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

**Qualidade físico-química da cana-de-açúcar e microbiológica do caldo
sobre o processo de ozonização do caldo na redução sustentável da cor
ICUMSA e impurezas vegetais**

Juliana Aparecida de Souza Sartori

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2017**

Juliana Aparecida de Souza Sartori
Engenheira Agrônoma

**Qualidade físico-química da cana-de-açúcar e microbiológica do caldo sobre o
processo de ozonização do caldo na redução sustentável da cor ICUMSA e
impurezas vegetais**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2017

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

Sartori, Juliana Aparecida de Souza

Qualidade físico-química da cana-de-açúcar e microbiológica do caldo sobre o processo de ozonização do caldo na redução sustentável da cor ICUMSA e impurezas vegetais / Juliana Aparecida de Souza Sartori. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

126 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cana-de-açúcar 2. Caldo 3. Cor 4. Clarificação 5. Ozônio I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, ao meu marido Lucas e aos meus pais Vanderleia e Reginaldo

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar sabedoria para fazer as minhas escolhas e me orientar para o melhor caminho.

Ao meu marido Lucas, por ter me apoiado nas minhas escolhas, por ter me ajudado em cada etapa, pela paciência em momentos difíceis e por estar sempre do meu lado todos esses anos.

Aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio, incentivo, oportunidades e carinho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Lima de Aguiar pela confiança em meu trabalho, por toda motivação e ajuda, pela oportunidade e pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista pela ajuda, pela amizade e pela disponibilidade sempre que foi preciso.

Aos amigos Nathalia, Juliana, Roberta, Gislene, Felipe, Marina, Graziela, Jéssica, Mariana, Lucas, Marília, Natasha e Ana Laura pela ajuda durante esses anos, seja no desenvolvimento do trabalho ou em momentos de alegria.

Aos técnicos do Laboratório, Pedrinho, Sylvino e Rose pela ajuda sempre que foi preciso.

Ao Prof. Dr. Marcos Eberlin e pós-doutorando Célio Angolini, do Laboratório Thomson – Instituto de Química/UNICAMP, pela oportunidade e disponibilidade para realização de análises essenciais para complementação desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPq) pelo apoio financeiro concedido no início do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro prestado através da concessão da bolsa de doutorado (Processo nº 2014/03512-5).

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Durante a realização do doutorado, que teve início em março de 2014, realizei as seguintes atividades e publicações:

- Artigos científicos publicados:
 - ✓ AGUIAR, C.L.; CORREA, N.T.; DAL-BÓ, C.J.R.; **SOUZA-SARTORI, J.A.**; HARDER, M.N.C. Full-Factorial Design for Extraction in vitro of Antioxidants from Sugarcane Top Leaves Assisted by Ozone. *Sugar Journal*, v.77, n.3, Aug. 2014.
 - ✓ SILVA, W.S.; **SARTORI, J.A.S.**; AGUIAR, C.L. Combination Effect of Ozone and Heat Treatment for the Color Reduction in Sugarcane Juice. *Chemical and Process Engineering Research*, v. 35, p. 75-83, 2015.
 - ✓ MANDRO, J.L.; BRAGA, N.L.L.B.; CATELAN, M.G.; BAPTISTA, A.S.; **SARTORI, J.A.S.**; CORREA, N.T.; ROCHA, A.L.B.; LIMA, R.B.; AGUIAR, C.L. Degradação de rutina em sistemas-modelo de caldo de cana-de-açúcar pela ação de peróxido de hidrogênio. *Revista de Química Industrial*, n. 747, 28-33, 2015.
 - ✓ **SARTORI, J.A.S.**; GALAVERNA, R.; EBERLIN, M.N.; CORREA, 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*, v. 39, p. 1826-1831, 2015.
 - ✓ **SARTORI, J.A.S.**; MAGRI, N.T.C.; AGUIAR, C.L. Clarificação de caldo de cana-de-açúcar por peróxido de hidrogênio: efeito da presença de dextrana como indicador de qualidade de matéria-prima. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.18, n.4, p. 299-306, Out./Dez. 2015.
 - ✓ OGANDO, F.I.B.; **SARTORI, J.A.S.**; MAGRI, N.T.C.; AGUIAR, C.L. Pretreatment of sugarcane top leaves by ozonation as a promotion of susceptibility to hidrolisis. *Journal of bioenergy and food science*, v. 3, p. 197-206, 2016.
 - ✓ **SARTORI, J.A.S.**; RIBEIRO, K.; TEIXEIRA, A.C.S.C.; MAGRI, N.T.C.; MANDRO, J.L.; AGUIAR, C.L. Sugarcane juice clarification by hydrogen peroxide: Predictions with artificial neural networks. *International Journal of Food Engineering*, v. 1, p. 1-8, 2017.
 - ✓ **SARTORI, J.A.S.**; ANGOLINI, C.F.F.; EBERLIN, M.N.; AGUIAR, C.L. Criegee mechanism as a safe pathway of color reduction in sugarcane juice by ozonation. *Food Chemistry*, v. 225, p. 181-187, 2017.
 - ✓ MANDRO, J.L.; MAGRI, N.T.C.; **SARTORI, J.A.S.**; AGUIAR, C.L. Redução de cor ICUMSA em soluções concentradas de açúcar bruto por processo oxidativo com peróxido de hidrogênio. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 20, e2016114, 2017.

- Congressos e Simpósios:

- ✓ Membro da comissão organizadora do I Workshop Internacional sobre Cadeia Sucroenergética – ESALQ/USP – 22 a 24 de julho de 2014.
- ✓ Participação no Simpósio - Açúcar: Produção, Armazenamento e Transporte - CEAGESP – Araraquara/SP – 21 e 22 de agosto de 2014
- ✓ Apresentação de trabalhos no 54º Congresso Brasileiro de Química (03 a 07 de novembro de 2014 - Natal/RN):
 - ❖ SARTORI, J.; CORRÊA, N.; MANDRO, J.; GALAVERNA, R.; EBERLIN, M.; AGUIAR, C. Uso do peróxido de hidrogênio num processo sustentável de clarificação de caldo de cana-de-açúcar e seu efeito sobre os conteúdos de sacarose.
 - ❖ BRAGA, N.; SARTORI, J.; BAPTISTA, A.; ROCHA, A.; LIMA, R.; OGANDO, F.; AGUIAR, C. Avaliação da degradação de rutina pelo uso do peróxido de hidrogênio como processo alternativo à sulfitação.
- ✓ Participação no "VI Simpósio de Tecnologia de Produção de Cana-de-açúcar" - 15 a 17 de Julho de 2015.
- ✓ Trabalhos apresentados no “VIII Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados” (03 a 06 de novembro de 2015 – Belo Horizonte/MG):
 - ❖ **SARTORI, J.A.S.**; MAGRI, N.T.C.; MANDRO, J.L.; AGUIAR, C.L. Degradação do ácido gálico utilizando a ozonização como processo alternativo à sulfitação (Short-communication).
 - ❖ MANDRO, J.L.; CORREA, N.T.; **SARTORI, J.A.S.**; AGUIAR, C.L. Redução de cor ICUMSA da calda de açúcar VHP por peroxidação (Postêr).
 - ❖ CORREA, N.T.; **SARTORI, J.A.S.**; MANDRO, J.L.; AGUIAR, C.L. Redução de cor ICUMSA em caldo de cana-de-açúcar por ozonização (Pôster).
- ✓ Trabalhos apresentados no “VIII Simpósio Científico dos Pós-Graduandos” (19 a 21 de Outubro de 2015 – Piracicaba/SP):
 - ❖ **SARTORI, J.A.S.**; OGANDO, F.I.B.; MANARIM, G.R. Degradação térmica acoplada à ozonização de soluções de sacarose com ácido gálico em processo de clarificação (Pôster).
 - ❖ MANARIM, G.R.; **SARTORI, J.A.S.**; MANDRO, J.L.; AGUIAR, C.L. Separação de clorofilas a, b e total de cana-de-açúcar por cromatografia de adsorção e quantificação por método espectrofotométrico (Pôster).
- ✓ Participação no “II Simpósio de Microbiologia Agrícola da ESALQ: Microbiologia *in foco*”. (03 a 05 de maio de 2016 – Piracicaba/SP)

- ✓ Membro da comissão organizadora do II Workshop Internacional sobre Cadeia Sucroenergética – ESALQ/USP – 20 e 21 de julho de 2016.
- ✓ Trabalhos apresentados no “XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química” (25 a 29 de setembro de 2016 – Fortaleza/CE):
 - ❖ MANDRO, J.L.; **SARTORI, J.A.S.**; CORREA, N.T.; MANARIM, G.R.; AGUIAR, J.L. Avaliação da eficiência da peroxidação como método alternativo a clarificação do açúcar por cinética química. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fortaleza/CE, 2016.
 - ❖ **SARTORI, J.A.S.**; MANDRO, J.L.; CORREA, N.T.; MANARIM, G.R.; AGUIAR, J.L. Redução de cor do caldo de cana-de-açúcar como efeito do pH em reações de peroxidação. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fortaleza/CE, 2016.
- ✓ Trabalhos apresentados no “6th BrMass Conference on Mass Spectrometry” (10 a 14 de dezembro de 2016 – Rio de Janeiro/RJ):
 - ❖ **SARTORI, J.**; ANGOLINI, C.; EBERLIN, M.; AGUIAR, C. Phenolics oxidation in sugarcane juice by ozonation (Pôster).
 - ❖ AGUIAR, C.; **SARTORI, J.**; COELHO, M.; EBERLIN, M. It is time for renewal: Out polarimetry enters mass spectrometry in Brazilian sugarcane mills (Pôster).
- Curso e Treinamentos:
 - ✓ Treinamento teórico e de operação no cromatógrafo de íons 930 Compact IC Flex (Metrohm) - Carga horária: 56 horas. Período: 22/06 a 25/06 e 20/07 a 24/07/2015. Local: LAN/ESALQ/USP
 - ✓ Curso de Extensão em Espectrometria de Massas: Aplicações Clínicas, Farmacêuticas, Analíticas e Industriais. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Período: 14/03/2016 a 18/03/2016. Carga horária: 35 horas-aula. Conceito de aproveitamento: 10,0.
 - ✓ Minicurso – Cromatografia em Análises Microbiológicas no “II Simpósio de Microbiologia Agrícola da ESALQ: Microbiologia *in foco*” (03 a 05 de Maio de 2016 – Piracicaba/SP). Carga horária: 04 horas.
 - ✓ Curso de Extensão em Validação de Metodologias Analíticas e Aplicações Industriais. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Período: 07/11/2016 a 11/11/2016. Carga horária: 35 horas-aula. Conceito de aproveitamento: 10,0.

- Atividades didáticas e participação em avaliações:
 - ✓ Estagiária do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da disciplina LAN 0697 – Controle Analítico das Usinas e Destilarias sob supervisão do Prof. Dr. Claudio Lima de Aguiar
 - ✓ Professora de Ensino Superior na disciplina Tecnologia de Açúcar e Álcool para o curso Superior de Tecnologia em Alimentos, na Faculdade de Tecnologia “Deputado Roque Trevisan” (FATEC) em Piracicaba. Período: 08 de Abril de 2015 a 31 de Junho de 2016.
 - ✓ Avaliadora da 1ª Etapa do 23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP/SIICUSP – ESALQ – Piracicaba/SP – 10 e 11 de Setembro de 2015.
 - ✓ Membro titular da banca de defesa do Trabalho de Graduação intitulado “Desenvolvimento de pães congelados com adição de mandioquinha, farelo de trigo, quinoa e linhaça” – Discente: Luciang Moya dos Santos. Duração: 1 hora. Data: 06 de Maio de 2016.
 - ✓ Membro titular da banca de defesa do Trabalho de Graduação intitulado “Proposta de desenvolvimento da formulação de pão de mel com adição de farinha de jatobá (*Hymenaea stilgonocarp* Mart.)” – Discente: Eliane Daniela Fernandes da Silva Guedes e Adilson Coelho. Duração: 1 hora. Data: 20 de Junho de 2016.
 - ✓ Membro titular da banca de avaliação dos Projetos Interdisciplinares dos Cursos de Tecnologia em Alimentos e Agroindústria apresentados pelos alunos na VII Mostra de Projetos-AGROinFATEC. Data: 01 de Junho de 2016.
 - ✓ Palestra “Programas de pré-requisitos para a segurança dos alimentos” apresentada na disciplina Higiene de Alimentos e Legislação do Curso de Ciências dos Alimentos. Data: 20 de Outubro de 2016. Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP.
 - ✓ Membro titular da banca de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Tempo de pátio como fator de influência no pagamento da cana-de-açúcar: Atualização para tempos de colheita mecanizada/cana crua” – Discente: Lucas Rosa Borges. Duração: 1 hora. Data: 25 de Novembro de 2016.
 - ✓ Membro titular da banca de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Caracterização do perfil enzimático de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO) em diferentes partes da cana-de-açúcar” – Discente: Nayara de Andrade Ramos Lifante. Duração: 1 hora. Data: 25 de Novembro de 2016.

EPÍGRAFE

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
1.1. CANA-DE-AÇÚCAR: PRINCIPAIS INDICADORES DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA E OS IMPACTOS NA INDÚSTRIA SUCROENERGÉTICA	15
1.2. COMPOSTOS COLORIDOS NA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR CRISTAL.....	19
1.3. PRODUÇÃO DE AÇÚCAR CRISTAL BRANCO - SULFITAÇÃO	21
1.4. OZONIZAÇÃO COMO TECNOLOGIA DE CLARIFICAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR ..	23
1.5. JUSTIFICATIVAS	24
REFERÊNCIAS.....	25
2. MATURAÇÃO COMO FATOR DE INFLUÊNCIA NA OZONIZAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR	31
RESUMO	31
ABSTRACT	31
2.1. INTRODUÇÃO.....	32
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.2.1. Obtenção das amostras de cana-de-açúcar	34
2.2.2. Açúcares totais recuperáveis (ATR)	35
2.2.3. Ozonização do caldo de cana-de-açúcar	37
2.2.4. Determinação de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar.....	37
2.2.5. Determinação de cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar	38
2.2.6. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar.....	38
2.2.7. Determinação de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar	39
2.2.8. Determinação de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar	39
2.2.9. Análise de turbidez do caldo de cana-de-açúcar	39
2.2.10. Análise de condutividade do caldo de cana-de-açúcar	39
2.2.11. Análises estatísticas	39
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
2.3.1. Açúcares Totais Recuperáveis (ATR)	40
2.3.2. Teores de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar.....	41
2.3.3. Cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar	44
2.3.4. Teores de amido em caldo de cana-de-açúcar.....	46
2.3.5. Teores de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar	47
2.3.6. Teores de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar	49
2.3.7. Análise de turbidez do caldo de cana-de-açúcar	50
2.3.8. Análise de condutividade do caldo de cana-de-açúcar	51
2.3.9. Interação entre a maturação e a ozonização do caldo de cana-de-açúcar	52
2.4. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	55
3. TEMPO ENTRE COLHEITA E PROCESSAMENTO COMO FATOR DE INFLUÊNCIA NA QUALIDADE E NA OZONIZAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	59
RESUMO	59

ABSTRACT	59
3.1. INTRODUÇÃO.....	60
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	62
3.2.1. Obtenção das amostras.....	62
3.2.2. Açúcares Totais Recuperáveis (ATR)	63
3.2.3. Análise de cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar	64
3.2.4. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar.....	65
3.2.5. Determinação de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar	65
3.2.6. Determinação de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar	66
3.2.7. Determinação de dextrana em caldo de cana-de-açúcar.....	66
3.2.8. Ozonização para redução da contaminação microbiana	67
3.2.9. Contagem de bactérias mesófilas totais	68
3.2.10. Análises estatísticas	68
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.3.1. Parâmetros tecnológicos em função do tempo entre a colheita e o processamento.....	68
3.3.2. Ozonização para redução da contaminação bacteriana.....	74
3.4. CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	75
4. IMPACTO DAS IMPUREZAS VEGETAIS SOBRE A OZONIZAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR	79
RESUMO	79
ABSTRACT	79
4.1. INTRODUÇÃO.....	80
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.2.1. Obtenção das amostras.....	81
4.2.2. Açúcares Totais Recuperáveis (ATR)	82
4.2.3. Ozonização do caldo de cana-de-açúcar	83
4.2.4. Análise de Cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar	83
4.2.5. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar.....	84
4.2.6. Determinação de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar	84
4.2.7. Determinação de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar	85
4.2.8. Quantificação de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar	85
4.2.9. Análises estatísticas	85
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.3.1. Açúcares Totais Recuperáveis (ATR)	86
4.3.2. Açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar.....	87
4.3.3. Cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar	88
4.3.4. Teores de amido em caldo de cana-de-açúcar.....	89
4.3.5. Teores de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar	90
4.3.6. Teores de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar	91
4.3.7. Interação entre impurezas vegetais e a ozonização do caldo de cana-de-açúcar ...	92
4.4. CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS	94
5. MECANISMO DE REAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR OZONIZAÇÃO.....	97
RESUMO	97
ABSTRACT	97
5.1. INTRODUÇÃO.....	98
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	99

5.2.1. Determinação dos teores de compostos fenólicos da solução	100
5.2.2. Análise de açúcares por cromatografia de íons	100
5.2.3. Análise de ácido gálico por espectrometria de massas pelo quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF).....	101
5.2.4. Mecanismo de ozonólise da degradação do ácido gálico por Q-ToF/MS	101
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
5.4. CONCLUSÃO.....	110
REFERÊNCIAS.....	110
6. REAÇÕES ENVOLVENDO A DEGRADAÇÃO DE FENÓLICOS POR OZONIZAÇÃO.....	113
RESUMO	113
ABSTRACT	113
6.1. INTRODUÇÃO.....	114
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	115
6.2.1. Experimentos de ozonização	115
6.2.2. Espectros de absorção por espectrofotometria	115
6.2.3. Análise de fenólicos por cromatografia líquida de alta performance por arranjo de diodo (HPLC/PDA).....	115
6.2.4. Análise de fenólicos por espectrometria de massas pelo quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF).....	116
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
6.4. CONCLUSÃO.....	122
REFERÊNCIAS.....	122

RESUMO

Qualidade físico-química da cana-de-açúcar e microbiológica do caldo sobre o processo de ozonização do caldo na redução sustentável da cor ICUMSA e impurezas vegetais

A qualidade da matéria-prima (cana-de-açúcar) é de suma importância para a obtenção de um produto final (açúcar branco) com elevada qualidade. Após o processamento da cana-de-açúcar, através do preparo e extração do caldo, a etapa de clarificação do caldo é a responsável pela remoção das impurezas do caldo com o objetivo de obter um açúcar com reduzida cor ICUMSA (International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis). No processo convencional de produção de açúcar cristal branco, a etapa de clarificação é realizada pelo uso da sulfitação, que tem como principal desvantagem a presença residual de sulfito no produto final. Têm sido relatado que o sulfito possa trazer riscos à saúde uma vez que parte da população apresenta sensibilidade ao mesmo. Assim, a ozonização já vem sendo utilizada como processo alternativo ao uso da sulfitação em várias usinas. Não há disponível na literatura, no entanto, trabalhos que relacionam a qualidade da matéria-prima com o uso de ozônio como agente clarificante. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da qualidade da cana-de-açúcar na eficiência do processo de ozonização, relacionando a maturação, tempo entre a colheita e o processamento e porcentagem de impurezas vegetais na composição do caldo, quanto a presença de amido, dextrana, compostos fenólicos e cor. A maturação e a adição de impurezas vegetais influenciaram na capacidade do ozônio em reduzir a cor do caldo, sendo que o principal parâmetro envolvido foi a quantidade de compostos fenólicos, entre os quais, principalmente, os flavonóides presentes no caldo a ser processado. O tempo entre a colheita e o processamento também influenciou na qualidade da matéria-prima, sendo que quanto maior o tempo, maior foi a quantidade de açúcares redutores, amido e bactérias mesófilas totais no processo e menor foi a quantidade de sacarose que poderia ser recuperada. O ozônio se mostrou eficiente na redução do número de bactérias presentes no caldo de cana-de-açúcar. Devido a ação observada do ozônio sobre os compostos fenólicos, foram propostos mecanismos de reações de ozonólise do ácido gálico, ácido cafeico e rutina, que indicaram potencial mineralização dos compostos estudados.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Caldo; Cor; Clarificação; Ozônio

ABSTRACT

Physical-chemical quality of sugarcane and microbiology quality of juice on the ozonation process of the juice in the sustainable reduction of ICUMSA color and vegetable impurities

The quality of the raw material (sugarcane) is very important to obtain a high quality final product (white sugar). After processing the sugarcane, by preparing and extracting the juice, the juice clarification step is responsible for the removal of the impurities from the juice in order to obtain a reduced color ICUMSA (International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis). In the conventional white crystal sugar production process, the clarification step is accomplished by the use of sulphitation, which has as its main disadvantage the residual presence of sulphite in the final product. It has been reported that sulfite may present health risks since part of the population is susceptible to it. Thus, ozonation has already been used as an alternative process to the use of sulphitation in several mills. There is no literature available, however, that relates the quality of the raw material with the use of ozone as a clarifying agent. The objective of this work was to evaluate the influence of sugarcane quality on the efficiency of the ozonation process, relating the maturation, time between harvest and processing and percentage of vegetable impurities in the composition of the juice, as well as the presence of starch, dextran, phenolic compounds and color. The maturation and the addition of vegetable impurities influenced the ozone's ability to reduce the color of the juice, and the main parameter involved was the amount of phenolic compounds, mainly the flavonoids present in the juice to be processed. The time between harvesting and processing also influenced the quality of the raw material, and the longer the time, the greater the amount of reducing sugars, starch and total mesophilic bacteria in the process and the lower the amount of sucrose that could be recovered. Ozone was efficient in reducing the number of bacteria present in the sugarcane juice. Due to the observed action of ozone on phenolic compounds, reactions mechanisms of ozonolysis of gallic acid, caffeic acid and rutin have been proposed, indicating potential mineralization of the compounds studied.

Keywords: Sugarcane; Juice; Color; Clarification; Ozone

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Cana-de-açúcar: principais indicadores de qualidade da matéria-prima e os impactos na indústria sucroenergética

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), que tem como origem a Nova-Guiné, de onde foi propagada para diversos países, mas encontrou nas Américas as melhores condições para o seu desenvolvimento (MOZAMBANI et al., 2006). A cana-de-açúcar é uma planta C4, que pertence à família das Poaceae, e é adaptada às condições de alta luminosidade, altas temperaturas e relativa escassez de água. A sua maturação se define como o processo fisiológico de carregamento e armazenamento de sacarose nas células do parênquima dos colmos, sendo fortemente influenciada pelas condições ambientais que desfavorecem o crescimento e desenvolvimento vegetativo – períodos moderados de seca, temperaturas mais baixas e carência de nitrogênio (SEGATO et al., 2006).

A cana-de-açúcar pode ser utilizada para produzir uma infinidade de produtos como: açúcar, etanol potável e/ou combustível, cachaça, servir para alimentação animal (variedades forrageiras), bem como, produzir garapa ou caldo de cana, que será consumido *in natura* (BRAZ, 2003). Segundo a União dos Produtores de Bioenergia (UDOP, 2017), o Brasil obteve uma produção de 666,3 milhões toneladas de cana em 2015/2016 e na safra de 2016/2017 obteve uma produção em torno de 657,3 milhões de toneladas, sendo que a maior parte foi produzida na região Centro-Sul (93,2%). O Brasil produziu, na safra de 2015/2016, 33,5 milhões toneladas de açúcar e na safra de 2016/2017, 38,7 milhões de toneladas.

Para garantir a produção de açúcar de qualidade, é necessário utilizar uma matéria-prima (cana-de-açúcar) de qualidade. A qualidade da matéria-prima pode ser influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos são os relacionados à composição da cana, como os teores de sacarose, açúcares redutores, fibra, compostos fenólicos, amido, cor do caldo, ácido aconítico e minerais. Os fatores extrínsecos são aqueles relacionados com materiais estranhos ao colmo (terra, pedra, plantas invasoras) ou compostos produzidos por micro-organismos devido à sua ação sobre os açúcares do colmo (AMORIM et al., 2004). As características de composição tecnológica variam em variedades comerciais, dentro dos valores apresentados na Figura 1.

Figura 1. Composição tecnológica de variedades de cana-de-açúcar (adaptado de MARQUES et al., 2001)

A produção de açúcar de boa qualidade depende da qualidade de matéria-prima, que possibilitará um processo eficiente sem prejuízos econômicos. Para avaliar a matéria-prima, cana-de-açúcar, recebida nas usinas foram estabelecidos indicadores da qualidade. Amorim et al. (2004) apresentam os valores recomendados (Tabela 1) para os principais indicadores da qualidade da cana-de-açúcar brasileira.

Tabela 1. Indicadores de qualidade da cana-de-açúcar e valores recomendados (AMORIM et al., 2004)

INDICADORES	VALORES RECOMENDADOS
Pol	> 14%
Pureza do caldo	> 85%
AR (glicose, frutose)	< 0,8%
Fibra	11 a 13%
Tempo entre queima e corte	< 35 horas para cana com corte manual
Impurezas minerais	< 5 kg/t cana
Impurezas vegetais	< 5% ou < 50 kg/t cana
Contaminação bacteriana	< $5,0 \times 10^5$ bastonetes/mL no caldo
Dextrana	< 500 ppm/Brix
Amido	< 500 ppm/Brix

Sendo: kg/t: quilogramas por tonelada. ppm: partes por milhão. Brix: teor em massa de sólidos solúveis totais.

A sacarose é o principal açúcar presente no caldo de cana-de-açúcar, sendo formada a partir da condensação dos monossacarídeos glicose e frutose (CLARKE, 1993). Os açúcares redutores, glicose e frutose, da cana-de-açúcar afetam diretamente a pureza, influenciando na recuperação de sacarose pela fábrica para a produção de açúcar cristal. A contaminação bacteriana leva ao aumento dos teores de açúcares redutores, assim como o processamento de cana-de-açúcar imatura no início de safra (AMORIM et al., 2004).

A diminuição da concentração de sacarose após a colheita da cana-de-açúcar não é proporcional ao aumento dos valores de açúcares redutores, uma vez que a planta continua respirando e realizando outras atividades metabólicas que acaba consumindo a glicose e frutose disponível (SAXENA et al., 2010).

A fibra é composta pela fração insolúvel em água contida na cana-de-açúcar, a qual é compreendida basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (FERNANDES, 2003; OGATA, 2013). Segundo Amorim et al. (2004), a Fibra%cana interfere na eficiência de extração de caldo pela moenda, sendo que com o aumento da quantidade de fibras menor será a eficiência da extração ($= (\text{Pol\%caldo} / \text{Pol\%cana}) \times 100$).

Os parâmetros Brix, Pol%cana e açúcares redutores podem sofrer influência devido à quantidade e o tipo de impurezas presentes: vegetais ou minerais. As principais impurezas vegetais vêm da própria cana-de-açúcar, como folhas verdes e secas, cartuchos, palmitos. Elas causam aumento da fibra industrial, consequentemente, reduzindo a capacidade de moagem e

extração do caldo, bem como, o aumento do desgaste mecânico dos equipamentos (BOVI e SERRA, 2001; BRASSOLATTI et al., 2016).

O tempo entre queima e o corte da cana-de-açúcar é um dos fatores que mais afetam a qualidade da matéria-prima, uma vez que ocorre a elevação da contaminação por micro-organismos e consequente deterioração da cana-de-açúcar (STUPIELLO, 1987).

A temperatura ambiente também afeta a contaminação e deterioração da cana-de-açúcar. Após a queima/corte, se inicia a degradação dos açúcares pelas bactérias, por fungos e leveduras, resultando em aumento do teor alcoólico e redução do pH do caldo da cana-de-açúcar. Quanto maior for a temperatura ambiental, mais rápida é essa degradação. A chuva é outro fator que pode prejudicar a qualidade da matéria-prima, uma vez que eleva o tempo no CTT (Corte/Transbordo/Transporte) e aumenta a quantidade de terra na cana-de-açúcar. A alta umidade relativa do ar tem sido correlacionada com o aumento da quantidade de terra (impureza mineral) na cana-de-açúcar, aumentando assim a cor do açúcar (AMORIM et al., 2004).

A dextrana representa o grupo de polissacarídeos da cana-de-açúcar formados pela ação de bactérias, principalmente *Leuconostoc mesenteroides*, resultante do desdobramento dos açúcares contidos no caldo após a queima e/ou corte da cana (FERNANDES, 2003). Amorim et al. (2004) afirmam que a dextrana ocasiona prejuízos ao processo por promover aumento da viscosidade do caldo, dificultando a cristalização e podendo estar associada com aumento de cor do açúcar. Os principais fatores que podem contribuir para a formação da dextrana são: tempo entre a colheita e o processamento; tamanho do tolete; características varietais; temperatura e umidade do ambiente; chuvas e lama; queima; entre outros (SOLOMON et al., 2009).

O amido da cana-de-açúcar está presente principalmente nas folhas, ponteiros e nós do colmo da cana-de-açúcar. Cana-de-açúcar imaturas possuem teores elevados de amido, especialmente nos ponteiros e nós. A presença de amido acarreta potencialmente no aumento da viscosidade das massas cozidas (caldo purificado e concentrado a 90-95 Brix), dificultando a cristalização da sacarose, e promovendo a distorção nos valores de Pol%caldo. Além disso, pode causar aumento da cor do açúcar cristal (CLARKE, 1993; ALVES et al., 2013; ALVES et al., 2014).

O ácido aconítico é o principal ácido orgânico encontrado em cana-de-açúcar. De acordo com Amorim et al. (2004), há uma relação direta entre teores de potássio no solo e concentrações elevadas de ácido aconítico na cana-de-açúcar. A sua concentração pode oscilar de acordo com a variedade e estágio de maturação da cana-de-açúcar. Segundo Martin (1953) citado por Voll (2005), o ácido aconítico é um dos constituintes que confere poder tampão ao

caldo juntamente com fosfatos e proteínas, o que tem prejudicado a clarificação do caldo. Há também aumento no número de problemas associados à incrustação, dado aos elevados teores de ácido aconítico em cana-de-açúcar, gerado a partir da necessidade do uso de maiores quantidades de cal virgem no tratamento do caldo. Além disso, na etapa de purificação do caldo, é também considerado um agente melagigênico (ou seja, substâncias que dificultam a recuperação da sacarose, alterando a forma dos cristais e retardando a filtração) e, por consequência a industrialização do açúcar, reduzindo o rendimento industrial (JÚNIOR, 2007).

Os compostos fenólicos quando presentes no caldo podem promover a formação de cor tanto no açúcar VHP (*very high polarization* ou bruto) como no branco, sendo que a sua concentração varia com a variedade, idade e época de colheita (CLARKE e LEGENDRE, 1999). Os compostos fenólicos são geralmente incolores, mas podem formar compostos coloridos ao reagir ou serem oxidados por ferro ou aminas durante o processo (DAVIS, 2001).

1.2. Compostos coloridos na produção de açúcar cristal

Considera-se que existam pelo menos quatro mecanismos que contribuem para a formação de cor durante a produção de açúcar: (1) melanoidinas, que são formadas pela reação de açúcares e aminoácidos, via reação de Maillard; (2) caramelização - degradação térmica e reações de condensação dos açúcares; (3) degradação alcalina e reações de condensação de açúcares redutores; e (4) reações oxidativas de compostos fenólicos. As três primeiras são reações não-enzimáticas. A oxidação de compostos fenólicos a quinonas é enzimática, sendo que esta ocorre na extração do caldo, quando a cana-de-açúcar é submetida ao preparo (desintegração das fibras) e moagem (processo mecânico de extração do caldo) (KORT, 1979). Outra classificação existente na literatura foi descrita por Farber et al. (1971), onde os compostos coloridos na produção do açúcar podem ser classificados pela sua origem em três classes: caramelos (produtos da decomposição da sacarose); melanoidinas (produtos da reação entre aminoácidos e açúcares redutores); e pigmentos das plantas e seus produtos de decomposição. Os aminoácidos e açúcares redutores não são compostos coloridos, porém a presença deles em temperaturas elevadas induz reações de Maillard e, consequentemente, contribuindo na formação de cor no processo industrial (GODSHALL, 1996).

As melanoidinas são substâncias poliméricas e coloridas das reações de Maillard, responsáveis por propriedades físicas (cor e viscosidade) e propriedades sensoriais (estabilidade de substâncias aromáticas) (HAYMAN, 2014). Segundo Eskin et al. (1971), as reações de escurecimento não-enzimático envolvem fatores como pH, temperatura, umidade e presença de

açúcares. As reações não somente formam melanoidinas (substâncias de coloração marrom intenso) como também vários compostos voláteis e de aroma (aldeídos, cetonas e pirazina) via intermediários de reação, tais como: 5-hidroxi metil-2-furfural (5-HMF), redutonas, aldiminas e outros (HODGE, 1953). A descrição do esquema proposto por Hodge está apresentado na Figura 2.

Figura 2. Esquema da reação de Maillard (Adaptado de MARTINS et al., 2001).

Os compostos que mais afetam a cor do caldo são aqueles presentes naturalmente na cana-de-açúcar. Os compostos fenólicos e flavonóides são responsáveis por 60 a 75% da cor do açúcar bruto (CLARKE e LEGENDRE, 1999). O ácido clorogênico tem sido relacionado ao escurecimento enzimático em caldo de cana-de-açúcar (PATON, 1992a). Goodacre e Coombs (1978) relataram que a proporção de cor total do caldo que pode ser atribuída às reações de escurecimento enzimático depende da maturação da cana-de-açúcar e do pH do caldo, sendo que em colmos maduros a cor resultante do escurecimento enzimático soma mais da metade da coloração total do caldo. Em trabalho realizado por Paton (1992b), não foi encontrado relação entre a concentração de fenólicos e a cor do caldo de cana-de-açúcar em 28 variedades comerciais estudadas por ela.

Os ácidos fenólicos presentes em maiores quantidades na cana-de-açúcar (Tabela 2) variam seus teores de acordo com a parte analisada na cana-de-açúcar (ZHAO et al., 2008).

Entre os ácidos fenólicos presentes no caldo de cana-de-açúcar, os ácidos cafeico, gálico e ferúlico são aqueles encontrados em maiores quantidades (Tabela 2). Nas folhas frescas e no bagaço, os ácidos ferúlico e coumárico são os que apresentam maiores quantidades.

Tabela 2. Ácidos fenólicos presentes em diferentes partes de cana-de-açúcar (adaptado de ZHAO et al., 2008).

Ácidos fenólicos	Caldo de cana-de-açúcar (mg L ⁻¹)	Folhas frescas (mg kg ⁻¹)	Bagaço (mg kg ⁻¹)
Ácido gálico	1,15 ± 0,02	7,28 ± 0,26	38,58 ± 1,25
Ácido protocatecuico	0,89 ± 0,02	4,38 ± 0,17	42,28 ± 1,51
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	0,86 ± 0,02	8,11 ± 0,32	34,85 ± 1,27
Ácido vanílico	0,97 ± 0,03	5,77 ± 0,21	27,67 ± 1,05
Ácido clorogênico	0,81 ± 0,03	10,42 ± 0,42	27,54 ± 1,17
Ácido cafeico	2,26 ± 0,06	10,77 ± 0,42	29,93 ± 1,38
Ácido siríngico	0,47 ± 0,02	6,28 ± 0,20	21,19 ± 0,73
Ácido coumárico	0,93 ± 0,02	28,42 ± 1,13	67,92 ± 2,55
Ácido ferúlico	1,13 ± 0,02	37,39 ± 1,28	119,73 ± 4,30
Ácido sinápico	0,42 ± 0,01	7,71 ± 0,25	8,05 ± 0,39

Os valores foram expressos como a média ± desvio padrão.

A quantidade de compostos fenólicos varia em função de diversos fatores. Dentre estes, pode-se citar que baixos teores de fenólicos são encontrados em matérias-primas produzidas em solos úmidos quando comparada com aquelas produzidas em solos mais secos. Com relação ao sistema de colheita, a cana-de-açúcar colhida crua e mecanizada conduz de 4 a 8 vezes mais compostos fenólicos para o processo industrial. Isto se deve ao alto teor de matéria estranha de natureza vegetal (em especial, ponteiros) que é conduzida juntamente com os colmos (em especial, entrenós). A matéria-prima com maior teor de compostos fenólicos dos ponteiros, cartuchos e folhas acabam introduzindo mais precursores de cor ao processo industrial, levando à produção de açúcares com cor ICUMSA maior (STUPIELLO, 2002).

1.3. Produção de açúcar cristal branco - Sulfitação

A cana-de-açúcar é colhida no campo e trazida à usina para iniciar o seu processamento. Ao chegar à usina, ela é descarregada na mesa receptora e transportada pelas esteiras até a etapa do preparo, que é reponsável por garantir que a maior quantidade de caldo

seja liberada na etapa seguinte de extração. O preparo é feito através dos jogos de facas e desintegradores. A extração do caldo pode ser feita através de moendas ou difusores, sendo que o resíduo, denominado bagaço, é utilizado para geração de vapor pela sua queima nas caldeiras. O caldo é, então, conduzido à fase de tratamento que consiste nas etapas de peneiragem, sulfitação (somente para a produção de açúcar cristal branco), caleagem, aquecimento e decantação. O lodo resultante da decantação é filtrado com o objetivo de recuperar o caldo presente, sendo gerado como o resíduo a torta de filtro. O caldo decantado é enviado para a etapa de evaporação, que tem como produto o xarope. O xarope passa pela etapa de cozimento e tem como produto a massa cozida. Essa massa cozida passa pelo processo de centrifugação, onde ocorre a separação do entre o mel e os cristais. Após as etapas finais (secagem, classificação, acondicionamento e armazenamento), o açúcar estará pronto para ser comercializado (MARQUES et al., 2001).

Dentre essas operações unitárias, a sulfitação é a etapa que garante a produção de um açúcar com cor ICUMS menor, uma vez que tem como objetivo remover impurezas causadoras de turbidez e de cor através do contato do caldo de cana-de-açúcar com os gases resultantes da combustão do enxofre em pó em colunas de absorção (colunas de sulfitação), sendo que o principal agente químico utilizado é o dióxido de enxofre (SO_2) (VILELA et al., 2008). O dióxido de enxofre atua na conversão de compostos coloridos em incolores, impedindo a formação de cor pela oxidação e, inibindo o desenvolvimento de reações de escurecimento entre açúcares e aminoácidos (PAYNE, 2010).

Durante a sulfitação, o caldo peneirado é adicionado pelo topo da coluna de sulfitação, enquanto que o SO_2 é adicionado pela base da coluna sendo aspirado por um exaustor no topo da coluna. Através de bandejas perfuradas superpostas, o caldo desce e o SO_2 sobe, sendo adsorvido pelo caldo e conferindo-lhe valores de pH entre 3,8 a 4,3 (MARQUES et al., 2001). A redução do pH se deve ao fato de que o SO_2 em contato com a água do caldo de cana-de-açúcar reage formando HSO_3^- com caráter ácido. Este mesmo ânion promove a oxidação de pigmentos do caldo de cana-de-açúcar (DELGADO E CÉSAR, 1990).

A sulfitação apresenta como vantagens ao tratamento do caldo de cana-de-açúcar: decantação mais rápida do lodo (consequentemente, aumento da eficiência dos decantadores); menor viscosidade das massas cozidas e cozimento mais rápido (melhora a cristalização); confere uma melhoria significativa na cor do açúcar (diminuindo a cor do caldo) e ganhos na capacidade de centrífugas de açúcar. Entre as desvantagens, a sulfitação pode gerar a presença de resíduos de sulfito no açúcar cristal que, se excedidas às especificações demandadas por órgãos de fiscalização (REIN, 2007) podem causar embargos comerciais. A ingestão de sulfito

(ou ainda, compostos reduzidos de enxofre) tem sido relacionada à efeitos adversos à saúde humana, como náuseas, irritação gástrica, urticária e broncoespasmos em indivíduos sensíveis ao composto ou asmáticos (MACHADO et al., 2006). Essas reações alérgicas são causadas pela intolerância de alguns indivíduos à ingestão de sulfito, uma vez que não causam nenhuma reação que envolve o sistema imunológico (FAVERO et al., 2011).

Por outro lado, processos oxidativos, os quais incluem diversos agentes oxidantes, têm sido estudados e utilizados em usinas como substitutos à sulfitação. Esses agentes oxidantes, tais como o ozônio (SILVA et al., 2015) e o peróxido de hidrogênio (SARTORI et al., 2015; MANDRO et al., 2017), produzem radicais livres ativos em soluções que atacam grupos funcionais suscetíveis (DAVIS, 2001).

1.4. Ozonização como tecnologia de clarificação do caldo de cana-de-açúcar

Entre os agentes oxidantes que têm sido propostos, o ozônio está sendo utilizado em algumas usinas brasileiras. O ozônio, forma triatômica do oxigênio, apresenta-se como um gás incolor e odor pungente. Em fase aquosa, o ozônio decompõe-se rapidamente formando oxigênio e espécies radicalares, sendo um agente oxidante de alto potencial padrão ($E^\circ = 2,08$ V) quando comparado a outros agentes oxidantes (i.e., peróxido de hidrogênio, $E^\circ = 1,78$ V), permitindo que esta espécie possa reagir com uma numerosa classe de compostos precursores de cor (KUNZ et al., 1999). Seus mecanismos de reação se apresentam em dois tipos: a) cicloadição ou adição eletrolítica; ou b) decomposição em meio alcalino formando radical hidroxila (VILELA et al., 2008).

É amplamente difundido o interesse industrial pelo ozônio, especialmente com o desenvolvimento em larga escala de geradores de ozônio, com baixo custo de instalação e operacional, sendo utilizado no tratamento de água potável, através da desinfecção, remoção de odor e de algas, e na degradação de poluentes orgânicos (BRITTO e RANGEL, 2008). Sua primeira aplicação em escala industrial ocorreu ainda no início do século XX, na França, quando foi utilizado no tratamento de águas de abastecimento (WEBER e SMITH, 1986). Em função de seu poder oxidante e da ausência de produtos de decomposição perigosos ou tóxicos, o ozônio é um agente potencial no pré-tratamento ou tratamento de compostos refratários que, posteriormente, poderão ser removidos através de métodos convencionais. Desde 1982, o Food and Drug Administration certifica o ozônio como um produto GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1998).

Como agente clarificante, o ozônio foi testado, particularmente, na indústria de papel e celulose, o que poderia servir de referência para a transferência desta tecnologia à indústria sucroenergética (BOURZUTSCHKY, 2005). A aplicação do ozônio na indústria do açúcar é uma tecnologia nova e tem sido observado que os melhores resultados são obtidos quando a ozonização é precedida pela clarificação por precipitação, removendo efetivamente os pigmentos, os quais poderiam formar durante o processo de cristalização da sacarose. O uso de ozônio tem um benefício adicional por reduzir a coloração não somente do produto cristalizado, mas também do melaço (VERCELLOTTI e CLARKE, 1997).

Na década de 90, Moodley et al. (1999) publicaram um trabalho relatando as possibilidades de uso do ozônio na clarificação, em escala industrial, do açúcar refinado na África do Sul e demonstraram ser possível sua aplicação no processo de branqueamento do açúcar refinado. Eles reportaram que o ozônio se mostrou capaz de destruir compostos coloridos e precursores de cor em soluções de açúcar, além do que se apresenta como um processo contínuo de clarificação do açúcar, o que tem sido considerado sua maior vantagem. A outra vantagem apresentada pelo ozônio é sua capacidade de destruir bactérias, leveduras e fungos filamentosos na massa cozida. Por outro lado, sua possível desvantagem seria a inversão (ou hidrólise, no jargão das usinas) da sacarose, fato que não está claramente elucidado.

1.5. Justificativas

Entre as vantagens do uso do ozônio como substituto do enxofre, podemos citar: economia de 100% dos custos com relação à compra, logística e estocagem do clarificante atualmente utilizado (enxofre, tanino, peróxido de hidrogênio, etc.), uma vez que o ozônio é produzido dentro da própria usina; economia superior à 50% do consumo de cal virgem (CaO) utilizado no processo; economia de 100% dos produtos químicos alcalinizantes de condensado; economia de 100% dos produtos anti-incrustantes utilizados na evaporação e destilaria; economia nos custos de co-produtos químicos antibióticos e bactericidas utilizados na fermentação alcoólica; ganhos de até 4,85% na produção de etanol originados do mel residual; economia de 100% dos produtos químicos utilizados na produção de etanol como corretores de pH e condutividade (GASIL, 2011).

Baseado nas vantagens apresentadas e demais artigos citados na introdução, pode-se constatar que o ozônio não apenas traz benefícios para a etapa de clarificação, mas auxilia e melhora nas demais etapas do processo tanto para a produção de etanol como para a produção de açúcar. Porém, não existiam na literatura científica, trabalhos que relatassem a interferência

que a matéria-prima pudesse causar na ozonização, utilizado como agente de clarificação do caldo de cana-de-açúcar.

Portanto, o objetivo dessa Tese de Doutorado foi avaliar as possíveis interferências dos principais indicadores da qualidade da cana-de-açúcar no uso da ozonização como alternativa ao uso da sulfitação no processo de tratamento/purificação do caldo de cana-de-açúcar, ou seja:

- Avaliar a influência da maturação nos principais parâmetros de qualidade de matéria-prima, relacionando a composição do caldo de cana-de-açúcar, e no desempenho da ozonização como processo de clarificação do caldo de cana-de-açúcar;
- Analisar a interferência do tempo entre a colheita e o processamento sobre a qualidade da matéria-prima e no processo de ozonização do caldo de cana-de-açúcar;
- Avaliar a eficiência do processo de ozonização como processo de clarificação frente às variações da quantidade de impurezas vegetais e sobre a composição do caldo extraído;
- Elucidar a ação do ozônio sobre os compostos fenólicos através da determinação dos mecanismos de reação envolvidos.

Referências

- ALVES, F.V.; AGUIAR, C.L.; SARMENTO, S.B.S. Interferência dos teores de amido e dextranas na análise tecnológica do caldo de cana-de-açúcar. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 76, n. 3, p. 26-31, 2013.
- ALVES, F.V.; POLES, L.F.; AGUIAR, C.L.; SARMENTO, S.B.S. Structural and physicochemical characteristics of starch from sugarcane and sweet sorghum stalks. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 592-597, 2014.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, A.J.; GODOY, A.; SILVA, L.F.L.F.; BERNARDINO, C.D. Qualidade da cana-de-açúcar e seu impacto na indústria. In: RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica. 1 ed. 2004. p. 185-193.
- BRASSOLATTI, T. F. Z. et al. Análise do Percentual de Impurezas Vegetais e Minerais Presentes na Cana-de-Açúcar. **Revista Interdisciplinar de Tecnologias e Educação**, Salto, v. 5, n. 8, p.1-13, 1 jun. 2001.

- BOVI, R.; SERRA, G.E. Folhas verdes, folhas secas, fibra de colmo e a clarificação do caldo de cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 457-463, 2001.
- BOURZUTSCHKY, H.C.C. Color formation and removal – Options for the sugar and sugar refining industries: a review. **Zuckerindustrie**, Berlin, v. 130, n. 6, p. 470-475, 2005.
- BRAZ, H. Garapa boa deve vir de cana apropriada. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 27 ago. 2003. Suplemento Agrícola, p. 1-3.
- BRITTO, J.M.; RANGEL, M.C. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. **Química Nova**, v.31, n.1, p.114-122, 2008.
- CLARKE, M.A. Sugars and Nonsugars in sugarcane. In: CHEN, J.C.P.; CHOU, C.C. **Cane Sugar Handbook**. 12 ed. 1993, p. 21-39.
- CLARKE, M.A.; LEGENDRE, B.R. Qualidade da cana-de-açúcar: impactos no rendimento do açúcar e fatores de qualidade. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.17, n. 6, p. 36-40, 1999.
- 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.; CESAR, M.A. Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana. Piracicaba: ESALQ, 1990. 1001p
- ESKIN, N.A.M.; HENDERSON, H.M.; TOWNSEND, R.J. **Biochemistry of foods**. New York: Academic Press, 1971. 240 p.
- FARBER, L.; CARPENTER, F.G., McDONALD, E.J. Separation of colorants from cane sugar. **International Sugar Journal**, v. 73, n.870, p. 170-173, 1971
- 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.
- FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. 2 ed. Piracicaba: EME. 240 p. 2003.
- GASIL. Os 10 motivos para substituir o enxofre por ozônio. **JornalCana**, Ribeirão Preto, Agosto/2011. Tecnologia Industrial, p. 128.
- GODSHALL, M.A. Recent progress in sugar colourants: GC-MS studies and extraction techniques. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, 1996, v.70, p.153-161.
- GOODACRE, B.C.; COOMBS, J. Formation of colour in cane juice by enzyme catalysed reaction. Part II. **International Sugar Journal**, Londresv. 80, p. 323-326, 1978.

- HAYMAN, C. **Food science and nutrition and the Maillard reaction: melanoidins.** Disponível em: <http://www2.warwick.ac.uk/fac/med/research/csri/proteindamage/food_nutrition/melanoidins>. Acesso em: 24 jan. 2014.
- HODGE, J.E. Chemistry of browning reactions in models systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 1, n. 15, p. 928-943, 1953.
- JUNIOR, C.C. Fertilização com lodo de esgoto e vinhaça e influência nas frações de nitrogênio do caldo e qualidade da cana-de-açúcar. 2007. Dissertação (Mestre em Agronomia – Área de concentração: Produção Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP.
- KORT, M.J. Colour in Sugar Industry. In: BIRCH, G.G. & PARKER, K.J. (ed.) **Science and Technology**. London: Applied Science Publications, 1979, p. 97-130.
- KUNZ, A. et al. Construção e Otimização de um Sistema para produção e Aplicação de Ozônio em Escala de Laboratório. **Química Nova**, v. 2 n. 3, p.425-428, 1999.
- MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F.; VICENTE, E. Sulfitos em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.
- MANDRO, J.L.; MAGRI, N.T.C.; SARTORI, J.A.S.; AGUIAR, C.L. Redução de cor ICUMSA em soluções concentradas de açúcar bruto por processo oxidativo com peróxido de hidrogênio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017
- MARQUES, M.O.; MARQUES, T.A.; JÚNIOR, L.C.T. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana-de-açúcar**.Jaboticabal: FUNEP.2001. 170 p. 2001.
- MARTINS, S.I.F.S.; JONGEN, W.M.F.; BOEKEL, M.A.J.S.V. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetics modelling. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 364-373, 2000.
- MOODLEY, M.; DAVIS, S.B.; ADENDORFF, M. Full scale decolourisation trials with ozone. **International Sugar Journal**, v. 101, p.165-171, 1999.
- MOZAMBANI, A.E.; PINTO, A.S.; SEGATO, S.V.; MATTIUZ, F.M. História e Morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. p.10-18
- OGATA, B.H. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial uso em biorrefinarias. 2013. Dissertação (Mestra em Ciências – Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP.

- PATON, N.H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part I: Determination of chlorogenic acid and other phenolics in sugar cane by HPLC. **International Sugar Journal**, Londres, v. 94, n. 1121, p. 99- 108, 1992a.
- PATON, N.H. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part II: Concentration of phenolics in sugar cane and colour of first expressed juice. **International Sugar Journal**, Londres, v. 94, n. 1123, p. 157-160, 1992b.
- PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo: NOBEL, 2010. 248p.
- REIN, P.W. **Cane sugar engineering**. Berlin: Bartens, 2007. 768 p.
- SARTORI, J.A.S.; GALAVERNA, R.; EBERLIN, M.N.; CORREA, 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**, v.39, n.6, 1826-1831, 2015.
- SAXENA, P.; SRIVASTAVA, R.P.; SHARMA, M.L. Impact of cut to crush delay and biochemical changes in sugarcane. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 9, p. 692-699, 2010.
- SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006, p.19-36.
- SILVA, W.S.; SARTORI, J.A.S.; AGUIAR, C.L. Combination effect of ozone and heat treatment for the color reduction in sugarcane juice. **Chemical and Process Engineering Research**, 35, 75-83, 2015.
- SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 11, n. 2, 2009.
- STUPIELLO, J.P. Efeitos dos não açúcares. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.20, n. 3, 2002.
- STUPIELLO, J.P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar – cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.v.2, p. 761-804.
- UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA (UDOP). Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=acucar>>. Acesso em: 15 jun. 2017.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. USDA. **Food safety technology: a potential role for ozone?** Washington: Economic Research Service/USDA, 1998. p. 13-15.
- VERCELLOTTI, J.R.; CLARKE, M.A. Color Removal: Chemical Treatment. In: **Symposium on Sugar Colour**, v. 56, p. 272-295, 1997.

- VILELA, J.M.C.L.; D'AVILA, F.M.; MENATO, M.D.D. Inovações na purificação do caldo. In: MARQUES, et al. **Tecnologias na agroindústria canavieira**, Piracicaba: STAB, 2008, p. 263-272.
- VOLL, C.E. **Aplicação de vinhaça e extrato de palhico de cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas**. 2005. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- WEBER, W.J.; SMITH, E.H. Removing dissolved organic contaminants from water. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 20, n. 10, p. 970-979, 1986.
- ZHAO, Z.G.; ZHU, L.C.; YU, S.J.; FU, X.; ZENG, X. Simultaneous determination of ten major phenolics acids in sugarcane by a reversed phase HPLC method. **Sugar Industry**, v. 133, p. 1-6, 2008.

2. MATURAÇÃO COMO FATOR DE INFLUÊNCIA NA OZONIZAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

Do ponto de vista prático, nas usinas, a maturação consiste no processo de acúmulo de sacarose no colmo pela cana-de-açúcar. Esse processo pode ser influenciado por diversos fatores e influencia na composição do caldo de cana-de-açúcar que será processado. Entre os parâmetros de qualidade do caldo de cana-de-açúcar mais importantes, podemos citar: sacarose, açúcares redutores, cor, fenólicos, amido, turbidez e minerais. O objetivo foi avaliar o efeito da maturação de duas variedades de cana-de-açúcar sobre os principais parâmetros de qualidade de matéria-prima: ATR (Açúcares Totais Recuperáveis), cor ICUMSA, amido, fenólicos totais, flavonoides totais, turbidez e condutividade, analisando quais os parâmetros interferem na eficiência da ozonização do caldo de cana-de-açúcar. A quantidade de flavonóides totais no caldo de cana-de-açúcar foi o parâmetro que mais influenciou a eficiência da ozonização na redução de cor do caldo, indicando que o ozônio atua sobre esses compostos que são responsáveis pela formação de cor.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Qualidade; Cor; Maturação; Ozônio

Abstract

The maturation consists of the process of sucrose accumulation in the stalk by the sugarcane. This process can be influenced by several factors and influence the composition of the sugarcane juice that is processed. Among the most important quality parameters, it can be mention sucrose, reducing sugars, color, phenolics, starch, turbidity and minerals. The objective was to evaluate the effect of maturation of two sugarcane varieties on the main raw material quality parameters: TRS (Total Recoverable Sugars), ICUMSA color, starch, total phenolics, total flavonoids, turbidity and conductivity, analyzing which parameters interfere in the ozonation efficiency of the sugarcane juice. The amount of total flavonoids in the sugarcane juice was the parameter that most influenced the ozonation efficiency in the reduction of the juice color, indicating that the ozone acts on those that are responsible for the formation of color.

Keywords: Sugarcane; Quality; Color; Maturation; Ozone

2.1. Introdução

A maturação da cana-de-açúcar pode ser definida como o processo fisiológico de carregamento e armazenamento de sacarose nas células do parênquima dos colmos, podendo ser afetada por fatores ambientais e de manejo. A maturação é estimulada por condições desfavoráveis ao crescimento vegetativo e cada variedade apresenta características próprias quanto ao processo de maturação (SEGATO et al., 2006b).

O estágio de maturação da cana-de-açúcar influencia a composição química e tecnológica da cana-de-açúcar, bem como diversos fatores como: variedade, época de colheita, idade e corte, sanidade dos cultivares, brotação da soqueira, florescimento e chochamento, adubação, tratos culturais, entre outros (HORII, 2004).

Esses fatores que afetam a qualidade da cana-de-açúcar podem ser divididos em: intrínsecos (relacionados com a composição da cana-de-açúcar) e extrínsecos (relacionados com materiais estranhos ao colmo da cana-de-açúcar). Entre os fatores intrínsecos, estão: teores de sacarose, açúcares redutores, fibras, compostos fenólicos, ácido aconítico, amido e minerais. Os fatores extrínsecos são: terra, pedra, restos de cultura, plantas invasoras e compostos produzidos por micro-organismos (como dextranas) (AMORIM et al., 2004).

A sacarose é o açúcar mais abundante no caldo de cana-de-açúcar, encontrado em maior concentração no entrenó. O seu teor aumenta à medida que a cana-de-açúcar amadurece até que atinja altas concentrações para ser colhida (CLARKE, 1998).

A glicose e frutose, açúcares redutores, estão presentes na cana-de-açúcar em quantidades similares, com exceção de algumas variedades não usuais. À medida que a cana-de-açúcar amadurece, a quantidade de açúcares redutores tende a diminuir (CLARKE, 1998). Em alguns casos, o aumento da sua quantidade pode ser resultante da inversão de sacarose, que pode ser acelerada pela presença de ácidos (pH baixo) ou de algumas enzimas (invertase; EC 3.2.1.26) (KNECHT, 1990).

A fibra em cana-de-açúcar é uma mistura complexa de celulose, hemicelulose e lignina (REIN, 2007). O teor de fibra depende da idade do canavial, época de plantio e das variedades escolhidas, sendo um fator que interfere na eficiência da extração - quanto mais fibra a cana tiver, menor será a eficiência da extração. Por outro lado, cana-de-açúcar com baixos teores de fibra se tornam mais suscetíveis a acamamento e quebra de ponteiros pela ação do vento, bem como podem ser mais sujeitas a danos mecânicos provocados pelo corte e carregamento, levando a maiores perdas agrícolas por contaminação (SEGATO et al., 2006a).

O aumento do teor de fibra da cana-de-açúcar durante o processamento pode ser resultante da entrada de impurezas vegetais, promovendo um aumento no teor de compostos fenólicos no caldo a ser processado. Os compostos fenólicos interferem diretamente na cor do caldo de cana-de-açúcar, sendo pigmentos e precursores de cor presentes naturalmente na matéria-prima (CLARKE e LEGENDRE, 1999).

A cor pode ser definida como uma medida do efeito total de todos os compostos coloridos na absorbância da luz, englobando a ampla variedade de compostos complexos e que não são facilmente quantificados (REIN, 2007). A cor varia com a maturação, variedade, tipo de solo e presença de pragas. O estresse hídrico também pode influenciar na formação de cor. A planta aumenta os teores de aminoácidos no caldo como resposta ao estresse sofrido, desencadeando o aumento de reações de Maillard e formação de cor no processo (CLARKE e LEGENDRE, 1999). A qualidade do açúcar a ser produzido é diretamente afetada pela cor do caldo extraído (NAIDOO e LIONNET, 2000).

A etapa responsável pela redução de cor e turbidez do caldo resultando em um açúcar com menor cor é a clarificação. Para a produção de açúcar cristal branco, a clarificação do caldo é feita em duas etapas: sulfitação e caleagem (MARQUES et al., 2001). Na sulfitação, o dióxido de enxofre atua de forma complexa, se envolvendo na conversão de compostos coloridos em incolores, na inibição do desenvolvimento de cor pela reação do escurecimento enzimático entre açúcares redutores e aminoácidos e impedindo a formação de cor por oxidação (PAYNE, 2010).

A sulfitação possui como desvantagem a presença de sulfito como residual no açúcar, produto final. Embora seja utilizado tradicionalmente como aditivo na indústria de alimentos com a função de conservação, o sulfito vem sendo apontando como um problema para a saúde humana. Há relatos de broncoespasmos em indivíduos asmáticos sensíveis à ingestão de sulfito e também foram diagnosticados sérios distúrbios neurológicos por pessoas que possuem atividade reduzida da enzima sulfito oxidase, que é responsável pela conversão de sulfito em sulfato (FAVERO et al., 2011).

Entre as alternativas propostas para a substituição da sulfitação, o ozônio tem sido estudado e utilizado em usinas, de forma empírica. O ozônio, a forma triatômica do oxigênio, é considerado um agente oxidativo poderoso, o que lhe permite reagir com uma numerosa classe de compostos, e apresenta como vantagem produzir como resíduo após a sua reação água e oxigênio (VILELA et al., 2008). O mecanismo de ação do ozônio para redução de cor é direto e variado. Eles atacam as duplas ligações conjugadas que são responsáveis pela maior parte da

cor em compostos orgânicos e também atacam grupos fenólicos, através da quebra do anel benzeno (MOODLEY et al., 1999).

O objetivo foi acompanhar a influência da maturação de duas variedades de cana-de-açúcar sobre os principais parâmetros de qualidade de matéria prima: ATR (Açúcares Totais Recuperáveis), cor ICUMSA¹, amido, fenólicos totais, flavonoides totais, turbidez e condutividade, além de analisar quais os parâmetros interferem na eficiência de redução de cor através da ozonização do caldo de cana-de-açúcar.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Obtenção das amostras de cana-de-açúcar

As amostras das variedades Cana#1 e Cana#2 foram coletadas entre os meses de abril a setembro de 2016. As amostras foram doadas por uma indústria sucroenergética da região de Piracicaba, SP, Brasil. As plantas das duas variedades foram plantadas em ambiente de produção A e solo classificado como latossolo vermelho, sendo a colheita realizada na primeira soca do ciclo.

A variedade Cana#1 caracteriza-se por ser uma planta de porte ereto e que apresenta longevidade de soqueiras, sendo apta para plantio mecanizado. É considerada uma variedade média, com recomendação de colheita entre os meses de Julho a Outubro. É indicada para ambientes favoráveis (A-C).

A variedade Cana#2 é indicada para ambientes favoráveis (A-C), apresentando porte muito ereto e ótima brotação de soqueira. Caracteriza-se por ter bom perfilhamento e fechamento de entrelinhas. A colheita é recomendada no período de junho a outubro, sendo considerada uma variedade média.

O ano safra 2016/2017 se caracterizou como tendo um outono úmido. Os dados meteorológicos referentes ao período de coleta das amostras, que estão apresentados na Figura 3, são provenientes da base de dados da estação meteorológica do Laboratório de Engenharia de Biosistemas (ESALQ/USP).

¹ Sigla para *International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis*.

Figura 3. Dados climáticos do período de abril a setembro de 2016. A temperatura mínima no período foi de 10,4 °C, a temperatura máxima foi de 31,2 °C e a maior precipitação foi de 161,8 mm.

Em cada coleta, as amostras de cada variedade eram constituídas de 3 feixes de 10 colmos de cana-de-açúcar. Após a coleta da amostra, os 3 feixes de colmos foram desfibrados separadamente e 500 g de amostra de cada feixe foi prensada em prensa hidráulica a 250 kgf cm⁻² por 1 min, em triplicatas. As amostras obtidas de caldo de cana-de-açúcar foram filtradas em algodão para retirada das impurezas grosseiras.

As análises foram realizadas no Laboratório Hugot de Tecnologia em Sucroderivados, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), localizada no município de Piracicaba, SP., Brasil.

2.2.2. Açúcares totais recuperáveis (ATR)

Para calcular o ATR, é necessário realizar as análises de Pol%caldo (teor de sacarose aparente), Brix (Teor de sólidos solúveis) e Fibra%cana, que foram feitas conforme as instruções presente no manual do Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Etanol do Estado de São Paulo (CONSECANA) (2015). Os bolos úmidos obtidos da prensagem foram pesados, sendo possível obter Fibra%cana. Os caldos foram analisados quanto ao Brix, utilizando o refratrômetro digital Bellingham+Stanley Ltda., modelo RFM 712 (com correção automática de temperatura à 20 °C). E as análises de Pol%caldo foram feitas utilizando mistura

clarificante à base de alumínio para clarificar as amostras e, em seguida, o polarímetro modelo ADS 420 (Bellingham+Stanley Ltda.) para fazer as leituras sacarimétricas. Com os valores de Brix, leitura sacarimétrica e peso do bolo úmido foi possível calcular os valores de ATR através das equações descritas abaixo:

2.2.2.1. Pol%caldo (S)

a. Conversão da leitura sacarimétrica com a mistura clarificante à base de alumínio (LAI) para a leitura equivalente em subacetato de Pb (LPb):

$$LPb = (1,00621 \times LAI) + 0,05117$$

b. Calcular Pol%caldo (S) usando leitura equivalente em subacetato de chumbo (LPb):

$$S = LPb \times [0,2605 - (0,0009882 \times Brix)]$$

2.2.2.2. Fibra%cana (F):

$$F = (0,08 \times PBU) + 0,876$$

Onde: PBU = Peso do bolo úmido (g)

2.2.2.3. Pol%cana (PC):

$$PC = S \times (1 - 0,01 \times F) \times C$$

Onde: C = coeficiente de transformação da pol do caldo extraído em pol do caldo absoluto, calculado por:

$$C = 1,02626 - (0,00046 \times PBU) \text{ ou } C = 1,0313 - (0,00575 \times F)$$

2.2.2.4. AR%caldo (Açúcares Redutores do caldo)

$$AR\%caldo = 3,641 - (0,0343 \times Q)$$

Onde: Q (pureza do caldo) = $100 \times (S/Brix)$

2.2.2.5. AR%cana (Açúcares Redutores da Cana)

$$ARC = AR\%caldo \times (1 - 0,01 \times F) \times C$$

2.2.2.6. Cálculo do ATR (Açúcares Totais Recuperáveis)

$$\text{ATR} = (9,6316 \times \text{PC}) + (9,15 \times \text{ARC})$$

2.2.3. Ozonização do caldo de cana-de-açúcar

As amostras de caldo obtidas mensalmente foram ozonizadas com o objetivo de reduzir a cor do caldo de cana-de-açúcar. O pH do caldo de cana-de-açúcar foi ajustado para 5,0 e a temperatura para 50°C antes de iniciar a ozonização de acordo com as condições ótimas de redução de cor ICUMSA do caldo obtidas em estudos realizados por Magri (2015). A ozonização foi feita utilizando a dose de 1,95 mg mL⁻¹ de ozônio pelo tempo de 1 hora. Foi utilizado um ozonizador Azcozon HTU 500 AC. Após a ozonização, o caldo ozonizado foi armazenado em frascos de polipropileno a -18°C.

2.2.4. Determinação de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar

A dosagem de sacarose, glicose e frutose foi realizada de acordo com metodologia descrita por Shimadzu Applications News (2017). Os açúcares foram determinados utilizando-se cromatógrafo líquido ultra rápido com detector de espalhamento de luz evaporativo a baixa temperatura (HPLC/ELSD-LT) (Projeto Bioen-FAPESP; Processo FAPESP #2008/56146-5). Como fase móvel foi utilizada uma solução mista de acetronitrila/água ultrapura na proporção de 70/30, previamente filtrada contra membranas Millipore de 0,45 µm, bem como as amostras. A coluna utilizada foi amino (Shodex NH₂P-50 4E), termostatizada a 30°C. As condições de trabalho foram: fluxo de 1,0 mL/min, temperatura do detector igual a 40°C, pressão de 350 kPa e o nitrogênio foi usado como gás de nebulização. O ganho do detector foi 3 para a análise de sacarose e 7, para glicose e frutose. As análises foram feitas em triplicada após injeção de 5 µL de cada amostra para análise de sacarose e 20 µL, para glicose e frutose. Antes das análises quantitativas dos açúcares, soluções-padrão de sacarose, glicose e frutose (99,9%, Sigma-Aldrich) foram preparadas para os açúcares para a elaboração das curvas de calibração sendo que as concentrações para a curva de sacarose foram 5 a 30 g L⁻¹, e para de glicose e frutose, 0,1 a 0,5 g L⁻¹.

2.2.5. Determinação de cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar

A análise de cor ICUMSA foi feita segundo o método GS2/3-9 (2011) da ICUMSA Methods Book. Para cada amostra, primeiramente, foi feita a leitura em triplicata do Brix. Em seguida, foi feito o cálculo para a diluição, em triplicata, da amostra para obter um Brix de 1,25, através da média das leituras de Brix. As amostras foram filtradas em filtro à vácuo usando membranas de filtro de nitrato de celulose (tamanho de poro de 0,45 µm) e foi feita a correção do pH para $7,0 \pm 0,05$, utilizando soluções de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) ou ácido clorídrico (1 mol L^{-1}). Então, foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 420 nm com cubeta de quartzo de 1 cm. Também foi feita a leitura do Brix. O índice de cor ICUMSA é expresso pela Equação 1:

$$\text{Cor ICUMSA (420 nm)} = \left[\frac{\text{ABS} \times 1000}{\text{Densidade} \times \left(\frac{\text{Brix}}{100} \right)} \right] \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

ABS = absorvância da amostra lida à 420 nm

Brix = valor de sólidos solúveis totais da amostra diluída;

Densidade = calculada pela equação 2

$$\text{Densidade} = 1 + \left[\left(\text{Brix O} \times \frac{200 + \text{Brix C}}{5400} \right) \times \left(\frac{\text{Brix C}}{\text{Brix O}} \right) \right] \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

Brix O = Valor da leitura de sólidos solúveis na amostra original

Brix C = Valor da leitura de sólidos solúveis na amostra diluída com pH já ajustado

2.2.6. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar

O caldo foi filtrado em algodão e foram pesados 3,6 g da amostra em dois balões volumétricos de 50 mL, sendo que um balão foi identificado como balão #1 (Branco) e o outro como balão #2 (amostra). Foram adicionados 15 mL de solução cloreto de cálcio 40% (m/m), corrigido para pH 3,0 com solução de ácido acético $0,030 \text{ mol L}^{-1}$ em cada balão e após fechar os balões, foram colocados em banho de água em ebulição por 15 minutos, para a digerir a amostra e solubilizar qualquer amido presente. Posteriormente, foram adicionados 15 mL da solução de ácido acético $0,030 \text{ mol L}^{-1}$. O balão #1 foi completado com água destilada até o menisco. No balão #2, foram adicionados 10 mL da solução de iodeto/iodato de potássio (solução preparada com 10 mL de iodeto de potássio 10% (m/v), 90 mL de água ultrapura e 100 mL de iodato de potássio $0,0017 \text{ mol L}^{-1}$) para a formação de um complexo azul de amido-iodo e adicionou-se água até completar o volume.

Os dois balões foram homogeneizados. As leituras da absorvância foram feitas no intervalo de 10 a 20 minutos após a adição de iodeto/iodato à 700 nm, em célula de 10 mm. O

balão #1 foi utilizado como prova em branco. A curva de calibração foi feita utilizando as concentrações de amido variando de 0 a 500 mg L⁻¹ (COPERSUCAR, 2001).

2.2.7. Determinação de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar

O teor de compostos fenólicos nas amostras foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu, onde alíquotas (1,0 mL) das amostras foram misturadas com 0,5 mL do reagente de Folin–Ciocalteu diluído 1:10 (v/v) com água deionizada e 2,5 mL de solução a 20% (m/v) de Na₂CO₃. A leitura da absorbância foi feita a 725 nm após 45 min de reação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O conteúdo de fenólicos totais foi expresso como mg L⁻¹ (em equivalentes de ácido gálico) (adaptado de JULKUNEN-TIITTO, 1985).

2.2.8. Determinação de flavonoides totais em caldo de cana-de-açúcar

Foram adicionados 500 µL da amostra, 4,3 mL de etanol 70% (v/v), 100 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio (2%, m/v) e 100 µL de acetato de sódio 1 M em tubo de ensaio. Após 40 minutos, as leituras foram feitas no espectrofotômetro modelo UV mini-1249 (Shimadzu Co.; Kyoto, Japão) a 415 nm. A curva de calibração foi feita com rotina P.A. nas concentrações de 10 a 50 µg mL⁻¹ (MABRY, 1970).

2.2.9. Análise de turbidez do caldo de cana-de-açúcar

A turbidez das amostras foi obtida através da leitura em turbidímetro de bancada Tecnopon TB 1000 (Tecnopon, Piracicaba, SP), devidamente calibrado com os padrões de calibração.

2.2.10. Análise de condutividade do caldo de cana-de-açúcar

A leitura da condutividade foi feita diretamente no caldo de cana-de-açúcar utilizando condutivímetro Tec-4MP (Tecnal, Piracicaba, SP). O aparelho foi calibrado utilizando o padrão de 146 µS cm⁻¹ a 25 °C (Tecnopon, Piracicaba, SP).

2.2.11. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste F da análise de variância. Posteriormente as médias dos tratamentos foram comparadas do teste de comparações múltiplas de Tukey. Para as análises estatísticas foi utilizado o software R.

Foram realizados teste de correlação entre as variáveis estudadas utilizando a Coeficiente de Correlação do Produto de Momentos de Pearson, ou simplesmente Coeficiente de Pearson. Segundo Martins (2006), o coeficiente varia entre -1 ou +1 ou, expresso em porcentagens, entre -100 e + 100%.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Açúcares Totais Recuperáveis (ATR)

Os valores de Pol%cana obtidos para as duas variedades estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. A Pol%cana aumentou ao longo dos meses analisados para as duas variedades estudadas. Considerando que o processo de maturação consiste no acúmulo de sacarose nos colmos da cana-de-açúcar e o valor de Pol%cana representa o teor de sacarose aparente da cana-de-açúcar, ocorreu a maturação das duas variedades atingindo os maiores valores de sacarose no mês de setembro, sendo esse mês recomendado para a colheita.

Após a ozonização, houve redução nos valores de Pol%cana para as duas variedades estudadas até o mês de agosto (Cana#1) e até julho (Cana#2). Após esse período, os valores de Pol%cana permaneceram constantes.

Tabela 3. Valores de Pol%cana, AR%cana, Fibra%Cana e ATR das amostras coletadas entre os meses de Abril e Setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio), referentes a variedade Cana#1.

Mês	Pol%cana (ST)*	Pol%cana (O ₃)*	AR%cana (ST)*	AR%cana (O ₃)*	Fibra%Cana*	ATR (ST)*	ATR (O ₃)*
Abril	6.47 ^E	5.12 ^D	1.23 ^A	1.70 ^A	9.59 ^D	73.5 ^E	64.8 ^D
Maio	9.53 ^D	9.36 ^C	0.77 ^B	0.81 ^B	10.75 ^{BC}	97.7 ^D	96.5 ^C
Junho	10.56 ^C	9.78 ^C	0.72 ^B	0.89 ^B	10.06 ^{CD}	107.2 ^C	101.2 ^C
Julho	12.97 ^B	11.97 ^B	0.58 ^B	0.69 ^B	10.51 ^{BC}	128.9 ^B	120.2 ^B
Agosto	13.29 ^{AB}	13.39 ^A	0.69 ^B	0.69 ^B	11.12 ^B	132.9 ^B	133.7 ^A
Setembro	14.08 ^A	13.94 ^A	0.54 ^B	0.59 ^B	12.16 ^A	139.0 ^A	138.2 ^A

* Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Tabela 4. Valores de Pol%cana, AR%cana, Fibra%Cana e ATR das amostras coletadas entre os meses de Abril e Setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio), referentes a variedade Cana#2.

Mês	Pol%cana (ST)*	Pol%cana (O ₃)*	AR%cana (ST)*	AR%cana (O ₃)*	Fibra%Cana*	ATR (ST)*	ATR (O ₃)*
Abril	3.42 ^F	3.07 ^E	1.84 ^A	2.02 ^A	9.89 ^E	49.76 ^F	48.03 ^E
Mai	5.69 ^E	5.46 ^D	1.25 ^B	1.35 ^B	10.65 ^D	65.55 ^E	64.29 ^D
Junho	6.54 ^D	6.05 ^D	1.10 ^C	1.24 ^B	10.33 ^D	72.19 ^D	68.90 ^D
Julho	9.47 ^C	8.73 ^C	0.82 ^D	1.05 ^C	11.87 ^B	97.59 ^C	92.72 ^C
Agosto	10.99 ^B	10.61 ^B	0.72 ^E	0.86 ^D	11.09 ^C	111.16 ^B	108.86 ^B
Setembro	12.51 ^A	12.50 ^A	0.60 ^F	0.62 ^E	12.54 ^A	124.65 ^A	124.77 ^A

* Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Com a maturação da cana-de-açúcar, os valores de açúcares redutores diminuíram para as duas variedades estudadas. Na variedade Cana#1, os valores de AR%cana diminuíram com a maturação da cana-de-açúcar e na variedade Cana#2, os valores de AR%cana diminuíram de abril para maio e depois se mantiveram constante até Setembro, não diferindo estatisticamente ao nível de 5% de significância. Segundo Clarke (1998), a quantidade de açúcares redutores tende a diminuir com a maturação da cana-de-açúcar. Houve aumento dos valores de açúcares redutores após a ozonização nos meses em que houve redução de sacarose.

Os valores de Fibra%cana aumentaram ao longo do período de maturação para as duas variedades estudadas, sendo que esse ganho de fibra ao longo da maturação se deve ao seu desenvolvimento (EGGLESTON et al., 2013a).

Com relação aos valores de ATR (Açúcares Totais Recuperáveis), eles aumentaram ao longo do tempo de maturação para as duas variedades estudadas.

O máximo de ATR atingido foi no mês de setembro em ambos os casos. Na variedade Cana#1, houve redução de ATR após a ozonização em todos os meses, com exceção ao mês de Agosto. No mês de Setembro, o valor de ATR permaneceu constante após a ozonização, não ocasionando perdas de açúcares decorrentes da ozonização. Para a Cana#2, os valores de ATR após a ozonização diminuíram para as amostras do mês de Abril até Agosto. No mês de Setembro, o valor de ATR permaneceu constante após a ozonização.

2.3.2. Teores de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar

Os valores de sacarose, frutose e glicose do caldo, por HPLC, estão apresentados na Figura 4 e 5.

Figura 4. Valores de sacarose, glicose e frutose do caldo das amostras coletadas entre os meses de abril e setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio) da variedade Cana#1. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Figura 5. Valores de sacarose, frutose e glicose do caldo das amostras coletadas entre os meses de abril e setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio) da variedade Cana#2. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Os valores de sacarose tiveram comportamento semelhante ao da Pol%cana, porém para as amostras ozonizadas, ocorreu aumento dos valores em relação às amostras sem tratamento. Esse aumento não foi observado nos valores de Pol%cana. Provavelmente, isso se deve à metodologia do polarímetro ser sujeita a interferências, como a presença de amido e dextrana (ALVES et al., 2013; MANARIM, 2017).

O aumento da sacarose após a clarificação por ozônio também foi observado por Magri (2015). O aumento foi justificado devido a precipitação de compostos, o que promove uma purificação da sacarose. Sartori et al. (2015) também observou o mesmo comportamento de precipitação, porém foi ao utilizar o peróxido de hidrogênio como agente clarificante.

Com relação aos açúcares redutores, glicose e frutose, eles reduziram ao longo da maturação para as duas variedades estudadas. Após a ozonização, os valores de açúcares permaneceram estáveis quando comparados aos valores do caldo antes do tratamento.

2.3.3. Cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar

Outros parâmetros de qualidade de matéria-prima são importantes para determinar a eficiência do processo de produção de açúcar cristal. Um dos parâmetros mais importantes é a cor ICUMSA do caldo, uma vez que a maior parte da cor do açúcar vem da cor do caldo e não é formada durante o processo (LIONNET, 1992). Os valores de cor ICUMSA diminuíram ao longo do tempo de maturação (Figura 6) para as duas variedades analisadas.

A diminuição da cor ICUMSA ao longo da maturação da cana-de-açúcar se deve a redução da atividade enzimática da planta que diminui a geração de cor e a presença de mais fenólicos na cana-de-açúcar mais imatura, como foi constatado em estudos realizados por Souza-Sartori et al. (2013), que indicam que nas folhas e ponteiros de perfilhos há maiores quantidades de fenólicos que na cana-de-açúcar verde e que a cana-de-açúcar madura tem uma menor quantidade quando comparada com as outras duas fases. O que corrobora com Goodacre e Coombs (1978), que afirmam que a cana-de-açúcar imatura apresenta maior cor devido aos elevados quantidades de aminoácidos e pigmentos na planta nessa fase.

A cor ICUMSA da variedade Cana#2 foi superior aos valores encontrados para todos os meses quando comparado a da variedade Cana#1. Naidoo e Lionnet (2000) demonstraram em estudo realizado com 26 variedades na África do Sul que a cor é predominantemente um efeito varietal. Em um outro estudo feito por Lionnet (1992), a época de colheita tem um grande efeito sobre a cor do caldo, sendo que os maiores valores de cor estão presentes no início e no fim da safra.

Figura 6. Valores de cor ICUMSA das amostras coletadas entre os meses de Abril e Setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio), sendo (I) Cana#1 e (II) Cana#2. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Eggleston et al. (2013b) reportaram a redução da cor ICUMSA do caldo ao longo período de colheita (setembro a dezembro) para as 3 variedades estudadas, nos 2 períodos avaliados (2009 e 2010).

Após a ozonização, houve redução de cor ICUMSA em todos os meses analisados e para as duas variedades estudadas. A maior redução de cor ICUMSA para a variedade Cana#1 foi obtida no mês de Maio (25,7%), seguida do mês de Agosto (23,7%). Na variedade Cana#2, a maior redução de cor ICUMSA foi obtida na ozonização do caldo do mês de Agosto (44,7%), seguido do mês de Junho (33,8%). Essa diferença na quantidade de redução de cor do caldo se

deve ao fato de que o caldo tem uma composição heterogênea e outros parâmetros podem interferir na ação do ozônio sobre a redução da cor.

2.3.4. Teores de amido em caldo de cana-de-açúcar

Os valores de amido no caldo da variedade Cana#1 aumentaram entre os meses de Abril e Agosto, mas diminuíram no mês de Setembro (Figura 7). No caldo da variedade Cana#2, houve redução dos valores de amido de Maio a Agosto em relação à Abril, seguido de aumento no mês de Setembro.

Figura 7. Valores de amido das amostras coletadas entre os meses de Abril e Setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio), sendo (I) Cana#1 e (II) Cana#2. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Segundo Clarke e Legendre (1999), o teor de amido na cana-de-açúcar é um fator varietal e é mais alto em canas verdes de qualquer variedade. Eggleston et al. (2013a) verificaram o aumento dos teores de amido no caldo de cana-de-açúcar ao longo da maturação em uma variedade tardia estudada, porém observou uma queda no último mês de colheita. A queda foi justificada pelos autores como consequência da redução das temperaturas no mês de dezembro em Louisiana (USA), uma vez que a planta provavelmente utiliza o amido como uma resposta ao estresse causado pelo tempo frio. Eles concluíram que há um efeito de variedade muito forte sobre o teor de amido e que o teor de amido está ligado as características de maturação da variedade.

Após a ozonização, os valores de amido no caldo aumentaram nos meses de Maio e Setembro para as duas variedades estudadas e no mês de Junho para a variedade Cana#2.

2.3.5. Teores de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar

Os valores de fenólicos variaram ao longo do processo de maturação para as duas variedades estudadas (Figura 8).

No caldo da variedade Cana#1, os valores de fenólicos totais aumentaram de Abril até Agosto, diminuindo no mês de Setembro. No caldo da variedade Cana#2, o valor de fenólicos totais do mês de Maio foi menor que o valor de Abril e menor que os valores de Junho e Julho. Os valores do mês de Maio, Agosto e Setembro não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de significância.

À medida que a planta amadurece, ocorre a predominância de reações de catabolismo, diferindo do que ocorre na cana-de-açúcar imatura, na qual prevalecem as reações de síntese (anabolismo), uma vez que a planta se encontra em crescimento e as moléculas existentes são mais simples (EGGLESTON et al., 2013).

Simioni et al. (2006) avaliaram os efeitos de 10 variedades em idades diferentes (10 a 16 meses) nos teores de compostos fenólicos. Verificaram que, em 6 variedades, ocorreu um aumento significativo dos fenólicos totais do caldo com a idade da planta. Porém, nas demais variedades, o aumento de fenólicos totais não foi significativo em relação à idade.

Após a ozonização, os valores de fenólicos tenderam a diminuir para as duas variedades nos meses avaliados. Porém, houve aumento dos valores de fenólicos no caldo ozonizado da variedade Cana#1 0 nos meses de Junho e Julho. No caldo da variedade Cana#2,

houve aumento dos valores de fenólicos no caldo ozonizado nos meses de Abril, Agosto e Setembro.

A medida que a cana-de-açúcar amadurece, ela fica mais lignificada e ozônio quebra a lignina e libera ácidos fenólicos. De acordo com Aguiar et al. (2014), a extração utilizando a ozonização em ponteiros aumentou a quantidade de fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante total extraídos quando comparada à a extração sem a utilização de ozônio.

Figura 8. Valores de fenólicos totais das amostras coletadas entre os meses de Abril e Setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio), sendo (I) Cana#1 e (II) Cana#2. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

2.3.6. Teores de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar

As maiores concentrações de flavonoides foram obtidas no mês de Maio para as duas variedades estudadas e diminuíram nos meses de Junho e Julho, tendendo à aumentar com a maturação (Figura 9). De acordo com Riffer (1988) citado por Eggleston et al. (2013b), a quantidade de flavonoides presentes na cana-de-açúcar depende de vários fatores como: maturação, variedade, presença de doenças, fatores ambientais e de manejo.

Figura 9. Valores de flavonóides totais das amostras coletadas entre os meses de Abril e Setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio), sendo (I) Cana#1 e (II) Cana#2. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Após a ozonização, houve redução dos teores de flavonoides totais apenas nos meses de Agosto e Setembro para as amostras das duas variedades estudadas e no mês de Maio para a variedade Cana#1.

Os flavonóides, bem como os fenólicos e os aminoácidos, estão relacionados com a formação de cor no caldo de cana-de-açúcar, através de reações oxidativas e enzimáticas. A proporção desses componentes na cana-de-açúcar, por sua vez, depende da variedade e do local de plantio (PATON e DUONG, 1992)

2.3.7. Análise de turbidez do caldo de cana-de-açúcar

Os valores de turbidez aumentaram com a maturação da cana-de-açúcar para as duas variedades estudadas. Após a ozonização, houve aumento da turbidez nos meses de Junho, Julho e Agosto (Figura 10).

Figura 10. Valores de turbidez do caldo das amostras coletadas entre os meses de Abril e Setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio), sendo (I) Cana#1 e (II) Cana#2. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

2.3.8. Análise de condutividade do caldo de cana-de-açúcar

A condutividade do caldo de cana-de-açúcar tendeu a diminuir ao longo do tempo de maturação para as duas variedades estudadas. Após a ozonização, houve aumento dos valores de condutividade das amostras (Figura 11).

Figura 11. Valores de condutividade do caldo das amostras coletadas entre os meses de Abril e Setembro da safra 2016/2017 antes da ozonização (Sem tratamento) e depois da ozonização (Ozônio), sendo (I) Cana#1 e (II) Cana#2. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

2.3.9. Interação entre a maturação e a ozonização do caldo de cana-de-açúcar

Para correlacionar os parâmetros avaliados com a eficiência da ozonização na redução de cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar, foi utilizado a correlação de Pearson com o intuito de verificar quais parâmetros estão diretamente ou inversamente relacionados (Tabelas 5 e 6).

Ao avaliar os valores de correlação de Pearson da variedade Cana#1 e considerando que a maturação é representada pelo aumento do valor de Pol%cana, essa variável apresentou correlação forte positiva com a pureza, a turbidez e o ATR, ou seja, quanto mais madura a cana-de-açúcar, maior a turbidez e a pureza do caldo, e maior a quantidade de ATR da cana-de-açúcar. A variável Pol%cana apresentou correlação forte negativa com o AR%cana e a condutividade, ou seja, quanto mais madura a cana-de-açúcar, menor a quantidade de açúcares redutores na cana-de-açúcar e menor a condutividade do caldo. Além desses parâmetros, a Pol%cana também apresentou correlação moderada negativa com a cor e moderada positiva com o amido, ou seja, quanto mais madura a cana-de-açúcar, menores são os valores de cor do caldo e maiores são as quantidades de amido no caldo. Os demais parâmetros estudados apresentaram correlações fracas à nula tanto positiva como negativa com a Pol%cana.

No caso da variedade Cana#2, a Pol%cana também apresentou correlação forte positiva com a pureza, turbidez e ATR. E também apresentou correlação forte negativa com os açúcares redutores. Mas diferiu da variedade Cana#1, por apresentar correlação forte negativa com a variável cor, ou seja, para a variedade Cana#2, quanto mais madura a cana-de-açúcar, menor será a cor do caldo. E com relação a condutividade, a variável Pol%cana apresentou correlação moderada negativa, diferindo da variedade Cana#1.

Ao analisar os resultados apresentados acima, é possível observar que há um efeito varietal na composição do caldo de cana-de-açúcar, bem como sobre a ação do ozônio na redução da cor do caldo tratado.

Com relação ao uso do ozônio como agente clarificante, o IRC (Índice de redução de cor) apresentou correlação forte positiva com o teor de flavonoides, ou seja, a maior redução de cor ICUMSA por ozonização é obtida quanto maior for o teor de flavonóides do caldo. O IRC apresentou correlação moderada positiva com a turbidez, ou seja, a maior redução de cor ICUMSA é obtida com maiores valores de turbidez.

Tabela 5. Correlação de Pearson para os parâmetros analisados das amostras referentes à variedade Cana#1 (n= 18).

	Pol%cana	Pureza	AR%cana	ATR	Cor	Amido	Fenolicos	Flavonoides	Turbidez	Condutividade	IRC(%)
Pol%cana	1,000										
Pureza	0,927	1,000									
AR%cana	-0,930	-1,000	1,000								
ATR	0,999	0,911	-0,915	1,000							
Cor	-0,692	-0,510	0,504	-0,708	1,000						
Amido	0,572	0,312	-0,319	0,593	-0,444	1,000					
Fenolicos	0,310	0,238	-0,224	0,316	-0,488	0,625	1,000				
Flavonoides	-0,016	0,073	-0,086	-0,029	0,681	0,142	-0,267	1,000			
Turbidez	0,810	0,818	-0,831	0,799	-0,157	0,431	-0,065	0,495	1,000		
Condutividade	-0,873	-0,791	0,787	-0,875	0,860	-0,490	-0,497	0,438	-0,510	1,000	
ICR(%)	0,188	0,303	-0,308	0,170	0,460	0,361	0,198	0,871	0,541	0,128	1,000

Onde: $IRC(\%) = 100 - ((Cor\ O_3 * 100) / Cor\ ST)$, sendo: IRC= Índice de redução de cor; Cor O₃ = Cor do caldo ozonizado; Cor ST = Cor do caldo sem tratamento.

Tabela 6. Correlação de Pearson para os parâmetros analisados das amostras referentes à variedade Cana#2 (n= 18).

	Pol%cana	Pureza	AR%cana	ATR	Cor	Amido	Fenolicos	Flavonoides	Turbidez	Condutividade	IRC (%)
Pol%cana	1,000										
Pureza	0,956	1,000									
AR%cana	-0,956	-1,000	1,000								
ATR	0,999	0,940	-0,941	1,000							
Cor	-0,823	-0,677	0,681	-0,840	1,000						
Amido	0,323	0,121	-0,125	0,352	-0,412	1,000					
Fenolicos	-0,351	-0,237	0,234	-0,366	0,132	-0,224	1,000				
Flavonoides	0,110	0,108	-0,111	0,107	0,142	0,077	-0,801	1,000			
Turbidez	0,963	0,969	-0,968	0,954	-0,769	0,063	-0,265	0,032	1,000		
Condutividade	-0,670	-0,813	0,810	-0,643	0,329	0,001	-0,214	0,265	-0,722	1,000	
IRC (%)	0,037	0,198	-0,187	0,012	0,392	-0,672	-0,358	0,278	0,209	-0,235	1,000

Onde: $IRC(\%) = 100 - ((Cor\ O_3 \cdot 100) / Cor\ ST)$, sendo: IRC= Índice de redução de cor; Cor O₃ = Cor do caldo ozonizado; Cor ST = Cor do caldo sem tratamento.

2.4. Conclusão

A eficiência da ozonização na redução de cor do caldo foi influenciada pela quantidade de flavonoides totais presentes no caldo de cana-de-açúcar, indicando que o ozônio age sobre esses compostos responsáveis pela formação de cor. As correlações de Pearson dos parâmetros apresentaram intensidades diferentes para as variedades estudadas, mostrando a existência do efeito varietal.

Referências

- AGUIAR, C.L.; CORREA, N.T.; DAL-BÓ; C.J.R.; SOUZA-SARTORI, J.A.; HARDER, M.N.C. Full-Factorial design for extraction in vitro of antioxidants from sugarcane top leaves assisted by ozone. **Sugar Journal**, v.77, n.3, p.22-29, 2014.
- ALVES, F.V.; AGUIAR, C.L.; SARMENTO, S.B.S. Interferência dos teores de amido e dextranas na análise tecnológica do caldo de cana-de-açúcar. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 76, n. 3, p. 26-31, 2013.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, A.J.; GODOY, A.; SILVA, L.F.L.F; BERNARDINO, C.D. Qualidade da cana-de-açúcar e seu impacto na indústria. In: RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros e Marques Editoração Eletrônica. 1 ed. 2004, p. 185-193.
- CLARKE, M. Composition of sugarbeet and sugarcane and chemical behavior of constituents in processing (Section 2.2 - Composition of sugarcane juice). In: VAN DER POEL, P.W.; SCHIWECK, H.; SHWARTZ, T. **Sugar Technology - Beet and Cane Sugar Manufacture**. Berlin: Verlag Dr. Albert Bartens KG, 1 ed. 1998, p. 115-208.
- CLARKE, M.A.; LEGENDRE, B.R. Qualidade da cana-de-açúcar: impactos no rendimento do açúcar e fatores de qualidade. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.17, n. 6, 1999.
- CONSECANA – Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Manual de instruções**. Piracicaba: CONSECANA. 2015. 112 p.
- COPERSUCAR – Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. Métodos Analíticos. In: COPERSUCAR. **Manual de Controle Químico da Fabricação do Açúcar**. Piracicaba: Copersucar, 2001, p.1-57.

- EGGLESTON, G.; Viator, R.; Gateuil, A.; Fenger, J-A.; White, P.; Jackson, W.; Waguespack Jr.; H.; Blackwelder, N. Effects of seasonal variations of sugarcane stalk and extraneous matter quantity and quality as they effect recoverable sugar, starch and fiber: Part I. **International Sugar Journal**, v.115, p. 477-487, 2013a.
- EGGLESTON, G.; Viator, R.; Gateuil, A.; Fenger, J-A.; White, P.; Jackson, W.; Waguespack Jr.; H. Seasonal variations of sugarcane stalk and extraneous matter on pH, color and ash as they affect the production of high quality raw sugars (Part II). **International Sugar Journal**, v.117, p. 634-641, 2013b.
- 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.
- GOODACRE, B.C.; COOMBS, J. Formation of colour in cane juice by enzyme catalysed reaction. Part II. **International Sugar Journal**, Londresv. 80, p. 323-326, 1978.
- HORII, J. A qualidade da matéria-prima, na visão agrícola. **Visão Agrícola**, v.1, n.1, p.91-93, 2004.
- ICUMSA - Method G.S. 2/3-9. The determination of sugar solution color at 7.0 - Accepted. **International Comission for Uniform Methods of Sugar Analysis**. 2011
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic Constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, n.2, p. 231-217, 1985.
- KNECHT, R.L. Properties of sugar. In: PENNINGTON, N.L.; BAKER, C.W. **Sugar**. New York: AVI Book, 1990.
- LIONNET, G.R.E. The effect of some selected factors on the colour in cane. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, 1992.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: _____. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. p. 33-36 .
- MAGRI, N.T. **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**. 2015. Dissertação (Mestra em Ciências – Área de concentração: Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- MANARIM, G.R. **Interferentes analíticos provenientes da colheita, carregamento e transporte nas análises tecnológicas de caldo de cana-de-açúcar**. 2017. Dissertação (Mestra em Ciências – Área de concentração: Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MARQUES, M.O.; MARQUES, T.A.; JÚNIOR, L.C.T. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP. 2001, 170 p.
- MARTINS, G.A. **Estatística geral e aplicada**. São Paulo: Atlas, 2006. 421p.
- MOODLEY, M.; DAVIS, S.B.; ADENDORFF, M. Full scale decolourisation trials with ozone. **International Sugar Journal**, v. 101, p.165-171, 1999.
- NAIDOO, L.; LIONNET, G.R.E. The effect of cane variety and other agricultural factors on juice composition. **Proceedings of the South African Sugar Technologists’ Association**, v.74, p. 19-24, 2000.
- PATON; N.H.; DUONG, M. Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part III. Role of chlorogenic acid and flavonoids in enzymic browning fo cane juice. **International Sugar Journal**, v. 94, p.170-176, 1999.
- PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo: NOBEL, 2010. 248p.
- REIN, P.W. **Cane sugar engineering**. Berlin: Bartens, 2007. 768 p.
- SARTORI, J.A.S.; GALAVERNA, R.; EBERLIN, M.N.; CORREA, 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**, v.39, n.6, 1826-1831, 2015.
- SEGATO, S.V.; ALONSO, V.; LAROSA, G. Terminologias no setor sucroalcooleiro. In: SEGATO, S.V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006a. p.396-405
- SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006b. p.19-36.
- SHIMADZU APPLICATION NEWS. n. **L294**, 2015.
- SIMIONI, K.R.; SILVA, L..L.F.; BARBOSA, V.; RÉ, F.E.; BERNADINO, C.D.; LOPES, M.L.; AMORIM, H.V. Efeito da variedade e época de colheita no teor de fenóis totais em cana-de-açúcar. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v. 24, n. 3, p. 36-39, 2006.

- SOUZA-SARTORI, J.A.; PRADO, A.; VEIGA, L.; TORRES, N.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Antioxidant capacity of fractions of alcoholic extracts of sugarcane leaves. **Zucker Industrie**, v. 138, n. 63, p. 165-169, 2013.
- VILELA, J.M.C.L.; D'AVILA, F.M.; MENATO, M.D.D. Inovações na purificação do caldo. In: MARQUES, et al. **Tecnologias na agroindústria canavieira**, Piracicaba: STAB. 2008, p. 263-272.

3. TEMPO ENTRE COLHEITA E PROCESSAMENTO COMO FATOR DE INFLUÊNCIA NA QUALIDADE E NA OZONIZAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

O tempo entre a colheita e o processamento da cana-de-açúcar é um dos parâmetros mais importantes para garantir a qualidade da matéria-prima entregue na usina. Ao cortar a cana-de-açúcar, há exposição da área do colmo onde está a sacarose, permitindo que os micro-organismos se proliferem e promovam perdas de açúcar e formação de compostos indesejados. A elevada quantidade de micro-organismo que entra no processo, não só prejudica o processo de açúcar como também a fermentação. O objetivo foi avaliar a influência do tempo entre a colheita e o processamento da cana-de-açúcar sobre os principais parâmetros de qualidade - ATR (Açúcares Totais Recuperáveis), cor ICUMSA, amido, fenólicos totais, flavonoides totais, turbidez - e avaliar o efeito do ozônio sobre as bactérias presentes no caldo deteriorado. Após analisar os caldos de cana-de-açúcar obtidos, foi possível correlacionar os principais fatores estudados utilizando coeficiente de correlação de Pearson. A deterioração da cana-de-açúcar se caracteriza, principalmente, pelo aumento dos açúcares redutores e presença de dextrana. O AR%cana apresentou correlação positiva com o amido e as variáveis ATR, cor ICUMSA e flavonoides foram as que apresentaram as maiores correlações negativas. Ou seja, quanto maior o tempo entre a colheita e o processamento, indicado pelo aumento do AR%cana, houve diminuição no valor de ATR da cana-de-açúcar, e no caldo, houve aumento do teor de amido e diminuição da cor ICUMSA e flavonoides. Os demais parâmetros estudados não apresentaram correlações significativas com o AR%cana. O ozônio se mostrou eficiente na redução do número de bactérias presentes no caldo de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Deterioração; Dextrana; Contaminação; Ozônio

Abstract

The time between harvesting and processing of sugarcane is one of the most important parameters to guarantee the quality of raw material delivered at the mill. When cutting the sugarcane, there is exposure of the stalk area where the sucrose is, allowing microorganisms to proliferate and promote sugar losses and formation of unwanted compounds. The high amount of microorganism that enters the process, not only harms the sugar process but also the fermentation. The objective of this study was to evaluate the influence of time between harvest and sugarcane processing on the main quality parameters - TRS (Total Recoverable Sugars), ICUMSA color, starch, total phenolics, total flavonoids, turbidity - and to evaluate the effect of ozone on the bacteria present in the deteriorated juice. After analyzing

the sugarcane juice obtained, it was possible to correlate the main factors studied using Pearson's correlation coefficient. The deterioration of sugarcane is mainly characterized by the increase of reducing sugars and the presence of dextran. The AR% cane presented positive correlation with the variable starch. TRS, ICUMSA color and flavonoids were the ones that presented the highest negative correlations. That is, the longer the time between harvesting and processing, indicated by the increase in AR% cane, there was a decrease in the TRS value of the sugarcane, and in the juice, there was an increase in the starch content and a decrease in the ICUMSA color and flavonoids. The other parameters studied did not present significant correlations with AR% cane. Ozone was efficient in reducing the number of bacteria present in the sugarcane juice.

Keywords: Deterioration; Dextran; Contamination; Ozone

3.1. Introdução

Uma vez que a cana-de-açúcar é cortada, ela está sujeita a deterioração que é causada, em sua maior parte, pela atividade de micro-organismos e resulta em perda de açúcares e formação de impurezas indesejadas (REIN, 2007). A cana-de-açúcar continua respirando, o que leva a diminuição das reservas nutritivas dos colmos causada pela inversão de sacarose. A perda de sacarose pode ser mais significativa em regiões de clima quente e úmido do que em regiões de clima frio e seco. Ocorre o ressecamento dos colmos pela perda contínua de água e aumento do teor de fibra, ocasionando problemas para o processamento como dificuldade na moagem e maiores teores de açúcar no bagaço. (MARQUES et al., 2001).

A deterioração ocorre mais rapidamente em cana-de-açúcar colhida picada do que colhida inteira, devido à maior quantidade de superfícies expostas. Em estudo realizado por Singh e Solomon (2003), observou-se que ao comparar a cana-de-açúcar colhida picada e inteira após 7 dias de espera para processamento, houve maior redução dos teores de sacarose, pureza e pH na cana picada quando comparada com a cana inteira e maiores quantidades de dextrana e açúcares redutores na cana picada.

Uma alternativa para minimizar o efeito da cana colhida em toletes é garantir que as facas das colhedoras estejam sempre bem afiadas proporcionando um corte limpo sem que haja liberação de elevadas quantidades de caldo. Os micro-organismos do solo e do ar contaminam o caldo e as superfícies expostas, podendo produzir como produtos de suas atividades dextrana, etanol, oligossacarídeos e ácidos orgânicos através do consumo do açúcar (REIN, 2007).

Os produtos resultantes da deterioração da pós-colheita da cana-de-açúcar dependem do método de colheita, injúrias na cana-de-açúcar, condições ambientais, variedades, demora

entre a colheita e o processamento, entre outros. No entanto, o tempo entre a colheita e o processamento (*cut-to-crush*) e temperatura externa são os fatores de maior importância para a determinação da taxa de perda de sacarose por inversão, de formação de dextrana, polissacarídeos e ácidos orgânicos, e de respiração (SOLOMON, 2009).

Dextranas são formadas pela conversão enzimática catalítica da sacarose com a dextranasacarase, a qual é secretada pela *Leuconostoc mesenteroides* (BUCHHOLZ et al., 1998). A dextrana se forma rapidamente na exposição do tecido da cana-de-açúcar, no caldo e no xarope, em condições de pH ácido, temperatura elevada e baixo brix. O acúmulo de dextrana causa muitos problemas no processamento, incluindo perda no rendimento, baixa recuperação, aumento da viscosidade e pureza do melaço, dificuldades na filtração e distorção do cristal (CLARKE, 1993).

As principais mudanças ocasionadas na cana-de-açúcar e no caldo, consequentemente, são originadas pela presença de microrganismos, principalmente, as bactérias. Após a extração do caldo, as bactérias presentes podem prejudicar o processo.

O ozônio tem sido muito utilizado como agente desinfetante atuando sobre uma grande variedade de organismos como bactérias, vírus e protozoários, com o intuito de inativar micro-organismo, aumentar a vida-de-prateleira de produtos alimentícios e sanitização de equipamentos e superfícies (SILVA et al., 2011).

Além disso, o ozônio tem sido estudado e utilizado de forma empírica como alternativa ao processo de sulfitação. Durante a produção de açúcar cristal branco, a etapa de sulfitação é responsável por reduzir a cor do açúcar a ser produzido (PAYNE, 2010). Porém, a sulfitação apresenta como desvantagem a presença de sulfito no produto final, o açúcar cristal branco. O sulfito tem sido considerado prejudicial à saúde humana, uma vez que estudos tem demonstrado que pessoas que são sensíveis à sua ingestão, apresentam sintomas como congestionamento no peito, tosse, desconforto na garganta, hipotensão e dermatite de contato e para pessoas asmáticas, pode induzir à episódios de asma ou broncoespasmos (POPOLIM, 2009; PAPAZIAN, 2013; MACHADO, 2008).

O ozônio atua na oxidação de duplas ligação e na clivagem de ácidos carboxílicos, álcool e aldeídos, na abertura de anéis aromáticos de fenóis e na oxidação de outros grupos aromáticos, sendo muito utilizado e estudado no processamento de açúcar refinado (DAVIS, 2001).

O objetivo foi avaliar a influência do tempo entre a colheita e o processamento da cana-de-açúcar sobre os principais parâmetros de qualidade e avaliar o efeito do ozônio sobre os micro-organismos presentes no caldo deteriorado.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Obtenção das amostras

As amostras, da variedade IAC955000, foram coletadas no mês de setembro de 2016, por ser o mês de máxima maturação da variedade. Foram doadas por uma indústria sucroenergética da região de Piracicaba. A colheita foi realizada na primeira soca do ciclo dela, sendo que as plantas estavam acondicionadas em ambiente de produção A e em solo classificado como latossolo vermelho.

A variedade IAC955000 é considerada uma variedade média, sendo recomendado a sua colheita entre os meses de Julho a Outubro. Caracteriza-se por ser uma planta de porte ereto, indicada para ambientes favoráveis (A-C) e que apresenta longevidade de soqueiras, sendo apta para plantio mecanizado.

As amostras eram constituídas 12 feixes de 10 colmos de cana-de-açúcar coletadas aleatoriamente no talhão. Após a coleta das amostras, 3 feixes de 10 colmos foram desfibrados e 500 g de amostra de cada feixe foi prensada em prensa hidráulica a 250 kgf/cm² por 1 minuto, em triplicata. As amostras obtidas de caldo de cana-de-açúcar foram filtradas em algodão para retirada das impurezas e consideradas como as amostras do tempo zero (0 h). O mesmo procedimento foi feito com o conjunto de 3 feixes por 3 dias consecutivos (24, 48 e 72 horas após o corte). Os colmos de cada feixe foram cortados em toletes para simular a colheita mecanizada e armazenados sob plástico. O tempo entre o corte e o processamento foi feito para simular o que ocorre nas usinas.

As análises foram realizadas no Laboratório Hugot de Tecnologia em Sucroderivados, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), localizada no município de Piracicaba, SP., Brasil.

Os dados meteorológicos que são provenientes da base de dados da estação meteorológica do Laboratório de Engenharia de Biossistemas (ESALQ/USP), se referam ao período de coleta das amostras estão apresentados na Figura 12.

Durante o período de realização do experimento, ocorreu uma queda de temperatura após o dia da coleta (19/09/2016) e aumento da umidade relativa, o que pode ter influenciado nos resultados obtidos. O período se caracterizou como frio e úmido, apresentando temperaturas mínimas de 9,7 °C.

Figura 12. Dados climáticos do período de 19 a 22 de setembro de 2016. Não ocorreu precipitação no período.

3.2.2. Açúcares Totais Recuperáveis (ATR)

As análises de Pol%cana, Brix e Fibra%Cana são necessárias para calcular o ATR e foram feitas instruções presente no manual do CONSECANA (2015). A Fibra%Cana é calculada a partir do peso dos bolos úmidos. Os caldos foram analisados quanto ao Brix, utilizando o refratrômetro digital Bellingham+Stanley Ltda., modelo RFM 712 (com correção automática de temperatura à 20 °C), e a análise de Pol%cana foi feita através da leitura sacarimétrica das amostras clarificadas, utilizando mistura clarificante à base de alumínio, em polarímetro modelo ADS 420 (Bellingham+Stanley Ltda.). Os valores de ATR foram calculados utilizando os valores de Brix, leitura sacarimétrica e peso do bolo úmido através das equações descritas abaixo:

3.2.2.1. Pol%caldo (S)

a. Conversão da leitura sacarimétrica com a mistura clarificante à base de alumínio (LAI) para a leitura equivalente em subacetato de Pb (LPb):

$$LPb = (1,00621 \times LAI) + 0,05117$$

b. Calcular Pol%caldo (S) usando leitura equivalente em subacetato de chumbo (LPb):

$$S = LPb \times [0,2605 - (0,0009882 \times Brix)]$$

3.2.2.2. Fibra%cana (F):

$$F = (0,08 \times \text{PBU}) + 0,876$$

Onde: PBU = Peso do bolo úmido (g)

3.2.2.3. Pol%cana (PC):

$$\text{PC} = S \times (1 - 0,01 \times F) \times C$$

Onde: C = coeficiente de transformação da pol do caldo extraído em pol do caldo absoluto, calculado por:

$$C = 1,02626 - (0,00046 \times \text{PBU}) \text{ ou } C = 1,0313 - (0,00575 \times F)$$

3.2.2.4. AR%caldo (Açúcares Redutores do caldo)

$$\text{AR\%caldo} = 3,641 - (0,0343 \times Q)$$

Onde: Q (pureza do caldo) = 100 x (S/Brix)

3.2.2.5. AR%cana (Açúcares Redutores da Cana)

$$\text{ARC} = \text{AR\%caldo} \times (1 - 0,01 \times F) \times C$$

3.2.2.6. Cálculo do ATR (Açúcares Totais Recuperáveis)

$$\text{ATR} = (9,6316 \times \text{PC}) + (9,15 \times \text{ARC})$$

3.2.3. Análise de cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar

A leitura do Brix foi feita para cada amostra, em triplicata. Baseado no valor do Brix, foi feita a diluição da amostra com o intuito de obter uma diluída com um brix de 1,25. Essa amostra diluída foi filtrada em filtro à vácuo utilizando membranas de filtro de nitrato de celulose (tamanho de poro de 0,45 µm) e foi feita a correção do pH para $7,0 \pm 0,05$, utilizando soluções de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) ou ácido clorídrico (1 mol L^{-1}). Em seguida, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro à 420 nm com cubeta de quartzo de 1 cm e a

leitura do Brix em refratômetro digital. Baseado no método GS2/3-9 (2011) da ICUMSA Methods Book, o índice de cor ICUMSA foi calculado utilizando a Equação 1:

$$Cor\ ICUMSA\ (420\ nm) = \left[\frac{ABS \times 1000}{Densidade \times \left(\frac{Brix}{100} \right)} \right] \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

ABS = absorbância da amostra lida à 420 nm

Brix = valor de sólidos solúveis totais da amostra diluída;

Densidade = calculada pela equação 2

$$Densidade = 1 + \left[\left(Brix\ O \times \frac{200 + Brix\ C}{5400} \right) \times \left(\frac{Brix\ C}{Brix\ O} \right) \right] \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

Brix O = Valor da leitura de sólidos solúveis na amostra original

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

3.2.4. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar

Para determinar o amido presente nos caldos de cana-de-açúcar foi utilizado o método Copersucar (2001). Após filtrar o caldo, 3,6 g de amostra foi pesada em 4 balões volumétricos de 50 mL. Destes 4 balões, o balão 1 foi considerado banco e os outros três balões, amostras. Em todos os balões, foram adicionados 15 mL de solução cloreto de cálcio 40% (m/m), corrigido para pH 3,0 com solução de ácido acético 0,030 mol L⁻¹. Após fechá-los, foram colocados em banho de água em ebulição por 15 minutos, para a digerir a amostra e solubilizar qualquer amido presente. Posteriormente, após o resfriamento em água corrente, foram adicionados 15 mL da solução de ácido acético 0,030 mol L⁻¹ em todos os balões. O balão do branco foi completado com água destilada até o menisco. Nos balões das amostras, foram adicionados 10 mL da solução de iodeto/iodato de potássio (preparo diário – 10 mL de iodeto de potássio 10% (m/v), 90 mL de água ultrapura e 100 mL de iodato de potássio 0,017 mol L⁻¹) para a formação de um complexo azul de amido-iodo e em seguida, foi completado com água até o menisco.

Após homogeneizar os dois balões, as leituras da absorbância foram feitas no intervalo de 10 a 20 minutos após a adição de iodeto/iodato à 700 nm, em célula de 10 mm. A curva de calibração foi feita utilizando as concentrações de amido variando de 0 a 500 mg L⁻¹.

3.2.5. Determinação de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar

O teor de compostos fenólicos nas amostras foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu (adaptado de JULKUNEN-TIITTO, 1985). Em tudo de ensaio, foram adicionadas alíquotas (1,0 mL) das amostras e misturadas com 0,5 mL do reagente de Folin–Ciocalteu diluído 1:10 (v/v) com água deionizada. Após 40 minutos, adicionou-se 2,5 mL de solução a 20% de Na_2CO_3 e foi feita a leitura da absorbância foi feita a 725 nm. O conteúdo de fenólicos totais foi expresso como mg L^{-1} (em equivalentes de ácido gálico).

3.2.6. Determinação de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar

A determinação de flavonóides totais no caldo de cana-de-açúcar foi feita segundo metodologia descrita por Mabry (1970). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 500 μL da amostra, 4,3 mL de etanol 70% (v/v), 100 μL de solução etanólica de cloreto de alumínio (2%) e 100 μL de acetato de sódio 1 mol L^{-1} . As leituras foram feitas no espectrofotômetro modelo UV Mini-1240 (Shimadzu Co.; Kyoto, Japão) a 415 nm, após 40 minutos de reação. A curva de calibração foi feita com rutina P.A. nas concentrações de 10 a 50 mg L^{-1} .

3.2.7. Determinação de dextrana em caldo de cana-de-açúcar

A determinação de dextrana nas amostras de caldo foi feita segundo a metodologia proposta por Roberts (1983). Inicialmente, foram adicionados 10 mL de caldo de cana-de-açúcar em um béquer de 100 mL, com 0,35 g de terra diatomácea e 1 mL de solução de ácido tricloacético 10%. Após a homogeneização por 5 min, foram adicionados 40 mL de etanol absoluto e o béquer foi deixado em repouso por mais 5 min. Após o período de repouso, foi realizada a filtração à vácuo em funil Buchner e foi feita a lavagem do retido com 10 mL de etanol 80% com o objetivo de retirar todo o açúcar que poderia interferir na análise. A lavagem foi feita 5 vezes. Em um balão de 25 mL, foi adicionado o conteúdo retido no filtro na etapa anterior e o volume foi completado com água destilada. Após homogeneização, foi realizada a filtração em papel filtro de 110 mm para a coleta do filtrado.

Em um tubo para centrifugação, foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de sódio 2,5 N, 10 mL do filtrado e 2 mL de reagente Cooper (50 mL de água destilada, 50 mL de solução de sulfato de cobre penta hidratado com citrato de sódio e 12,5 g de sulfato de sódio anidro – reagente preparado no momento da utilização). Com a finalidade de precipitar o complexo dextrana-cooper, a suspensão foi colocada em banho de água em ebulição por 5 min.

Após o resfriamento à temperatura ambiente, foi realizada a centrifugação a 5000 g por 30 min para a compactação do sedimento. Em seguida, foi feito o descarte do sobrenadante e foram adicionados 10 mL de solução de lavagem (50 mL de água destilada, 10 mL de reagente de Cooper e 10 mL de solução de hidróxido de sódio 2,5 N). Após suspender os sedimentos com agitação, foi realizada uma nova centrifugação a 5000 g por 30 min. Após descartar o sobrenadante, os tubos foram virados de cabeça para baixo por 5 min, em papel absorvente, com o objetivo de retirar o excesso da solução de lavagem. Logo após, foram adicionados 2 mL de solução de ácido sulfúrico 2N ao tubo e todo o conteúdo foi transferido para um balão de 10 mL. Foram adicionados mais 2 mL da solução ao tubo e novamente transferido para o mesmo balão. O volume do balão foi completado com água destilada.

Na etapa do teste Fenol-Ácido Sulfúrico, em um tubo de ensaio, foram adicionados 2 mL da solução do balão e para o branco, 2 mL de água destilada. Em seguida, foi pipetado 1 mL de solução fenol 5% e com o dispensador, rapidamente, foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, o que garante que o ácido se misture completamente com a solução aquosa promovendo o máximo de calor. Para o desenvolvimento completo de cor, os tubos foram colocados em banho de água em ebulição por 2 min. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro modelo UV Mini-1240 (Shimadzu Co.; Kyoto, Japão) à 485 nm. A curva de calibração foi feita com dextrana nas concentrações de 0,01 a 0,10 mg mL⁻¹.

3.2.8. Ozonização para redução da contaminação microbiana

As amostras de caldo obtidas após 72 horas do corte foram ozonizadas com o objetivo de verificar a redução de contaminação microbiana do caldo, sendo selecionada por apresentar o maior número de bactérias mesófilas totais. O pH do caldo de cana-de-açúcar foi ajustado para 5,0 e a temperatura para 50°C antes de iniciar a ozonização de acordo com as condições ótimas de redução de cor ICUMSA do caldo obtidas em estudos realizados por Magri (2015). A ozonização foi feita utilizando a dose de 1,95 mg mL⁻¹ de ozônio pelo tempo de 1, 2 e 3 horas, utilizando o ozonizador Azcozon HTU 500 AC.

3.2.9. Contagem de bactérias mesófilas totais

A contagem de bactérias mesófilas totais foi feita pelo plaqueamento em profundidade, onde 1000 μL de cada amostra foi distribuída em 5 placas de Petri descartáveis. Em seguida, foi adicionado o meio de cultivo Plate Count Agar (PCA) e depois, a homogeneização do meio PCA com o inóculo. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa à 35°C durante 48 horas. Os resultados foram expressos pela média da contagem das 5 placas e expressos em Unidades Formadoras de Colônias ou UFC por mL da amostra (UFC mL^{-1}) (SILVA et al., 1997).

3.2.10. Análises estatísticas

Utilizando o software R, os resultados obtidos foram analisados pelo teste F da análise de variância e posteriormente, as médias dos tratamentos foram comparadas do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Também foram realizados testes de correlação entre as variáveis estudadas utilizando o Coeficiente de Correlação do Produto de Momentos de Pearson, ou simplesmente Coeficiente de Pearson. O coeficiente varia entre -1 ou +1 ou, expresso em porcentagens, entre -100 e +100% (Martins, 2006).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Parâmetros tecnológicos em função do tempo entre a colheita e o processamento

Os valores de Pol%cana obtidos estão apresentados na Figura 13(a). Ocorreu redução do valor de Pol no processamento da cana após 48 horas do corte. O valor de Pol representa o teor de sacarose aparente da cana. Com a demora do processamento da cana-de-açúcar após o corte, ocorre a inversão da sacarose resultando no aumento de açúcares redutores (AR%cana)(Figura 13b).

Saxena et al. (2010) observou aumento nos valores de AR com a demora do processamento da cana-de-açúcar após o corte. Esse aumento resultante da inversão de sacarose pode ser acelerada pela presença de ácidos (pH baixo) ou de algumas enzimas (invertase) (KNECHT, 1990).

Figura 13. (a) Valores de Pol da cana (PC) das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas; (b) Valores de açúcares redutores da cana (AR% cana) das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

Os valores de fibra não sofreram alteração ao longo do tempo de pátio, não diferindo estatisticamente ao nível de 5% de significância (Figura 14a). Marques et al. (2001) afirmam que ocorre o ressecamento dos colmos após o corte e devido à perda contínua de água, há aumento do teor de fibra.

Figura 14. (a) Valores de fibra (%) das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas; (b) Valores de açúcares totais recuperáveis (ATR) das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

Com relação aos valores de ATR (Açúcares Totais Recuperáveis), ocorreu um aumento do valor de ATR da amostra processada 24 horas após o corte em relação a cana processada logo após o corte. Após 48 horas de tempo de pátio, o valor de ATR diminuiu e teve um aumento após 72 horas, porém o valor encontrado não foi maior que os valores das amostras de 0 e o 24 horas (Figura 14b).

Solomon (2009) afirma que a cana-de-açúcar madura não deteriora tão rapidamente quando comparada com a imatura ou com a cana-de-açúcar que já atingiu o auge da maturação (dita “bisada” ou “trisada”). E em relação ao clima, maiores temperaturas e maiores valores de umidade aceleram a deterioração da cana-de-açúcar. Durante o período estudado, houve redução de temperatura atingindo a temperatura mínima de 9,7 °C, como é possível observar na Figura 12. Essa redução de temperatura influencia na deterioração mais lenta do que era esperada.

Burcer et al. (2004) determinou perdas de açúcar de 1,5% por dia de espera para o processamento, enquanto Chiranjivi Rao (1989) obteve perdas de açúcar de 2% quando o tempo de espera para o processamento excedeu 72h. Singh e Solomon (2003) mostrou perdas de 21% de sacarose em cana-de-açúcar processada após 7 dias da colheita.

Os valores de cor ICUMSA diminuíram ao longo do tempo entre colheita e processamento (Figura 15a). Os valores de amido aumentaram ao longo do tempo entre colheita e processamento (Figura 15b).

Figura 15. (a) Valores de cor ICUMSA das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas; (b) Valores de amido das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

Os valores de fenólicos diminuíram ao longo do tempo entre colheita e processamento em 48 horas. Porém, houve um aumento após 72 horas (Figura 16a). Os valores de flavonoides diminuíram ao longo do tempo assim como os valores de cor ICUMSA (Figura 16b).

Figura 16. (a) Valores de fenólicos totais das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas; (b) Valores de flavonóides totais das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

Os valores de dextrana estão apresentados na Figura 17. Ocorreu um aumento dos teores de dextrana nas primeiras 24 horas, decorrido de um decréscimo até 72 horas.

Segundo Alvarez e Cardentey (1988), existem 3 parâmetros críticos que influenciam na deterioração da cana-de-açúcar e na formação de dextrana: condições ambientais, condições da cana-de-açúcar e tempo entre a queima/corte e o processamento.

Figura 17. Valores de dextrana das amostras processadas logo após o corte (0 h) e após 24, 48 e 72 horas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

Para correlacionar os parâmetros avaliados com o tempo entre a colheita e o processamento, foi utilizada a correlação de Pearson com o intuito de verificar quais parâmetros estão diretamente ou inversamente relacionados (Tabela 6).

A deterioração da cana-de-açúcar se caracteriza, principalmente, pelo aumento dos açúcares redutores e presença de dextrana. Entre os parâmetros estudados, o amido foi a variável que apresentou maior correlação positiva com o AR%cana, ou seja, quanto maior a quantidade de açúcares redutores no caldo, maior a quantidade de amido presente no caldo. As variáveis ATR, cor ICUMSA e flavonoides foram as que apresentaram as maiores correlações negativas, ou seja, com a deterioração do caldo e aumento do AR%cana, há diminuições nos valores de ATR, cor ICUMSA e flavonoides.

O aumento de dextrana no caldo de cana-de-açúcar também é considerado um fator para indicar a deterioração da cana-de-açúcar. Fenólicos foi o parâmetro que apresentou maior correlação negativa com a variável dextrana, ou seja, quanto maior a quantidade de dextrana no caldo de cana-de-açúcar menor a quantidade de fenólicos presente. Os demais parâmetros estudados apresentaram correlação fracas a nula, tanto positiva como negativa, com a quantidade de dextrana.

Segundo Rakkiyappan et al. (2009), as alterações sofridas pela cana-de-açúcar no tempo entre a colheita e o processamento depende da variedade que está sendo utilizada. Uma vez que, o estágio de maturação e a qualidade da cana-de-açúcar no momento da colheita afetam a velocidade da deterioração.

Tabela 7. Correlação de Pearson para os parâmetros analisados para os diferentes tempos entre colheita e processamento.

	Pol%cana	AR%cana	Fibra%Cana	ATR	Cor	Amido	Fenólicos	Flavonoides	Dextrana
Pol%cana	1,000								
AR%cana	-0,902	1,000							
Fibra%Cana	0,218	-0,618	1,000						
ATR	0,989	-0,827	0,070	1,000					
Cor	0,740	-0,861	0,566	0,665	1,000				
Amido	-0,847	0,958	-0,607	-0,770	-0,970	1,000			
Fenólicos	0,670	-0,785	0,590	0,600	0,374	-0,582	1,000		
Flavonoides	0,572	-0,870	0,920	0,443	0,813	-0,867	0,695	1,000	
Dextrana	-0,012	0,288	-0,674	0,084	0,091	0,082	-0,746	-0,494	1,000

3.3.2. Ozonização para redução da contaminação bacteriana

A produção de dextrana é oriunda de bactérias. A contaminação microbiana é inevitável após colheita, uma vez que há exposição de áreas com elevada concentração de sacarose. O aumento da contaminação microbiana é prejudicial para o processo, uma vez que, na fermentação, ocorre aumento da competição pela sacarose com as leveduras (SOLOMON, 2009).

O ozônio é utilizado na indústria como bactericida devido a sua elevada eficácia na ação como biocida, amplo espectro de antimicrobiana, ausência na formação de subprodutos que sejam prejudiciais à saúde e a capacidade de ser gerado “in situ” de acordo com a demanda, sem necessidade de ser armazenado (PASCUAL et al., 2007).

Os caldos de cana-de-açúcar coletados nos diferentes tempos entre a colheita e processamento foram analisados quanto à contaminação bacteriana. Os valores de bactérias mesófilas totais estão apresentados na Tabela 7. Os valores de bactérias aumentaram com o aumento do intervalo entre a colheita e o processamento.

Tabela 8. Contagem de bactérias nos caldos de cana-de-açúcar obtidos nos diferentes tempos entre a colheita e o processamento.

Tempo entre colheita e processamento	Bactérias mesófilas totais (UFC mL ⁻¹)
0	3,2 x 10 ⁶ C
24 horas	5,9 x 10 ⁶ BC
48 horas	8,0 x 10 ⁶ AB
72 horas	1,0 x 10 ⁷ A

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (P≤0,05)

A ozonização foi feita no caldo de cana-de-açúcar que apresentou maior contaminação bacteriana, que foi o caldo resultante da prensagem dos colmos após 72 horas da colheita. Os valores de bactérias mesófilas totais após a ozonização do caldo obtido após 72 horas da colheita estão apresentados na Tabela 8. Os valores de bactérias diminuíram ao longo do tempo de ozonização, porém não houve diferença estatística após 1 hora de ozonização.

Tabela 9. Contagem de bactérias mesófilas totais no caldo de cana-de-açúcar ozonizado

Tempo de ozonização	Bactérias mesófilas totais (UFC mL ⁻¹)
0 hora	1,0 x 10 ⁷ A
1 hora	1,0 x 10 ⁴ B
2 horas	5,0 x 10 ³ B
3 horas	2,0 x 10 ³ B

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

3.4. Conclusão

O aumento do tempo entre a colheita e o processamento aumentou a quantidade de açúcares redutores, amido e bactérias no caldo extraído, bem como diminuiu o valor de ATR da cana-de-açúcar processada. O ozônio se mostrou eficiente na redução do número de bactérias presentes no caldo de cana-de-açúcar, podendo ser considerado não apenas um processo alternativo à sulfitação, mas também uma ferramenta para minimizar o efeito da contaminação bacteriana ao longo das diferentes etapas do processo.

Referências

- ALVAREZ, J.F.; CARDENTY, H. Practical aspects of the control of dextran at Atlantic Sugar Association.” **International Sugar Journal**, v. 90, n. 1078, 1988.
- BURGER, A.M.; DELROSARIO, R.A.; GUEVARRA, M.M.; QUILLOY, O.T. Evolution of different harvesting and post harvest practices on sugarcane. **Annual Report**, Sugar Regulatory Administration, Philippines, 2004.
- BUCHHOLZ, K.; BLIESNER, K.M.; BUCZYS, R.; THIELECKE, K.; MIEHE, D. Composition of sugarbeet and sugarcane and chemical behavior of constituents in processing (Section 2.4 – Reactions of juice constituents). In: VAN DER POEL, P.W.; SCHIWECK, H.; SHWARTZ, T. **Sugar Technology - Beet and Cane Sugar Manufacture**. Berlin: Verlag Dr. Albert Bartens KG, 1 ed. 1998, p. 115-208.
- CHIRANJIVI RAO, K. Recent advances in pre- and post-harvest technology of sugarcane. **Bhartiya Sugar**, p.9-12, 1989.
- CLARKE, M.A. Sugars and Nonsugars in sugarcane. In: CHEN, J.C.P.; CHOU, C.C. **Cane Sugar Handbook**. 12 ed. 1993, p. 21-39.

- CONSECANA – Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Manual de instruções**. Piracicaba: CONSECANA. 2015, 112 p.
- COPERSUCAR – Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. Métodos Analíticos. In: COPERSUCAR. **Manual de Controle Químico da Fabricação do Açúcar**. Piracicaba: Copersucar. 2001, p.1-57.
- DAVIS, S.B. The chemistry of colour removal: A processing perspective. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, v. 75, p. 328-336, 2001.
- ICUMSA - Method G.S. 2/3-9. The determination of sugar solution color at 7.0 - Accepted. **International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis**, 2011
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic Constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, n.2, 231-217, 1985.
- KNECHT, R.L. Properties of sugar. In: PENNINGTON, N.L.; BAKER, C.W. **Sugar**. New York: AVI Book, 1990.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: _____. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970, p. 33-36 .
- 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
- MAGRI, N.T. **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**. 2015. Dissertação (Mestra em Ciências – Área de concentração: Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MARQUES, M.O.; MARQUES, T.A.; JÚNIOR, L.C.T. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP. 170 p. 2001.
- MARTINS, G.A. **Estatística geral e aplicada**. São Paulo: Atlas, 2006. 421p.
- PAPAZIAN, R. Sulfites: safe for most, dangerous for some. Disponível em: <www.fda.gov/FDAC/features/096_sulf.html>. Acesso em: 25 jan 2017.
- PASCUAL, A.; LLORCA, I.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. S29-S35, 2007.
- PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo: NOBEL, 2010. 248p.

- POPOLIM, W.D. **Análise de sulfitos em sucos de frutas e estimativa de seu consumo por escolares**. 2009. Tese (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.
- RAKKIYAPPAN, P.; ESTHER SHEKINAH, D.; GOPALASUNDARAM, P.; MATHEW, M.D.; ASOKAN, S. Post-harvest deterioration of sugarcane with special reference to quality loss. **Sugar Tech**, v.11, n.2, p. 167-170, 2009.
- REIN, P.W. **Cane sugar engineering**. Berlin: Bartens, 2007. 768 p.
- SAXENA, P.; SRIVASTAVA, R.P.; SHARMA, M.L. Impact of cut to crush delay and biochemical changes in sugarcane. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 9, p. 692-699, 2010.
- SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2ed. Livraria Varela: São Paulo, 1997. 295p.
- SILVA, S.B.; LUVIELMO, M.M.; GEYER, M.C.; PRÁ, I. Pontecialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.
- SINGH, I.; SOLOMON, S. Post-harvest quality loss of sugarcane genotypes under sub-tropical climate : deterioration of whole stalk and billets. **Sugar Tech**, v.5, n. 4, p. 285-288, 2003.
- SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Tech**, v.11, n.2, p. 109-123, 2009.

4. IMPACTO DAS IMPUREZAS VEGETAIS SOBRE A OZONIZAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

Com a proibição da queima e aumento da colheita mecanizada, o aumento de impurezas vegetais entrando na usina tem causado problemas para o processo de produção de açúcar. A presença de impurezas vegetais durante a moagem altera a composição do caldo, prejudicando a eficiência do processo e aumentando os custos de produção, uma vez que requer mais insumos durante o seu processamento. O objetivo foi avaliar a interferência das impurezas vegetais sobre a qualidade da matéria-prima e na composição do caldo de cana-de-açúcar, determinando a sua influência na eficiência do processo de ozonização. A adição de impurezas vegetais diminuiu a qualidade da matéria-prima a ser processada, diminuindo o valor de ATR (Açúcares Totais Recuperáveis) da cana-de-açúcar e no caldo, de sacarose. Com a adição de impurezas vegetais, o teor de fenólicos, amido e cor ICUMSA inicial do caldo aumentaram, bem como os açúcares redutores. A eficiência da redução de cor ICUMSA do caldo pela ozonização foi influenciada pela presença de impurezas vegetais, indicando a ação do ozônio sobre os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides.

Palavras-chave: Impurezas; Caldo; Qualidade; Ozônio; Clarificação

Abstract

With the ban on burning and increased mechanized harvesting, the increase in vegetable impurities entering the mill has caused problems for the sugar production process. The presence of vegetable impurities during crushing alters the composition of the juice, hampering process efficiency and increasing production costs, since it requires more inputs during processing. The objective was to evaluate the interference of the vegetable impurities on the quality of the raw material and on the composition of the sugarcane juice, determining its influence on the efficiency of the ozonation process. The addition of vegetable impurities decreased the quality of the raw material to be processed, reducing the ATR (Total Recoverable Sugars) value of sugarcane and sucrose in the juice. With the addition of vegetable impurities, the phenolic and starch content, and ICUMSA initial color of the juice increased as well as the reducing sugars. The efficiency of the ICUMSA color reduction of the juice by ozonation was influenced by the presence of vegetable impurities, indicating the action of ozone on the phenolic compounds, mainly the flavonoids.

Keywords: Impurities; Juice; Quality, Ozone; Clarification

4.1. Introdução

A produção de açúcar de qualidade depende da qualidade da cana-de-açúcar que está entrando no processo, que, por sua vez, é muito afetada pela quantidade e composição da matéria estranha presente (EGGLESTON et al., 2013b).

Através do decreto de Lei Estadual 47.700, de 11 de março de 2003, que regulamenta a Lei 11.241, de 19 de setembro de 2002, que propôs a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar até 2021 e com a posterior proibição de queima em 2014, houve aumento da entrada de impurezas vegetais devido à intensificação da colheita mecanizada.

Segundo Eggleston et al. (2012), com o aumento da quantidade de impurezas adicionadas a matéria prima, há redução da qualidade da matéria-prima, que por sua vez, é medida através de parâmetros como: sólidos solúveis, sacarose, pureza, cinzas, cor, amido, entre outros. Segundo Eggleston et al. (2013a), em Louisiana (EUA), o aumento da entrada de amido na usina não é apenas decorrente da colheita mecanizada, mas também é devido ao uso de novas variedades e mudanças nas condições ambientais, que afetam a maturação da cana-de-açúcar e as condições de colheita.

O amido está presente na cana-de-açúcar na forma de pequenos grânulos insolúveis em água, sendo formado pela condensação da glicose e constituído de uma mistura de 2 polissacarídeos: amilopectina (75-85%) e amilose (15-25%). O teor de amido presente na cana-de-açúcar depende muito da variedade utilizada. A maior concentração de amido encontra-se no palmito e nas folhas, e o teor de amido diminui com a maturação da cana-de-açúcar (REIN, 2007).

A quantidade média de amido nas folhas verdes, que é 10 vezes maior que no colmo, varia durante o dia porque os produtos da fotossíntese são armazenados temporariamente nas folhas como amido. À noite, o amido é convertido em açúcares que se movem das folhas para o restante da planta. Maiores quantidades de amido são encontradas no pôr-do-sol, e menores após o nascer do sol (CLARKE, 1993).

A concentração de amido presente na cana-de-açúcar pode variar com a variedade escolhida, presença de doenças, maturação, da época do ano, condições de processo e métodos analíticos utilizados (IMRIE e TILBURY, 1972). Com a adição de 1% de ponteiros e folhas, é estimado um aumento de 4 a 15% na cor do caldo de cana-de-açúcar (REIN, 2007).

Como a maior parte da cor do açúcar não é formada durante o processo e tem como origem a matéria-prima, a sulfitação é a etapa responsável pela remoção de impurezas causadoras de cor e turbidez no caldo durante a produção de açúcar cristal branco (VILELA et

al., 2008). Através do contato do dióxido de enxofre com o caldo em contracorrente, ocorre a solubilização do gás no líquido. Porém a sulfitação, além de estar associada à problemas relacionados à saúde humana, tem sido apontada como potencial geradora de poluentes atmosféricos. Por essa razão, a ozonização tem sido proposta como alternativa à sulfitação. O ozônio se caracteriza como um poderoso agente oxidante que possui uma ampla variedade de reações oxidativas possíveis, atuando principalmente na abertura de anéis aromáticos de fenólicos (DAVIS, 2001).

O objetivo foi avaliar a interferência das impurezas vegetais sobre a qualidade da matéria-prima e principalmente, na composição do caldo de cana-de-açúcar. E avaliar a sua influência na eficiência do processo de ozonização.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Obtenção das amostras

Os experimentos apresentados neste trabalho, foram todos realizados no Laboratório Hugot de Tecnologia em Sucroderivados, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, no município de Piracicaba-SP. Para a realização do experimento, foram coletadas amostras de cana-de-açúcar cultivada no município de Iracemápolis-SP, durante a safra 2016/2017. As amostras foram constituídas de 3 feixes de 10 colmos de cana-de-açúcar da variedade RB966928. O solo do local de coleta é classificado como latossolo vermelho e as plantas alocadas em ambiente de produção A, sendo a colheita realizada em cana-planta.

Após a coleta das amostras, os colmos foram limpos através da retirada das folhas secas e ponteiros. Os colmos e as impurezas vegetais (folhas secas e verdes) foram desfibrados separadamente.

Para avaliar a interferência das impurezas vegetais, foram feitas adições crescentes de material vegetal antes da extração do caldo no colmo desfibrado. As concentrações foram de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de impurezas vegetais em relação ao colmo, com três repetições das concentrações em todos os experimentos.

A extração dos caldos de cana-de-açúcar foi seguida de caracterização quanto aos teores de Pol%cana, Brix%cana, AR%cana e ATR, segundo metodologia descrita pelo CONSECANA-SP (2015). Também, foram realizadas as análises de cor ICUMSA, teores de amido, fenólicos totais, flavonóides e açúcares.

4.2.2. Açúcares Totais Recuperáveis (ATR)

Segundo o manual do Consecana (2015), o valor de ATR foi obtido a partir das análises de Pol%cana, Brix e Fibra%Cana. A análise de Fibra%Cana foi feita a partir da prensagem do bolo úmido. Os caldos foram analisados quanto aos valores de Pol%cana, obtidos através da leitura sacarimétrica das amostras clarificadas pela mistura clarificante à base de alumínio e leitura em polarímetro modelo ADS 420 (Bellingham+Stanley Ltda.), e quanto ao Brix, utilizando o refratrômetro digital Bellingham+Stanley Ltda., modelo RFM 712 (com correção automática de temperatura à 20 °C). Com os valores de Brix, leitura sacarimétrica e peso do bolo úmido foi possível calcular os valores de ATR através das equações descritas abaixo:

4.2.2.1. Pol%caldo (S)

a. Conversão da leitura sacarimétrica com a mistura clarificante à base de alumínio (LAI) para a leitura equivalente em subacetato de Pb (LPb):

$$LPb = (1,00621 \times LAI) + 0,05117$$

b. Calcular Pol%caldo (S) usando leitura equivalente em subacetato de chumbo (LPb):

$$S = LPb \times [0,2605 - (0,0009882 \times Brix)]$$

4.2.2.2. Fibra%cana (F):

$$F = (0,08 \times PBU) + 0,876$$

Onde: PBU = Peso do bolo úmido (g)

4.2.2.3. Pol%cana (PC):

$$PC = S \times (1 - 0,01 \times F) \times C$$

Onde: C = coeficiente de transformação da pol do caldo extraído em pol do caldo absoluto, calculado por:

$$C = 1,02626 - (0,00046 \times PBU) \text{ ou } C = 1,0313 - (0,00575 \times F)$$

4.2.2.4. AR%caldo (Açúcares Redutores do caldo)

$$\text{AR\%caldo} = 3,641 - (0,0343 \times Q)$$

Onde: Q (pureza do caldo) = 100 x (S/Brix)

4.2.2.5. AR%cana (Açúcares Redutores da Cana)

$$\text{ARC} = \text{AR\%caldo} \times (1 - 0,01 \times F) \times C$$

4.2.2.6. Cálculo do ATR (Açúcares Totais Recuperáveis)

$$\text{ATR} = (9,6316 \times \text{PC}) + (9,15 \times \text{ARC})$$

4.2.3. Ozonização do caldo de cana-de-açúcar

Com o objetivo de reduzir a cor do caldo de cana-de-açúcar, as amostras de caldo obtidas foram ozonizadas após ajuste do pH do caldo para 5,0 e em temperatura para 50°C, conforme as condições ótimas de redução de cor ICUMSA do caldo obtidas em estudos realizados por Magri (2015). A ozonização foi feita utilizando a dose de 1,95 mg m⁻¹ de ozônio pelo tempo de 1 hora, utilizando o ozonizador Azcozon HTU 500 AC. Após a ozonização, o caldo ozonizado foi armazenado em frascos de polipropileno a -18 °C.

4.2.4. Análise de Cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar

Para realização da análise de cor ICUMSA, foi necessário fazer a leitura do Brix das amostras inicialmente. Após diluir o caldo para obtenção de um Brix de 1,25, foi feita a filtração das amostras em filtro à vácuo usando membranas de filtro de nitrato de celulose (tamanho de poro de 0,45 µm) e a correção do pH para 7,0 ± 0,05, utilizando soluções de hidróxido de sódio (1 mol L⁻¹) ou ácido clorídrico (1 mol L⁻¹). Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 420 nm com cubeta de quartzo de 1 cm e a leitura do Brix. A análise de cor ICUMSA foi feita segundo o método GS2/3-9 (2011) da ICUMSA Methods Book. O índice de cor ICUMSA é expresso pela Equação 1:

$$Cor\ ICUMSA\ (420\ nm) = \left[\frac{ABS \times 1000}{Densidade \times \left(\frac{Brix}{100} \right)} \right] \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

ABS = absorvância da amostra lida à 420 nm

Brix = valor de sólidos solúveis totais da amostra diluída;

Densidade = calculada pela equação 2

$$Densidade = 1 + \left[\left(Brix\ O \times \frac{200 + Brix\ C}{5400} \right) \times \left(\frac{Brix\ C}{Brix\ O} \right) \right] \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

Brix O = Valor da leitura de sólidos solúveis na amostra original

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

4.2.5. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar

Para a realização da análise de amido, foi necessário pesar 3,6 g de amostra de caldo filtrado em 4 balões volumétricos de 50 mL. Um dos balões foi considerado como branco. Foram adicionados 15 mL de solução cloreto de cálcio 40% (m/m), corrigido para pH 3,0 com solução de ácido acético 0,030 mol L⁻¹ em cada balão. Após fechar os balões, com o intuito de digerir a amostra e solubilizar qualquer amido presente, colocou-se em banho de água em ebulição por 15 minutos. Posteriormente ao resfriamento em água corrente, foram adicionados 15 mL da solução de ácido acético 0,030 mol L⁻¹. O balão do branco foi completado até o menisco com água destilada. Nos balões de amostra, foram adicionados 10 mL da solução de iodeto/iodato de potássio (preparada diariamente – 10 mL de iodeto de potássio 10% (m/v), 90 mL de água ultrapura e 100 mL de iodato de potássio 0,0017 mol L⁻¹) para a formação de um complexo azul de amido-iodo e foi completado com água até o menisco.

As leituras da absorvância à 700 nm foram feitas no intervalo de 10 a 20 minutos após a adição de iodeto/iodato e homogeneização dos balões, em célula de 10 mm. A curva de calibração foi feita utilizando as concentrações de amido variando de 0 a 500 mg L⁻¹ (COPERSUCAR, 2001).

4.2.6. Determinação de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar

A determinação do teor de compostos fenólicos foi feita pelo método de Folin–Ciocalteu, segundo JULKUNEN-TIITTO (1985) com modificações. Alíquotas (1,0 mL) das amostras foram misturadas com 0,5 mL do reagente de Folin–Ciocalteu diluído 1:10 (v/v) com água deionizada em tubos de ensaio. Após 40 min, 2,5 mL de solução a 20% de Na₂CO₃ foi adicionada e a leitura da absorvância foi feita a 725 nm. O conteúdo de fenólicos totais foi expresso como mg L⁻¹ (em equivalentes de ácido gálico).

4.2.7. Determinação de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar

A determinação de flavonóides totais no caldo de cana-de-açúcar foi feita segundo metodologia descrita por Mabry (1970). Foram adicionados 500 μL da amostra, 4,3 mL de etanol 70% (v/v), 100 μL de solução etanólica de cloreto de alumínio (2%) e 100 μL de acetato de sódio 1 mol L^{-1} em um tubo de ensaio. Após 40 min de reação, as leituras foram feitas no espectrofotômetro modelo UV Mini-1240 (Shimadzu Co.; Kyoto, Japão) a 415 nm. A curva de calibração foi feita com rotina P.A. nas concentrações de 10 a 50 mg L^{-1} .

4.2.8. Quantificação de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar

A dosagem dos açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar foi feita de acordo com metodologia descrita por Shimadzu Applications News (2017). Os açúcares foram determinados utilizando-se cromatógrafo líquido ultra rápido com detector de espalhamento de luz evaporativo a baixa temperatura (HPLC/ELSD-LT) (Projeto Bioen-FAPESP; Processo FAPESP #2008/56146-5). Foi utilizada como fase móvel uma solução mista de acetronitrila/água na proporção de 70/30, previamente filtrada contra membranas Millipore de 0,45 μm , bem como as amostras. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1} . A coluna utilizada foi amino (Shodex $\text{NH}_2\text{P-50 4E}$), termostatizada a 30 $^{\circ}\text{C}$. As condições de trabalho do detector, no qual utilizamos nitrogênio como gás de nebulização, foram: temperatura do detector igual a 40 $^{\circ}\text{C}$ e pressão de 350 kPa. O volume de injeção para detecção de glicose e frutose foi 20 μL e para sacarose, 5 μL . As soluções-padrão de sacarose, glicose e frutose (99,9%, Sigma-Aldrich) foram preparadas para a elaboração das curvas de calibração antes das análises quantitativas, sendo que as concentrações para a curva de sacarose foram 5 a 30 g L^{-1} , e para de glicose e frutose, 0,1 a 0,5 g L^{-1} .

4.2.9. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste F da análise de variância e posteriormente, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando o software R.

O Coeficiente de Correlação do Produto de Momentos de Pearson (ou simplesmente Coeficiente de Pearson) foi utilizado para correlacionar as variáveis estudadas, sendo que esse coeficiente pode variar entre -1 ou +1 ou, ser expresso em porcentagens, entre -100 e + 100%.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Açúcares Totais Recuperáveis (ATR)

Os valores de Pol%cana (PC) e AR%cana obtidos estão apresentados na Tabela 9. Ocorreu redução dos valores de Pol, AR e ATR com o incremento de impurezas vegetais. O valor de Pol representa o teor de sacarose aparente da cana-de-açúcar. O valor de fibra aumentou e os valores de pureza não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de significância com a adição crescente de impurezas vegetais.

Tabela 10. Valores de Pol%cana, AR%cana, Fibra%Cana, Pureza e ATR para os tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

% Imp. Veg.	Pol%cana	AR%cana	Pureza	% Fibra	ATR (kg t ⁻¹)
0,0%	13,29 ^a	0,68 ^a	83,6 ^a	10,1 ^b	132,7 ^a
2,5%	12,98 ^{ab}	0,69 ^{ab}	83,0 ^a	10,7 ^{ab}	129,9 ^{ab}
5,0%	13,19 ^{ab}	0,62 ^{ab}	85,3 ^a	11,0 ^a	131,2 ^{ab}
7,5%	13,12 ^{ab}	0,62 ^{ab}	85,1 ^a	10,8 ^a	130,6 ^{ab}
10,0%	12,56 ^b	0,71 ^b	82,1 ^a	10,9 ^a	126,1 ^b

Eggleston et al. (2012) estudaram a adição de impurezas na qualidade da cana-de-açúcar e determinaram que para cada 1% de impurezas adicionadas, há redução aproximadamente 0,13-0,21% da pureza do caldo misto. Muir and Eggleston (2009) concluíram que há redução de 0,41% de pureza do caldo misto a cada 1% de impurezas adicionadas.

Baseado nos valores obtidos de ATR em relação a adição de impurezas vegetais e na equação de regressão (Figura 18), é possível estimar que a cada 1% de impureza vegetal que entra na usina, reduz 0,45% no valor de ATR.

Figura 18. Valores de ATR (kg/t) nos tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4.3.2. Açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar

Os valores de sacarose obtidos para as amostras dos diferentes tratamentos estão apresentados na Figura 19. Não houve diferença estatística na quantidade de sacarose dos caldos obtidos a partir da adição de diferentes quantidades de impurezas antes da ozonização.

Figura 19. Valores de sacarose nos tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais antes (sem tratamento) e depois da ozonização (ozônio). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Após a ozonização, é possível observar uma redução dos valores de sacarose à medida que aumentasse a porcentagem de impurezas vegetais no caldo tratado.

Com relação aos açúcares redutores, glicose e frutose, houve aumento dos valores com incremento da adição de impurezas vegetais (Figura 20 e 21). Após a ozonização, de maneira geral, houve aumento dos valores de glicose e frutose, o que pode ser resultante da precipitação dos não-açúcares pela ozonização.

Figura 20. Valores de frutose nos caldos obtidos dos tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais antes (sem tratamento) e depois da ozonização (ozônio). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Figura 21. Valores de glicose nos caldos obtidos dos tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais antes (sem tratamento) e depois da ozonização (ozônio). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4.3.3. Cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar

Os valores de cor ICUMSA aumentaram com a adição de impurezas vegetais (Figura 22). Para cada 1% de impurezas vegetais adicionada aos colmos a serem processados, há aumento de 5,5% na cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar extraído.

Figura 22. Valores de cor ICUMSA nos tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais antes (sem tratamento) e depois da ozonização (ozônio). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Após a ozonização, ocorreu a redução de cor ICUMSA em todas as porcentagens de impurezas utilizadas. Para reduzir a cor do açúcar bruto VHP produzido é preciso atentar-se mais na qualidade da cana-de-açúcar que está sendo entregue do que buscar alternativas no processo, o que levaria ao aumento do custo de produção (SMITH, 1990 citado por EGGLESTON et al., 2013b).

Maiores quantidades de impurezas presentes nos ponteiros e nas folhas verdes são atribuídas ao fato dessas partes da cana estarem mais fisiologicamente ativas e terem maiores atividades enzimáticas (EGGLESTON et al., 2013a). No entanto, as moléculas adicionadas são mais simples, sendo facilmente degradadas pelo ozônio.

4.3.4. Teores de amido em caldo de cana-de-açúcar

Os valores de amido aumentaram com a adição de impurezas vegetais (Figura 23). O amido é produzido nas folhas, sendo o local onde se encontra as maiores concentrações de amido na planta (EGGLESTON et al., 2013a).

Após a ozonização, ocorreu aumento nos teores de amido no caldo para as amostras de caldo resultantes da adição de 2,5% ou mais de impurezas vegetais.

Figura 23. Valores de amido nos tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais antes (sem tratamento) e depois da ozonização (ozônio). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4.3.5. Teores de fenólicos totais em caldo de cana-de-açúcar

Os valores de fenólicos aumentaram com o aumento da quantidade de impurezas vegetais adicionada (Figura 24). Para cada 1% de impurezas vegetais adicionada aos colmos a serem processados, há aumento de 4,5% na quantidade de fenólicos totais no caldo de cana-de-açúcar extraído. Os compostos fenólicos estão presentes, principalmente, nas folhas da cana-de-açúcar.

Com a ozonização, houve redução da quantidade de fenólicos presentes no caldo em todos os tratamentos realizados.

Figura 24. Valores de fenólicos nos tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais antes (sem tratamento) e depois da ozonização (ozônio). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4.3.6. Teores de flavonóides totais em caldo de cana-de-açúcar

Os valores de flavonóides aumentaram com o aumento da quantidade de impurezas vegetais adicionada (Figura 25). Para cada 1% de impurezas vegetais adicionada aos colmos a serem processados, há aumento de 6,0% na quantidade de flavonóides totais no caldo de cana-de-açúcar extraído.

Com a ozonização, houve redução da quantidade de flavonóides presentes no caldo.

Figura 25. Valores de flavonóides nos tratamentos com diferentes porcentagens de impurezas vegetais antes (sem tratamento) e depois da ozonização (ozônio). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4.3.7. Interação entre impurezas vegetais e a ozonização do caldo de cana-de-açúcar

Na Tabela 10, estão descritos os coeficientes de correção entre os parâmetros avaliados. A correlação de Pearson foi utilizada com o intuito de verificar quais parâmetros estão diretamente ou inversamente relacionados com o aumento da entrada de impurezas vegetais no processo.

O aumento da entrada de impurezas vegetais apresentou correlação forte positiva com os parâmetros de açúcares redutores, fenólicos, flavonóides, cor ICUMSA e amido, ou seja, quanto mais impureza vegetal entra no processo, maiores os teores de glicose, frutose, fenólicos, flavonóides e amido no caldo. E maior a cor ICUMSA do caldo a ser processado. O ATR e a sacarose apresentaram correlação forte negativa com o aumento da entrada de impurezas vegetais, ou seja, quanto mais impureza vegetal tem na matéria prima a ser processada, menores serão os valores de sacarose e ATR.

Tabela 11. Correlação de Pearson dos parâmetros analisados em relação a adição de impurezas vegetais

	%Impurezas	Sacarose	Frutose	Glicose	ATR	Fenólicos	Flavonóides	Cor	Amido	%IRC
%Impurezas	1,000									
Sacarose	-0,883	1,000								
Frutose	0,959	-0,869	1,000							
Glicose	0,943	-0,923	0,897	1,000						
ATR	-0,802	0,887	-0,884	-0,889	1,000					
Fenólicos	0,916	-0,919	0,842	0,846	-0,682	1,000				
Flavonóides	0,980	-0,915	0,943	0,901	-0,774	0,970	1,000			
Cor	0,904	-0,643	0,833	0,863	-0,655	0,689	0,807	1,000		
Amido	0,889	-0,653	0,882	0,689	-0,560	0,813	0,895	0,800	1,000	
%IRC	0,771	-0,501	0,814	0,532	-0,471	0,666	0,776	0,699	0,970	1,000

Onde: $IRC(\%) = 100 - ((Cor\ O_3 * 100) / Cor\ ST)$, sendo: IRC= Índice de redução de cor; Cor O₃ = Cor do caldo ozonizado; Cor ST = Cor do caldo sem tratamento.

A eficiência da redução de cor ICUMSA do caldo pela ozonização (IRC) está fortemente correlacionada de forma positiva com a quantidade de amido e frutose presente no caldo, ou seja, quanto mais amido e frutose presentes no caldo, maior será a redução de cor do caldo a ser processado. Fenólicos, flavonóides, cor e porcentagem de impurezas vegetais apresentaram correlação positiva moderada para o IRC, ou seja, quanto maior a quantidade de fenólicos, flavonóides e cor inicial do caldo, maior a redução de cor. Bem como, quanto maior a porcentagem de impurezas vegetais que entra no processo, maior será a redução da cor após a ozonização.

4.4. Conclusão

A eficiência da redução de cor ICUMSA do caldo pela ozonização foi influenciada pela quantidade de impurezas vegetais presente na cana-de-açúcar processada, indicando que o ozônio atua sobre flavonóides, que são os principais compostos formadores de cor.

Referências

- CLARKE, M.A. Sugars and Nonsugars in sugarcane. In: CHEN, J.C.P.; CHOU, C.C. **Cane Sugar Handbook**. 12 ed. 1993, p. 21-39.
- CONSECANA – Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Manual de instruções**. Piracicaba: CONSECANA. 2015. 112 p.
- COPERSUCAR – Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. Métodos Analíticos. In: COPERSUCAR. **Manual de Controle Químico da Fabricação do Açúcar**. Piracicaba: Copersucar. 2001, p.1-57.
- DAVIS, S.B. The chemistry of colour removal: A processing perspective. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, v. 75, p. 328-336, 2001.
- EGGLESTON, G.; BIRKETT, H.; GAY, J.; JACKSON, W.; SCHUDMAK, C.; MONGE, A.; ANDRZEJEWSKI, B.; VIATOR, R.; CHARLET, T. How combine harvesting of green cane billets with diferentes levels of trash affects production and processing. Part I: Field yields and delivered cane quality. **International Sugar Journal**, v. 114, n. 1358, 2012.
- EGGLESTON, G.; Viator, R.; Gateuil, A.; Fenger, J-A.; White, P.; Jackson, W.; Waguespack Jr.; H.; Blackwelder, N. Effects of seasonal variations of sugarcane stalk and extraneous

- matter quantity and quality as they effect recoverable sugar, starch and fiber: Part I. **International Sugar Journal**, v.115, p. 477-487, 2013a.
- EGGLESTON, G.; Viator, R.; Gateuil, A.; Fenger, J-A.; White, P.; Jackson, W.; Waguespack Jr.; H. Seasonal variations of sugarcane stalk and extraneous matter on pH, color and ash as they affect the production of high quality raw sugars (Part II). **International Sugar Journal**, v.117, p. 634-641, 2013b.
- ICUMSA - Method G.S. 2/3-9. The determination of sugar solution color at 7.0 - Accepted. **InternationalComission for UniformMethodsof Sugar Analysis**. 2011
- IMRIE, F. K. E.; TILBURY, R. H. Polysaccharides in sugar cane and its products. **Sugar Technology Reviews**, v. 1, p. 291-361, 1972.
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic Constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, n.2, 231-217, 1985.
- MAGRI, N.T. **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**. 2015. Dissertação (Mestra em Ciências – Área de concentração: Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MARTINS, G.A. **Estatística geral e aplicada**. São Paulo: Atlas, 2006. 421p.
- MUIR, B.; EGGLESTON, G. Factory trials to determine how sugarcane trash impacts downstream processing including affinated sugar production. **Proceedings of the 38th Annual Sugar Industry Technologists Meeting**, n. 960, p. 24-48, 2009.
- REIN, P.W. **Cane sugar engineering**. Berlin: Bartens, 2007. 768 p.
- SHIMADZU APPLICATION NEWS. **n. L294**, 2015.
- VILELA, J.M.C.L.; D’AVILA, F.M.; MENATO, M.D.D. Inovações na purificação do caldo. In: MARQUES, et al. **Tecnologias na agroindústria canavieira**, Piracicaba: STAB.2008, p. 263-272.

5. MECANISMO DE REAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO POR OZONIZAÇÃO²

Resumo

A produção de açúcar cristal é baseada na clarificação do caldo de cana-de-açúcar por sulfitação, isto é, tratamento térmico com dióxido de enxofre. O uso de ozonização como alternativa à sulfitação visa eliminar a desvantagem da presença de sulfito residual no açúcar cristal. Ambos os tratamentos são utilizados para redução da cor do caldo de cana-de-açúcar. O objetivo deste trabalho foi avaliar dois parâmetros de processo (temperatura e pH) para a redução do ácido gálico, um pigmento de baixo peso molecular (PM 170 g mol⁻¹) amplamente encontrado na cana-de-açúcar. Utilizou-se ácido gálico como composto modelo em solução de sacarose. A partir dos resultados, observou-se que a degradação do ácido gálico foi favorecida a pH 7,0 a 7,82 e valores de temperatura entre 50 e 70 °C. O mecanismo de reação foi proposto para a degradação do ácido gálico por ozônio baseado no mecanismo de Criegee. A ozonização foi um método eficiente para a redução do potencial pigmento de baixo peso molecular presente na cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Clarificação; Ozonização; Sulfitação; Açúcar; Fenólicos; Degradação

Abstract

The production of crystal sugar is based on sugarcane juice clarification through sulphitation, that is, heat treatment with sulfur dioxide. The use of ozonation as an alternative to sulphitation aims to eliminate the disadvantageous presence of residual sulphite in crystal sugar. Both treatments are used to reduce color of sugarcane juice. The objective of this work was to evaluate two process parameters (temperature and pH) to reduce gallic acid, a low molecular weight pigment (MW 170 g.mol⁻¹) widely found in sugarcane. Gallic acid was used as a model compound in sucrose solutions. The results showed that degradation of gallic acid was favored at pH 7.0 to 7.82 and temperature values between 50 and 70 °C. The reaction mechanism was proposed for gallic acid degradation by ozone based on Criegee mechanism. Ozonation was an efficient method to reduce the potential low molecular weight pigment present in the sugarcane.

Keywords: Clarification; Ozonation; Sulphitation; Sugar; Phenolic; Degradation

² Conteúdo referente à esse capítulo foi publicado:

SARTORI, J.A.S.; ANGOLINI, C.F.F; EBERLIN, M.N.; AGUIAR, C.L. Criegee mechanism as a safe pathway of color reduction in sugarcane juice by ozonation. **Food Chemistry**, v. 225, p. 181-187, 2017.

5.1. Introdução

Poucos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de compreender a formação e a decomposição de compostos. Isto tem tido um papel importante na indústria do açúcar, principalmente em termos de remoção de fenólicos por técnicas de oxidação, proporcionando redução de cor e reduzindo custos na refinaria (NGUYEN et al., 2015).

Existem pelo menos quatro mecanismos que contribuem para a formação de cor durante a produção de açúcar cristal nas usinas: (a) melanoidinas formadas durante as reações de açúcares redutores-aminoácidos pela reação de Maillard; (B) degradação térmica e reação de condensação do açúcar por caramelização; (C) degradação alcalina e reações de condensação dos açúcares redutores; (D) reação oxidativa de compostos fenólicos. As três primeiras são reações não-enzimáticas, enquanto a reação oxidativa de compostos fenólicos a quinonas quimicamente reativas é uma reação enzimática e ocorre durante o processo de moagem, quando a cana-de-açúcar é moída para extrair caldo (KORT, 1979). Os compostos que mais afetam a cor do caldo são aqueles encontrados naturalmente na cana-de-açúcar, isto é, compostos fenólicos e flavonóides, que são responsáveis por 60 a 75% da cor do caldo (CLARKE E LEGENDRE, 1999; BUCHELI E ROBISON, 1994). A proporção total de cor atribuída às reações de escurecimento enzimático depende da maturação e do pH do caldo. A cor resultante das reações de escurecimento enzimático nos colmos maduros é responsável por mais de metade da coloração (GOODACRE E COOMBS, 1978; QUDSIEH et al., 2002). Entre os ácidos fenólicos presentes no caldo de cana-de-açúcar, encontram-se ácido cafeico ($2,26 \pm 0,06 \text{ mg.L}^{-1}$), ácido gálico ($1,15 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$) e ácido ferúlico ($1,13 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$) em maiores quantidades (ZHAO et al., 2008).

A sulfitação, método tradicional de clarificação do caldo de cana-de-açúcar, visa eliminar as impurezas que aumentam a turbidez e a cor através do contato direto do caldo quente com o dióxido de enxofre (SO_2) resultante da combustão do enxofre em colunas de absorção (Vilela et al., 2008). O SO_2 atua na conversão dos compostos coloridos em incolores, impedindo a formação de cor por oxidação e inibindo o desenvolvimento da reação de escurecimento entre açúcares e aminoácidos (PAYNE, 2010). A presença de sulfito residual no açúcar cristal acima das especificações técnicas e de saúde é uma desvantagem da sulfitação. Efeitos adversos na saúde humana têm sido associados à ingestão de sulfito, tais como náuseas, irritação gástrica, urticária e broncoespasmo em asmáticos sensíveis (MACHADO et al., 2006).

Por outro lado, os oxidativos descolorantes, que incluem quaisquer produtos químicos fortemente oxidantes, têm sido estudados e utilizados em usinas como substitutos da sulfitação.

Esses processos oxidativos, como o ozônio (SILVA et al., 2015) e o peróxido de hidrogênio (SARTORI et al., 2015), produzem radicais livres ativos em solução que atacam grupos funcionais suscetíveis (DAVIS, 2001). Moodley et al. (1999) mostraram ser possível a aplicação de ozônio no processo de branqueamento de açúcar refinado em larga escala em refinarias de açúcar na África do Sul. O ozônio foi capaz de destruir compostos coloridos e precursores de cor em soluções de açúcar. No Brasil, a tecnologia do ozônio tem sido experimentalmente utilizada no tratamento de caldo de cana-de-açúcar em usinas nos estados da Paraíba, Bahia, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul (GASIL, 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar, em detalhes, as melhores condições operacionais de pH e temperatura para otimizar a degradação de compostos fenólicos usando ozonização, promovendo assim uma melhor compreensão da cinética de degradação de precursores de cor presentes no caldo de cana-de-açúcar por ozônio. Utilizou-se um sistema modelo constituído de um ácido fenólico de baixo peso molecular (ácido gálico) e solução de sacarose (13,5% m.v⁻¹) para eliminar a interferência de outros componentes do caldo de cana-de-açúcar nos resultados.

5.2. Material e métodos

Uma solução aquosa de sacarose (13,5% m.v⁻¹) com 1000 mg.L⁻¹ de ácido gálico ($\geq 99\%$, grau HPLC, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram ozonizados em reatores AISI 316 de aço inoxidável de 6 L. Um volume útil de 2 L de solução mista de sacarose e ácido gálico foi utilizado em cada tratamento. O ácido gálico foi escolhido como um composto fenólico modelo, uma vez que é um dos ácidos fenólicos presentes em maior quantidade no caldo de cana-de-açúcar (ZHAO et al., 2008). O efeito da aplicação de ozônio combinado com diferentes pH (X_1) e temperatura (X_2) foi estudado através do Delineamento Composto Central Rotacional (CCRD) 2², contendo três pontos centrais e quatro pontos axiais. Os valores de pH variaram de 2,18 a 7,82 e os valores de temperatura variaram de 30 a 70°C, sendo que os valores para cada nível estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 12. Valores codificados e reais dos parâmetros do planejamento fatorial completo

Parâmetros	- α (-1,41)	-1	0	+ 1	+ α (+ 1,41)
------------	--------------------	----	---	-----	---------------------

pH	2,18	3,0	5,0	7,0	7,82
Temperatura (°C)	30,0	35,8	50,0	64,2	70,0

A taxa de dose utilizada durante a ozonização foi de $3,82 \text{ mg O}_3 \cdot \text{min}^{-1}$ com um tempo total de reação de 4 h, utilizando o ozonizador Azcozon HTU 500 A. A análise estatística e a superfície gerada foram feitas a partir da taxa de degradação do ácido gálico após 240 min (4 h), utilizando o software Statistic versão 12 (Statsoft, Tulsa, 2013). A taxa de degradação do ácido gálico foi calculada usando a seguinte equação: $\text{Ácido gálico} = (C_n / C_0)$, onde C_n é concentração de ácido gálico em tempo n e C_0 é a concentração inicial de ácido gálico.

As amostras foram recolhidas a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180 e 240 min, com o objetivo de monitorar a cinética da degradação do ácido gálico. Uma amostra foi retirada antes do início do processo como um controle. O conteúdo de sacarose (g L^{-1}) também foi analisado. O volume final coletado não excedeu 10% do volume inicial.

5.2.1. Determinação dos teores de compostos fenólicos da solução

O teor de compostos fenólicos nas amostras foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu, onde alíquotas (1,0 mL) das amostras foram misturadas com 0,5 mL do reagente de Folin–Ciocalteu previamente diluído na proporção 1:10 (v/v) com água deionizada e 2,5 mL de solução a 20% de Na_2CO_3 . A leitura da absorbância foi feita à 725 nm em espectrofotômetro UV-Visível Mini 1240 (Shimadzu Co., Japão) após 45 min de reação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O conteúdo de fenólicos totais foi expresso como mg.L^{-1} (em equivalentes de ácido gálico) (adaptado de JULKUNEN-TIITTO, 1985).

5.2.2. Análise de açúcares por cromatografia de íons

A dosagem de sacarose foi realizada por cromatografia de íons, de acordo com metodologia descrita por IC Application Note (2016). Os açúcares foram determinados utilizando-se o cromatógrafo de íons 930 Compact IC Flex (Metrohm AG, Suíça), utilizando o detector amperométrico. Como fase móvel foi utilizada uma solução de 100 mmol.L^{-1} de hidróxido de sódio. As amostras foram diluídas e previamente filtrada em membranas Millipore de $0,45 \mu\text{m}$. A coluna utilizada foi a Metrosep Carb 1 (150/4.0), termostatizada a 35°C e o fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, com tempo de corrida de 12 minutos. As análises foram feitas em triplicada após injeção de $0,25 \mu\text{L}$ de cada amostra. Antes das análises quantitativas, a solução-padrão de

sacarose ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi utilizada na elaboração da curva de calibração nas concentrações entre 0,1 e 0,5 g.L⁻¹.

5.2.3. Análise de ácido gálico por espectrometria de massas pelo quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF)

A presença do ácido gálico foi confirmada por ESI-MS. A análise de ESI-MS foi feita utilizando um HPLC (Hewlett Packard, Agilent Technologies 1290 series), sem coluna, acoplado ao espectrômetro de massas Q-ToF iFunnel 6550. Um sistema de solvente de acetonitrila (ACN; $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Brasil) e água ultra-pura (1:1) foi utilizado em fluxo de 0.6 mL.min⁻¹. 10 μ L de amostra foi diluída em 1 mL de ACN e 1 μ L foi injetado. A análise dos espectros de massas para a primeira ordem (MS) e para os restantes dos experimentos de vários estágios foi realizada sob as seguintes condições: Temperatura do gás a 290 °C; Fluxo do gás de secagem a 14 L.min⁻¹; Nebulização à 45 psi; Temperatura do gás de bainha a 350 °C; Fluxo do gás de bainha a 12 L.min⁻¹; V_{Cap} 3000; Nozzle voltage 320 V; Fragmentor 100 V; OCT 1 RFVpp 750 V; e energia de colisão 35V. A versão B.07.00 do programa Agilent MassHunter Qualitative Analysis foi utilizada para adquirir e processar os dados.

5.2.4. Mecanismo de ozonólise da degradação do ácido gálico por Q-ToF/MS

As soluções aquosas de ácido gálico (100 mg L⁻¹) ($\geq 99\%$, grau HPLC, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram ozonizadas em microreator de vidro de 145 mL (Figura 26). Os ensaios foram realizados utilizando diferentes condições de pH (3,0 a 7,0), temperatura (40 a 80 °C) e dose de ozônio (0,58 a 3,82 mg min⁻¹). As amostras foram coletadas aos 5, 10, 20 e 30 min, com o objetivo de monitorar a cinética de degradação do ácido gálico. As amostras foram analisadas de acordo com a metodologia para Q-ToF/MS descrita acima.

Figura 26. Sistema de reação com análise em fluxo: (a) Ozonizador; (b) Reator; (c) Bomba peristáltica; (d) Espectrofotômetro com cubeta de fluxo contínuo; (e) Computador; (f) Frascos com iodeto de potássio.

5.3. Resultados e discussão

A definição de melhores condições operacionais no processo industrial é fundamental para o sucesso da cadeia produtiva de vários produtos de interesse comercial.

Com base no gráfico de Pareto (Figura 27a), os fatores pH (L), temperatura (Q) e interação pH $\times$ temperatura foram significativos a um intervalo de confiança de 95%. Estes três parâmetros significativos foram mantidos no modelo para a construção da análise de variância (ANOVA) ajustada (Tabela 12). Os fatores pH (Q) e temperatura (L) não foram significativos porque os valores dos efeitos dessas variáveis não excederam a linha de significância e puderam ser removidos sem comprometer a previsão.

Na ozonização, a natureza exata do radical depende particularmente da solução de pH. Em meios neutros ou ácidos, o ozônio atua através de um radical de oxigênio. Por outro lado, o radical hidroxilo predomina em meio alcalino (DAVIS, 2001). Portanto, a influência do pH na ozonização, que foi confirmada pelos resultados obtidos na Figura 27a.

O modelo de regressão gerado foi significativo ($p \leq 0,05$), uma vez que $F_{\text{calculado}}(0,95; 3,7) = 16,55$ foi maior que $F_{\text{tabelado}}(0,95; 3,7) = 4,35$ e preditivo, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ foi três vezes maior que F_{tabelado} (de acordo com Barros Neto et al., (1996)). O coeficiente de

determinação (R^2) da regressão mede a proporção total da resposta é explicada pelo modelo. Assim, um R^2 maior, ou mais próximo de 1, significa um erro menor e um modelo melhor. O R^2 obtido foi igual a 0,876 ou 87,6% da variância total em torno da média e é explicado pelo modelo.

Figura 27. (a) Diagrama de Pareto do ácido gálico (C/C_0) de acordo com as variáveis independentes pH e temperatura; (b) Superfície de resposta da concentração de ácido gálico pela interação entre as variáveis X1 (pH) e X2 (Temperatura).

Tabela 13. Análise da variância (ANOVA) do modelo ajustado ($p \leq 0,05$) obtida a partir do coeficiente de regressão da resposta de cor ICUMSA.

FV	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	0,06875	3	0,02299	16,55*
Resíduo	0,00976	7	0,00139	
Total	0,07870	10		

* Significativo a $p \leq 0,05$.

Os coeficientes de regressão significativos a 95% foram considerados nos modelos matemáticos propostos para representar a equação de degradação de ácido gálico (C/C_0), em função do pH e temperatura (Equação 3). Gould e Weber (1976) reportaram que o ozônio tem a capacidade de oxidar compostos orgânicos em compostos mais simples e degradáveis e que a reação é influenciada pelo pH inicial da solução.

Através das análises de superfícies de respostas pôde-se visualizar os efeitos das variáveis independentes e de suas interações sobre a resposta avaliada, uma vez que a ANOVA mostrou-se significativa.

$$\text{Ácido gálico} = 0,500891 - 0,055847 \times \text{pH} + 0,055089 \times [t(^{\circ}\text{C})]^2 - 0,079875 \times \text{pH} \times t(^{\circ}\text{C}) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

Ácido gálico = Concentração final (mg/mL)/Concentração inicial (mg/mL)

pH = valor do pH inicial do caldo

t (°C) = Temperatura da reação

Na Figura 27b, é possível observar que houve maior degradação de ácido gálico em pH acima de 6,0 quando em temperaturas maiores que 50°C. Também houve maior degradação em pH menor que três quando em temperaturas menores que 50°C.

Davis et al. (1998) verificaram uma diminuição substancial nos valores de cor medidos em pH 9,0, o que pode indicar que o ozônio ataca fortemente pigmentos de plantas como flavonoides e outros compostos fenólicos. Beltran et al. (2006) relataram que, como outros compostos fenólicos, o ácido gálico reage rapidamente com o ozônio e, por causa da dissociação característica dos fenóis, a constante de velocidade entre o ozônio e o ácido gálico aumenta com o aumento do pH.

A quantidade de sacarose presente também foi analisada antes e depois da ozonização. Baseado no diagrama de Pareto (Figura 28a), os fatores pH (L), pH (Q), pH x temperatura e temperatura (L) foram significativos ao nível de 95% de confiança. Os quatros parâmetros foram mantidos no modelo para a construção da análise da variância (ANOVA) ajustada (Tabela 13). O modelo de regressão gerado foi significativo ($p \leq 0.05$), uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ (0,95; 4,6) = 20,98 foi maior que o F_{tabelado} (0,95; 4,6) = 4,53 e preditivo. O R^2 obtido foi igual a 0,898, ou seja, 89,8% da variância total em torno da média é explicada pelo modelo. Para representar a equação da degradação da sacarose (C/C_0) foram considerados os fatores que foram significativos ao nível de 95% de confiança para o modelo matemático proposto em função do pH e da temperatura (Equação 4).

A Figura 28b mostra que a maior degradação de sacarose ocorre quando há combinação de pH ácido (3,0 a 5,0) e temperatura elevada (50 a 70 °C). Também foi reportado Pennington e Baker (1990) e Panpae et al. (2008), que esta combinação de temperatura e pH causou inversão da sacarose, resultando em glicose e frutose.

$$\text{Sacarose} = 0,932737 + 0,249096 \times \text{pH} - 0,149458 \times (\text{pH})^2 - 0,123005 \times t(^{\circ}\text{C}) + 0,186250 \times \text{pH} \times t(^{\circ}\text{C})$$

Equação 4

Onde:

Sacarose = Concentração Final (mg/mL)/Concentração inicial (mg/mL)

pH = valor inicial do pH do caldo

t (°C) = Temperatura de reação em °C

Figura 28. (a) Diagrama de Pareto dos efeitos estimados dos fatores pH e temperatura sobre a sacarose; (b) Superfície de resposta da concentração de sacarose para interação de variáveis X1 (pH) e X2 (Temperatura)

Tabela 14. Análise da variância (ANOVA) do modelo ajustado ($p \leq 0,05$) obtida a partir do coeficiente de regressão da degradação de sacarose

FV	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	0,89982	4	0,89949	20,98*
Resíduo	0,10179	6	0,04287	
Total	1,00161	10		

*Significativo a $p \leq 0,05$.

A inversão da sacarose em glicose e frutose ocorre mais rapidamente com o aquecimento. Inversão de soluções de sacarose puras ocorrem quase 5.000 vezes mais rápidas em 90°C do que a 20°C. Em termos práticos, estas reações ocorrem em pH abaixo de 7,0 e mais rapidamente com a diminuição do pH (PENNINGTON E BAKER, 1990).

Davis et al. (1998) relataram não ter encontrado significativa destruição de açúcares nas condições por eles utilizadas (Ozônio= 0 a 3,0 kg h⁻¹; pH entre 6,0 e 7,0 e temperatura acima

de 70 °C). Eles afirmam que pequenas perdas de açúcar ($< 0,1\%$) poderiam ser sacrificadas se necessário quando considera-se a eficiência do ozônio na remoção de cor. Gomez et al. (1980) afirmam que os açúcares não degradam durante a ozonização em condições de pH neutro ou levemente ácido. Os autores também reportaram que uma pequena degradação somente em pH acima de 8,5 por causa da mudança no mecanismo do oxigênio para radical hidroxila em pH elevado.

Na Figura 29 são apresentados os perfis cinéticos do ácido gálico durante o tempo de ozonização. Na Figura 29B, é possível observar o ensaio que apresentou a menor degradação de ácido gálico e na Figura 29C, o ensaio que apresentou a maior degradação do ácido gálico quando comparado aos demais ensaios realizados. A maior degradação do ácido gálico foi obtida nas condições de reação de pH igual a 7,82 e temperatura de 50 °C. Portanto, a degradação de fenólicos foi favorecida pelo pH básico do meio.

Esplugas et al. (2002) afirmam que, no processo de ozonização, a degradação foi maior em pH básico por causa da contribuição da forma radical aumentada com o pH, em estudo realizado para a degradação de fenol em diferentes pH. Eles concluíram que a taxa de degradação e o custo menor obtido na ozonização favorecem o seu uso na degradação de fenol quando comparado com outros POA (O_3/H_2O_2 , UV, UV/ O_3 , UV/ H_2O_2 , O_3 /UV/ H_2O_2 , Fe^{+2}/H_2O_2 e fotocatalise). Forero et al. (2001) avaliaram o comportamento da reação de degradação de fenol em dois valores de pH diferentes (pH 5 e 10). E verificaram que valores de pH mais altos aumentam a taxa de oxidação do fenol com ozônio.

Figura 29. Perfil cinético dos valores de ácido gálico obtidos após o tratamento de ozonização para diferentes de temperatura e pH: (A) pH = 3,0 (B) pH = 7,0 (C) pH = 5,0 (D) Temperatura = 50 °C

O tratamento 9 (pH= 7,82; temperatura= 50 °C) foi analisado por espectrometria de massas por ser o tratamento que apresentou maior taxa de degradação do ácido gálico. As figuras 30 e 31 os espectros de massas com os íons durante a ozonização.

Baseado na comparação dos íons com maiores abundâncias relativas, na Figura 30, foram observadas as presenças dos íons m/z 169 (Ácido gálico); m/z 341 (Sacarose); m/z 377 (Sacarose + Cl); m/z 455 ($[C_{16}H_{24}O_{15}]$ -H; 3,02 ppm); m/z 683 (Dímero de sacarose).

Figura 30. ESI-MS (-) da solução de sacarose com ácido gálico antes (a) e depois (b) de 240 min de ozonização.

A abundância relativa da sacarose ($m/z = 341$) foi mantida durante o processo de ozonização (0 a 240 min), indicando que não houve degradação de sacarose, o que é um importante parâmetro para produção industrial de açúcar cristal. O íon de $m/z 377$ (sacarose + Cl) não é um composto presente naturalmente no caldo de cana-de-açúcar ou produto originado na reação de ozonização. Este é um íon presente no processo de ionização. A presença deste íon molecular também foi observada em análise de espectrometria de massas de caldo de cana-de-açúcar como previamente descrito por Sartori et al. (2015).

O íon molecular $m/z 455$ teve um decréscimo da abundância relativa após a ozonização. Os íons moleculares $m/z 377$ e 683 mativeram as abundâncias relativas após o processo de ozonização.

A Figura 31 mostra a presença de íons $m/z 112$ (não identificado); $m/z 125$ ($[C_6H_6O_3]^-$; 3.11 ppm); $m/z 169$ (Ácido gálico); e $m/z 195$ (não identificado) com maiores abundâncias relativas. Ocorreu um decréscimo de abundância relativa do íon Ácido gálico ($m/z 169$) ao longo da ozonização, confirmando a degradação apresentada na Figura 29.

Figura 31. ESI-MS (-) da solução de sacarose com ácido gálico: (a) antes e depois de (b) 240 min de ozonização.

Para o mecanismo de degradação do ácido gálico, os espectros de soluções de ácido gálico ozonizado foram analisados para identificar quais íons poderiam resultar do processo de ozonização. Observamos a presença de íons m/z 147; m/z 167; m/z 169 (ácido gálico); m/z 180; m/z 183; m/z 201; e m/z 215. De acordo com Moodley et al. (1999), o ozônio rompe as ligações duplas e a estrutura do anel benzênico dos grupos fenólicos.

Com base nestas informações e nos íons encontrados, foram propostas as vias de ozonólise do ácido gálico (Figura 32). A degradação do ácido gálico (1) pode ocorrer através de duas vias principais. O primeiro passo começa pela oxidação de 3 hidroxilas no anel aromático baseado no mecanismo oxidativo dos fenóis pelo ozônio (2). Em seguida, a clivagem da ligação dupla de alceno remanescente ocorre de acordo com o mecanismo de Criegee (Criegee, 1975) e forma o ácido 2,3,4-trioxo-heptanodióico (3). Em seguida, são esperadas descarboxilações consecutivas, produzindo CO_2 e água e causando a mineralização total do ácido gálico.

A oxidação pelo ozônio pode levar à inclusão de mais oxigênio na molécula, principalmente devido à formação de vários radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$). Assim, observou-se também a segunda via, onde além da oxidação dos grupos hidroxila, há inserção de um quarto grupo (4), que é oxidado por ozônio novamente seguindo o mecanismo de Criegee e formando o 2,3,4,5 -tetraoxo-heptanodióico (5) que será posteriormente mineralizado. A formação de íons diácido poderia justificar a redução do pH final nos sistemas de reação após ozonização. Além

disso, a oxidação de ácido gálico seguida pela clivagem de anéis aromáticos pode explicar as alterações de cor observadas durante a reação.

Figura 32. Mecanismo proposto de degradação de ácido gálico em soluções aquosas

5.4. Conclusão

A ozonização foi efetiva na degradação do ácido gálico, pigmento de baixo peso molecular amplamente encontrado em cana-de-açúcar e beterraba, sendo influenciada pelos valores de pH e temperatura utilizados.

Referências

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299 p.
- BELTRÁN, F.J.; GIMENO, O.; RIVAS, F.J.; CARBAJO, M. Photocatalytic ozonation of gallic acid in water. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 11, p. 1787–1796, 2006.
- BUCHELI, C.S.; ROBINSON, S.P. Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 257-261, 1994.
- CLARKE, M.A.; LEGENDRE, B.R. Qualidade da cana-de-açúcar: impactos no rendimento do açúcar e fatores de qualidade. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.17, n. 6, p. 36-40, 1999.
- CRIEEGE, R. Mechanism of ozonolysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 14, n.11, p. 745-752, 1975.

- DAVIS, S.B. The chemistry of colour removal: A processing perspective. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, v. 75, p. 328-336, 2001.
- DAVIS, S.B.; MOODLEY, M.; SINGH, I.; ADENFORD, M.W. The use of ozone for colour removal at the malelane refinery. **Proceedings of South African Technologists Association**, v. 72, p. 255-260, 1998.
- ESPLUGAS, S.; GIMENEZ, J.F.; CONTRERAS, S. Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. **Water Research**, v. 36, p. 1034-1042, 2002.
- FORERO, J.E.; DUQUE, J.J.; RIOS, F.; DÍAZ, J. Ozone for phenol treatment in industry wastewater. **Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 2, n. 2, p. 17-26, 2001.
- GASIL. **Gerados de ozonio**. URL (<http://www.silton.com.br/pt/index.php/areas/acucar-e-etanol/geradores-de-ozonio/>). Acessado em 12 jun 2016.
- GOODACRE, B.C.; COOMBS, J. Formation of colour in cane juice by enzyme catalyzed reaction. Part II. Distribution of enzyme and colour precursors. **International Sugar Journal**, v. 80, p. 323-326, 1978.
- GOULD, J.P.; WEBER, W.J. Oxidation of phenols by ozone. **Water Pollution Control Federation**, v. 48, n. 1, p. 47-60, 1976.
- IC Application Note P-48. **Glucose, fructose and sucrose applying pulsed amperometric detection using the 930 Compact IC Flex**. URL (http://www.metrohm.co.th/news/20140605_METROHM_ANALYSIS_OF_GLUCOSE_FRUCTOSE_AND_SUCROSE_IN_FOOD). Acessado em 03 jun 2016.
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic Constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.
- KORT, M.J. 1979. Colour in Sugar Industry. In: BIRCH, G.G. & PARKER, K.J. (ed.) **Science and Technology**. London: Applied Science Publications, 1979, p. 97-130.
- MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F.; VICENTE, E. Sulfitos em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.
- MOODLEY, M.; DAVIS, S.B.; ADENDORFF, M. Full scale decolourisation trials with ozone. **International Sugar Journal**, v. 101, p. 165-171, 1999.
- NGUYEN, D.M.T.; ZHANG, Z.; DOHERTY, W.O.S. Degradation of hydroxycinnamic acid mixtures in aqueous sucrose solutions by the Fenton process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, 1582-1592, 2015.
- PANPAE, K.; JATURONRUSMEE, W.; MINGVANISH, W.; NUNTIWATTANAWONG, C.; CHUNWISSET, S.; SANTUDROB, K.; TRIPHANPITAK, S. Minimization of sucrose

- losses in sugar industry by pH and temperature optimization. **The Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 513–519, 2008.
- PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo: NOBEL, 2010. 248p.
- PENNINGTON, N.L.; BAKER, C.W. **Sugar: User's Guide to sucrose**. New York: AVI Book, 1990. 332 p.
- QUDSIEH, H.Y.M.; YUSOF, S.; OSMAN, A.; RAHMAN; R.A. Effect of maturity on chlorophyll, tannin, color, and polyphenol oxidase (PPO) activity of sugarcane juice (*Saccharum officinarum* Var. Yellow Cane). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1615-1618, 2002.
- SARTORI, J.A.S.; GALAVERNA, R.; EBERLIN, M.N.; CORREA, 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**, v.39, n.6, 1826-1831, 2015.
- SILVA, W.S.; SARTORI, J.A.S.; AGUIAR, C.L. Combination effect of ozone and heat treatment for the color reduction in sugarcane juice. **Chemical and Process Engineering Research**, 35, 75-83, 2015.
- VILELA, J.M.C.L.; D'AVILA, F.M.; MENATO, M.D.D. Inovações na purificação do caldo. In: MARQUES, et al. **Tecnologias na agroindústria canavieira**, Piracicaba: STAB, 2008, p. 263-272.
- ZHAO, Z.G.; ZHU, L.C.; YU, S.J.; FU, X.; ZENG, X. Simultaneous determination of ten major phenolics acids in sugarcane by a reversed phase HPLC method. **Sugar Industry**, v. 133, p. 1-6, 2008.

6. REAÇÕES ENVOLVENDO A DEGRADAÇÃO DE FENÓLICOS POR OZONIZAÇÃO³

Resumo

O uso do ozônio como um processo alternativo de clarificação de caldo de cana-de-açúcar tem sido estudado por apresentar como vantagem a mineralização de compostos orgânicos que causam cor no açúcar a ser processado. Não há formação de compostos nocivos à saúde humana como ocorre na sulfitação, que é o processo tradicionalmente utilizado. Neste trabalho, a degradação de fenólicos e flavonóides foram estudados utilizando dois compostos modelos: rutina e ácido cafeico. A ozonização foi eficiente e foi monitorada por HPLC/PDA, UV e por espectrometria de massas com infusão direta por eletrospray. A partir dos dados coletados, mecanismos de degradação da rutina e ácido cafeico sob condições de ozonização estudadas foram propostos. A potencial mineralização dos compostos foi confirmada.

Palavras-chave: Ozonização; Sulfitação; Açúcar; Flavonoides

Abstract

The use of ozone as an alternative process for the clarification of sugarcane juice has been studied because it presents as an advantage the mineralization of organic compounds that can cause color in the sugar to be produced. No residues harmful to human health such as those from sulfitation, which is the process traditionally used, are also formed. In this work, the degradation by ozonation of flavonoids and phenolic acids were studied using two model compounds: rutin and caffeic acid. Ozonation was efficient and was monitored by HPLC/PDA, UV and direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. From the collected data, degradation mechanisms of rutin and caffeic acid under the ozonation conditions studied were proposed. And the potential mineralization of the compounds was confirmed.

Keywords: Ozonation; Sulphitation; Sugar; Flavonoid

³ Conteúdo referente à esse capítulo foi enviado à Green Chemistry: SARTORI, J.A.S.; ANGOLINI, C.F.F; EBERLIN, M.N.; AGUIAR, C.L. Reactions involved in phenolic degradation by ozonation as a green-process in sugarcane mills.

6.1. Introdução

A cor é um termo genérico utilizado para englobar a ampla variedade de componentes que contribuem para a cor do açúcar e é medida como o efeito total de todos os compostos coloridos na absorbância da luz (REIN, 2007). A maioria desses componentes são complexos e não são fáceis de quantificar. A cor do caldo de cana-de-açúcar é mais afetada pelos compostos fenólicos e flavonoides, pigmentos e precursores de cor, naturais da cana-de-açúcar. A cor varia com a maturação, variedade, tipo de solo e presença de pragas. Condições ambientais também podem causar estresse, levando ao aumento de cor do açúcar devido ao aumento do teor de aminoácidos, que são precursores de cor. Aminoácidos podem ser convertidos em pigmentos pelas reações de Maillard, que ocorrem durante o processamento de cana-de-açúcar (CLARKE E LEGENDRE, 1999).

Ácidos fenólicos, derivados de ácidos cinâmicos e benzoicos, são moléculas de baixo peso molecular e são amplamente distribuídos na cana-de-açúcar, sendo precursores de cor durante o processamento do açúcar de cana-de-açúcar. No caldo de cana-de-açúcar, os ácidos fenólicos encontrados em maiores quantidades são ácido cafeico, ácido gálico e ácido ferúlico (ZHAO et al., 2008). Sob determinadas condições, o ácido cafeico e seus derivados podem sofrer oxidação em tecidos de plantas ou em produtos originados de plantas, sendo excelentes substratos para as polifenoloxidasas (BASSIL et al., 2005).

Os flavonóides são extraídos quando a cana-de-açúcar é moída e são uma das classes de pigmentos naturais presentes na cana planta, sendo encontrados em uma ampla gama de produtos oriundos da cana-de-açúcar. Cinco classes de flavonoides têm sido encontradas na cana-de-açúcar: antocianinas, catequinas, chalconas, flavonóis e flavonas. Entre os flavonóis, a rutina foi um dos compostos encontrados, principalmente, nas folhas (SMITH e PATON, 1985).

Durante a produção de açúcar cristal branco, a sulfitação é comumente responsável por reduzir a cor do açúcar a ser produzido (PAYNE, 2010). Porém, a sulfitação apresenta como desvantagem a presença de sulfito no produto final. O sulfito tem sido considerado prejudicial à saúde humana, uma vez que estudos tem demonstrado que pessoas que são sensíveis à sua ingestão, apresentam sintomas como congestionamento no peito, tosse, desconforto na garganta, hipotensão e dermatite de contato e para pessoas asmáticas, pode induzir à episódios de asma ou broncoespasmos (PAPAZIAN, 2013; MACHADO, 2006).

Como alternativa ao processo de sulfitação, o ozônio vem sendo proposto mas utilizada de forma empírica. O ozônio atua como um oxidante e quebra duplas ligações entre

carbonos, originando ácidos carboxílicos, álcool e aldeídos. Ele também abre anéis aromáticos (DAVIS, 2001).

Nesse estudo, foi avaliado a degradação de compostos fenólicos pela ozonização, buscando uma melhor compreensão das suas cinéticas de degradação.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Experimentos de ozonização

Dois compostos-modelos foram utilizados na ozonização: ácido cafeico e rutina. As soluções desses compostos (250 mg.L^{-1}) ($\geq 99\%$, grau HPLC, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram ozonizadas em microreator de vidro de 145 mL. Os ensaios foram realizados utilizando as condições definidas em estudos prévios (Sartori et al., 2017) que apresentam maior degradação de fenólicos: $\text{pH}=7,82$ e temperatura= 50°C . A dose de ozônio utilizada foi de $1,95 \text{ mg.min}^{-1}$, utilizando o ozonizador Azcozon HTU 500 AC. As amostras foram coletadas aos 5, 10, 20, 30, 60 e 90 min, com o objetivo de monitorar a cinética de degradação dos compostos. As soluções de ácido cafeico e rutina foram feitas em metanol devido à baixa solubilidade da rutina em água.

6.2.2. Espectros de absorção por espectrofotometria

As medidas de absorção foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 1 cm, por meio de um espectrofotômetro UV-Visível Mini 1240 (Shimadzu Co., Japão), com varredura no intervalo de 200-400 nm e resolução de 1 nm. A diluição utilizada foi de 20 vezes.

6.2.3. Análise de fenólicos por cromatografia líquida de alta performance por arranjo de diodo (HPLC/PDA)

A quantificação dos compostos fenólicos foi feita utilizando o método descrito por Colombo et al. (2006) com pequenas modificações, utilizando um cromatógrafo líquido modelo HPLC Shimadzu com detector de UV/PDA. Foi utilizada uma coluna do tipo C18 e como fase móvel utilizados: Solvente A (Ácido fórmico a 0,2% em água ultrapura) e Solvente B: acetonitrila, a um fluxo de $1,0 \text{ mL/min}$ e temperatura da coluna de 40°C . O gradiente da fase móvel foi: 0-8 min, 10–13% B; 8–25 min, 13–20% B; 25–40 min, 20–40% B and 40–45 min,

40–60% B. O volume de injeção da amostra foi de 10 μL . Antes das análises quantitativas do ácido, soluções-padrão de ácido cafeico e rutina e p-hydroxy-biphenyl foram preparadas para a elaboração das curvas de calibração (5 a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

6.2.4. Análise de fenólicos por espectrometria de massas pelo quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF)

A análise de ESI-MS foi feita utilizando um HPLC (Hewlett Packard, Agilent Technologies 1290 series), sem coluna, acoplado ao espectrômetro de massas Q-ToF iFunnel 6550. Um sistema de solvente de acetonitrila (ACN; $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Brasil) e água ultra-pura (1:1) foi utilizado em fluxo de 0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. 10 μL de amostra foi diluída em 1 mL de ACN e 1 μL foi injetado. A análise dos espectros de massas para a primeira ordem (MS) e para os restantes dos experimentos de vários estágios foi realizada sob as seguintes condições: Temperatura do gás a 290 $^{\circ}\text{C}$; Fluxo do gás de secagem a 14 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; Nebulização à 45 psi; Temperatura do gás de bainha a 350 $^{\circ}\text{C}$; Fluxo do gás de bainha a 12 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; V_{Cap} 3000; Nozzle voltage 320 V; Fragmentor 100 V; OCT 1 RFVpp 750 V; e energia de colisão 35V. A versão B.07.00 do programa Agilent MassHunter Qualitative Analysis foi utilizada para adquirir e processar os dados.

6.3. Resultados e discussão

O ácido cafeico é um dos principais ácidos fenólicos presentes no caldo de cana-de-açúcar e a rutina é um dos flavonóides presentes no caldo. Para comparar os mecanismos de ação do ozônio nesses compostos modelo, os espectros UV obtidos em diferentes tempos de reação para os dois compostos analisados foram comparados (Figura 33).

A rutina possui 3 grandes bandas de absorbância: 204,5; 257 e 357 nm (Figura 33a). Ao longo da ozonização, foi possível observar que, para a banda I (204,5 nm), ocorreu o deslocamento batocrômico de 4,5 nm. A Banda II (257 nm) referente ao anel heterocíclico, observamos redução da absorbância até 60 min, seguida de um aumento em 90 min. Para a banda III (358 nm), houve uma redução dos valores de absorbância ao longo de toda a reação de ozonização. Ao comparar o espectro da amostra inicial com a amostra obtida a 90 min, é possível observar a degradação total da rutina devido à ozonização, uma vez que o espectro não apresenta mais as suas bandas características.

Figura 33. Espectros UV das soluções de rutina (a) e do ácido cafeico (b) obtidos em diferentes tempos de reação.

O ácido cafeico tem 3 bandas de absorção: 205, 287 e 315 nm (Figura 33b). Ao longo de todo o processo de ozonização, a absorbância na banda I (205 nm) foi reduzida até 20 min e a absorbância aumentou nessa região até 90 min com mudança batocrômica para 208 nm (3 nm). Para a banda II (287 nm) e a banda III (315 nm), houve redução na absorbância ao longo do tempo de reação.

Ao comparar as bandas I dos dois compostos analisados, é possível observar o mesmo comportamento: redução inicial com subsequente aumento de absorbância, acompanhada de uma mudança batocrômica.

A Figura 34 mostra a cinética da degradação. A degradação da rutina foi mais rápida do que o ácido cafeico e, após 30 minutos, nenhum pico de rutina pode ser detectado por análises de HPLC/PDA (Anexo Aa e B). Para o ácido cafeico, nenhum pico (Anexo Ab e C) pode ser detectado após 60 min.

Figura 34. Cinética de degradação da rutina e do ácido cafeico por ozonização.

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos na degradação de compostos fenólicos por ozonização, foram realizadas análises de infusão direta de ESI(-)-MS para tentar caracterizar as moléculas presentes, sabendo que os principais intermediários e produtos finais resultantes da ozonização com fenol descritos na literatura são: catecol, hidroquinona, ácido mucônico, aldeído de ácido mucônico, aldeído de ácido maleico, ácido oxálico, glioxal, ácido glioxílico, ácido fórmico, H_2O_2 e CO_2 e a quantidade desses produtos depende do pH (RAMSEIER & GUNTEN, 2009; MVULA & SONNTAG, 2003).

A mineralização completa do fenol é importante para assegurar a formação de compostos mais tóxicos. A formação de hidroquinona e 1,4-benzoquinona durante o processo de ozonização é conhecida por causar maior toxicidade (MVULA e SONNTAG, 2003).

A Figura 35 mostra ESI-MS típica da solução de rutina a zero e 90 min de ozonização.

Figura 35. ESI-MS(-) da solução da rutina no tempo zero (a) e de 90 min (b) de ozonização.

A quercetina, a aglicona da rutina, possui duas classes de dupla ligação submetidas à degradação do ozônio: as ligações duplas carbonílicas α,β -insaturadas e do anel. Espera-se que a ligação dupla α,β -insaturada com íons de electrons seja oxidada de preferência, no entanto, nossos resultados MS/MS (Anexo D) e a presença de íon de m/z 655 mostraram que a ligação dupla do anel foi degradada primeiro (Figura 36).

Após a abertura do anel, existem 3 ligações duplas que podem ser oxidadas pelo ozônio e é difícil prever uma via preferível. Os intermediários caracterizados por ESI-MS nos permitiram, no entanto, propor a via de degradação da Figura 37. Os ácidos carboxílicos aromáticos e os ésteres de ceto propostos como produtos finais na Figura 37 são, de fato, mais mineralizados com maior exposição ao ozônio como mostrado por Sartori et al. (2017). Além disso, observamos uma maior contribuição de éteres de metilo em condições básicas de ozonólise. Sabe-se que, sob a formulação de ozonização básica, os radicais hidroxilo podem conduzir à formação de radicais metoxi na presença de metanol como solvente (KHUNTIA et al., 2015).

Figura 36. Mecanismo de degradação por ozonização inicial proposto da rutina em solução metanólica.

Figura 37. Mecanismo de degradação proposto da rutina em solução metanólica.

A Figura 38 mostra um típico ESI-MS da solução de ácido cafeico no tempo zero e de 90 min de ozonização.

ESI-MS(-) da solução de ácido cafeico no tempo zero (a) e de 90 min (b) de ozonização.

O ácido cafeico também possui duas classes de dupla ligação que podem ser oxidadas pelo ozônio: o α,β -carbonila insaturada e as ligações duplas do anel (Figura 39). A ligação dupla α,β -carbonila insaturada é oxidada de preferência, portanto, os primeiros e mais abundantes compostos de degradação foram detectados como as moléculas desprotonadas de m/z 137 e m/z 167 (éster metílico). A segunda possibilidade mais provável foi a oxidação da dupla ligação do anel aromático, o que leva ao íon de m/z 211 (Figura 39). A oxidação adicional de ambos os intermediários resulta no íon m/z 199, e sua ozonização contínua leva a descarboxilações sucessivas e mineralização total.

Figura 38. Mecanismo de degradação proposto do ácido cafeico em solução metanólica.

6.4. Conclusão

A ozonização foi capaz de degradar os compostos fenólicos, sendo que a rutina foi degradada mais rapidamente do que o ácido cafeico. Os mecanismos propostos mostraram a potencial mineralização dos compostos, indicando a ozonização como um processo seguro alternativo à sulfitação.

Referências

- BASSIL, D.; MAKRIS, D.P.; KEFALAS, P. Oxidation of caffeic acid in the presence of L-cysteine: isolation of 2-S-cysteinylcaffeic acid and evaluation of its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, p. 395-402, 2005.
- CLARKE, M.A.; LEGENDRE, B.R. Qualidade da cana-de-açúcar: impactos no rendimento do açúcar e fatores de qualidade. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.17, n. 6, p. 36-40, 1999.
- DAVIS, S.B. The chemistry of colour removal: A processing perspective. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, v. 75, p. 328-336, 2001.

- KHUNTIA, S.; MAJUMDER, S.K.; GHOSH, P. Quantitative prediction of generation of hydroxylradicals from ozone microbubbles. **Chemical Engineering Research and Design**, 98, 231–239, 2015.
- 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.
- MVULA, E.; SONNTAG, C.V. Ozonolysis of phenols in aqueous solution. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 1, p. 1749-1756, 2003.
- PAPAZIAN, R. Sulfites: safe for most, dangerous for some. Disponível em: <www.fda.gov/FDAC/features/096_sulf.html>. Acesso em: 25 jan 2017.
- PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo: NOBEL, 2010. 248p.
- RAMSEIER, M.K.; GUNTEN, U.V. Mechanisms of Phenol Ozonation - Kinetics of Formation of Primary and Secondary Reaction Products. **Ozone: Science & Engineering**, v. 31, p. 201-215, 2009.
- REIN, P.W. **Cane sugar engineering**. Berlin: Bartens, 2007. 768 p.
- SARTORI, J.A.S.; ANGOLINI, C.F.F; EBERLIN, M.N.; AGUIAR, C.L. Criegee mechanism as a safe pathway of color reduction in sugarcane juice by ozonation. **Food Chemistry**, v. 225, p. 181-187, 2017.
- SMITH, P.; PATON, N.H. Sugarcane flavonoids. *Sugar Technology Reviews*, v. 12, p. 117-142, 1985.
- ZHAO, Z.G.; ZHU, L.C.; YU, S.J.; FU, X.; ZENG, X. Simultaneous determination of ten major phenolics acids in sugarcane by a reversed phase HPLC method. **Sugar Industry**, v. 133, p. 1-6, 2008.

ANEXOS

ANEXO A. Espectros de rutina (a) e ácido cafeico (b) por HPLC/PDA

(a)

(b)

ANEXO B. Cromatogramas das amostras de rutina em diferentes tempos de reação: (a) 0; (b) 30; (c) 60; (d) 90 min

(a)

(b)

(c)

(d)

ANEXO C. Cromatogramas das amostras de ácido cafeico em diferentes tempos de reação: (a) 0; (b) 30; (c) 60; (d) 90 min

ANEXO D. (-) ESI-MS/MS mostrando a fragmentação do íon m/z 641.