L.C.A.; INIMATA, E.L.; CARVALHO, M.F.H. Estudo da composição química da água-de-coco-anão-verde em diferentes estágios de maturação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1988, Rio de Janeiro, **Anais...**, Rio de Janeiro: SBCTA, 1988, v.2, p. 1262-1265.

TETRA PAK. [www.tetrapak.com](http://www.tetrapak.com). 25, jan., 2005.

TEIXEIRA, E.A.M. **Contribuição à industrialização do coco (*Cocos nucifera*), leite de coco e coco ralado**. Fortaleza, 1986. 188p. Tese (Mestrado), Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará.

TOLEDO, R. T. Chemical sterilants for aseptic packaging. **Food Technology**. p.102-112, mai.,1975.

TOLEDO, R.T. Postprocessing changes in aseptically packed beverages. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 405-408, 1986.

TROLLER, J.A. **Sanitation in food processing**. 2<sup>nd</sup> ed. Orlando: Academic Press, 1993.

TURTLE, B.I. Packaging materials - their properties and criteria of selection. In: WILLHOFT, E.M.A. **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1993. Chap.3, p.39-73.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 49-126, 1981.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. **Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables** – A review of principles and practice. IN: LEE, C. Y.; WHITAKER, J. R. **Enzymatic browning and its prevention**. Washington: American Chemical Society, 1995. Chap. 4, p. 49-62.

VON BOCKELMANN, B. Quality control of aseptically Packaged Food Products. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1<sup>st</sup> ed. Hamburg: Technomic, 1988. Chap.6.1, p.237-243.

VON BOCKELMANN, B. Aseptic packaging. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**, Philadelphia: Lea Febiger, 1991. Chap.48, p. 833-845.

WALKER, J. R. L. Enzymatic browning in fruits – Its biochemistry and control. IN: LEE, C. Y.; WHITAKER, J. R. **Enzymatic browning and its prevention**. Washington: American Chemical Society, 1995. Chap. 2, p. 9-22.

WAKELING, I.N.; MacFIE, H.J.H. Designing consumer trials balanced for first and higher orders of carry-over effect when only a subset of k samples from t may be tested. **Food Quality and Preference**, v. 6, n. 4, p. 299-308, 1995.

WILLOFT, E.M.A. The market for aseptic products, processing and packaging systems. In: WILLHOFT, E.M.A. **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1993. Chap.2, p.23-38.

WOSIACKI, G.; DEMIATE, J.M.; MELLO, F. Nata de coco – O estado da arte. **Boletim da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, SBCTA, v. 30, n.2, p.142-155, 1996.

YAMAMOTO, H. Y.; STEINBERG, M. P.; NELSON, A. I. Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. **Journal of Food Science**, v. 27, n. 2, p. 113-119, 1962.

ANEXO - ETAPAS DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO DE EMBALAGENS

