**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Cinética da redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por
ozonização em reator RPA/CSTR para produção *sulfur-free* de açúcar
branco**

Nathália Torres Corrêa

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2016**

Nathália Torres Corrêa
Tecnóloga em Biocombustíveis

**Cinética da redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização
em reator RPA/CSTR para produção *sulfur-free* de açúcar branco**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CLAUDIO LIMA DE AGUIAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Corrêa, Nathália Torres

Cinética da redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização em reator RPA/CSTR para produção *sulfur-free* de açúcar branco / Nathália Torres Corrêa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
100 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ozônio 2. Cor 3. Enxofre 4. POA 5. Agente antimicrobiano I. Título

CDD 664.122
C824c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico este trabalho aos meus pais

Mario e Aparecida, ao meu marido

Lucas e meu irmão André

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por todas as oportunidades e graças concedidas.

Aos meus pais Mario e Aparecida por todo amor e dedicação, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e por serem meu exemplo de vida.

Ao meu marido Lucas, o amor da minha vida, pela extrema paciência, otimismo, companheirismo, dedicação e suporte.

Aos meus familiares, os Torres, os Corrêa e a minha nova família Romanzini Magri.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Lima de Aguiar pelas oportunidades ao longo desses anos, pela confiança em meu trabalho e pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista pelo apoio e ensinamentos.

A Juliana Sartori e Juliana Lorenz, pela ajuda no desenvolvimento deste e de muitos outros trabalhos, mas principalmente pela amizade que construímos.

A todos os amigos e colegas de laboratório do Grupo de Pesquisa Hugot-Bioenergia, os quais tive o privilégio de conhecer e trabalhar, em especial à Jéssica Jambassi e Felipe Ogando pela imensa colaboração e disponibilidade nas análises e a Roberta Bergamin pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos técnicos do laboratório, Pedrinho, Sylvino e Rose.

Ao Prof. Dr. Marcos Eberlin e seus alunos, do Laboratório Thomson – Instituto de Química/UNICAMP, pela oportunidade para realização das análises de espectrometria de massas.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pelas oportunidades.

Aos apoios financeiros concedidos pelo processo nº 2014/03295-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pela CAPES.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*"Porvezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota." (Madre Teresa de Calcutá)*

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Cana-de-açúcar	21
2.1.1 Principais componentes do caldo de cana-de-açúcar	23
2.2 Sacarose e açúcares redutores (AR)	24
2.3 Não-açúcares	25
2.4 Produção de açúcar	26
2.4.1 Clarificação.....	28
2.5 Uso de sulfito nos alimentos	31
2.6 Processos oxidativos avançados (POA)	33
2.7 Ozônio.....	34
2.7.1 Uso do ozônio na indústria de alimentos e na indústria sucroalcooleira	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Material vegetal: cana-de-açúcar e preparo do caldo	37
3.2 Geração e quantificação por análise titulométrica de ozônio (O ₃).....	37
3.3 Tratamentos reacionais por ozonização.....	40
3.3.1 Planejamento composto central e otimização dos parâmetros da redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização.....	40
3.3.2 Estudo do perfil cinético de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização..	41
3.4 Métodos analíticos	42
3.4.1 Métodos analíticos para as análises de planejamento e otimização dos parâmetros de redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização.	42
3.4.2 Métodos analíticos para as amostras obtidas pelo estudo do perfil cinético de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização.....	45
3.4.3 Métodos analíticos para as amostras obtidas pelo planejamento e otimização e pelo estudo cinético dos parâmetros tecnológicos caldo de cana-de-açúcar por ozonização.	47

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Dosagem de ozônio no reator	51
4.2 Resultados das análises realizadas para o planejamento e otimização dos parâmetros da redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização	52
4.2.1 Cor ICUMSA de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros	52
4.2.2 Turbidez de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros	54
4.2.3 Teores de açúcar de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros	57
4.2.4 Acidez total titulável de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros	60
4.2.5 Espectrometria de massas de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros	63
4.3 Resultados das análises realizadas para o perfil cinético de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização	66
4.3.1 Cor ICUMSA de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização em cinética química	66
4.3.2 Teores de açúcar de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização em cinética química	69
4.3.3 Análises microbiológicas de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização em cinética química	72
4.3.4 Redes Neuras Artificiais (RNA)	75
5 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE	93

RESUMO

Cinética da redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização em reator RPA/CSTR para produção *sulfur-free* de açúcar branco

A clarificação do caldo de cana-de-açúcar consiste em uma das etapas mais importantes dentro de todo o processo de produção de açúcar, isso porque, é a cor do açúcar final que determina seu preço de comercialização no mercado, bem como sua qualidade. Porém, além de ter um processo de redução de cor, que ao final apresente um açúcar de qualidade, é necessário que este processo não gere resíduos, nem para o meio ambiente, nem nenhum resíduos tóxicos que esteja presente no produto final e que venha prejudicar a saúde do consumidor. Desta forma, a busca por processos alternativos à sulfitação - que é a atual operação de clarificação do caldo de cana-de-açúcar na produção de açúcar cristal branco - tornou-se mais frequente. Tais processos são conhecidos como processos oxidativos avançados (POA) e, entre eles está o uso de ozônio. Diante deste cenário avaliaram-se as melhores condições de pH, temperatura e dosagem de ozônio para a redução da cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar, obtendo como condições ótimas para pH entre 1,64 a 5,0, temperaturas de 50 a 70 °C e dosagens de ozônio entre 1,34 mg O₃/min a 3,82 mg O₃/min. O estudo cinético da redução da cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar ozonizado permitiu observar maiores reduções de cor ICUMSA após 60 min de reação, contudo a exposição do caldo a longos períodos, em pH baixos (1,64 e 3,0) associados a altas temperaturas (50 e 70 °C) levou a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, o que inviabilizaria o processo. As análises por espectrometria de massas permitiram observar que a redução nos teores de cor ICUMSA das amostras de caldo de cana-de-açúcar ozonizadas não está associada à eliminação das partículas promotoras de cor, mas sim da precipitação destas partículas, uma vez que não foram identificados novos compostos nas amostras analisadas, mas sim uma variação nas concentrações destes compostos, identificados como lipídios. Além de favorecer a redução da cor ICUMSA do caldo, o ozônio também se apresentou como um agente antimicrobiano, reduzindo a presença de bactérias e fungos nas amostras de caldo tratado. A análise em redes neurais artificiais (RNA) mostrou um bom ajuste na maioria dos casos apresentados e indicou que a variável Brix%caldo apresentou maior influência na redução da cor ICUMSA e o tempo a variável que apresentou a menor influência.

Palavras-chave: Ozônio; Cor; Enxofre; POA; Agente antimicrobiano

ABSTRACT

Kinetics ICUMSA color reduction in juice sugarcane by ozonation reactor in RPA/CSTR to produce sulfur-free white sugar

Clarification of the sugarcane juice is one of the most important steps within the entire sugar production process, so why is the color of the final sugar that determines its trading price in the market as well as its quality. However, besides having a color reduction process, which ultimately makes a quality sugar, it is necessary that this process does not generate waste or to the environment, and no toxic residues are present in the final product and that may harm consumer health. Thus, the search for alternative processes to sulfite - which is the current operating clarification of sugarcane juice in white crystal sugar production - has become more frequent. Such processes are known as advanced oxidation processes (AOP), and among them is the use of ozone. In this scenario evaluated the best conditions of pH, temperature and ozone dosing for reducing ICUMSA color of sugarcane juice, optimal conditions for obtaining such pH between 1.64 to 5.0, temperatures from 50 at 70 °C and ozone O₃ dosages between 1.34 mg/min to 3.82 mg O₃/min. The kinetic study of the reduction of ICUMSA color of sugarcane juice ozonized allowed to observe greater reductions ICUMSA color after 60 min of reaction, however the exposure of the juice long periods at low pH (1.64 and 3.0) associated with high temperatures (50 to 70 °C) led to hydrolysis of sucrose to glucose and fructose, which would make the process. Analysis by mass spectrometry allowed to observe that the reduction in ICUMSA color content of sugarcane ozonatedjuice samples not associated with the elimination of promoting particles color, but the precipitation of these particles, since they were not novel compounds identified in the samples, but a variation in concentration of these compounds, identified as lipids. In addition to further reduce the ICUMSA color of juice, ozone is also presented as an antimicrobial agent, reducing the presence of bacteria and fungi on the treated juice samples. The analysis on artificial neural networks (ANN) showed good fit in most cases presented and indicated that the variableBrix%juice showed greater influence in reducing ICUMSA color and time the variable that had the least influence.

Keywords: Ozone; Color; Sulfur; AOP; Antimicrobial agent

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista integral da planta de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.) e detalhe da soqueira	22
Figura 2 - Estruturas químicas dos açúcares encontrados em cana-de-açúcar: (A) molécula de sacarose; (B) molécula de frutose; (C) molécula de glicose (Fonte: SEAD/UFSCAR,2011).....	25
Figura 3 - Estruturas químicas de alguns pigmentos encontrados em cana-de-açúcar: (A) Clorofila; (B) Estrutura básica do fenol; (C) Antocianinas (Fonte: SARTORI, 2014)	26
Figura 4 - Fluxograma geral da produção de açúcar cristal branco, destacando as etapas, produtos e resíduos do processo (Fonte: Modificado SARTORI, 2014).....	28
Figura 5 - Forno de queima do enxofre (Arquivo pessoal - R.B. Lima)	30
Figura 6 - Estrutura química do ozônio. (A) estrutura planar; (B) estrutura espacial.	34
Figura 7 - Aparelho de geração de ozônio (Azcozon Mod. HTU 500AC).....	37
Figura 8 - Montagem de equipamento para geração e titulação de ozônio.....	39
Figura 9 - Soluções de iodeto de potássio (KI) após 5 minutos de borbulhamento com ozônio (O_3), sendo o frasco A diretamente ligado ao reator de O_3 e o frasco B ligado ao frasco A para absorção de teores mínimos de O_3 não absorvidos	39
Figura 10 - Estrutura do reator de aço inoxidável usado para o estudo cinético dos parâmetros tecnológicos em caldo de cana-de-açúcar, sendo: (A) parte interna do reator; (B) a estrutura montada da parte interna com o copo de aço inoxidável AISI 316.	42
Figura 11 – Representação gráfica do conjunto amostra e matriz: antes da irradiação a laser (A) e após a irradiação a laser (B) (Fonte: SHIMADZU, 2015).....	44
Figura 12 - Curva de calibração das doses de ozônio para cada posição do ozonizador.....	51
Figura 13 - Unidade geradora de ozônio (Azcozon Mod. HTU 500AC).....	51
Figura 14 - Superfície de resposta para a interação das variáveis: (A) pH e dosagem de ozônio ($mg\ O_3/min$); (B) temperatura ($^{\circ}C$) dosagem de ozônio ($mg\ O_3/min$); (C) temperatura ($^{\circ}C$) e pH para obtenção dos valores de redução de cor ICUMSA (UI) do caldo de cana-de-açúcar através da otimização do processo de ozonização do caldo	53
Figura 15 - Superfície de resposta para a interação das variáveis: (A) pH e dosagem de ozônio ($mg\ O_3/min$); (B) temperatura ($^{\circ}C$) dosagem de ozônio ($mg\ O_3/min$); (C)	

temperatura (°C) e pH para obtenção dos valores de turbidez (NTU) do caldo de cana-de-açúcar através da otimização do processo de ozonização do caldo 56

Figura 16 - Valores de sacarose ($\mu\text{g/mL}$), glicose ($\mu\text{g/mL}$) e frutose ($\mu\text{g/mL}$) para os tratamentos de otimização do uso de ozônio para redução da cor do caldo 58

Figura 17 - Superfície de resposta para a interação das variáveis: (A) pH e dosagem de ozônio ($\text{mg O}_3/\text{min}$); (B) temperatura (°C) dosagem de ozônio ($\text{mg O}_3/\text{min}$); (C) temperatura (°C) e pH para obtenção dos valores de glicose e frutose ($\mu\text{g/mL}$) (açúcares redutores) do caldo de cana-de-açúcar através da otimização do processo de ozonização do caldo 59

Figura 18 - Valores de pH inicial e final para as 17 amostras obtidas através da otimização dos parâmetros para redução da cor do caldo de cana-de-açúcar por ozonização..... 61

Figura 19 - Superfície de resposta para a interação das variáveis: (A) pH e dosagem de ozônio ($\text{mg O}_3/\text{min}$); (B) temperatura (°C) dosagem de ozônio ($\text{mg O}_3/\text{min}$); (C) temperatura (°C) e pH para obtenção dos valores de acidez total titulável (mg/mL) do caldo de cana-de-açúcar através da otimização do processo de ozonização do caldo 62

Figura 20 - Espectros de massas obtidos por MALDI-TOF/MS referentes ao caldo de cana-de-açúcar submetido à ozonização em diferentes doses, pH e temperaturas. 65

Figura 21 - Perfil cinéticos dos valores de cor ICUMSA obtidos após 240 min. nos 17 tratamentos de ozonização do caldo de cana-de-açúcar com diferentes valores de temperatura (°C), pH e dose de ozônio ($\text{mg O}_3/\text{min}$) 69

Figura 22 - Perfil cinéticos dos valores de sacarose, glicose e frutose obtidos após 240 min nos 17 tratamentos de ozonização do caldo de cana-de-açúcar com diferentes valores de temperatura (°C), pH e dose de ozônio ($\text{mg O}_3/\text{min}$)..... 72

Figura 23 - Representação esquemática da rede neural usada com as variáveis de entrada e saída. (Fonte: Adaptado SARTORI, 2014) 76

Figura 24 - Coeficiente de determinação (R^2) e angular (Coef) em função do número de neurônios ($NH= 4$ a 10 , n° de apresentações = 20000 e $LS/TS= 3$). (A) Dados LS; (B) Dados TS 77

Figura 25 - Valores dos resíduos médios em função dos neurônios ($NH= 4$ a 10 , n° de apresentações = 20000 e $LS/TS= 3$) 77

Figura 26 - Importância das variáveis da rede neural ($NH=9$, n° de apresentações= 20000 e $LS/TS= 3$) 79

Figura 27 - Valores de cor ICUMSA obtidos na simulação e experimentalmente com diferentes dados de entrada 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do caldo de cana-de-açúcar	23
Tabela 2 - Critérios para estabelecimento de padrão microbiológico em açúcares, determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)	31
Tabela 3 - Potencial redox de algumas espécies oxidantes (Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 2004).....	34
Tabela 4 - Valores codificados e reais dos parâmetros do planejamento composto central.	40
Tabela 5 - Análise da variância para redução de cor ICUMSA	54
Tabela 6 - Análise da variância para valores de turbidez.....	57
Tabela 7 - Análise da variância para valores de acidez total titulável	63
Tabela 8 - Relação m/z de íons e tratamentos do caldo de cana-de-açúcar ozonização	64
Tabela 9 - Número de unidade formadora de colônias (UFC) de bactérias mesófilas totais encontradas nos tempos 0 e 240 minutos dos cinco tratamentos com maiores reduções de cor ICUMSA pelo processo de ozonização	73
Tabela 10 - Número de unidade formadora de colônias (UFC) de bolores e leveduras totais encontradas nos tempos 0 e 240 minutos dos cinco tratamentos com maiores reduções de cor ICUMSA pelo processo de ozonização	75
Tabela 11 - Pesos da rede neural ajustada (W1): pesos entre a camada de entrada e a camada oculta. (W2): pesos entre a camada oculta e a camada de saída (NH = 9; 20.000 apresentações).....	78

1 INTRODUÇÃO

Com o objetivo de aumentar a vida de prateleira dos produtos, a indústria de alimentos faz uso de aditivos alimentares, principalmente em alimentos processados. Dentre os aditivos mais utilizados, o sulfito ganha destaque. Os agentes sulfitantes, dentre eles o dióxido de enxofre (SO_2), atuam como agentes inibidores do crescimento de bactérias, bolores e leveduras e de reações de escurecimento, enzimático e não enzimático, durante o período de armazenagem (FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011). Embora, os sulfitos tais como sulfito sódico, metabissulfito sódico, metabissulfito de potássio, bissulfito de cálcio e sulfito ácido de cálcio, sejam amplamente utilizados na indústria de alimentos, inúmeros efeitos adversos à saúde humana têm sido relacionados à sua ingestão, dentre eles, anafilaxia, urticária, hipotensão, náusea, irritação gástrica local, diarreia e crise asmática em indivíduos asmáticos sensíveis a sulfitos (FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011; POPOLIM, 2009).

De acordo com a FoodandDrugAdministration(FDA), uma em cada 100 pessoas é sensível ao consumo de sulfito (PAPAZIAN, 2011). Segundo Popolim (2009) não existe nenhuma obrigatoriedade legal em declarar a quantidade de aditivos presentes nos alimentos, deve-se apenas identificar quais deles estão presentes. Desta forma, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de sulfitos que não pode ser maior que 0,7 mg/kg peso corpóreo (FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011), pode ser facilmente ultrapassada devido ao consumo de vários alimentos que contenham esse aditivo em sua formulação e devido a não especificação das quantidades nos rótulos e embalagens. Na indústria sucroenergética, o uso do sulfito ocorre na etapa de clarificação do caldo de cana-de-açúcar. O enxofre é utilizado como agente branqueador do açúcar e dependendo do tipo de açúcar produzido, os níveis de sulfito presentes no produto final podem variar, ficando ao redor de 10 a 20 ppm (OLIVEIRA; ESQUIAVETO; SILVA JÚNIOR, 2007).

Devido aos possíveis efeitos alergênicos que têm sido associados ao sulfito, há uma busca por novas tecnologias para a sua substituição por produtos menos nocivos ao ambiente e ao consumidor durante o processo de tratamento do caldo de cana-de-açúcar para a produção de açúcar branco.

Os processos oxidativos avançados (POA) são empregados no tratamento de águas há anos e passaram a ser estudados na etapa de clarificação do caldo de

cana-de-açúcar como possível substituto do sulfito. Entre os POA mais utilizados na produção de açúcar branco estão o ozônio (O_3) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

De acordo com Silva et al. (2011), o ozônio é utilizado como um agente germicida contribuindo para eliminar microrganismos, além de aumentar o período de estocagem, assim como o sulfito, porém sem formar subprodutos durante o processamento. Além da eliminação de agentes microbianos, o ozônio pode agir como agente redutor da cor ICUMSA em amostras de caldo de cana-de-açúcar, para a produção de açúcar cristal branco, atuando como alternativa ao processo de sulfitação nas usinas paulistas e/ou brasileiras. Desta forma, avaliou-se o uso do ozônio na etapa de tratamento do caldo de cana-de-açúcar, bem como:

- a) Identificar os fatores que influenciam nas reações de redução da cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar quando submetido à ozonização, utilizando um planejamento composto central, tendo como fatores estudados a dosagem de ozônio ($mg\ O_3/min$), pH e temperatura ($^{\circ}C$);
- b) Determinar o perfil cinético de parâmetros tecnológicos do caldo tratado com adição de ozônio, considerando alterações na cor ICUMSA e concentrações de sacarose, glicose e frutose;
- c) Avaliar os efeitos do uso de ozônio no controle de microrganismos presentes no caldo de cana-de-açúcar, quantificando os microrganismos antes e após o tratamento do caldo de cana-de-açúcar;
- d) Determinar uma rede neural artificial para prever o comportamento da resposta de cor ICUMSA em função dos dados apresentados e qual a variável que apresenta a maior influência, considerando como parâmetros de entrada – tempo de reação (min); características do caldo (sólidos solúveis); doses de ozônio ($mg\ O_3/min$); pH; e temperatura ($^{\circ}C$) – e como parâmetros de saída – cor ICUMSA;
- e) Identificar os perfis de ácidos graxos, presentes nas ceras obtidas pela precipitação das amostras de caldo de cana-de-açúcar ozonizadas, através da espectrometria de massas por MALDI-TOF/MS

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no período colonial, tornando-se umas das principais culturas da economia brasileira, colocando o Brasil em destaque na produção de açúcar e etanol e como produtor de cana-de-açúcar (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015). A cultura da cana-de-açúcar, atualmente apresenta uma grande importância socioeconômica, visto que é utilizada como matéria-prima para a produção de inúmeros produtos e subprodutos. O açúcar e etanol são os principais produtos de interesse do mercado. Além deles, outros produtos de menor destaque podem ser produzidos como a garapa, a aguardente e subprodutos obtidos entre as etapas de produção de açúcar e etanol, como a torta de filtro, vinhaça, melaço e leveduras (BRAZ, 2003). Ponteiros, palha e bagaço obtidos da cana-de-açúcar também podem ser utilizados, por exemplo, para geração de energia elétrica (CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992).

A cana-de-açúcar (Figura 1) é uma planta perene, pertencente à família Poaceae, do gênero *Saccharum* (GODOY; TOLEDO, 1972). Sua propagação é feita através de pedaços de colmos. O colmo é fibroso e compõe a parte cilíndrica e ereta da planta, as folhas saem das bases dos nós, sendo alternadas e de coloração verde. A composição química do colmo, entretanto, é variável, dependendo exclusivamente de diversos fatores como a variedade da cultura; idade fisiológica; condições climáticas durante o desenvolvimento; e maturação, além das propriedades físicas, químicas e microbiológicas encontradas no solo, entre outros fatores (MARQUES; MARQUES; TASSO JÚNIOR, 2001; PARANHOS, 1987).

Figura 1 - Vista integral da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e detalhe da soqueira

Segundo Stupiello (1987), a cana-de-açúcar é uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais devido à grande contribuição socioeconômica que sua exploração representa e por causa de seu alto teor de sacarose. A sacarose fica predominantemente estocada no colmo da cana-de-açúcar, sendo desta forma, o colmo, correspondente à parte de maior interesse industrial. A quantidade de sacarose existente no colmo varia de acordo com a espécie a ser cultivada.

A ponta da cana é entendida como a parte composta por entrenós imaturos, o cartucho contendo o meristema apical e a parte das folhas ainda verdes. Esta região apresenta altos teores de açúcares redutores (glicose e frutose), aminoácidos, amido, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, polissacarídeos totais e baixos teores de sacarose. Com exceção da sacarose, os demais componentes citados têm impacto negativo na fabricação de açúcar e etanol, pois são precursores de cor, dificultando a cristalização da sacarose, inibindo a fermentação alcoólica, entre outros inconvenientes (STUPIELLO, 2000), razão pela qual se faz o desponte da cana-de-açúcar no momento da colheita.

A cana-de-açúcar é composta por aproximadamente 73-76% de água, englobado neste aspecto encontra-se a sacarose correspondendo a 70-91% das substâncias sólidos solúveis (FAVA, 2004). Por ser o principal produto de interesse, mas não o mais importante do ponto de vista do processo, a sacarose e os outros parâmetros devem ser monitorados através de análises como pureza, POL (% mássica de sacarose aparente), açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais

(ART), e tempo entre queima e/ou corte e processamento. Tais fatores influenciam na qualidade dos produtos finais: açúcar cristal e etanol (PARANHOS, 1987). Os outros 11-16% restantes correspondem ao teor de fibra, outra importante característica da cana-de-açúcar. Na região Nordeste, ainda é feita a queima da cana-de-açúcar antes da colheita, devido ao predomínio da colheita manual. Este tipo de colheita ainda acontece nesta região devido à grande quantidade de relevos acidentados, que dificultam o uso de máquinas colhedoras.

2.1.1 Principais componentes do caldo de cana-de-açúcar

O caldo extraído da cana-de-açúcar apresenta uma composição química bastante complexa e diversificada, é um líquido viscoso, espumoso, opaco, com a coloração variando do pardo ao verde escuro e um pH que pode oscilar de 4,7 a 5,6, (ANDRADE; LIMA, 2007; AOKI, 1987; PAYNE, 1989). As características de sua composição estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do caldo de cana-de-açúcar

Constituintes do caldo de cana-de-açúcar	(%) em sólidos solúveis
<u>Açúcares</u>	75-92
Sacarose	70-88
Glicose	2,0-4,0
Frutose	2,0-4,0
<u>Sais</u>	3,0-4,5
Ácidos Orgânicos	1,5-5,5
Ácidos carboxílicos	1,1-3,0
Aminoácidos	0,5-2,5
<u>Outros não-açúcares orgânicos</u>	
Proteínas	0,5-0,6
Amido	0,001-0,100
Gomas	0,30-0,60
Ceras, gorduras, fosfolipídios	0,05-0,15

Fonte: Modificado de Chen; Chou, 1993

Existem inúmeros fatores que podem alterar as características do perfil do caldo de cana-de-açúcar, entre eles, Souza (1988) cita a variedade de cana cultivada; o grau de maturidade; condições do tipo do solo, clima e adubação da região de plantio; e tempo entre a colheita e o processamento da cana. Ainda que a quantidade de sacarose presente no caldo seja um dos parâmetros mais importante,

a qualidade da cana-de-açúcar não pode ser mensurada apenas com base neste fator, mas sim por todos os fatores citados anteriormente (PARANHOS, 1987).

2.2 Sacarose e açúcares redutores (AR)

A sacarose (Figura 2a), um dissacarídeo, composto por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, é o componente de maior interesse obtido a partir do processamento da cana-de-açúcar. Segundo Mantelatto (2005) a molécula de sacarose é muito susceptível a algumas reações, como as de degradação por influência de temperaturas ou de pH ácido ou básico, ou até mesmo a combinação de temperatura e pH e a presença de enzimas ou de microrganismo. Em meio ácido a molécula de sacarose sofre inversão transformando-se em glicose e frutose (açúcares redutores) (CHEN; CHOU, 1993) e em meio alcalino sob condições de aquecimento, pode haver a formação de furfural, acetona, gliceraldeídos, ácidos lácticos, acéticos, fórmicos e dióxido de carbono, entre outras substâncias (EDYE; CLARKE, 1995). Quando submetidas a temperaturas elevadas, maiores que 140°C, as moléculas de sacarose desencadeiam uma série de reações químicas, dando origem a polímeros de coloração escura, chamados caramelos (FENNEMA, 1996). A composição desses polímeros varia de acordo com o tempo, temperatura e pH ao qual a sacarose foi submetida e que ocasionou a reação (HAMERSKI, 2009).

As moléculas de frutose e glicose (Figuras 2b e 2c, respectivamente), conhecidas como açúcares redutores, são monossacarídeos. Estão naturalmente presentes na composição do caldo de cana-de-açúcar, mas podem ser gerados a partir da degradação das moléculas de sacarose. Os produtos gerados a partir de suas decomposições ocasionam na formação de compostos altamente coloridos que podem interferir negativamente na morfologia da molécula de sacarose (DELGADO; CESAR, 1977; HONIG, 1953).

Figura 2 - Estruturas químicas dos açúcares encontrados em cana-de-açúcar: (A) molécula desacarose; (B) molécula de frutose; (C) molécula de glicose (Fonte: SEAD/UFSCAR,2011)

2.3 Não-açúcares

Além dos açúcares já citados anteriormente (sacarose, glicose e frutose) existem ainda outros componentes presentes no caldo de cana-de-açúcar, considerados não-açúcares que podem exercer grande influência durante o processamento da cana-de-açúcar para a produção do açúcar, ocasionando o escurecimento do caldo (SPENCER; MEADE, 1967). Além desses compostos já presentes no caldo, existem ainda pigmentos presentes no colmo, ponteiros e nas folhas da cana-de-açúcar, que uma vez que entram no processo podem promover um aumento na coloração do açúcar (SARTORI, 2014). Das substâncias já conhecidas, podem-se destacar as clorofilas, que são pigmentos verdes, encontrados em folhas e caules da planta de cana-de-açúcar e de fácil degradação; as antocianinas, que são pertencentes ao grupo dos flavonóides, de pigmentação avermelhada e altamente instáveis quando submetidas a elevadas temperaturas; as sacaretinas, que são encontradas na fibra e na casca, solúvel em pH alcalino e ácido; e os polifenóis ou compostos fenólicos que são compostos que tendem a escurecer na presença de um pH alcalino, além de serem facilmente oxidados (Figura 3) (ARAÚJO, 2007; GODSHALL; GRIMM, 1994; HARBORNE, 1984; PATON, 1992).

Figura 3 - Estruturas químicas de alguns pigmentos encontrados em cana-de-açúcar: (A) Clorofila; (B) Estrutura básica do fenol; (C) Antocianinas (Fonte: SARTORI, 2014)

Os pigmentos responsáveis pelo escurecimento do caldo podem ainda, ser produzidos durante os processos de tratamento da clarificação do caldo de cana-de-açúcar. As melanoidinas são compostos formados a partir da reação não enzimática que acontece entre açúcares redutores e aminoácidos, a reação é conhecida por reação de Maillard e foi relatada pela primeira vez em 1912 pelo francês Louis Camille Maillard, tal reação não enzimática envolve fatores como o pH, temperatura e umidade do meio, além da presença de açúcares (ARAÚJO, 2007; ESKIN; HENDERSON; TOWNSEND, 1971). Chandra, Bharagava, Rai(2008) relataram que as melanoidinas podem ser descoradas na presença de espécies de oxigênio ativo produzidas por reações catalisadas por enzimas oxidativas, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

2.4 Produção de açúcar

O açúcar produzido no Brasil é destinado para consumo no mercado doméstico e para exportação, apesar de enfrentar barreiras na Europa e nos Estados Unidos devido às restrições a produtos que contenham sulfito em sua formulação. O mercado interno do açúcar é dividido em duas vertentes, o mercado doméstico, onde prevalece o consumo de açúcar cristal e refinado e o mercado industrial, no qual prevalecem os açúcares VHP e líquido. Os principais usos do açúcar são para as indústrias de alimentos e bebidas. A partir do tratamento industrial do caldo extraído da cana-de-açúcar podem ser produzidos diferentes tipos de açúcar (SANTOS, 2008).

Segundo dados apresentados por um informativo de dezembro de 2015 da CONAB, o Brasil deverá produzir 658,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar nesta safra (2015/16). A estimativa é que a produção do país tenha um incremento de 3,8% em relação à safra passada. A produção de açúcar na safra 2014/15 chegou a 35,56 milhões de toneladas. Para a safra 2015/16 a expectativa é de redução de 2,7%, chegando a 34,61 milhões de toneladas. Segundo Fernandes et al. (2004), o açúcar proveniente da cana-de-açúcar está entre os produtos mais consumidos pela população mundial e a indústria açucareira tende a crescer continuamente, não só em porte, mas também em qualidade. A Figura 4 apresenta as etapas de produção desde a extração do caldo de cana-de-açúcar até a obtenção do açúcar final e os resíduos formados em cada etapa.

Uma vez que a cana-de-açúcar é colhida e entregue a usina, ela tem seu peso aferido e uma amostragem do caminhão é coletada para as análises preliminares, que permitem fazer o pagamento da cana-de-açúcar através do teor de sacarose nela contido. Em seguida, a cana-de-açúcar segue para as etapas de limpeza, através da lavagem com água ou de secadores, seguindo-se para o preparo, sendo desintegrada através de um jogo de facas e desintegradores com o objetivo de facilitar a extração do caldo contido nas células da cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar desintegrada passa então pela extração, que é feita através de moendas e/ou difusores, obtendo como produto o caldo de cana-de-açúcar e como resíduo o bagaço, que pode ser utilizado para geração de vapor através da queima em caldeiras e consequente geração de energia.

O caldo extraído, denominado caldo misto, segue então para a etapa de purificação, através da peneiragem, seguido da sulfitação e da clarificação, de forma a remover as impurezas presente no caldo. De acordo com o tipo de açúcar a ser produzido, o processo de purificação, pode ou não conter a etapa de sulfitação.

Para a produção de açúcar VHP (Very High Polarization), utiliza-se como processo de purificação a caleagem simples ou defecação, através do uso leite de cal para purificação do caldo misto. Contudo, se a intenção for produzir o açúcar cristal branco, a clarificação do caldo misto é realizada pelo processo de sulfo-defecação, no qual o caldo é submetido primeiramente ao processo de sulfitação e depois à caleagem. A etapa de aquecimento e decantação do caldo de cana-de-açúcar, subsequentes a etapa de purificação, geram como resíduo, através da filtragem do lodo da decantação, a torta de filtro. O caldo passa então para as

etapas de evaporação, originando o xarope que segue para ocozimento, resultando na massa cozida que através da cristalização e da centrifugação proporcionam a separação entre os cristais de açúcar e o mel final. Os cristais de açúcar são então direcionados para as etapas finais de secagem, classificação, acondicionamento e armazenamento (LIMA, 2012; MARQUES; MARQUES; TASSO JÚNIOR, 2001; SARTORI, 2014).

Figura 4 - Fluxograma geral da produção de açúcar cristal branco, destacando as etapas, produtos e resíduos do processo (Fonte: Modificado SARTORI, 2014)

2.4.1 Clarificação

O processo clarificação do caldo de cana-de-açúcar para produção de açúcar cristal branco é uma das etapas mais importantes de todo o processo produtivo. A qualidade dos cristais de açúcar deve ser aferida segundo métodos analíticos recomendados com o intuito de definir um padrão de qualidade para a comercialização do açúcar. Dentre esses métodos o mais usual é o método estabelecido pela ICUMSA – International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (SANTOS, 2008).

Quanto mais claro ou mais branco for a cor do açúcar, menor é a sua unidade ICUMSA (U.I). A cor do açúcar é o fator de maior influência para a determinação de sua qualidade e de seu preço de comercialização, de forma que, um açúcar de menor qualidade é determinado pela presença de cor mais escura, impurezas e pontos pretos (ENGENHO NOVO, 2008). Santos (2008) afirma que a não conformidade do açúcar com os parâmetros estabelecidos pela ICUMSA não apresenta riscos a saúde do consumidor, apenas influência nas tomadas de decisão quanto a sua comercialização.

O objetivo principal da clarificação é a remoção dos não-açúcares e impurezas presentes no caldo misto, os quais se encontram na forma solúvel, coloidal e insolúvel em suspensão (SOUZA, 1988). Após o peneiramento, o caldo passa pelo processo de clarificação que envolve basicamente as duas etapas, a de sulfitação (com adição SO_2) e a calagem (com a adição do leite de cal) (TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007).

A etapa de sulfitação tem como principal objetivo remover as impurezas presentes no caldo, afim de, dar origem a um açúcar de cor clara, preservando a qualidade da sacarose presente, ou seja, reduzindo a cor sem que haja a inversão da sacarose em glicose e frutose (AOKI, 1987; COPERSUCAR, 1987; SOUZA, 1988). Na sulfitação, a queima de enxofre é realizada para a obtenção do anidrido sulfuroso ou dióxido de enxofre (SO_2). Esta queima ocorre em fornalhas a 250 °C produzindo o dióxido de enxofre (Figura 5). De acordo com Camargo (1990), o gás gerado passa por um resfriamento, de forma a reduzir a possível formação de SO_3 que pode promover a degradação de sacarose e corrosão dos equipamentos.

Uma vez misturado ao caldo de cana-de-açúcar (cerca de 150 a 300 g de sulfito para cada tonelada de cana), o sulfito promove a redução do pH do caldo para 3,8 a 4,2. O caldo misto é pré-aquecido a 60 °C sendo, a seguir, enviado à etapa de caleagem (LIMA, 2012). O sulfito age quimicamente com as substâncias pigmentosas que seriam responsáveis pelo aumento de cor do açúcar, além de promover a conversão de compostos férricos coloridos em incolores (ENGENHO NOVO, 2008).

A etapa de caleagem é feita a partir da adição do leite de cal em quantidades suficientes para neutralizar os ácidos orgânicos presentes no caldo (LIMA, 2012). De acordo com Honig (1953) são adicionados, geralmente, de 500 a 800 g de cal para

cada tonelada de cana-de-açúcar processada, obtendo assim um pH na faixa de 7,0 a 7,5. Na sequência, o caldo caleado é aquecido de 90 a 105°C, o que leva a formação de precipitados de composição complexa que aderem e arrastam grande parte do material suspenso no caldo, o qual é posteriormente separado por decantação (HUGOT, 1977).

Além da etapa de sulfitação e da caleagem há ainda a adição de polímeros que promovem o aumentada velocidade de sedimentação das impurezas presentes no caldo. O caldo passa então pelas etapas de aquecimento e de decantação, sendo em seguida direcionado para a etapa de concentração (MARQUES; MARQUES; TASSO JÚNIOR, 2001; TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007).

Figura 5 - Forno de queima do enxofre (Arquivo pessoal - R.B. Lima)

A etapa de tratamento do caldo, além de promover a redução de compostos pigmentos, é responsável também pela eliminação de microrganismos. Os microrganismos presentes no processo de fabricação do açúcar são provenientes principalmente da matéria-prima. Condições como temperatura, umidade e alta fonte de nutrientes são responsáveis por favorecer a multiplicação de bactérias durante o processo de extração do caldo. A maior parte dos microrganismos é eliminada no processo de tratamento térmico do caldo, que chega a atingir temperaturas em torno de 110°C. Entretanto, o tratamento térmico do caldo não elimina completamente a microbiota presente no caldo, que acaba consequentemente seguindo para as demais etapas do processamento e podendo prejudicar a produção de açúcar e etanol, reduzindo a eficiência e produtividade do processo.

Segundo Evangelista (2000) o número total de bactérias encontrados no caldo bruto de cana-de-açúcar pode aumentar devido a longos períodos entre o corte e o processamento da cana-de-açúcar ou devido a não prática de higienização e

aspepsia durante o processo de fabricação, como a desinfecção na moenda, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto com o caldo.

A presença das bactérias mesófilas estão diretamente relacionadas a qualidade sanitária do alimento. Elas apresentam um crescimento ótimo em temperaturas de 35 a 37°C. Os bolores e leveduras são microrganismos altamente resistentes a condições adversas de pH e água e apresentam alto crescimento em temperaturas de 25 a 28°C. Em temperaturas ótimas para o crescimento de bactérias mesófilas (35 a 37°C) e de bactérias termotolerantes (45°C) os bolores e leveduras, raramente conseguem crescer (SILVA et al., 2007). A Tabela 2 apresenta os critérios para estabelecimento de padrão microbiológico determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Tabela 2 - Critérios para estabelecimento de padrão microbiológico em açúcares, determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

Grupo de alimentos de açúcares, adoçantes e similares	Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa	Amostra indicativa tolerância para amostra representativa			
			n ⁽¹⁾	c ⁽¹⁾	m ⁽¹⁾	M ⁽¹⁾
a) açúcar refinado, sólido (moído, em grânulos e similares) ou líquido	Coliformes a 45 °C/g (mL)	5	5	2		5
b) açúcar cristal não refinado, açúcar mascavo e demerara, melado, melaço e rapadura e similares	Coliformes a 45 °C/g (mL)	10 ²	5	2	10	10 ²
	<i>Salmonella</i> sp 25g (mL)	Ausente	5	0	Ausente	-

⁽¹⁾n, c, m, M representam as formas de amostragem segundo consta na Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA. (Fonte: ANVISA, 2001)

2.5 Uso de sulfito nos alimentos

Os sulfitos ou agentes sulfitantes, como por exemplo, o dióxido de enxofre (SO₂) e os sais de sódio, potássio e cálcio (Na, K e Ca), o sulfito de hidrogênio (bissulfito), o metabissulfito ou íons de sulfito (MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006) são largamente utilizados como aditivo nas indústrias de alimentos, bebidas e farmacêutica (YANG; PURCHASE, 1985). Os sulfitos são utilizados devido seu alto poder de inibição do crescimento microbiano e de reações de escurecimento, sendo estas enzimáticas ou não, durante o período de estocagem de alimentos e bebidas (AUN et al., 2011; FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011), enquanto, na indústria

farmacêutica seu uso confere estabilidade e potencial aos medicamentos (PAPAZIAN, 2011). A ação inibitória dos sulfitos sobre microrganismo é dependente do pH do meio, sendo mais ativa em pH inferior a 3,0, pois, em pH ácido há uma maior liberação de dióxido de enxofre molecular (TAYLOR; BUSH, 1986). O controle do escurecimento enzimático através do uso de sulfitos ocorre devido à redução das o-quinonas para o-difenóis, os quais são compostos de menor coloração, ou através da formação de compostos de menor coloração e pela inativação da enzima polifenoloxidase (PFO) que é o agente causador da formação de cor em tecidos de frutas e hortaliças, sendo responsável pela oxidação de compostos fenólicos produzindo pigmentos escuros (FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011).

O Brasil segue as recomendações sugeridas pelo Ministério da Saúde (MS), que por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pela regulamentação dos aditivos alimentares (FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011). A Food and Drug Administration (FDA) proíbe a utilização de sulfitos em frutas e legumes que possam ser ingeridos crus, além de exigir avisos e descrições nos produtos que contenham agentes sulfitantes (PAPAZIAN, 2011) e de acordo com Favero, Ribeiro e Aquino (2011) a quantidade de sulfitos adicionada aos alimentos e bebidas pode variar no produto final, devido perdas ocasionadas durante o processamento e a estocagem do produto, além disso, se houver o consumo excessivo de certos alimentos contendo sulfitos, isso acarretará em uma maior ingestão desses aditivos por parte do consumidor, podendo causar riscos à sua saúde, pois uma pessoa pode adquirir sensibilidade ao sulfito em qualquer momento de sua vida (PAPAZIAN, 2011).

O uso de sulfitos como aditivos, entretanto, tem sido duramente criticado. Segundo a Health Canada (2012), os sulfitos estão entre os dez aditivos alimentares alergênicos prioritários e pessoas com alta sensibilidade a estes reagentes podem apresentar sintomas como hipotensão, desconforto na garganta, congestionamento no peito, entre outros (MACHADO et al., 2008; PAPAZIAN, 2011; POPOLIM, 2009). De acordo com a FDA, aproximadamente 5% dos asmáticos são sensíveis aos sulfitos e em seu regulamento está definido que a presença de sulfitos como aditivos em alimentos deve ser discriminada nos rótulos dos produtos quando em quantidades superiores a 10 ppm, contudo, dependendo do teor de sensibilidade do indivíduo, quantidades inferiores a 10 ppm já podem ser consideradas suficientes

para provocar reações adversas ao consumidor (FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011).

Além de estar associado a danos a saúde do consumidor, o uso de sulfitos na produção do açúcar cristal branco também é responsável por ocasionar dificuldades operacionais, instabilidade no processo, perdas de teores de sacarose, originar produtos de qualidade inferior com altos teores de SO_2 presentes e problemas de armazenagem (CHOU et al., 2006). O açúcar cristal branco, produzido no Brasil e obtido através do processo convencional de clarificação (com a adição de dióxido de enxofre) é um produto que encontra barreiras à sua exportação devido a questões de saúde pública internacionais, por causa da presença de compostos residuais de enxofre. Desta forma, atualmente, buscam-se alternativas para a substituição do uso de sulfitos na indústria de alimento, principalmente na indústria açucareira.

2.6 Processos oxidativos avançados (POA)

Os processos oxidativos avançados (POA ou AOP, do inglês AdvancedOxidative Processes), apresentam-se, atualmente, como uma alternativa ao processo de sulfitação do caldo de cana-de-açúcar. Entre os processos estão o uso de ozônio (O_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou a mistura de H_2O_2 com íons metálicos como Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} conhecido como reação Fenton. Segundo Teixeira (2004) os POA apresentam como vantagens um menor consumo de energia se comparados a processos tradicionais, acarretando em menor custo operacional e quando usados quantidades de oxidante suficientes, a total mineralização dos contaminantes e a não formação de subprodutos.

Os processos oxidativos avançados têm como objetivo, através de reações de degradação, transformar grande parte dos contaminantes orgânicos em dióxido de carbono, água e ânions inorgânicos, em fase aquosa, gasosa, ou adsorvidos em uma matriz sólida, sendo que na presença de catalisadores sólidos, o processo é considerado heterogêneo e na presença dos demais catalisadores o processo é considerado homogêneo (TEIXEIRA, 2004). Estas reações envolvem espécies transitórias oxidantes, como por exemplo, o ozônio (O_3) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) considerados fortes oxidantes, ou os semicondutores como o dióxido de titânio (TiO_2), o óxido de zinco (ZnO) e a irradiação ultravioleta (UV) (MANSILLA et al., 1997). A Tabela 3 apresenta os valores de potencial redox de alguns oxidantes segundo Teixeira (2004).

Tabela 3 - Potencial redox de algumas espécies oxidantes (Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 2004)

ESPÉCIE	POTENCIAL REDOX (V)
Flúor (F)	3,03
Radical Hidroxila (OH [•])	2,80
Oxigênio atômico (O)	2,42
Ozônio (O ₃)	2,07
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	1,78
Permanganato (HMnO ₄)	1,68
Dióxido de Cloro (ClO ₂)	1,57
Cloro (Cl)	1,36
Iodo (I)	0,54

O uso de agentes redox no processo de descoloração do caldo de cana-de-açúcar vem sendo bastante estudado, entre os oxidantes mais analisados estão o ozônio, o peróxido de hidrogênio e o hipoclorito. O uso de compostos que possam vir a produzir algum tipo de resíduo no caldo, como é o caso dos compostos clorados devido à toxicidade presente, não são recomendados (DAVIS, 2001).

2.7 Ozônio

O ozônio é a forma triatômica do oxigênio (Figura 6a e 6b), é um gás incolor que em fase aquosa, decompõe-se rapidamente a oxigênio e outras espécies radicalares. É um agente oxidante altamente poderoso ($E^\circ = 2,07V$), quando se é comparado com outros agentes oxidantes, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ($E^\circ = 1,78 V$), permitindo, desta forma, que a espécie possa reagir com uma grande classe de compostos (KUNZ et al., 1999).

Figura 6 - Estrutura química do ozônio. (A) estrutura planar; (B) estrutura espacial

O ozônio foi descoberto em 1839, por Schonbein e reconhecido como potente desinfetante de águas 27 anos depois, em 1866 (LAPOLLI et al., 2003). O primeiro

gerador de ozônio foi criado na Alemanha em 1875 (TORRES; REGÊ FERREIRA; RÍMOLI, 1996).

A aplicação do ozônio como um tratamento, ou a ozonização como é conhecido, é amplamente utilizada no tratamento de água potável, desinfecção, remoção de odor e de algas e na degradação de poluentes orgânicos. Devido seu alto poder de oxidação e da ausência de produtos de decomposição perigosos, o ozônio tornou-se um agente potencial no pré-tratamento de compostos recalcitrantes que, posteriormente, poderão ser removidos através de métodos convencionais. A ozonização de compostos dissolvidos em água constitui-se em um POA, uma vez que são gerados radicais hidroxila a partir da decomposição do ozônio e a reação pode ser catalisada pela presença de traços de outras substâncias, como metais de transição (CHEN et al., 1976).

A aplicação do ozônio no tratamento de águas ocorreu pela primeira vez nos Estados Unidos em 1940. Na mesma década, os Estados Unidos consideraram o ozônio como uma substância GRAS (“generally recognized as safe”) podendo ter uma aplicação direta em produtos alimentícios (GRAHAM, 1997). No Brasil, o ozônio passou a ser empregado no tratamento de águas a partir de 1983 (LAPOLLI et al., 2003), um ano após a FDA certificá-lo como um produto GRAS (USDA, 1998).

2.7.1 Uso do ozônio na indústria de alimentos e na indústria sucroalcooleira

Nas últimas décadas, o uso de ozônio na indústria de alimentos tornou-se mais frequente, devido a sua característica de não formar subprodutos halogenados com a matéria orgânica, tornando-se assim um possível substituto do cloro. As principais aplicações do ozônio no setor alimentício são o aumento de vida de prateleira do produto, podendo ser aplicado diretamente na matéria-prima e a higienização de superfícies e equipamentos (SILVA et al., 2011). Na indústria sucroenergética sua aplicação ocorreu após ser utilizado na indústria de papel e celulose (BOURZUTSCHKY, 2005) e os melhores resultados são obtidos quando o processo de ozonização é precedido pela clarificação por precipitação, o que remove efetivamente os pigmentos, os quais poderiam formar durante o processo de cristalização. Além disso, o uso do ozônio permite não só a redução da coloração do produto cristalizado, mas também do melaço, o que afeta a coloração dos cristais formados (VERCELLOTTI; CLARKE, 1997).

Em 1999, Moodley, Davis e Adendorff publicaram um trabalho onde haviam relatos da aplicação de ozônio no processo de clarificação, em escala industrial, do açúcar refinado em uma refinaria na África do Sul. Os resultados mostraram ser possível a aplicação do ozônio no processo de descoloração do açúcar refinado, sendo a redução da coloração do xarope de 10 a 30%, além da redução da cor de aproximadamente de 15 a 20% em quatro tipos de açúcar produzidos pela refinaria. O processo de clarificação do açúcar mostrou-se ainda contínuo, além de auxiliar na eliminação de bactérias, leveduras e fungos filamentos contidos no xarope, porém, houve a desvantagem de inversão de sacarose.

Nos anos de 2005, 2011 e 2013, o JornalCana publicou três diferentes matérias apresentando os benefícios do uso de ozônio como processo substituto a sulfitação. Uma vez substituído o processo de sulfitação pela ozonização, o Brasil poderia exportar o açúcar cristal para a Europa e Estados Unidos, onde o açúcar brasileiro não é aceito devido às restrições ao enxofre, considerado cancerígeno (JORNALCANA, 2005). Em reportagem publicada em 2011, o JornalCana apresentou dados que comprovavam as vantagens em utilizar o ozônio como agente clarificante do caldo de cana-de-açúcar, uma vez que as usinas obtinham reduções de até 50% nos custos de insumos do tratamento de branqueamento do açúcar, além de reduzir custos como passivos trabalhista e perdas de açúcar que ocorriam por vazamento devido a ação corrosiva do enxofre nos equipamentos. Além disso, a reportagem abordou que a substituição também permitiria a adição de novos nutrientes ao açúcar como a vitamina A, o que agregaria maior valor nutricional ao produto. O ozônio possui potencial de redução superior ao do enxofre, além de não reduzir o pH do meio, o que implica em um menor consumo de cal, para correção do pH, o que leva a menores incrustações nos evaporadores e aquecedores, causando menor custo de manutenção para a usina, além de reduzir consideravelmente as perdas por inversão de sacarose em açúcares redutores que são inviáveis para a produção de açúcar (JORNALCANA, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal: cana-de-açúcar e preparo do caldo

A lavoura de cana-de-açúcar (variedade RB 96-6928) utilizada nessa pesquisa foi cultivada no município de Iracemápolis/SP. O caldo da cana-de-açúcar coletado foi obtido com o auxílio de uma moenda Modelo Mause (Piracicaba/SP), sendo em seguida, peneirado, armazenado em frascos de polipropileno e acondicionado no freezer a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$, em frações homogêneas e subdivididas para os tratamentos experimentais.

3.2 Geração e quantificação por análise titulométrica de ozônio (O_3)

A medida da concentração de ozônio (mg/min) foi realizada pelo método descrito por Eaton e Franson (2000). O ozônio foi produzido por uma unidade geradora de ozônio (Azcozon Mod. HTU 500AC) (Figura 7), sendo o ar ambiente utilizado como fonte de alimentação do aparelho para a geração do gás ozônio.

Figura 7 - Aparelho de geração de ozônio (Azcozon Mod. HTU 500AC)

Primeiramente foi feita a fatoração do cálculo do ozônio pesando 0,15 g de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (Mallinckrodt Baker, Inc. Paris), previamente seco em estufa a 150°C durante 1 hora. O dicromato de potássio foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL e as paredes do frasco foram lavadas com água

atemperatura ambiente, que era previamente fervida, até completar o volume de 100 mL. O aquecimento prévio da água promovia a liberação de gás carbônico (CO₂), responsável pela redução do dicromato de potássio.

Em seguida adicionou-se 5g de iodeto de potássio (LabSynth, Brasil) e 5 mL de ácido clorídrico (HCl, ECIBRA, Brasil) 6 N agitando até dissolver. O frasco foi tampado com rolha esmerilhada e a solução foi deixada em repouso durante 5 minutos na ausência de luz. Após esse tempo, adicionou-se 100 mL de água a temperatura ambiente, previamente fervida. O iodo liberado na solução foi titulado com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N (Exodo, Brasil) até obter a coloração de amarelo claro, acrescentando em seguida 2mL de solução de amido 1% (m/v) (QuimibrasInd Química, Brasil) obtendo uma coloração de azul esverdeado. Seguiu-se com a titulação até a coloração mudar de azul esverdeado para verde pálido. O cálculo do fator de correção foi feito de acordo com eq. (1), através da média de três determinações:

$$\text{Fator de correção} = \frac{m}{0,049 \times V \times N} \quad (1)$$

Onde:

M = massa de dicromato de potássio, em gramas;

V = volume da solução de tiosulfato de potássio gasto na titulação, em mL;

N = normalidade esperada da solução (0,1 N).

Para a determinação da produção de ozônio a corrente gasosa que deixava o reator, era neutralizada em dois frascos com capacidade de 600 mL cada um, denominados frasco A e B, contendo cada um uma solução de 200 mL de iodeto de potássio (KI) 2% (m/v) por 5 min. O gás era conduzido do reator para os frascos de neutralização através de mangueiras de silicone e borbulhado no fundo do primeiro frasco (A) por meio de tubo vítreo. Teores mínimos de ozônio que não eram absorvidos pelo frasco A eram consumidos por borbulhamento no segundo frasco (B), que liberava o gás residual livre de O₃ à atmosfera (Figura 8).

Figura 8 - Montagem de equipamento para geração e titulação de ozônio

Eram adicionados à solução de KI, após borbulhamento com ozônio (Figura 9), 10 mL de H_2SO_4 2N (Quimitec, Brasil). As soluções de KI eram tituladas com tiosulfato de sódio 0,1 N até que a cor amarela do iodo quase desaparecesse.

Figura 9 - Soluções de iodeto de potássio (KI) após 5 minutos de borbulhamento com ozônio (O_3), sendo o frasco A diretamente ligado ao reator de O_3 e o frasco B ligado ao frasco A para absorção de teores mínimos de O_3 não absorvidos

Em seguida, adicionavam-se 2mL de solução indicadora de amido 1% (m/v) e titulava-se até o desaparecimento completo da cor azul acinzentada. O ozônio produzido era calculado conforme a eq. (2) e expresso em mg O₃/min.:

$$Dose\ de\ O_3 = \frac{(A + B) \times N \times 24}{T} \quad (2)$$

Onde:

A = volume (mL) da solução padronizada de Na₂S₂O₃.5H₂O 0,1 N gasto na titulação do frasco A;

B = volume (mL) da solução padronizada de Na₂S₂O₃.5H₂O 0,1 N gasto na titulação do frasco B;

N = normalidade do Na₂S₂O₃ corrigida com padrão primário;

T = tempo de borbulhamento do gás em min.

3.3 Tratamentos reacionais por ozonização

3.3.1 Planejamento composto central e otimização dos parâmetros da redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização

Um planejamento composto central foi realizado com o intuito de obter as melhores condições para redução de cor do caldo pela ozonização. Foi utilizado um planejamento 2³ completo com três pontos centrais e seis pontos axiais sendo os fatores estudados pH, temperatura (°C) e doses de O₃ (mg O₃/min), para um tempo fixo de uma hora (1h). Os frascos foram colocados em agitação constante em um banhomaria com agitação. A dosagem do ozônio foi feita através da mesma unidade geradora de ozônio (descrita no item 3.2) que ficou ligada aos frascos contendo caldo de cana-de-açúcar por mangueiras de silicone com diâmetro de 5 mm, e estes frascos ligados, através de mangueiras de silicone, a frascos para neutralização de gases residuais contendo 400 mL de solução de iodeto de potássio 2% (v/v). Os valores utilizados nos tratamentos realizados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores codificados e reais dos parâmetros do planejamento composto central.

Parâmetros	- α (-1,68)	-1	0	+ 1	+ α (+1,68)
pH	1,64	3,0	5,0	7,0	8,36
Temp. (°C)	16,4	30	50	70	83,6
O ₃ (mg O ₃ /min)	0	0,58	1,34	2,37	3,82

Após a realização de cada ensaio, as amostras foram analisadas quanto à cor ICUMSA, teores de açúcares, acidez total titulável, pH, Brix%caldo, turbidez

e espectrometria de massas por Maldi-TOF/MS. Alguns resultados foram analisados através do software Statistica Trial 12.0 para a geração de superfícies de resposta.

3.3.2 Estudo do perfil cinético de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização

Os tratamentos para avaliar os perfis cinéticos resultantes da clarificação do caldo de cana-de-açúcar por ozonização foram desenvolvidos a partir de condições experimentais pré-definidas no item 3.3.1, do qual foram obtidas as condições de otimização do processo de redução da coloração do caldo em função do tempo. Os tratamentos para avaliar os perfis cinéticos da redução da cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar tiveram um tempo máximo de quatro horas (240 minutos) de reação. Nos intervalos de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos foram coletadas amostras para serem analisadas quanto a cor ICUMSA, pH, Brix%caldo, teores de açúcares e taxa de contaminação. Os resultados obtidos para cor ICUMSA foram analisados ainda através de redes neurais artificiais.

Para o ensaio cinético foi utilizado um reator perfeitamente agitado (RPA ou CSTR do inglês *continuous stirred-tank reactor model*) embatelada (Figura 10) com volume total de 6 L, e volume útil de 2,1 L de caldo de cana-de-açúcar com pH previamente ajustado conforme indicado pela Tabela 4. O caldo de cana-de-açúcar ficava sob constante agitação de 100 rpm. A temperatura do sistema e a dosagem do ozônio eram adequadas segundo o planejamento composto central (Tabela 4). O ozônio residual que deixava o reator foi neutralizado com uma solução de iodeto de potássio 2% (m/v) antes de ser descartado.

Figura 10 - Estrutura do reator de aço inoxidável usado para o estudo cinético dos parâmetros tecnológicos em caldo de cana-de-açúcar, sendo: (A) parte interna do reator; (B) a estrutura montada da parte interna com o copo de aço inoxidável AISI 316.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Métodos analíticos para as análises de planejamento e otimização dos parâmetros de redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização

As metodologias descritas a seguir foram utilizadas apenas para as análises das amostras obtidas pelo planejamento e otimização dos parâmetros de redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização (item 3.3.1)

3.4.1.1 Determinação da acidez total titulável

Para a determinação da acidez foi utilizada a metodologia de AOAC (1980), a partir da titulação de NaOH (0,1N).

Pipetou-se 5mL da amostra de caldo de cana-de-açúcar tratado em um balão volumétrico de 50 mL, o restante do volume foi completado com água destilada. Em seguida, titulou-se NaOH 0,1 N até que o pH da amostra ficasse 8,2, anotando-se o volume de NaOH gasto. Os teores de acidez total titulável foram quantificados em mg/mL através da eq. (3):

$$A = \frac{Vg \times N \times 60 \times 100}{V} \quad (3)$$

Onde:

Vg = Volume total titulado de NaOH;

N = Normalidade do NaOH;

V = Volume total de solução que foi titulada com NaOH

3.4.1.2 Análise da composição química de precipitados das amostras de caldo de cana-de-açúcar ozonizadas através de espectrômetro de massas MALDI-TOF/MS.

As análises de identificação dos compostos químicos presentes nos precipitados do caldo de cana-de-açúcar, foram desenvolvidas por espectrometria de massas utilizando um equipamento MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization–time-of-flight). A técnica possibilitou analisar os compostos presentes nos precipitados obtidos das amostras de caldo de cana-de-açúcar antes e após o tratamento de ozonização. Foram analisados os precipitados de oito dos dezessete tratamentos realizados através do planejamento composto central (item 3.3.1) além do caldo controle.

Os precipitados obtidos da amostra controle e dos oito primeiros tratamentos do planejamento composto central foram preparados pelo método Bligh-Dyer, onde 20 mg de cada precipitado foram ressuspensas em 300 µL de uma mistura constituída por clorofórmio e metanol (1:2, v/v). Em seguida, adicionou-se 100 µL de clorofórmio e 100 mL de água (formando uma mistura de duas fases), misturando-os com o auxílio de um agitador de vórtice e levados a centrifugação a 5000 rpm durante 4 min. A fase orgânica (fase inferior) foi separada, seca sob vácuo e ressuspensa em 50 µL de clorofórmio e metanol (1:2, v/v), adicionando, em seguida, 1 mL de cada uma destas soluções na placa de aço do MALDI e deixando secar ao ar. Em seguida, 1 µL da solução matriz, que consiste de 2,5-di-hidroxibenzoico ácido (DHB) em 15 mg/mL em metanol, foi adicionada superficialmente em cada amostra.

A matriz é responsável por absorver uma luz ultravioleta (em um comprimento de onda de 337 nm) e convertê-la em energia térmica. Uma pequena parte da matriz (para baixo de 100 nm a partir da superfície) aquece-se rapidamente (em alguns nanos segundos) e é evaporizada, juntamente com a amostra (Figura 11).

Figura 11 – Representação gráfica do conjunto amostra e matriz: antes da irradiação a laser (A) e após a irradiação a laser (B) (Fonte: SHIMADZU, 2015)

Os espectros de MALDI foram adquiridos no modo de íons positivos utilizando um espectrômetro de massa de MALDI Autoflex III TOF (time-of-flight) equipado com tecnologia laser smartbeam™ de Bruker Daltonics (Breme, Alemanha). Os dados de MS foram adquiridos na faixa m/z entre 600 e 1000 por uma média de 1.500 disparos de laser consecutivos com uma frequência de 200 Hz. Para processar os espectros de massa foi utilizado um software FlexAnalysis 3.0.

A atribuição para formulação molecular obtida pelo MALDI-TOF foi feito pelo ESI(+)Orbitrap MS. Uma alíquota de 20 μL de cada solução de fosfolípidos previamente utilizada para a análise de MALDI-TOF, foram diluídos com 400 mL de metanol e as soluções resultantes foram analisadas por ultra resolução MS com um espectrômetro de massa Q Exactive Orbitrap com ionização por electrospray (ThermoScientific, Bremen, Alemanha). Os espectros foram adquiridos em modo de íon positivo ESI, na faixa de 200-1000 m/z , acumulando 20 microscans em cada corrida, com potência de 140.000 resolver a m/z 400, o fluxo do sheath gás (N_2) em 10 unidades arbitrárias, tensão capilar de 30,00 V, temperatura capilar a 320 °C e tensão de Skimmer em 16 V. Os espectros de massa foram processados pelo pacote de software Análise Xcalibur (versão 3.0.63, Thermo Electron Corporation) e as composições elementares foram geradas usando o software navegador Quali (versão 3.0.63 Thermo Electron Corporation). As composições elementares eram aceitas apenas quando as diferenças médias entre as massas calculadas e experimentais eram menores que 1,0 ppm.

3.4.2 Métodos analíticos para as amostras obtidas pelo estudo do perfil cinético de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização

3.4.2.1 Redes Neurais Artificiais (RNA)

Redes Neurais Artificiais são sistemas matemáticos que processam informações fornecidas, similarmente ao sistema de neurônios biológicos e sistemas nervosos (BARRETO, 2002). A estrutura de uma RNA é formada a partir dos dados obtidos durante experimentos realizados. Tais dados permitem realizar simulações de situações laboratoriais prevendo, resultados similares aos obtidos experimentalmente baseando-se nas condições atribuídas (SARTORI, 2014).

Em um sistema RNA existe uma camada de entrada, onde os dados obtidos são fornecidos a rede; uma camada oculta ou intermediária, onde ocorre a maior parte dos processamentos desta rede; e uma camada de saída, onde o resultado é concluído e apresentado (TATIBANA; KAETSU, 2009). Dentro de uma RNA os neurônios estão ligados através de conexões chamadas sinápticas (BARRETO, 2002). A camada de entrada de uma RNA possui, além dos dados que são fornecidos, neurônios especiais chamados Bias, que são responsáveis pelo aumento de grau de liberdade da RNA, o que permite uma maior e melhor adaptação da RNA aos dados que lhe foram fornecidos, fazendo com que a RNA trabalhe apenas dentro da margem de mínimo e máximo existente entre os dados fornecidos (TATIBANA; KAETSU, 2009).

Os programas utilizados para preparação dos dados foram desenvolvidos no CESQ/DEQ-EPUSP (NASCIMENTO; GIUDICI; GUARDANI, 2000). Os dados experimentais foram divididos, sendo 2/3 usados para o conjunto de ajuste da rede neural, o Learning-Set (LS) e 1/3 para o conjunto de teste para validação, o Test-Set (TS). Para o treinamento da rede manteve-se fixo o número de apresentações em 20000. As respostas de cor ICUMSA fornecidas à rede, foram obtidas a partir das análises feitas com as amostras coletadas do item 3.3.2.

3.4.2.2 Acompanhamento da taxa de contaminação das amostras de caldo de cana-de-açúcar

Para as análises microbiológicas do caldo de cana-de-açúcar tratado com ozônio, foram utilizadas as amostras obtidas através do estudo cinético de reações

químicas descritas no item 3.3.2. Foram analisados quanto aos teores de bactérias mesófilas totais e teores de bolores e leveduras, apenas os tratamentos que obtiveram maiores reduções da cor do caldo de cana-de-açúcar, sendo que, de cada tratamento analisado apenas dois pontos foram estudados, os tempos 0 (zero) e 240 minutos. As análises de contagem de bactérias mesófilas totais (aeróbias) e a contagem de bolores e leveduras foram feitas segundo a metodologia descrita por Silva et al. (2007).

Todo o material utilizado para as análises foi previamente esterilizado em uma autoclave por 15 minutos a 1 atm e 105 °C. E ao final de todas as análises, o material foi descartado, sendo primeiro esterilizado em autoclave a 1 atm e 121 °C por 30 minutos.

3.4.2.2.1 Contagem de bactérias mesófilas totais (aeróbias)

Para contagem de bactérias mesófilas totais a técnica utilizada foi o método “pour-plate”. Inicialmente foram feitos testes de diluição em concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , com o intuito de obter a melhor diluição para se trabalhar. Primeiramente uma alíquota de 1,0 mL da amostra pura foi diluída em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85% de NaCl) para se obter a diluição de 10^{-1} . A solução foi agitada e em seguida, 1 mL da solução de 10^{-1} foi transferida para um segundo tubo contendo 9 mL da solução salina, a fim de se obter a diluição na ordem de 10^{-2} . O processo foi repetido mais duas vezes de forma a se obter as diluições de 10^{-3} e 10^{-4} .

Após obter as quatro diluições, 1 mL de cada solução era espalhada no fundo das placas de petri, previamente nomeadas com seus fatores de diluição. O espalhamento da alíquota diluída de cada amostra foi feita por todo o fundo da respectiva placa, de forma a se obter uma melhor distribuição. Em seguida verteu-se aproximadamente 15 mL de meio Plate Count Ágar (PCA) (DIFCO Laboratories, USA) difuso, resfriado e esterilizado em cada uma das placas. O preparo do meio foi feito segundo as instruções do próprio fabricante, de 23,5 g de PCA para cada litro de meio líquido preparado. A mistura do meio com o inóculo foi feita em uma superfície plana com aproximadamente dez movimentos na forma de oito em sentido horário e dez movimentos no sentido anti-horário, a fim de se obter a maior homogeneização possível das placas. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por $48 \pm 3\text{h}$, sendo que todo o procedimento foi realizado em triplicata e os resultados descritos através da

soma da contagem das três placas e expressos em UFC bactérias/g de amostra ou UFC/g.

Após se obter a melhor diluição para cada tratamento, o processo de plaqueamento foi repetido utilizando 1mL da amostra diluída em cada placa. Para cada um dos cinco tratamentos analisados foram utilizados os tempos de 0 (zero) e 240 minutos, sendo que cada tempo teve três placas inoculadas, totalizando seis placas por tratamento. Após a inoculação e solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por $48 \pm 3\text{h}$ e os resultados descritos através da soma da contagem das três placas e expressos em UFC de bactérias/mL.

3.4.2.2.2 Contagem de Bolores e Leveduras

A contagem de bolores e leveduras também foi realizada pela técnica de “pour-plate”. O meio utilizado foi o Batata Dextrose Ágar (BDA), preparado na quantidade de 39 g de BDA para cada litro de meio líquido, segundo instruções fornecidas pelo fabricante (FlukaAnalytical). A infusão de batata e a dextrose na formulação do meio promovem um abundante crescimento fúngico. O meio foi acidificado com ácido tartárico (LABSYNTH, Brasil) 10% (m/v), sendo utilizado 1mL de ácido para cada 100 mL de meio preparado, com o objetivo de inibir o crescimento bacteriano.

O procedimento de teste de diluição e de inoculação das amostras para a análise de bolores e leveduras foi feito da mesma forma que o utilizado na técnica de bactérias mesófilas totais, descrita acima com a inoculação de três placas para cada amostra (tempo zero e 240 minutos) dos cinco tratamentos selecionados, que apresentaram as melhores reduções de cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar. Após a inoculação e solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 73 horas e os resultados descritos através da soma da contagem das três placas e expressos em UFC de bolores e leveduras/mL.

3.4.3 Métodos analíticos para as amostras obtidas pelo planejamento e otimização e pelo estudo cinético dos parâmetros tecnológicos caldo de cana-de-açúcar por ozonização.

As metodologias descritas a seguir foram utilizadas para as análises das amostras obtidas pelo planejamento e otimização dos parâmetros na redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização (item 3.3.1) e para as

amostras obtidas pelo estudo cinético dos parâmetros tecnológicos (cor ICUMSA e degradação de sacarose) em caldo de cana-de-açúcar por ozonização (item 3.3.2).

3.4.3.1 Análise de cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar

A análise de cor ICUMSA foi feita segundo o método GS2/3-9 (2005) da ICUMSA Methods Book. Para cada ensaio foi feita, primeiramente, a leitura do Brix%caldo de cada uma das amostras coletadas. Em seguida, através da média das leituras de Brix%caldo, foi feito o cálculo para a diluição da amostra para obter um Brix%caldo de 1,25. As amostras foram filtradas com membranas de filtro de nitrato de celulose (tamanho de poro de 0,45 µm) (SartotStedimBiotech, Alemanha) em filtro à vácuo. Em seguida, foi feita a correção do pH para $7,0 \pm 0,05$, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCL) ambos 0,1 N. As amostras com pH ajustado eram analisadas em espectrofotômetro à 420 nm com cubeta de quartzo de 1 cm e aferido novamente o Brix%caldo. Todas as amostras foram diluídas e analisadas em triplicatas. O índice de cor ICUMSA das amostras foi expresso pela eq. (4):

$$Cor\ ICUMSA\ (420\ nm) = \left[\frac{ABS \times 1000}{\left(densidade \times \left(\frac{Brix}{100} \right) \right)} \right] \quad (4)$$

Onde:

ABS = absorbância da amostra lida a 420 nm;

Brix = sólidos solúveis totais da amostra diluída;

densidade é calculada através da seguinte eq.(5):

$$densidade = 1 + \left(\left(Brix0 \times \frac{200 + BrixC}{5400} \right) \times \left(\frac{BrixC}{Brix0} \right) \right) \quad (5)$$

Onde:

Brix0 = leitura de sólidos solúveis na amostra original;

BrixC = leitura de sólidos solúveis na amostra diluída com pH já ajustado.

3.4.3.2 Determinação de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar

A dosagem dos açúcares (sacarose, glicose e frutose) foi realizada através da metodologia descrita por IC Application Note (2015), utilizando um cromatógrafo de íons 930 Compact IC Flex (Metrohm) equipado com um detector amperométrico. Os íons de interesse foram separados através de uma coluna MetrosepCarb 1 (150 x

4,0 mm), termostata a 35°C, com o fluxo de eluente de 1,0 mL/min de solução de hidróxido de sódio (8g/L) e água deionizada. O tempo de cada leitura foi de 9 min, com injeção de 0,25 µL de amostra preparada em balão de 5mL contendo 250 µL de amostra e o restante de água deionizada e previamente filtradas com membranas Millipore de 0,45 µm. As leituras foram feitas em triplicatas e previamente, foram feitas soluções-padrão de sacarose (Sigma) em concentrações de 50000 ppm, de glicose (Sigma) em concentração de 20000 ppm e frutose (Sigma) em concentração de 20000 ppm para a elaboração das curvas de calibração, sempre que era preparado um novo eluente.

3.4.3.3 Determinação de turbidez

Para determinar a turbidez do caldo de cana-de-açúcar foi utilizado um turbidímetro de bancada Tecnoon TB 1000 (Piracicaba, Brasil), previamente calibrado com padrões de 0,1, 0,8, 8,0, 80 e 1000 NTU, fornecidos pela mesma empresa.

3.4.3.4 Determinação de pH

Para determinar o pH do caldo de cana-de-açúcar foi utilizado um pHmetro de bancada Tecnal (pH meter Tec 2), previamente calibrado com padrões.

3.4.3.5 Determinação de Brix%caldo

Para determinar de sólidos solúveis do caldo de cana-de-açúcar foi utilizado um refratômetro de bancada (Bellingham + Stanley Ltd.), previamente calibrado com água destilada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dosagem de ozônio no reator

A Figura 12 apresenta a curva de calibração elaborada para os valores obtidos através da dosagem do ozônio gerado em cada uma das 10 posições presentes no reator (Figura 13). A geração de ozônio foi feita através do ar atmosférico segundo, a metodologia e os cálculos descritos no item 3.2. O fator de correção para o tiosulfato de sódio foi de 1,16.

Figura 12 - Curva de calibração das doses de ozônio para cada posição do ozonizador

Figura 13 - Unidade geradora de ozônio (Azcozon Mod. HTU 500AC)

4.2 Resultados das análises realizadas para o planejamento e otimização dos parâmetros da redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização

4.2.1 Cor ICUMSA de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros

O tratamento que apresentou aumento de cor ICUMSA em relação à cor do caldo controle foi o Tratamento 3, com dosagens de 0,58 mg O₃/min, pH 7,0 e 30 °C, tendo todos os demais tratamentos, redução da cor ICUMSA em relação à cor do caldo controle. A seguir estão apresentadas as três superfícies de resposta para a interação entre os fatores em relação à redução da cor ICUMSA.

Menores resultados de cor ICUMSA foram obtidos quando o pH estava entre 1,64 e 5,0, associado a dosagens de ozônio entre 0,58 mg O₃/min e 2,37 mg O₃/min (Figura 14a); com dosagens de O₃ entre 1,34 mg O₃/min e 2,37 mg O₃/min, associadas a temperaturas entre 30°C e 16,4 °C (Figura 14b); ou em pH entre 5,0 e 1,64 relacionados a temperaturas de 30 a 70°C (Figura 14c).

Davis et al. (1998) analisaram previamente a redução da cor de soluções de açúcar, xarope e caldo clarificado, através de dois tratamentos, um com a adição de 250 ppm de ozônio e outro sem a adição de ozônio e determinaram como condições ótimas para a descoloração, com a adição de 250 ppm de ozônio, temperaturas acima de 70°C e pH entre 6 e 7, concluindo que o ozônio não só é capaz de reduzir a cor diretamente, mas também reduz os pigmentos precursores da cor, tais como, aminas e compostos fenólicos.

Gomez, Perez e Ramos (1980) demonstraram que pH foi o principal fator que influenciou na descoloração de soluções de açúcar, caldo clarificado e xarope concentrado que foram tratadas com uma mistura de ozônio com um fluxo de 10 a 20 litros por hora com temperaturas variando entre 30 a 90 °C, sendo que o pH ótimo para descoloração foi estabelecido com valores próximos ao neutro. Além disso, eles obtiveram que a concentração (Brix%caldo) teve um efeito negativo sobre a descoloração e a temperatura pouco influenciou na descoloração, devido a baixa energia de ativação do ozônio, sendo que o consumo de ozônio atingindo durante o estudo foi de 0,4 Kg de ozônio por tonelada de açúcar refinado produzido.

Figura 14 - Superfície de resposta para a interação das variáveis: (A) pH e dosagem de ozônio (mg O₃/min); (B) temperatura (°C) dosagem de ozônio (mg O₃/min); (C) temperatura (°C) e pH para obtenção dos valores de redução de cor ICUMSA (UI) do caldo de cana-de-açúcar através da otimização do processo de ozonização do caldo

O software StatisticaTrial permitiu realizar a análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão e da falta ajuste ao nível de 95% de confiança, utilizando o teste F para o planejamento estudado (Tabela 5). O valor de R^2 obtido foi de 0,759 e o modelo foi considerado significativo uma vez que o F calculado foi maior que o F tabelado ($F_{tab} = 3,29$) segundo os critérios apresentados por Box e Wetz (1973).

Tabela 5 - Análise da variância para redução de cor ICUMSA

FV	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	77073288,7	7	11010469,8	4,04 *
Resíduo	24526044,0	9	2725116,0	
Falta de Ajuste	24427129,0	7	3489589,9	70,56 *
Erro Puro	98915,0	2	49457,5	
Total	101599332,6	16	6349958,3	

*significativo a $p \leq 0,05$

Uma regressão, embora seja considerada significativa, uma vez que o F calculado for maior que o F tabelado, pode não ser considerada preditiva (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). De acordo com Box e Wetz (1973), para que uma regressão possa ser considerada significativa, de forma estatística e para fins preditivos, o valor de F calculado para a regressão deve ser, no mínimo, de quatro a cinco vezes maior que o valor de F tabelado.

O F calculado da falta de ajuste em relação ao erro puro apresentou um valor relativamente alto, o que indicou uma grande falta de ajuste dos dados ao modelo obtido (BOX; WETZ, 1973)

4.2.2 Turbidez de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros

A turbidez é um dos parâmetros de qualidade de maior impacto na aceitação de líquidos destinados a indústria de alimentos e é causada essencialmente pela presença de partículas de tamanho coloidal (COLLADO-FERNÁNDEZ; GONZÁLEZ-SANJOSÉ; PINO-NAVARRO, 2000).

Quanto menor a turbidez, ou seja, o quanto menor o teor de partículas em suspensão em uma solução, maior será sua transparência. A remoção de turbidez é um dos principais parâmetros de avaliação da capacidade de clarificação do caldo de cana-de-açúcar (EGGLESTON, 2000), sendo que a maior turbidez se deve à

presença de não-açúcares no caldo e, a redução desta, pode ser um indício de remoção destes componentes, tais como gomas, amido, proteínas, entre outras macromoléculas.

Após 60 min de reação, os 17 tratamentos realizados apresentaram aumento de turbidez em relação ao caldo controle. Contudo, não foi possível relacionar a ozonização do caldo com os aumentos nos teores de turbidez, uma vez que, em todos os tratamentos houve aumento, independente das dosagens de ozônio aplicadas ou até mesmo da não aplicação de ozônio como no Tratamento 12.

O tratamento que apresentou o maior aumento percentual na turbidez foi o Tratamento 9 com 29%, seguido dos Tratamentos 10 e 11, que apresentaram aumento de turbidez de 21 e 22%, respectivamente.

A seguir são ilustradas as três superfícies de resposta frente às variáveis estudadas: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH e dose de ozônio ($\text{mg O}_3/\text{min}$) em relação à leitura da turbidez do caldo de cana-de-açúcar.

Teores elevados de turbidez foram obtidos com a associação de doses médias ($1,34 \text{ mg O}_3/\text{min}$) de ozônio e pH 5,0 (Figura 15a); com dosagens de ozônio entre $1,34 \text{ mg O}_3/\text{min}$ a $2,37 \text{ mg O}_3/\text{min}$ com temperaturas de 30 a 70°C (Figura 15b); e temperaturas entre 70 e 30°C associadas a pH entre 3 e 7 (Figura 15c).

Figura 15 -Superfície de resposta para a interação das variáveis: (A) pH e dosagem de ozônio (mg O₃/min); (B) temperatura (°C) dosagem de ozônio (mg O₃/min); (C) temperatura (°C) e pH para obtenção dos valores de turbidez (NTU) do caldo de cana-de-açúcar através da otimização do processo de ozonização do caldo

De acordo com os resultados da ANOVA (Tabela 6), aplicada aos dados obtidos para turbidez do caldo, o coeficiente de correlação (R^2) obtido para o modelo foi relativamente baixo de (0,66) o que significa dizer que a percentagem de variação explicada pelo modelo foi de apenas 66%. Além disso, o modelo não pode ser considerado significativo, uma vez que o F calculado foi menor que o tabelado.

Tabela 6 - Análise da variância para valores de turbidez

FV	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	71187,4	7	10169,6	2,48
Resíduo	36849,7	9	4094,4	
Falta de Ajuste	31923,2	5	6384,6	2,59
Erro Puro	4926,5	2	2463,3	
Total	108037,1	16	6752,3	

4.2.3 Teores de açúcar de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros

Os dados das concentrações de sacarose, glicose e frutose estão apresentados na Figura 16. Posto que, houve a redução da cor ICUMSA das amostras, se faz necessária a análise dos teores de açúcares, pois uma vez que juntamente com a redução da cor houve a inversão de sacarose, o processo acaba por ser tornar inviável, devido à degradação da principal matéria-prima para produção de açúcar, a sacarose (SARTORI, 2014).

O tratamento que apresentou o maior teor de AR (glicose e frutose), havendo a inversão da sacarose foi o Tratamento 14, cujo pH foi o mais baixo do planejamento composto central (pH=1,64) associado a temperatura de 50 °C. Os Tratamentos 5 e 6 que tiveram a combinação de pH baixo (3,0) com temperatura elevada (70 °C) também apresentaram elevados teores de AR, entretanto neste caso, não houve a inversão da sacarose como o Tratamento 14. Mane e colaboradores (1998) relataram que em pH abaixo do 5,5 inicia-se a hidrólise da sacarose favorecendo a formação de melanoidinas. Panpaeet al. (2008) analisaram as perdas de sacarose na indústria do açúcar pela ação do pH e da temperatura e observaram que em pH 3,0 os teores de açúcares redutores aumentaram enquanto os de sacarose reduziram, concluindo que o processo de inversão de sacarose acontece de forma mais acentuada em soluções mais ácidas. A inversão de sacarose também foi notada pelos autores, de forma mais significativas com o aumento da temperatura.

Figura 16 -Valores de sacarose (µg/mL), glicose (µg/mL) e frutose (µg/mL) para os tratamentos de otimização do uso de ozônio para redução da cor do caldo

A seguir são apresentadas as três superfícies de resposta para glicose e frutose. Maiores teores de glicose e frutose (resultantes da inversão de sacarose) foram obtidos quando doses de ozônio entre 0 e 3,82 mg O₃/min foram associadas: a pH entre 1,64 e 3,0 (Figura 17a); ou a temperaturas entre 70 e 83,6°C (Figura 17b); e com temperaturas de 50 a 70°C com pH inferior a 3,0 (Figura 17c).

Figura 17 - Superfície de resposta para a interação das variáveis: (A) pH e dosagem de ozônio (mg O₃/min); (B) temperatura (°C) dosagem de ozônio (mg O₃/min); (C) temperatura (°C) e pH para obtenção dos valores de glicose e frutose (µg/mL) (açúcares redutores) do caldo de cana-de-açúcar através da otimização do processo de ozonização do caldo

4.2.4 Acidez total titulável de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros

As amostras com maiores valores de acidez (Tratamentos 1, 2, 5, 6 e 14) são os tratamentos que de acordo com o planejamento composto central (item 3.3.1), possuíam pH baixo, na faixa de 1,64 a 3,0, sendo que o Tratamento 14 dentre os 17 tratamentos, apresentava o pH mais baixo e ácido do planejamento composto central (pH=1,64). Teores muito elevados de acidez no caldo de cana-de-açúcar comprometem a produção de açúcar, afetando negativamente a qualidade do produto final, o que acaba por reduzir a eficiência do processo de produção e aumenta os custos devido à necessidade de um maior consumo de insumos para controlar a acidez (TASSO JÚNIOR et al., 2010). Os menores resultados para acidez foram obtidos nos Tratamentos 3, 4, 7 e 15 que possuíam valores de pH altos delimitados pelo planejamento composto central, na faixa de 7,0 a 8,36, sendo o Tratamento 15, aquele com o maior valor de pH (=8,36) e o que apresentou o menor valor de acidez (27,60 mg/mL). Desta forma, é possível relacionar as respostas obtidas para acidez total titulável das 17 amostras com os valores pH inicial e final dos tratamentos. O Tratamento 13, que recebeu maior dosagem de ozônio (3,82 mg O₃/min) teve aproximadamente 26% de redução no teor de acidez do caldo. Lima (2012) analisou o processo de clarificação do caldo de cana-de-açúcar através da aplicação de feixe de elétrons e radiação ionizante com cobalto-60, sendo que as maiores reduções nos teores de acidez total titulável foram obtidas nas amostras que foram irradiadas com altas doses (20 kGy).

Os valores para pH após o tratamento de 60 min de reação da otimização dos parâmetros na redução de cor por ozonização pouco variaram em relação aos valores iniciais como mostra a Figura 18, sendo que os tratamentos que apresentaram maiores variações de pH inicial e final foram os tratamentos 4, 8 e 15. Davis e colaboradores (1998) analisaram os efeitos da ozonização na redução da cor do açúcar e puderam notar que o pH das amostras diminuía, porém, sem apresentar qualquer tipo de efeitos significativamente negativos, sendo que, esta redução no pH se dava pela formação de ácidos orgânicos devido à degradação da sacarose. Desta forma, ainda segundo os pesquisadores, foi necessário o uso de agentes neutralizantes como cal ou soda cáustica para evitar a inversão da sacarose

e formação dos ácidos orgânicos, sendo que para valores de 250 ppm (250 mg/L) de ozônio adicionados as amostras, a redução do pH foi decerca de 0,5.

Figura 18 - Valores de pH inicial e final para as 17 amostras obtidas através da otimização dos parâmetros para redução da cor do caldo de cana-de-açúcar por ozonização

A seguir são ilustradas as três superfícies de resposta que relacionam os três fatores dosagem de ozônio, temperatura e pH contra os teores de acidez total titulável. Menores teores de acidez foram obtidos quando havia associação entre: pH entre 4,0 e 8,36 associado: a doses de ozônio 0 a 3,82 mg O₃/min (Figura 19a); ou a temperaturas entre 16,4 até 83,6 °C (Figura 19c); e teores de ozônio menores entre 0 e 0,58 mg O₃/min associadas a temperatura entre 16,4 até 83,6 °C (Figura 19b).

A **B** **C**

Figura 19 - Superfície de resposta para a interação das variáveis: (A) pH e dosagem de ozônio (mg O_3 /min); (B) temperatura ($^{\circ}C$) dosagem de ozônio (mg O_3 /min); (C) temperatura ($^{\circ}C$) e pH para obtenção dos valores de acidez total titulável (mg/mL) do caldo de cana-de-açúcar através da otimização do processo de ozonização do caldo

A ANOVA (Tabela 7) apresenta a análise de variância, para os teores de acidez total titulável. O modelo pode ser considerado significativo ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$), entretanto devido ao alto valor de F calculado para regressão e para a falta de ajuste em relação ao erro puro, o modelo obtido apresentou elevada falta de ajuste dos dados (BOX; WETZ, 1973).

Tabela 7 - Análise da variância para valores de acidez total titulável

FV	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	204533,9	3	68178,0	600,86*
Resíduo	1475,1	13	113,5	
Falta de Ajuste	1408,6	11	12875,6	387,35*
Erro Puro	66,5	2	33,2	
Total	206008,9	16		

*significativo a $p \leq 0,05$

4.2.5 Espectrometria de massas de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização pela otimização dos parâmetros

Dos 17 tratamentos delimitados pelo planejamento composto central (item 3.3.1) os Tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e o controle foram analisados quanto à composição de seus precipitados através da espectrometria de massas por MALDI-TOF/MS. Os íons de maior abundância obtidos na amostra controle e nos oito tratamentos são os íons que apresentam a razão de m/z 756,552, 780,552 e 871,571. Tais íons aparecem em todas as amostras, independente das condições as quais o tratamento foi realizado, mudando apenas a intensidade, contudo, todos pertencem à região característica dos fosfolipídios (m/z 700-1000), entretanto, não foi possível determinar com exatidão todos compostos através da razão m/z . Dentre os oito tratamentos analisados e o controle, os Tratamentos 3, 7 e o controle apresentaram maiores valores de cor ICUMSA (UI), bem como, uma maior intensidade do íon de m/z 871,571 e menores intensidades dos íons m/z 756,552 e 780,552 quando comparados aos demais tratamentos (1, 2, 4, 5, 6 e 8). Desta forma, pode-se relacionar o aumento de cor ICUMSA com a presença desses compostos, sendo que os tratamentos que tiveram menores cores apresentavam menores intensidades desses lipídios.

A Tabela 8 apresenta os valores de razão m/z de alguns íons obtidos, bem como, os tratamentos com seus parâmetros, identificando com “x” os íons obtidos

em cada tratamento. As fórmulas moleculares obtidas a partir da razão m/z de alguns íons estão representadas na tabela abaixo de sua respectiva razão m/z .

Tabela 8 - Relação m/z de íons e tratamentos do caldo de cana-de-açúcar ozonização

Tratamento (O ₃ ; pH; Temperatura)	m/z							
	650,438(C ₃₃ H ₆₅ O ₉ NP)	661,463	672,503	701,499	756,552(C ₄₀ H ₈₀ O ₈ NP)	780,552(C ₄₄ H ₇₉ O ₈ NP)	871,571	885,551
0 (0;0;0)					X	X	X	X
1 (0,58;3,0;30)					X	X	X	
2 (2,37;3,0;30)	X	X	X	X	X	X	X	
3 (0,58;7,0;30)					X	X	X	X
4 (2,37;7,0;30)			X		X	X	X	X
5 (0,58;3,0;70)					X	X	X	X
6 (2,37;3,0;70)	X	X			X	X	X	
7 (0,58;7,0;70)					X	X	X	
8 (2,37;7,0;70)		X			X	X	X	

Durante a moagem da cana-de-açúcar para obtenção do caldo, aproximadamente 40% do material lipídico contido na própria planta acaba se dispersando no caldo como material suspenso, enquanto o restante fica retido no bagaço residual da etapa da moagem. Tais lipídeos, as ceras, são encontrados na casca da planta de cana-de-açúcar e acabam por protegê-la de perdas de água e contra ataques microbiológicos (NAZATO et al., 2012). Tais lipídios provavelmente foram precipitados pela ação do ozônio. Sartori et al. (2014) observou o aumento de precipitados em caldo de cana-de-açúcar tratado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo que o aumento das doses de peróxidos utilizadas promovia um aumento de precipitado. Esta precipitação foi decorrente da interação entre a ação do peróxido de hidrogênio com não-açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar. O aumento ou diminuição de cor do caldo de cana-de-açúcar pela ação do ozônio não está relacionado ao surgimento de novos composto ou a eliminação dos compostos promotores da cor, mas sim a precipitação em maiores ou menores quantidades dos compostos coloridos já presentes no caldo.

A Figura 20 apresenta os espectros de massa obtidos para a amostra controle e para o oito tratamentos, sendo que os íons de maior destaque estão representados pelas suas razões de m/z .

Figura 20 -Espectros de massas obtidos por MALDI-TOF/MS referentes ao caldo de cana-de-açúcar submetido à ozonização em diferentes doses, pH e temperaturas

4.3 Resultados das análises realizadas para o perfil cinético de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização

4.3.1 Cor ICUMSA de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização em cinética química

A cor ICUMSA foi monitorada pelo período de quatro horas (240 min) para cada um dos 17 tratamentos do planejamento composto central (item 3.3.1). Os perfis cinéticos de cada tratamento estão descritos na Figura 21.

Os tratamentos que apresentaram as maiores reduções de cor ICUMSA ao longo dos 240 min de reação foram os Tratamentos 4, 8, 9, 10, 11, 13 e 14. Em comum estes tratamentos, recebiam doses de ozônio entre 2,37 mg O₃/min e 3,82 mg O₃/min, sendo que o Tratamento 12, que teve ausência de ozônio ao longo da reação, teve um aumento relativo no decorrer das quatro horas de reação.

A grande maioria dos tratamentos apresentou reduções nos índices de cor ICUMSA do caldo após 60 min de reação, entretanto, os Tratamentos 7, 8 e 13 e os pontos centrais 9, 10 e 11, realizados nas mesmas condições apresentaram reduções da cor ICUMSA logo no início do tratamento (a partir de 5 min). O Tratamento 15 que apresentou uma redução significativa nos valores de cor ICUMSA foi realizado sob condições de pH elevado (pH=8,36). Davis et al. (1998) reportaram uma diminuição substancial nos valores de cor medida a pH 9, indicando que os pigmentos presentes na plantas, como os flavonóides e outras compostos fenólicos foram fortemente atacadas sob ação do ozônio em dosagens de 250 ppm.

Os Tratamentos 7 e 8 foram realizados em condições de temperatura elevada (70 °C), mesmo pH (7,0), mas com dosagens de ozônio distintas, tendo o Tratamento 7 recebido 0,58 mg O₃/min e o Tratamento 8 recebido 2,37 mg O₃/min. A partir dos perfis cinéticos foi possível notar redução na cor ICUMSA muito mais acentuada no oitavo tratamento que recebeu a maior dose entre os dois.

Os Tratamentos 1, 3, 16 e 17, apresentaram aumentos significativos nas últimas horas de reação. Os Tratamentos 1 e 3 tiveram a mesma temperatura de reação (30 °C) e a mesma dosagem de ozônio (0,58 mg O₃/min), os valores de pH porém, foram diferentes entre eles. Os Tratamentos 16 e 17 foram conduzidos em condições de temperaturas extremas, sendo o Tratamento 16 a 16,4 °C e o Tratamento 17 a 83,6 °C, as condições de dosagem de ozônio e pH foram as

mesma para ambos os tratamentos, sendo 1,34 mg O₃/min e pH 5,0. A baixa dosagem de ozônio nestes tratamentos pode ter favorecido a oscilação nos valores de cor ao longo de 240 min.

Figura 21 - Perfil cinéticos dos valores de cor ICUMSA obtidos após 240 min. nos 17 tratamentos de ozonização do caldo de cana-de-açúcar com diferentes valores de temperatura (°C), pH e dose de ozônio (mg O₃/min)

4.3.2 Teores de açúcar de caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização em cinética química

Os dados das concentrações de sacarose, glicose e frutose estão demonstrados na Figura 22. As amostras coletadas ao longo dos 240 min de reação foram analisadas em cromatografia de íons e os cromatogramas dos tempos 0 e 240 min dos 17 tratamentos estão ilustrados no item Apêndice.

Dos 17 tratamentos, três apresentaram maiores quantidades de glicose e frutose ao longo do tempo, sendo que no Tratamento 14 não foi possível detectar quantidades de sacarose a partir de 150 min de reação. O décimo quarto tratamento foi realizado em condições de pH extremamente baixo (pH=1,64), associado a temperatura elevada (50 °C) o que certamente favoreceu a degradação de sacarose em glicose e frutose. Os Tratamentos 5 e 6 apresentavam a combinação de pH baixo (3,0) e temperatura elevada (70 °C) diferenciando apenas na dosagem de ozônio, sendo que o quinto tratamento recebeu 0,58 mg O₃/min, enquanto o sexto tratamento, que teve maior degradação de sacarose entre os dois, recebeu 2,37 mg

Figura 22 - Perfil cinéticos dos valores de sacarose, glicose e frutose obtidos após 240 min nos 17 tratamentos de ozonização do caldo de cana-de-açúcar com diferentes valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH e dose de ozônio ($\text{mg O}_3/\text{min}$)

4.3.3 Análises microbiológicasde caldo de cana-de-açúcar clarificado por ozonização em cinética química

Dos 17 tratamentos realizados através da cinética da redução da cor ICUMSA (item 3.3.2), cinco foram selecionados, de acordo com a redução da cor ICUMSA, para a análise quanto aos teores totais de bactérias mesófilas e de fungos (bolores e

leveduras). Foram analisados as amostras coletadas nos tempos 0 (zero) e 240 minutos dos seguintes tratamentos: 4, 8, 9, 13 e 14.

O objetivo foi avaliar a presença de microrganismos e verificar se além de promover a redução da cor do caldo de cana-de-açúcar, o ozônio também foi eficiente no controle microbiano, em especial, bacteriano. Devido à diferenciação nos parâmetros dos tratamentos, as diluições para cada uma das amostras foi diferente.

Chen e Chou (1993) relataram que os microrganismos de maior impacto no processo de fabricação de açúcar são as bactérias, bolores e leveduras, sendo que as bactérias presentes no xarope e no açúcar final são geralmente aquelas que sobreviveram ao processo de produção e refinação do açúcar e os bolores e leveduras podem ser encontrados no açúcar final. O ozônio é um poderoso agente oxidante, capaz de promover a redução ou até mesmo a inibição do crescimento de bactérias, bolores, leveduras, vírus e protozoários, sendo que seu poder de controle é dependente inteiramente do tempo e da dosagem de ozônio aplicada, além da característica do microrganismo envolvido (LAPOLLI et al. 2003; SILVA et al., 2011).

A Tabela 9 apresenta a contagem de unidade formadora de colônias (UFC) de bactérias mesófilas totais, avaliadas para as amostras controle (tempo zero) e na amostra final (240 min) de cada um dos cinco tratamentos analisados.

Tabela 9 - Número de unidade formadora de colônias (UFC) de bactérias mesófilas totais encontradas nos tempos 0 e 240 minutos dos cinco tratamentos com maiores reduções de cor ICUMSA pelo processo de ozonização

Tratamento	TEMPO	
	0 min	240 min
4	$27,67 \times 10^{1a}$	$0,33 \times 10^{4b}$
8	32×10^{3a}	1×10^{1b}
9	$15,67 \times 10^{1a}$	$8,33 \times 10^{1b}$
13	11×10^{4a}	$3,33 \times 10^{3a}$
14	Ausente ^a	Ausente ^a

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey, 5%)

O ozônio mostrou-se eficiente na redução do número de bactérias mesófilas totais nas amostras de caldo de cana-de-açúcar ozonizadas, sendo que dos cinco tratamentos analisados, quatro apresentaram redução na quantidade de bactérias mesófilas totais. O Tratamento 14, não apresentou presença de microrganismos na

amostra de tempo zero e na amostra de quatro horas. A ausência de microrganismos neste tratamento se deve provavelmente ao baixo pH (pH=1,64) que inibiu o crescimento bacteriano. O ozônio age primeiramente na membrana celular bacteriana (SILVA et al., 2011), sendo que bactérias gram-negativas são mais sensíveis a sua ação, uma vez que possuem menores quantidades de peptídeoglicano na constituição de sua parede molecular, o que as torna menos resistente a ação do ozônio. Di-Tanno, Kozusny-Andreani e Zângaro (2014) caracterizaram e quantificaram a microbiota presente em amostras de caldo de cana-de-açúcar misto, obtido logo após a moagem da cana-de-açúcar, e clarificado e obtiveram a presença de *Bacillus* sp em ambos os caldos e *Micrococcus* sp no caldo misto, entretanto um maior número de UFC/mL foi obtido no caldo clarificado o que segundo os autores, aconteceu devido a sua maior manipulação durante o processamento. O crescimento da maioria das bactérias ocorre na presença de pH na faixa de 6,5 a 7,5, há entretanto, as bactérias acidófilas que tendem a crescer em meios de pH ácido. A eficiência da ação do ozônio é maior em pH neutro, já em pH ácido ocorre a formação de radicais livre de hidroxila que possuem alto poder de oxidação que acabam sendo os responsáveis pela desinfecção (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; LANGLAIS; RECKHOW; BINK, 1991). Os outros quatro tratamentos, que se apresentaram eficientes no controle de microrganismos, apresentavam pH neutros ou próximo a esta faixa, sendo os Tratamentos 4 e 8 com pH inicial de 7,0 e os Tratamentos 9 e 13, com pH 5,0. Antier (1996) analisou as implicações na qualidade do açúcar e o prejuízo causado pelo não controle microbiológico durante a produção e notou uma redução significativa na quantidade de bactérias mesófilas quando foi feito o aquecimento a 80 °C do caldo, entretanto o autor destaca que esse tipo de bactéria não interfere necessariamente nos teores de sacarose contidos no caldo.

As amostras também foram analisadas quantos ao número de unidade formadora de colônias para bolores e leveduras e seus resultados estão dispostos na Tabela 10. Novamente as amostras controle e 240 min do Tratamento 14 não apresentaram nenhum microrganismo mesmo sendo feito o plaqueamento das amostras puras, sem qualquer diluição, como para as análises bactérias mesófilas totais. As amostras de 240 minutos dos tratamentos 8, 9 e 13 também não apresentaram presença de bolores e leveduras, mostrando que além de reduzir os teores de cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar o ozônio ainda é um eficiente

agente fungicida. A ação do ozônio vem se mostrando bastante eficiente contra fungos e micotoxinas, apesar dos fungos tenderem a ser mais resistente (RUSSEL; HUGO e AVLIFFE, 1999; KIM; YOUSEF; DAVE, 1999).

Tabela 10 - Número de unidade formadora de colônias (UFC) de bolores e leveduras totais encontradas nos tempos 0 e 240 minutos dos cinco tratamentos com maiores reduções de cor ICUMSA pelo processo de ozonização

Tratamento	TEMPO	
	0 min	240 min
4	$26,33 \times 10^3$ ^a	$9,67 \times 10^1$ ^b
8	$12,00 \times 10^1$ ^a	Ausente ^a
9	$3,33 \times 10^1$ ^a	Ausente ^a
13	$3,00 \times 10^3$ ^a	Ausente ^b
14	Ausente ^a	Ausente ^a

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey, 5%)

As condições climáticas, bem como, os sistemas de colheita e plantio podem minimizar ou acentuar a contaminação da cana-de-açúcar, desta forma, os níveis de populações microbianas presentes durante todo o processo de fabricação de açúcar podem ser altos (ANTIER, 1996).

4.3.4 Redes Neuras Artificiais (RNA)

A Rede Neural Artificial (RNA) foi escolhida tendo como objetivo esclarecer as interações entre as propriedades do material estudado, o caldo de cana-de-açúcar, e o uso do ozônio.

Os valores das variáveis, da camada de entrada controláveis, foram determinados com base nos experimentos descrito no item 3.3.2. Como valores de resposta foram utilizados os valores obtidos para cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar pela análise cinética (item 4.3.1). As entradas do modelo foram o tempo (min) das reações cinéticas, temperatura (°C), pH, dosagem de ozônio (mg O₃/min) e Brix%caldo.

As redes foram testadas com diferentes números de neurônios, pois se o número de neurônios for muito elevado, o esforço computacional é grande e a rede tem uma generalização fraca, porém se o número de neurônios é muito pequeno a rede pode não conseguir a desempenho desejado (HAGAN et al., 2014). Desta forma, foram testadas as redes de 4 a 10 neurônios para se obter a melhor condição de trabalho.

A Figura 23 representa graficamente a rede neural utilizada, com as variáveis de entrada e a de saída. Esta rede neural é do tipo acíclica e contém três camadas. A camada de entrada permite as apresentações dos padrões obtidos à rede; a camada oculta ou camada intermediária é onde ocorre a maior parte de processamento dos dados através das conexões ponderadas; e a camada de saída é onde o resultado final é concluído e apresentado (TATIBANA;KAETSU, 2009).

Figura 23 - Representação esquemática da rede neural usada com as variáveis de entrada e saída. (Fonte: Adaptado SARTORI,2014)

O melhor número de neurônios foi escolhido através de dois critérios: foi avaliada a análise da variação do resíduo médio de cada neurônio, o qual deveria ser o menor valor possível; e foi avaliada também a análise dos coeficientes angular e de determinação de cada neurônio que deveriam ser os mais próximos de 1.

As Figuras 24 e 25 apresentam, respectivamente, os valores de coeficiente angular e de determinação e os valores de resíduo médio de 4 a 10 neurônios. Pode-se observar que os valores de resíduo médio para 9 e 10 neurônios foram os mais baixos e os valores dos coeficientes angular e de determinação para 9 e 10 neurônios foram mais próximos de 1. Como os valores obtidos para 10 neurônios foram muito próximos aos obtidos para 9 neurônios, optou-se pelo uso de 9 neurônios, que proporcionou um bom ajuste as redes neurais.

Figura 24 - Coeficiente de determinação (R2) e angular (Coef) em função do número de neurônios (NH= 4 a 10, nº de apresentações = 20000 e LS/TS= 3). (A) Dados LS; (B) Dados TS

Figura 25 - Valores dos resíduos médios em função dos neurônios (NH= 4 a 10, nº de apresentações = 20000 e LS/TS= 3)

A Tabela 11 apresenta a configuração de rede neural de 9 neurônios a ser usada na simulação para a resposta de cor ICUMSA.

Tabela 11 - Pesos da rede neural ajustada (W1): pesos entre a camada de entrada e a camada oculta. (W2): pesos entre a camada oculta e a camada de saída (NH = 9; 20.000 apresentações)

W ₁							W ₂	
Neurônios	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	bias	Neurônios	
1	-4,7694	4,8023	8,5146	-6,3379	-11,072	0,057486	1	-1,0741
2	-0,74926	2,0032	10,717	-6,8666	-3,3143	0,41383	2	5,6419
3	3,1215	-14,188	3,5177	-9,7605	3,2388	0,85468	3	4,7449
4	1,9912	-8,6376	7,9636	4,7042	-1,4115	0,21069	4	-4,9562
5	0,15787	-8,0218	0,12836	4,3272	-1,7557	0,22796	5	5,557
6	2,5397	-20,272	8,8696	2,7994	-3,5722	0,43331	6	-6,6124
7	2,2406	3,398	-5,9289	-3,8501	6,1764	0,24142	7	-4,7983
8	3,7688	0,17036	-9,3549	2,2254	-4,9304	0,50309	8	5,0069
9	1,0147	-15,765	5,9934	-0,21152	11,293	0,69196	9	2,6674
							bias	0,56664

X₁: Tempo (min); X₂: Temperatura (°C); X₃: pH; X₄: Dosagem de O₃; X₅: Brix

Em seguida, foi feita a avaliação da importância relativa das variáveis baseada no método HIPR ("Holdback Input Randomization Method"), proposto por Kemp, Zaradic e Hansen (2007). O método baseia-se na comparação do erro causado em cada saída do modelo por perturbações aleatórias impostas a cada uma das variáveis de entrada.

Para isso, utiliza-se a base de dados original e o modelo de rede neural ajustado a esses dados, aplicando-se perturbações aleatórias em cada variável de entrada, mantendo-se as demais variáveis com seus valores reais medidos. O critério de avaliação da importância relativa das variáveis de entrada é o erro entre o valor de cada saída calculado pela rede neural e os valores medidos, causado pela aplicação de tais perturbações. As perturbações aleatórias são aplicadas a cada variável de entrada isoladamente e para todas as observações do conjunto de dados.

Os valores do erro quadrático médio, que constituem o critério de avaliação da importância relativa das variáveis de entrada em relação a cada saída da rede, referem-se às perturbações nas variáveis de entrada.

O procedimento foi repetido 1000 vezes para cada variável de entrada. A Figura 26 apresenta a porcentagem do erro quadrático médio de cada variável. Pode-se notar que a variável que demonstrou maior importância quando comparada com as demais variáveis foi o Brix%caldo, com aproximadamente 45% do valor total. A variável com menor importância para rede foi o tempo, com 4,34%.

Figura 26 - Importância das variáveis da rede neural (NH=9, n° de apresentações=20000 e LS/TS= 3)

Com base nos pesos obtidos através da rede neural, que são responsáveis por ponderar as informações de entrada, foram feitas simulações para verificar o ajuste da rede de 9 neurônios comparando os resultados obtidos experimentalmente com os obtidos na simulação.

A Figura 27, apresenta os 17 tratamentos comparando os resultados obtidos experimentalmente e os obtidos na simulação para cor ICUMSA. Os valores obtidos na simulação reproduziram similarmente os resultados obtidos experimentalmente, mostrando que a rede foi capaz de prever os resultados de cor ICUMSA.

Figura 27 - Valores de cor ICUMSA obtidos na simulação e experimentalmente com diferentes dados de entrada

Ao observar os valores obtidos para os tratamentos já realizados e os valores obtidos na simulação de redes neurais para cor ICUMSA, é possível afirmar que o programa da rede neural apresentou um bom ajuste na maioria dos casos.

Os Tratamentos 3, 11 e 12 foram os que não apresentaram um bom ajuste, o que ocasionou uma diferenciação entre os valores obtidos pela simulação e os valores experimentais de cor ICUMSA utilizados na entrada da rede neural. Apesar de não ser uma das variáveis de maior impacto, é possível observar a influência da dosagem de ozônio na redução da cor ICUMSA, uma vez que os dois tratamentos tiveram as mesmas condições de temperatura (50 °C) e mesmo pH (5,0) diferindo apenas na dosagem de ozônio, uma vez que o Tratamento 12, realizados sem a adição de ozônio, não obteve reduções significativas para cor do caldo, enquanto o Tratamento 13, que recebeu a maior dosagem de ozônio de 3,82 mg O₃/min, apresentou uma das maiores reduções de cor ICUMSA dentre os 17 tratamentos realizados.

Foi possível relacionar a temperatura e o pH, que apresentaram grande influência, uma vez que altas temperaturas (70 °C) com pH 7,0 apresentaram a melhor redução da cor ICUMSA ao longo das quatro horas. O ozônio se mostrou pouco expressivo não só através das análises pelas redes neurais, mas é possível notar isso pelos gráficos de redução de cor ICUMSA uma vez que não houve um padrão a ser seguido relacionando a redução da cor com altos ou baixos teores de ozônio especificamente, já que tratamentos com dosagens de 1,34 mg O₃/min ou de 2,37 mg O₃/min ou o máximo de 3,82 mg O₃/min apresentaram reduções da cor satisfatórias. De maneira geral é possível observar um bom ajuste pela rede, demonstrando que foi feito um bom treinamento.

5 CONCLUSÃO

Os fatores estudados, temperatura (°C), pH e dosagem de ozônio, apresentaram influência em relação à diminuição da cor ICUMSA final do caldo de cana-de-açúcar ozonizado. Através da otimização do processo de ozonização do caldo de cana-de-açúcar foi possível determinar as condições ótimas da redução da cor ICUMSA, sendo temperatura de 50 a 70 °C, pH entre 1,64 e 5,0 e dosagens de ozônio de 1,34 mg O₃/min até 3,82 mg O₃/min.

A análise de cinética química de redução da cor ICUMSA permitiu avaliar que a redução da cor do caldo de cana-de-açúcar ozonizado aconteceu de forma mais acentuada após 60 min de reação em grande parte dos tratamentos. E que condições de pH baixo, de 1,64 a 3,0 associados ou não a altas temperaturas (50 e 70 °C) levam a degradação da sacarose em açúcares redutores (glicose e frutose), o que acaba por inviabilizar o processo, mesmo que ocorra a redução da cor do caldo de cana-de-açúcar, uma vez que o produto de principal interesse para a produção de açúcar é a sacarose.

As análises microbiológicas do caldo de cana-de-açúcar ozonizado mostraram que além de ser eficiente na redução da cor do caldo, o ozônio é ainda um excelente agente antimicrobiano, controlando os teores de bactérias mesófilas totais e de bolores e leveduras.

A rede neural apresentou um bom ajuste, tendo os valores de simulação muito próximos aos valores experimentais, para a maioria dos tratamentos em relação a cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar ozonizado. Dentre as variáveis estudadas a que apresentou maior influência foi o Brix%caldo, seguido da temperatura (°C) e pH. A dosagem do ozônio apresentou baixa influência assim como o tempo (min) que foi a variável de menor influência entre as cinco.

A partir da análise de espectrometria de massas dos precipitados de 8 tratamentos pode-se observar que não houve a formação de novos compostos após uma hora de reação de ozonização do caldo, mas sim alterações nas quantidades dos compostos já existentes, identificados como lipídios, o que mostra que o aumento ou diminuição de cor do caldo de cana-de-açúcar não está relacionado ao surgimento de novos composto mas sim a precipitação em maiores ou menores quantidades dos compostos já presentes no caldo.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA - **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos 2001**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 22 nov. 2015
- ANDRADE, L.A.B.; LIMA, J.M.S. **Cultivo de cana-de-açúcar para produção de cachaça**. Viçosa, CPT, 136p., 2007.
- ANTIER, P. Clarification developments at Bois-Rouge. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, Durban, v.70, p.149-152, 1996.
- AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 13th ed. Washington: AOAC, 1015p., 1980.
- AOKI, I.V. **Clarificação de caldos de cana: comparação entre os processos de sulfitação e carbonatação**. 1987. 177p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.
- ARAÚJO, F.A.D. Processo de clarificação do caldo de cana pelo método da bicarbonatação. **Revista Ciências e Tecnologia**, Recife, v.1, n.1, p.1-6, 2007.
- AUN, M.V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J.C.; KALIL, J; AGONDI, R.C.; MOTTA, A.A. Aditivos em alimentos. **Revista Brasileira Alergia Imunopatol**. São Paulo, v. 34, n. 5, p. 177-186, 2011.
- BARRETO, J.M. **Introdução às Redes Neurais Artificiais**. Departamento de Informática e Estatística – UFSC, Florianópolis, 2002. Disponível em: <http://educaonline.eng.br/unisanta/html/download/aulas/rna.pdf>> Acesso em: 11 nov. 2015
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP, v.1.401p., 2001.
- BRAZ, H. Garapa boa deve vir de cana apropriada. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, Suplemento Agrícola, p. 1-3, 27 ago. 2003.
- BOURZUTSCHKY, H.C.C. Color formation and removal: options for the sugar and sugar refining industries: a review. **Zuckerindustrie**, Berlin, v. 130, n. 7, p. 545-553, 2005.
- BOX, G.E.P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function**. Local: University of Wisconsin, 95p. (Technical Report, 9), 1973.
- CAMARGO, C. A. **Conservação de Energia na Indústria do Açúcar e do Alcool: Manual de Recomendações**, IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 693p., 1990.

- CHANDRA, R.; BHARAGAVA, R.N.; RAI, V. Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 4648-4660, 2008.
- CHEN, J.W.; HUI, C.; KELLER, T.; SMITH, G. Water: physical chemical wastewater treatment. **AIChE Symposium Series**, New York, v.73, n.166, p.206-212, 1976.
- CHEN, J.C.P.; CHOU, C. Cane Sugar Handbook. **A manual for cane sugar manufacturers and their chemists**. 12th. New York, John Wiley, 1120p., 1993.
- CHOU, C.C.; IQBAL, K.; MIN, Y.G.; GAO, D.W.; DUFFAUT, E. SAT process as a replacement for sulfitation in mill white sugar production. **International Sugar Journal**, Tunbridge Wells, v. 108, n. 1289, p. 247-253, 2006.
- COLLADO-FERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L.; PINO-NAVARRO, R. Evaluation of turbidity: correlation between Kerstet Turbidimeter and nephelometric turbidimeter. **Food Chemistry**, Langford Lane, v. 7, p. 563-566, 2000.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento - **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar– Safra 2015/16- Primeiro Levantamento**, Brasília, n. 1, v. 2, dez. 2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf Acesso em: 21 jan. 2016
- COPERSUCAR. **Apostila do curso de Engenharia Açúcareira – Processo de fabricação do açúcar – Parte I**. Centro de Tecnologia Copersucar– CTC. Copersucar, Piracicaba, 145p., 1987.
- CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, Itajubá, v. 2, n. 2, p. 1-17, 1992.
- DAVIS, S. B.; MOODLEY, M.; SINGH, I.; ADENDORFF, M.W. The use of ozone for colour removal at the malelane refinery. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, Durban, v.72, p.255-260, 1998.
- DAVIS, S.B. The chemistry of colour removal: a processing perspective. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 75, p. 328-336, 2001.
- DELGADO, A.A.; CÉSAR, M.A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. v.2, Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1061p., 1977.
- DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Rima, v. 2, 784 p., 2005.

DI-TANNO, M.F.P.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I.; ZÂNGARO R.A. **Caracterização microbiana de contaminantes em caldo de cana de misto e clarificado** - Encontro de Pós-Graduação e Iniciação Científica – Universidade Camilo Castelo Branco, 2014. Disponível em: <http://www.epginic.com.br/arquivos/2014/epg/ciencias_saude/289-EPG233.pdf> Acesso em: 11 set.2015

EATON, A.D.; FRANSON, M.A.H. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20th Ed. Washington: American Public Health Association, 1200p., 2000.

EDYE, L. A.; CLARKE, M.A. Sucrose loss and color formation in evaporators. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, New Orleans, v. 22, p.238, 1995.

EGGLESTON, G. Hot and cold lime clarification in raw sugar manufacture II: Lime addition and settling behavior. **International Sugar Journal**, Tunbridge Wells, v. 102, n. 1221, p. 453-457, 2000.

ENGENHO NOVO. **Clarificação de xarope por flotação**. Rio de Janeiro: TecEn Comercial: 7p., 2008.

ESKIN, N.A.M.; HENDERSON, H.M.; TOWNSEND, R.J. **Biochemistry of foods**. New York: Academic Press. 240p., 1971.

EVANGELISTA, J. Tecnologia dos Alimentos, 2^o edição – Editora Atheneu, São Paulo, 652p., 2000.

FAVA, A.R. Atletas ingerem garapa para repor energia. **Jornal da Unicamp**, edição 250, de 3 a 9 de Maio de 2004. Disponível em: <www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/maio2004/ju250pag8a.html>. Acesso em: 05 fev. 2015

FAVERO, D.M.; RIBEIRO, C.S.G.; AQUINO, A.D. **Sulfitos**: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população, Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, v. 18, n. 1, p.1-20, 2011.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3th ed. New York: Ed. Marcel Dekker, 1262p., 1996.

FERNANDES, A.P.; SANTOS, M.C. dos; FERREIRA, M.M.C.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. Aplicação de análise quimiométrica na diferenciação de açúcar. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 27, 2004, Salvador. **Anais...** São Paulo: Editora SBQ, Pôster QA-178, 2004.

GODOY, O.P.; TOLEDO, F.F. **Plantas extrativas**: cana-de-açúcar, amendoim, girassol, mamona, mandioca, soja. Piracicaba: ESALQ, v. 1, 352p., 1972.

GODSHALL, M.A., GRIMM, C.G. Leucoanthocyanins, aconitic acid and turbidity in sugarcane. An update on cane colourants. **Sugar Processing Research Institute, INC., Conferences**, p.334-357, 1994.

GOMEZ, M.; PEREZ, R.; RAMOS, R. Method of sugar refining with ozone. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, New Orleans, v.17, n. 3, p. 2066-2071, 1980.

GRAHAM, D.M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.6, p.72-75, 1997.

HAGAN, M. T.; DEMUTH, H. B.; BEALE, M.H.; JESÚS, O. **Neural Network Design**, 2nd Edition, 1012p., 2014. Disponível em: <<http://hagan.okstate.edu/NNDesign.pdf>>. Acesso em: 11 out. 2015

HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar**. 2009, 148p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos ao Programa) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods**: A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 307p., 1984.

HEALTH CANADA. **Sulphites**: One of the ten priority food allergens. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/pubs/securit/2012-allergen_sulphitesulfites/2012-allergen_sulphites-sulfites-eng.Pdf>. 2012. Acesso em: 10 fev. 2015

HONIG, P. **Principles of sugar technology**. New York: Elsevier Publishing, v. 1, 765p., 1953.

HUGOT, E. **Manual da Engenharia Açucareira**. São Paulo: Mestre Jou, v.1. 544p., 1977.

IC APPLICATION NOTE P-48. **Glucose, fructose and sucrose applying pulsed amperometric detection using the 930 Compact IC Flex**. Disponível em: <http://www.metrohm.co.th/news/20140605_METROHM_ANALYSIS_OF_GLUCOSE_FRUCTOSE_AND_SUCROSE_IN_FOOD>. Acesso em: 03 ago. 2015

ICUMSA - Method G.S. 2/3-9. **The determination of sugar solution colour at 7.0** - Accepted. International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis, 2005.

JORNALCANA - **Europa importará do Brasil açúcar cristal sem enxofre**. 2005. Disponível em: <<https://www.jornalcana.com.br/europaimportaradobrasilacucarcristalsemenxofre/>> Acesso em: 1 nov. 2015

JORNALCANA - **Fenasucro&Agrocana**: Tecnologia substitui o enxofre por ozônio na produção do açúcar. 2011. Disponível em: <<https://www.jornalcana.com.br/fenasucroagrocanatecnologiasubstituioenxofreporozonionaproducaodoacucar/>> Acesso em: 1 nov. 2015.

JORNALCANA - **Ozônio como alternativa para a redução da cor do açúcar**. 2013. Disponível em: <<https://www.jornalcana.com.br/ozoniocomoalternativaparaareducaodacordoacuozo/>> Acesso em: 1 nov. 2015.

KEMP, S.J.; ZARADIC, P.; HANSEN, F. An approach for determining relative input parameter importance and significance in artificial neural networks, **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 204, p. 326-334, 2007.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KUNZ, A.; FREIRE, R.S.; ROHWEDDER, J.J.R.; DURAN, N.; MANSILLA, H.; RODRIGUEZ, J. Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 426-428, 1999.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D.A.; BRINK, D.R. **Ozone in water treatment: application and engineering**. Chelsea: AWWARF, Lewis Publishers, 568p., 1991.

LAPOLLI, F.R.; SANTOS, L.F.; HÁSSEMER, M.E.N.; AISSE, M.M.; PIVELI, R.P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R.F. (Coord.). **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas**: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica. Vitória: PROSAB, p.169-208, 2003.

LIMA, R.B. **Processo de clarificação do caldo de cana-de-açúcar aplicando elétrons acelerados**. 2012. 61p. Dissertação de (Mestrado em Ciência na área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F.; VICENTE, E. Sulfites em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.

MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F.; ALMEIDA, C.A.S.; VICENTE, E. Analytical determination of sulphites in fruit juices available on the Brazilian market. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 3, p. 226-233, 2008.

MANE, J.D.; PACHPUTE, S.P.; PHADNIS, S.P. Effects of hydrogen peroxide treatment on cane syrup. **International Sugar Journal**, London, v. 100, n. 1193, p. 210-212, 1998.

MANSILLA, H.D.; YEGER, M.C.; FREER, J.; RODRÍGUEZ, J.; BAEZA, J. Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry. **Water Science Technology**, London, v. 35, n. 4, p. 273-278, 1997.

MANTELATTO, P.E. **Estudo do processo de cristalização de soluções impuras de sacarose de cana-de-açúcar por resfriamento**. 2005. 235p. Dissertação de (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

MARQUES, M.O.; MARQUES, T.A.; TASSO JÚNIOR, L.C. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 170p., 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 1 nov. 2015

MOODLEY, M.; DAVIS, S.B.; ADENDORFF, M. Full scale decolourisation trials with ozone. **International Sugar Journal**, Tunbridge Wells, v. 101, n. 1203, p. 165-170, 1999.

NASCIMENTO, C.A.O.; GIUDICI, R.; GUARDANI, R. Neural network based approach for optimization of industrial chemical processes. **Computers and Chemical Engineering**, New York, v. 24, n.10, p. 2303-2314, 2000.

NAZATO, C.; FERRAZ, S.C.U.; VILEA, F.Z.; TORRES, N.H.; SILVA, D.F.C.; HARDER, M.N.C.H. Cera de Cana-de-Açúcar (*Saccharum Officinarum* L.) na Formulação de um Brilho Labial a Partir de Extração Simples e por Bioetanol. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.14, n.4, p.389-396, 2012.

OLIVEIRA, D. T.; ESQUIAVETO, M. M. M.; SILVA JUNIOR, J. F. Impacto dos itens da especificação do açúcar na indústria alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol.27, n.1, pp. 99-102. Ago., 2007.

PAPAZIAN, R. **Sulfites**: Safe for most, dangerous for some. 2011. Disponível em: <www.fda.gov/fdac/features/096_sulf.html>. Acesso em: 07 fev. 2014

PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar**: Cultivo e utilização. Campinas, Fundação Cargil, v. 1, 431p., 1987.

PATON, N.H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Pt I. Determination of chlorogenic acid and other phenolics in sugar cane by HPLC, **International Sugar Journal**, London, v.94, n. 1123, p. 157-160, 1992.

PANPAE, K.; JATURONRUSMEE, W.; MINGVANISH W.; NUNTIWATTANAWONG, C.; CHUNWISIT S. SANTUDROB, K.; TRIPHANPITAK S. Minimization of sucrose losses in sugar industry by pH and temperature optimization. **The Malaysian Journal of Analytical Sciences**, Bangi, v. 12, n. 3 p.513–519, 2008.

PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo, Nobel: STAB, 245p., 1989.

PENNINGTON, N.L.; BAKER, C.W. **Sugar**: User's Guide to sucrose. AVI Books, New York, 332p., 1990.

POPOLIM, W.D. **Análise de sulfitos em sucos de frutas e estimativa de seu consumo por escolares**. 2009. 155p. Tese de (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade; Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B.; AVLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.** 3rded. Oxford: Blackwell Science, 826p., 1999.

SANTOS, F.A. **Análise de trilha dos principais constituintes orgânicos e inorgânicos sobre a cor do caldo em cultivares de cana-de-açúcar.** 2008. 50p. Dissertação de (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SARTORI, J.A.S. **Cinética química do decaimento de cor ICUMSA de caldo de cana-de-açúcar por reação de oxidação com peróxido de hidrogênio em reatores de fase homogênea.** 2014. 116p. Dissertação de (Mestrado na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

SARTORI, J. A. S.; GALAVERNA, R.; EBERLIN, M. N.; CORRÊA, N. T.; MANDRO, J. L.; AGUIAR, C. L. Elucidation of color reduction involving precipitation of non-sugars in sugarcane (*Saccharum* sp.) juice by Fourier-Transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Journal of Food Processing and Preservation**, Malden, 2014, p. 1-6. Disponível em: <
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.12417/abstract>> Acesso em: 20 nov. 2015

SEaD/UFSCar. **Estrutura molecular da frutose, glicose e sacarose.** 2011, Disponível em:<<
<http://livresaber.sead.ufscar.br:8080/jspui/handle/123456789/535>>> Acesso em: 20 set. 2015

SHIMADZU. **Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry.** Disponível em: <
<http://www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/princpl1.html>> Acesso em: 13 set. 2015

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R. F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análises Microbiológica de Alimentos.** 3ed. São Paulo: Livraria Varela, 552p., 2007.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

SPENCER, C.L.; MEADE, G.P. **Manual Del azúcar de caña.** 9 ed. Barcelona: Montaner y Simon, 940p., 1967.

STUPIELLO, J.P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização.** Campinas: Fundação Cargill, p. 30-51, 1987.

STUPIELLO, J.P. Pontas de cana: problema industrial? **Stab**, Sociedade dos Técnicos Açúcareiros e Alcoleiros do Brasil, Piracicaba, 2000, v.18, p.12, 2000.

SOUZA, J. **Estudo da eficiência de alguns polielitrólitos utilizados na clarificação do caldo de cana.** 1988. 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz De Queiroz," Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

TASSO JUNIOR, L.C.; SILVA, J.D.; SILVA NETO, H.F.; MARQUES, D.; MARQUES, M.O. Variação na acidez do caldo de cultivares de cana-de-açúcar aptas para o corte no meio de safra. Enciclopédia Biosfera. **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.6, n.11,p.8, 2010.

TATIBANA, C. Y.; KAETSU, D. **Aplicações de Redes Neurais Artificiais**, 2009 Disponível em: <<http://www.din.uem.br/ia/neurais>>. Acessado em 10 out.2015

TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. **Food Technology**, Chicago, v.40, n. 6, p.47-52, 1986.

TEIXEIRA, C.P.B.T.; JARDIM, W.F. **Processos oxidativos avançados**: conceitos teóricos. Campinas: UNICAMP, v.1 (Caderno Temático, 3), 2004.

TFOUNI, S.A.V.; VITORINO, S.H.P.; TOLEDO, M.C.F. Efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 76-82, 2007.

TORRES, E.A.F.S.; REGÊ FERREIRA, A.F.; RÍMOLI, C.D. Estudos das propriedades desinfetantes do ozônio em alimentos. **Higiene Alimentar**, Itapetininga, v. 10, n. 42, p. 8-23, 1996.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Food Safety Technology**: A potential role for ozone? Washington: Economic Research Service/USDA, p. 13-15, 1998.

VERCELLOTTI, J.R.; CLARKE, M.A. **Color removal**: chemical treatment. In: SYMPOSIUM ON SUGAR COLOR, v. 56, p. 272-281, 1997.

YANG, W.H.; PURCHASE, E.C.R. Adverse reactions to sulfites. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v.133, p.865-867, 1985.

APÊNDICE

Cromatogramas dos 17 tratamentos realizados para o perfil cinético de clarificação por ozonização para a redução de cor do caldo de cana-de-açúcar nos tempos 0 (zero) e 240 min