ANA FABRÍCIA DE OLIVEIRA BRUGOS

**Inativação da pectinametilesterase na pasteurização assistida por micro-ondas
de suco de laranja pera *Citrus sinensis* L. Osbeck**

São Paulo

2018

ANA FABRÍCIA DE OLIVEIRA BRUGOS

**Inativação da pectinametilesterase na pasteurização assistida por micro-ondas
de suco de laranja pera *Citrus sinensis* L. Osbeck**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

ANA FABRÍCIA DE OLIVEIRA BRUGOS

**Inativação da pectinametilesterase na pasteurização assistida por micro-ondas
de suco de laranja pera *Citrus sinensis* L. Osbeck**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Engenharia Química

Orientadora:
Prof.^a Dra. Carmen Cecília Tadini

**São Paulo
2018**

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor:

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Brugos, Ana Fabricia de Oliveira

Inativação da pectinametilesterase na pasteurização assistida por micro ondas de suco de laranja pera *Citrus sinensis* L. Osbeck / A. F. O. Brugos -- versão corr. -- São Paulo, 2018.

145 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Suco de laranja 2.Pasteurização 3.Micro-ondas 4.Cinética de inativação 5.Pectinesterase I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

Dedico este trabalho a Deus, o grande eu sou, criador da ciência,
e à minha família a quem tanto amo.

AGRADECIMENTOS

Meu principal agradecimento a Deus que apesar de tão ocupado mantendo o universo sempre tem um tempo para me ouvir e me ensinar algo novo a cada dia. A Tua ciência me impressiona. Nada sou sem Você.

À minha orientadora Prof^a Dra. Carmen Tadini, minha sincera admiração pela sua trajetória de vida e profissional. Por todo o alcançado no mundo acadêmico da engenharia, às vezes tão absorvido pelo universo masculino. Meu agradecimento por sua orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Jorge Gut pela disponibilidade em todos os momentos, pelas valiosas sugestões e agradável convívio.

Aos meus colegas e amigos do laboratório: Eduardo, Tiago, Juliana, Helena, Luz, Analía, Carla, Rosa, Érica, Marcos, Priscila, Arielle e Ariany pelos momentos compartilhados. Em especial à: Carola, Cris, Arlet, pelo apoio e incentivo. À minha “irmã” Lina pela amizade sincera e suporte mesmo a distância. À Vanessa e ao Ivan pela paciência e disposição. À Graça, Alexandre e Elisete pela amizade e auxílio.

A Capes pela concessão da bolsa de doutorado. A Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pelo auxílio financeiro através dos processos 2013/07914-8 e 2014/17534-0. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio através do processo 459177/2014-1.

Aos meus queridos pelo encorajamento e conselhos oportunos: Dudu, Estela, Guto, Miguel, Suellen, Valentina, Leo, Catarina, Fran de Mattos, Perpétua, Karin, Fran Pacheco, Matt e Alessandra, Jorge e Lygia. Ao meu sogro Julio por seu incentivo constante.

À minha mãe Dilza por suas orações e apoio incondicional. A meu pai Valdez (*in memoriam*) por seu positivismo. A meu irmão André por vibrar comigo a cada vitória alcançada.

Aos meus queridos filhos, Julia e Arthur, por seu apoio e compreensão em todos os momentos. Ao meu marido Julio, meu primeiro incentivador, por não medir esforços para me apoiar.

“Ele estende os céus [...] sobre o espaço vazio; suspende a terra sobre o nada. E
isso tudo é apenas a borda de suas obras! Um suave sussurro é o que ouvimos
d’Ele”

Jó 26:7,14 *PTNVI*

RESUMO

O estudo da inativação da enzima pectinametilesterase (PME) em suco de laranja foi realizado, tanto por tratamento térmico convencional quanto por micro-ondas em batelada. O tratamento térmico convencional foi realizado em banho termostático em diferentes temperaturas no intervalo entre (40 e 95) °C e tempo de retenção entre (0 a 60) s. O processo de aquecimento assistido por micro-ondas foi conduzido em digestor e em reator de síntese química e enzimática, ambos operando em modo descontínuo, por energia de micro-ondas. Nesse processo as condições de ensaio foram: intervalo de temperatura entre (40 e 90) °C e tempo de retenção entre (0 e 60) s. O histórico da temperatura foi adquirido em tempo real para todos os processos. Foram conduzidas análises físico-químicas de caracterização do suco não processado. As análises da atividade da enzima PME presente, acidez e teor de sólidos solúveis foram realizadas tanto para o suco não processado quanto para o suco pasteurizado em diferentes condições. A efetividade entre os métodos empregados foi verificada pela análise dos parâmetros obtidos para a cinética da inativação enzimática. Os resultados demonstram que o processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas se mostrou mais efetivo que o processamento térmico convencional atingindo inativação de 90 % a 60 °C após 10 s de processamento e atingindo 99 % de inativação quando exposto a 80 °C por no mínimo 20 s.

Palavras-chave: Suco de laranja. Micro-ondas. Inativação. Pectinametilesterase.

ABSTRACT

The enzyme pectin methylesterase (PME) inactivation in orange juice was studied by both conventional and microwave heat treatment in batch conditions. Conventional heat treatment was carried out in a thermostatic bath, maintaining the temperature constant during the process. Different temperatures were tested at the interval between (40 and 95) °C and time between (0 and 60) s. The microwave-assisted heating process took place through two equipments: the first one have used a multi-mode microwave digester, and the second a chemical and enzymatic synthesis mono-mode microwave reactor. Temperatures have been tested in the range of (40 to 90) °C and retention time between (0 and 60) s. The temperature's history has been acquired in real time for all processes. Physical-chemical characterization of the non-processed juice, pectin methylesterase enzyme activity, acidity and soluble solids content were conducted for both, fresh and treated juice. The results demonstrated that the microwave-assisted pasteurization was more effective than conventional, reaching 90 % inactivation at 60 °C after 10 s and reaching 99 % inactivation when exposed to 80 °C by at least 20 s.

Keywords: Orange juice. Microwave. Inactivation. Pectin methylesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura da laranja.....	37
Figura 3.2 - Estrutura química da pectina na cadeia linear	50
Figura 3.3 - Espectro eletromagnético com especificação das frequências e comprimentos de ondas eletromagnéticas, modo de ação na molécula e suas aplicações práticas industriais.....	65
Figura 3.4 - Representação esquemática da condução iônica e da rotação dipolar quando um material é exposto a um campo eletromagnético	66
Figura 3.5 - Vista esquemática superior interna do <i>magnetron</i>	68
Figura 3.6 - Vista esquemática de aplicadores de micro-ondas:.....	68
Figura 4.1 - Diagrama descritivo do procedimento experimental	73
Figura 4.2 - Processo de obtenção da pectina líquida a partir do bagaço da laranja: (a) bagaço triturado, (b) solução aquecida e (c) solução filtrada.....	76
Figura 4.3 - Processo de obtenção da pectina em gel a partir do bagaço da laranja	77
Figura 4.4 - Processo de: (a) lavagem, (b) seleção e (c) envase do suco extraído...	80
Figura 4.5 - (a) banho de água termostático; (b) embalagens em polietileno (2x10) cm	81
Figura 4.6 - (a) Forno de micro-ondas unifocal CEM, Star System 2; (b) Tubo de vidro inserido na cavidade.....	82
Figura 4.7 - (a) Reator de síntese química e enzimática por micro-ondas focalizadas CEM, Discover; (b) Representação da guia de onda circular e as sete fendas em vista superior	84
Figura 4.8 - Diagrama esquemático da determinação dos parâmetros da cinética de inativação enzimática.	87
Figura 5.1 - Histórico da temperatura durante o processamento térmico convencional (BT) em batelada do suco de laranja processado a 70 °C, em diferentes tempos....	94

Figura 5.2 - Atividade enzimática residual de suco de laranja em processo térmico convencional com temperatura de processo de 40 °C e respectivas barra de erros a 5 %.....	95
Figura 5.3 - Atividade enzimática residual da PME em função do tempo de processo equivalente com T_{ref} a 90 °C ($F_{90^{\circ}C}$) em suco de laranja processado pelo processo convencional a 70 °C, correspondente a isoforma termolábil (F_1) e a termorresistente (F_2).....	97
Figura 5.4 - Atividade enzimática residual da PME em função do tempo de processo equivalente (T_{ref} a 90 °C) em suco de laranja processado pelo tratamento térmico convencional, correspondente a isoforma termolábil (F_1) e a termorresistente (F_2) .	99
Figura 5.5 - Histórico da temperatura no suco de laranja durante o processamento térmico por micro-ondas em digestor CEM Star 2 em diferentes temperaturas (70, 75, 85 e 95) °C com tempo de retenção de 5 s	102
Figura 5.6 - Histórico da temperatura durante o processamento térmico assistido por micro-ondas no suco de laranja processado a 70 °C em digestor CEM Star System 2, em diferentes tempos de retenção	104
Figura 5.7 - Atividade enzimática residual da PME em função do tempo de processo equivalente a 90 °C ($F_{90^{\circ}C}$) em suco de laranja processado por micro-ondas (MW) a (50, 70 e 80) °C, correspondente a isoforma termolábil (F_1) e a termorresistente (F_2) e o respectivo gráfico da paridade.....	105
Figura 5.8 – Comparativo do histórico de temperatura do mesmo processo realizado em reator de micro-ondas a 80 °C obtido sob controle automático e obtido por fases de aquecimento	106
Figura 5.9 - Histórico da temperatura durante o processamento térmico de suco de laranja assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada CEM Discover (WDsc) a 80 °C, em diferentes tempos	107
Figura 5.10 - Atividade enzimática residual da PME em função do tempo de processo equivalente a 90 °C ($F_{90^{\circ}C}$) em suco de laranja para processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas (WDsc) a (50, 60, 70, 80 e 90) °C, correspondente a isoforma termolábil (F_1) e a termorresistente (F_2)	111

Figura 5.11 - Histórico da temperatura durante o processamento térmico de suco de laranja assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada CEM Discover a 80 °C para o tempo de retenção de 60 s com volumes variando entre (15 e 100) mL

..... 114

Figura 5.12 - Gráfico de paridade entre a atividade residual experimental e a calculada pelo modelo multicomponente conforme eq.(10) para tratamento térmico de suco de laranja em micro-ondas com análise de diferentes volumes (volumWDsc)

..... 117

Figura 5.13 - Comparativo entre a atividade enzimática residual da PME em suco de laranja entre o processo convencional (BT) e o assistido por micro-ondas (WDsc) predito pelo modelo de dois componentes em função do tempo equivalente (F) a $T_{ref} = 90$ °C a (60, 70, 80 e 90) °C

..... 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição química média da laranja	36
Tabela 5.1- Teores de sólidos solúveis (SS), sólidos totais (ST), polpa (P), cinzas (C), pH, acidez titulável (AT), rendimento (R), vitamina C (vit C) e razão do suco de laranja não processado da variedade Pera de acordo com a safra e comparativo com valores reportados pela literatura	90
Tabela 5.2 - Atividade enzimática (A_0), teor de polpa (P) e pH de suco de laranja não processado de acordo com a safra da laranja, em comparação com os dados da literatura	93
Tabela 5.3 – Valores médios da atividade da enzima com seus respectivos desvios e grau de inativação em suco de laranja Pera tratado termicamente pelo processo convencional (BT) em batelada em diferentes binômios tempo-temperatura.....	96
Tabela 5.4 – Letalidade da isoforma termolábil (F_1) e termorresistente (F_2); atividade residual enzimática da PME em suco de laranja tratado termicamente por processo convencional (BT) em batelada obtida experimentalmente (A/A_0) _{exp} ; a calculada pelo modelo (A/A_0) _{calc} ; e o respectivo desvio entre ambas	98
Tabela 5.5 - Parâmetros obtidos para o modelo da cinética de inativação de PME em suco de laranja no processo térmico convencional (BT). Os valores de z_1 e z_2 são válidos para o intervalo de temperatura entre (50 e 95) °C.....	100
Tabela 5.6 – Valores D e z obtidos da cinética de inativação da PME em suco de laranja processado por tratamento térmico convencional comparados aos relatados na literatura	101
Tabela 5.7 - Atividade enzimática residual da PME e letalidade integrada a $T_{ref} = 90$ °C com $z = 11$ °C e $D = 0,22$ s em suco de laranja para o processo de pasteurização assistido por micro-ondas em digestor CEM Star 2 entre (40 a 95) °C com tempo de retenção de 5 s.....	103
Tabela 5.8 - Atividade residual enzimática experimental da PME e respectivo grau de inativação em suco de laranja Pera após processo térmico assistido por micro-ondas (MW) em digestor.....	104

Tabela 5.9 - Atividade residual da enzima PME com respectivos desvios e grau de inativação em suco de laranja variedade Pera após processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc)	108
Tabela 5.10 - Letalidade da isoforma termolábil (F_1) e termorresistente (F_2); atividade residual enzimática da PME em suco de laranja tratado termicamente por processo assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc) obtida experimentalmente e a calculada pelo modelo de dois componentes; e o respectivo desvio entre ambas	110
Tabela 5.11 - Parâmetros da cinética de inativação de PME em suco de laranja no processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc).....	111
Tabela 5.12 - Parâmetros D e z para inativação de PME em suco de laranja por tratamento térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc).....	112
Tabela 5.13 - Atividade residual da enzima da PME e respectivo grau de inativação em suco de laranja variedade Pera para processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada com diferentes volumes (volumWDsc).....	115
Tabela 5.14 - Análise de variância aplicada nos valores obtidos para atividade enzimática da PME no estudo padronizado com diferentes volumes em reator assistido por micro-ondas (volumWDsc) a 80 °C com volumes variando entre (15 e 100) mL.....	115
Tabela 5.15 - Análise de variância aplicada ao processamento (volumWDsc) para a condição de 60 s a 80 °C com volumes variando entre (15 e 100) mL.....	116
Tabela 5.16 - Letalidade da isoforma termolábil (F_1) e termorresistente (F_2); atividade residual enzimática da PME em suco de laranja tratado termicamente por processo assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada a diferentes volumes (volumWDsc) obtida experimentalmente e a calculada pelo modelo de dois componentes; e o respectivo desvio entre ambas.....	117
Tabela 5.17 – Comparativo da inativação enzimática para os processos (WDsc) e (BT).....	118

Tabela 5.18 - Parâmetros da cinética de inativação de PME em suco de laranja no processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc)	120
--	-----

Tabela 5.19 - Comparação das frações das isoformas da enzima pectinametilesterase menos e mais resistentes conforme encontradas na literatura	120
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIJN	Association of the Industry of Juices and Nectars (EU)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ANOVA	Análise de variância
BT	Processo Térmico Convencional
CITRUSBR	Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos
DC	Corrente Direta
DM	Grau de metoxilação (do inglês <i>Degree of Methylation</i>)
EP	Eletroplasmólise
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FCOJ	Suco de laranja concentrado (do inglês <i>Frozen Concentrate Orange Juice</i>)
FO	Fibra ótica
FUNDECRIUS	Fundo de Defesa da Citricultura
GRG	Gradação Reduzida Generalizada
HM	Alta metoxilação (do inglês <i>High Methoxy</i>)
HSD	Grau de significância (do inglês <i>Honest Significant Difference</i>)
HTST	Alta temperatura com curto tempo (do inglês <i>High Temperature Short Time</i>)
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IR	Infravermelho
LM	Baixa metoxilação (do inglês <i>Low Methoxy</i>)

LTLT	Baixa temperatura com longo tempo (do inglês <i>Low Temperature Long Time</i>)
MO	Micro-ondas
MW	Aquecimento Assistido por Micro-ondas em Digestor
NFC	Não Concentrado (do inglês <i>Not From Concentrate</i>)
NMP	Número Mais Provável
NP	Amostra Não Processada
PEU	Unidade da Pectinametilesterase
PME	Pectinametilesterase
RTD	Pronto para comer (do inglês <i>Ready To Eat</i>)
SV	Valor de Esterilização
USDA	United States Department of Agriculture
UFC	Unidade Formadora de Colônia
volumWDsc	Aquecimento Assistido por Micro-Ondas Focalizadas com diferentes Volumes
WDsc	Aquecimento Assistido por Micro-Ondas Focalizadas em Reator

SUMÁRIO

1	Introdução e Justificativa	27
2	Objetivos.....	31
3	Revisão da Literatura.....	33
3.1	Matéria prima - Laranjas	34
3.1.1	Laranja e seus Componentes	34
3.1.1.1	Variedades de laranjas	35
3.1.1.2	Composição química comum	36
3.1.1.3	Estrutura da laranja.....	36
3.1.2	Suco de laranja.....	38
3.1.2.1	Principais componentes encontrados no suco de laranja	38
3.1.2.1.1	Açúcares e ácidos.....	38
3.1.2.1.1.1	Relação entre teor de sólidos solúveis / acidez	39
3.1.2.1.2	Polissacarídeos.....	39
3.1.2.1.3	Compostos nitrogenados	39
3.1.2.1.4	Minerais	40
3.1.2.1.5	Componentes responsáveis pelo aroma.....	40
3.1.2.1.6	Componentes responsáveis pelo sabor.....	41
3.1.2.1.7	Componentes responsáveis pela cor.....	41
3.1.2.1.8	Lipídios	42
3.1.2.1.9	Vitaminas	42
3.1.2.1.1	Conteúdo nutricional	43
3.1.2.2	Categorias e tipos de sucos de laranja	43
3.1.2.2.1	Suco de laranja pronto para beber.....	43
3.1.2.2.2	Suco de laranja concentrado congelado (FCOJ)	44
3.1.3	Importância da laranja para o mercado brasileiro	44

3.1.3.1	Dados do setor da plantação de citros	44
3.1.3.2	Dados de exportação.....	45
3.1.4	Evolução da demanda por suco de laranja no mundo	46
3.1.4.1	Preferência do consumidor brasileiro	47
3.1.5	Microbiologia do suco de laranja.....	48
3.1.5.1	Padrões microbiológicos.....	48
3.2	Pectina	49
3.2.1	Estrutura química de pectinas isoladas.....	49
3.2.2	Degradação da pectina	50
3.2.3	Quantidade de pectina presente na laranja.....	51
3.2.4	Grau de metoxilação (DM)	51
3.3	Enzimas.....	52
3.3.1	Enzimas presentes no suco de laranja	52
3.3.1.1	As isoformas da PME	54
3.3.1.2	A influência do pH sobre a inativação térmica da PME	55
3.3.2	Determinação da atividade da enzima PME em suco de laranja	55
3.3.3	Modelo da cinética de inativação enzimática	56
3.3.3.1	Condições isotérmicas.....	56
3.3.3.2	Condições não-isotérmicas	58
3.4	Tratamento térmico	60
3.4.1	Processo térmico tradicional	62
3.4.1.1	Tratamento térmico convencional de suco de laranja.....	62
3.4.2	Pasteurização assistida por micro-ondas.....	63
3.4.2.1	Vantagens e desvantagens do aquecimento por micro-ondas	64
3.4.2.2	Características das micro-ondas	64
3.4.2.3	Mecanismos envolvidos no aquecimento por micro-ondas	66
3.4.2.4	Sistemas de micro-ondas (MW)	67

3.4.2.5	Efetividade do aquecimento por micro-ondas	68
3.4.2.6	Inativação da PME por micro-ondas	69
3.4.2.7	Efeito das micro-ondas sobre outros componentes	70
3.4.2.7.1	Vitamina C (ácido ascórbico)	70
3.4.2.7.2	Perda de carotenóides.....	71
3.4.2.7.3	Alterações na cor	71
4	Materiais e Métodos.....	73
4.1	Testes preliminares.....	74
4.1.1	Matéria-prima (laranjas).....	74
4.1.2	Caracterização do suco de laranja	74
4.1.3	Análise da atividade enzimática da PME.....	75
4.1.3.1	Fontes de pectina utilizadas para medição da atividade enzimática PME	76
4.1.3.1.1	Pectina líquida obtida a partir do bagaço da laranja	76
4.1.3.1.2	Pectina em gel obtida a partir do bagaço da laranja.....	77
4.1.3.1.3	Pectina cítrica comercial DANISCO – RS400	77
4.1.3.1.4	Pectina cítrica comercial SIGMA – P9436	77
4.1.3.2	Medição da atividade enzimática segundo o método de Rouse e Atkins (1955)	78
4.2	Estudo padronizado	79
4.2.1	Matéria-prima (laranjas).....	79
4.2.2	Etapas da preparação e armazenamento do suco de laranja	79
4.2.3	Descongelamento.....	80
4.2.4	Caracterização do suco de laranja	80
4.2.5	Análise da atividade enzimática da PME.....	80
4.2.6	Processamento Térmico	80
4.2.6.1	Tratamento térmico convencional em batelada (BT).....	81

4.2.6.2	Tratamento térmico assistido por micro-ondas.....	82
4.2.6.2.1	Tratamento térmico por micro-ondas em digestor (MW)	82
4.2.6.2.2	Tratamento térmico por micro-ondas focalizadas em reator de síntese química e enzimática (WDsc)	83
4.2.6.2.3	Tratamento térmico por micro-ondas focalizadas em reator de síntese química e enzimática em diferentes volumes (volumWDsc)	84
4.2.6.3	Cinética de inativação da PME	85
4.2.7	Tratamento de dados	86
5	Resultados e Discussão	89
5.1	Caracterização do suco de laranja não processado	89
5.2	Atividade enzimática.....	91
5.2.1	Substrato.....	91
5.2.1.1	Testes preliminares	91
5.2.1.2	Estudo padronizado.....	91
5.2.2	Medição da atividade enzimática	92
5.2.3	Atividade enzimática do suco não processado	92
5.3	Processo térmico convencional (BT)	94
5.4	Processo térmico por micro-ondas	102
5.4.1	Testes preliminares.....	102
5.4.1.1	Tratamento térmico assistido por micro-ondas em digestor CEM Star System 2 (MW)	103
5.4.2	Estudo padronizado	105
5.4.2.1	Tratamento térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada CEM Discover (WDsc).....	105
5.4.2.2	Tratamento térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator CEM Discover com diferentes volumes (volumWDsc)	113
5.5	Comparativo entre processos: convencional (BT) e micro-ondas (WDsc) reator	118

6	Conclusões.....	123
7	Continuidade do Trabalho.....	125
8	Referências Bibliográficas	127
	Apêndice A	139
	Calibração do termopar tipo T:	139
	Calibração do sensor de infravermelho (IR):	139
	Calibração do sensor de fibra ótica (FO):	139

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é o maior produtor de laranjas no mundo, com aproximadamente 60 % da produção mundial de suco de laranja, e também é o líder de exportação do produto (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013; USDA, 2017).

Cerca de 80 % da produção brasileira de laranjas resulta em sucos industrializados. O principal comprador da bebida brasileira é a União Europeia cuja importação vem crescendo anualmente (AIJN, 2016; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013; USDA, 2016).

A região brasileira com maior produção de laranjas está concentrada no sudeste do Brasil numa região entre São Paulo e Triângulo Mineiro, conhecida como cinturão citrícola (LOHBAUER, 2010).

Sendo uma cultura e um produto tão importantes para o Brasil e para o mundo, desenvolver técnicas e aprimorar processos que mantenham a sua qualidade tanto em características organolépticas, quanto em conservação e extensão da vida de prateleira torna-se necessário.

O consumidor brasileiro consome de 12 a 20 L de suco de laranja *per capita* por ano e 92 a 95 % desta quantidade se refere a suco recém-preparado devido à disponibilidade da fruta durante o ano inteiro, a um menor preço e com sabor fresco quando comparado com o industrializado (LOHBAUER, 2011; QUEIROZ; MENEZES, 2010; VALIM et al., 2001). Em relação ao suco de laranja industrializado existe uma preferência do consumidor brasileiro por sucos com aroma e sabor próximos ao do suco recém-preparado. Este fato aliado também à procura por produtos prontos de alta qualidade sensorial tem aumentado o consumo de suco de laranja integral pasteurizado, não concentrado (AIJN, 2016; VALIM et al., 2001).

A pasteurização é uma opção de tratamento moderado convencionalmente utilizado para controlar a atividade de micro-organismos deterioradores, tais como bactérias vegetativas, leveduras, fungos e para inativar enzimas em alimentos líquidos (EAGERMAN; ROUSE, 1976; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1995).

A indústria de sucos tradicionalmente realiza a pasteurização sob aquecimento contínuo com alta temperatura e curto período (HTST do inglês *High*

Temperature Short Time) usando trocadores de calor (MATH et al., 2014). Esse método é eficiente do ponto de vista da redução microbiológica e enzimática, no entanto, alterações sensoriais e nutricionais normalmente são apresentadas, o que pode comprometer a qualidade e a aceitação do produto final (VAN DEN BROECK et al., 1999b).

A pectinametilesterase (PME), enzima nativa nos frutos cítricos é vital para a sua maturação e modificações da parede celular durante o crescimento (JOLIE, 2010). Esta enzima tem sido usualmente utilizada para determinar a eficácia da pasteurização do suco, por reconhecidamente possuir resistência térmica maior do que a maioria das bactérias e fungos encontrados neste produto (EAGERMAN; ROUSE, 1976; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997; VAN DEN BROECK et al., 1999b).

Dentre as várias características que conferem aceitabilidade ao suco de laranja industrializado, a turbidez, ou seja, a suspensão coloidal de partículas sólidas e óleo emulsionado tem importância destacada, pois propicia ao produto um aspecto muitas vezes definido pelo consumidor como "natural" ou "fresco", numa alusão ao suco recém-extraído (AMSTALDEN, 1992).

A pectina solúvel é responsável pela estabilidade da suspensão coloidal. Quando a PME atua sobre a pectina solúvel neste sistema ocorre a liberação do grupo carboxílico. Este grupo reage com íons de cálcio presentes formando pectato de cálcio que é insolúvel e precipita, sedimentando a fase sólida causando assim a desestabilização da suspensão coloidal e consequente clarificação do suco (CASTALDO et al., 1991). O produto é assim convertido num sistema de duas fases de aspecto pouco atrativo ao consumidor diminuindo seu valor comercial (AMSTALDEN, 1992).

O tratamento térmico de alimentos líquidos por micro-ondas promove aquecimento mais rápido que o convencional (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b), com maior inativação enzimática e menores perdas nutricionais e sensoriais (AGHAJANZADEH; ZIAIFAR, 2018; MATH et al., 2014).

Diante dos benefícios obtidos pela menor exposição ao calor sobre a qualidade final do produto processado, a indústria de alimentos tem buscado alternativas; e sistemas contínuos de pasteurização por micro-ondas têm despertado o interesse

por parte da indústria de bebidas (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b; GENTRY; ROBERTS, 2005; CORONEL et al., 2008a; LIN; RAMASWAMY, 2011; SALAZAR-GONZALEZ et al., 2012).

2 OBJETIVOS

Tendo em vista que o Brasil é o país mais proeminente na exportação de suco de laranja e que este é um produto com excelente valor comercial para o país, este trabalho teve por objetivo realizar a pasteurização assistida por micro-ondas em suco de laranja e obter parâmetros da cinética de inativação enzimática através da coleta de dados de temperatura, tempo de retenção e atividade enzimática da enzima PME durante o processo de pasteurização.

Para alcançar tal objetivo, as seguintes etapas do projeto foram propostas:

- Realizar tratamento térmico em suco de laranja sob diferentes condições de temperatura e tempo para os processos convencional e assistido por micro-ondas;
- Determinar a cinética da atividade residual da PME no suco submetido ao tratamento térmico em cada condição de processo;
- Comparar a efetividade dos métodos sobre a inativação da PME.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A pasteurização de suco de laranja é usualmente realizada a 90 °C por 60 s (POLYDERA; STOFOROS; TAOUKIS, 2005). Entretanto nestas condições pode ocorrer a degradação de importantes componentes termicamente sensíveis como vitaminas e polifenóis, além de causar modificações sensoriais afetando a qualidade, o sabor, a cor e a textura do produto final (MARSZALEK et al., 2015)

Assim sendo, há mais de duas décadas estudos têm sido desenvolvidos a fim de verificar a possibilidade do uso de tratamentos menos agressivos (ARJMANDI et al., 2016) com o uso de temperaturas mais amenas em períodos mais curtos a fim de proteger as características nutricionais e sensoriais do produto durante o processamento (NIKDEL et al., 1993; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b).

Neste contexto, métodos alternativos como os que aplicam energia eletromagnética por micro-ondas (MO), vem sendo testados para pasteurização e esterilização (AGHAJANZADEH; ZIAIIFAR, 2018; ARJMANDI et al., 2016; GENTRY; ROBERTS, 2005; KUMAR et al., 2008; MATH et al., 2014; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b).

Este método apresenta potencial benefício por ser energeticamente eficiente, além de preservar melhor cor, sabor e nutrientes quando comparado ao método convencional (ARJMANDI et al., 2016; MATH et al., 2014), reduzir tempo de processo (GENTRY; ROBERTS, 2005) e estabilizar o produto enzimaticamente (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b) e microbiologicamente causando mínimo dano organoléptico (CAÑUMIR et al., 2002).

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas que estão dentro de uma faixa de frequência de 300 MHz a 300 GHz (AHMED; RAMASWAMY, 2007). São portadoras de energia, e aquecem materiais dielétricos contendo água. Industrialmente processos térmicos assistidos por MO são utilizados para aquecimento, secagem, descongelamento, esterilização (REGIER; SCHUBERT, 2001), pasteurização, branqueamento, cozimento, assamento, e extração (MARSZALEK et al., 2015).

Embora o processo assistido por MO apresente algumas restrições para alimentos pastosos ou sólidos pelo fato de apresentar distribuição não uniforme de

calor e possível geração de pontos frios e quentes dentro do produto (KUMAR et al., 2008), o mesmo não ocorre com alimentos líquidos que quando bem agitados possuem distribuição térmica satisfatória, assim sendo, a indústria de bebidas tem desenvolvido interesse pelo processo (GENTRY; ROBERTS, 2005).

Pesquisas têm sido realizadas para o processamento térmico assistido por micro-ondas de sucos: em batelada (SALAZAR-GONZALEZ; MARTIN-GONZÁLEZ; SOSA-MORALES, 2012; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b), e em processo contínuo (GENTRY; ROBERTS, 2005; KUMAR et al., 2008; MARSZALEK et al., 2015; NIKDEL et al., 1993; STRATAKOS et al., 2016; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a) com excelentes resultados quando comparado ao método convencional.

Embora o assunto ainda seja alvo de estudo e discussão na comunidade acadêmica, alguns autores defendem o possível efeito não térmico do campo eletromagnético sobre enzimas como outra importante vantagem do processamento térmico assistido por micro-ondas (CAVALCANTE; FUNCIA; GUT, 2016; LIN; RAMASWAMY, 2011; MATSUI et al., 2008; ROY; GUPTA, 2003).

3.1 Matéria prima - Laranjas

3.1.1 *Laranja e seus Componentes*

O clima, o solo, o regime pluvial, a altitude e a temperatura exercem vasta influência sobre o desenvolvimento da laranjeira e seus frutos. Foi observado que os frutos produzidos em regiões com temperatura entre (23 e 32) °C, alta umidade relativa do ar, regime pluvial bem distribuído anualmente entre (1.000 a 1.800) mm e altitude dos pomares entre (20 a 500) m, produzem frutos de melhor qualidade e em maior quantidade (HELLMEISTER, 2012) e que existe perda de produtividade em temperaturas acima de 40 °C e abaixo de 13 °C, pela diminuição da taxa de fotossíntese. Em climas mais frios e secos, como o do Mediterrâneo, foi observado que os frutos possuem coloração da casca e da polpa mais amareladas além de apresentar teores mais altos de ácidos, e que em locais quentes, os frutos apresentam colorações mais pálidas, tanto interna quanto externamente, porém teores mais altos de açúcares (RINGBLOM, 2004; MATTOS JUNIOR et al., 2005).

A colheita e o processamento de laranjas no Brasil ocorrem de maio a fevereiro e a safra é contabilizada de julho a junho de cada ano, enquanto que nos Estados Unidos por diferenças climáticas a colheita e processamento ocorrem de outubro a maio e a safra é contabilizada de outubro a setembro de cada ano (LOHBAUER, 2010).

3.1.1.1 *Variedades de laranjas*

Embora existam diferentes variedades de laranja no mundo, as espécies predominantes no Brasil são: *Hamlin*, *Westin*, Rubi, Pera, Valência, Valência Folha Murcha, Natal, Bahia e Lima (FUNDECITRUS, 2018).

As variedades com maturação precoce estão representadas por Lima, *Hamlin*, *Kona*, *Salustiana*, *Pearson Brown*, *Pineapple*; maturação de meia-estação está representada pelas variedades Bahia, Baianinha, Rubi, *Torregon*, *Midsweet*, *Pearson Brown*, *Biondo*, *Gadner*, *Jafa*; maturação de meia estação a tardia está representada pela variedade Pera; enquanto que a maturação tardia está representada pelas variedades Valência e Natal (HELLMEISTER, 2012). O tempo de maturação para os frutos de variedades precoces ocorrem entre sete e oito meses, enquanto que nas variedades tardias, o período varia entre doze a quatorze meses (SIMÃO, 1971).

Hamlin, Pera, Valência e Natal são comumente usadas para a produção de suco, enquanto que as variedades Bahia e Lima são destinadas ao consumo *in natura* (LOHBAUER, 2010). Em geral os citricultores tem preferência pelas variedades tardias e de meia-estação em função da sua maior produtividade. No Estado de São Paulo os pomares possuem 55 % das árvores com as variedades tardias (Natal e Valência), 22 % com as de meia-estação (Pera) e 23 % com as precoces (*Hamlin*, *Westin*, *Rubi* e *Pineapple*) (NEVES et al., 2011).

A variedade Pera além de ter uma boa aceitabilidade no mercado *in natura*, também tem a preferência das indústrias processadoras de suco pelo fato de possuir maior teor de sólidos solúveis, constituinte essencial para a produção do suco concentrado (LOHBAUER, 2010).

3.1.1.2 Composição química comum

A composição da laranja varia conforme a variedade, enxerto, clima, altitude, adubação, tratos culturais e estágios de maturação (HELLMEISTER, 2012).

Na Tabela 3.1. está descrita a composição química média da laranja reportada na literatura. Além destes componentes também são reportados: enzimas, pigmentos, constituintes voláteis, flavonóides e vitaminas (RODRIGUEZ et al., 1991; USDA, 2016).

Tabela 3.1 - Composição química média da laranja

	(MACRAE; ROBINSON; SADLER, 1993)	(RODRIGUEZ et al., 1991)	(USDA, 2016)
Água (g/100 g)	85 a 90	86 a 92	88
Açúcares(g/100 g)	6 a 9	5 a 8	8
Pectina (g/100 g)	0,5 a 1,5	1 a 2	
Ácidos (g/100 g)	0,5 a 1,5		
Fibras (g/100 g)	0,5 a 1,0		0,2
Componentes nitrogenados (g/100 g)	0,5 a 0,8	0,7 a 0,8	0,7
Minerais (g/100 g)	0,5 a 0,8	0,5 a 0,9	0,3
Óleos essenciais (g/100 g)	0,2 a 0,5	0,2 a 0,5	
Lipídios (g/100 g)	0,1 a 0,2	0,2 a 0,5	0,2

3.1.1.3 Estrutura da laranja

Os citrinos são cobertos com uma casca cerosa que protege a porção comestível da fruta (polpa). Essa casca é composta por duas porções: uma camada externa chamada flavedo, constituída por inúmeras vesículas de óleo essencial aromático e carotenoides, que dão ao fruto sua cor característica; e uma segunda camada interna esponjosa branca chamada albedo que contém flavonoides, D-limoneno, limonina, pectina e 20 % das substâncias pécticas do fruto (RINGBLOM, 2004; USDA, 1956).

Conforme exibido na Figura 3.1, a polpa interna da laranja possui núcleo central, segmentos individuais, segmentos de parede, vesículas de suco e sementes.

Figura 3.1 - Estrutura da laranja
a) vesículas de óleo no flavedo, b) semente, c) vesículas de suco, d) núcleo central, e) albedo, f) segmento, g) segmentos de parede, h) flavedo

Fonte: USDA (1956)

O núcleo central é composto por um tecido esponjoso branco semelhante ao encontrado no albedo. Os segmentos individuais e de parede são compostos por uma membrana de tecido epidérmico fino responsável por manter as vesículas de suco unidas, as vesículas contêm suco, óleo e lipídios e sementes quando presentes dentro dos segmentos (RINGBLOM, 2004; USDA, 1956). O fruto possui em média (50 a 55) % de suco, (3 a 10) % de polpa e (38 a 47) % de casca, bagaço e sementes (LOHBAUER, 2010).

Além do produto principal que é o suco de laranja, são obtidos subprodutos tais como: óleo essencial, farelo de polpa cítrica, *pulp-wash*, D-limoneno (YAMANAKA, 2005); pectina, flavonoides, molassa cítrica e ração animal (RINGBLOM, 2004).

O óleo essencial e os compostos voláteis são retirados da casca e recuperados durante a extração de suco. O material restante (polpa, casca, albedo, e sementes) é recuperado e pode ser vendido separadamente. A polpa pode ser separada como produto comercial, ou como sólidos solúveis da lavagem com água (*pulp-wash*) e pode ser reincorporada posteriormente ao suco na linha de produção antes da concentração se a legislação do país permitir. Da casca pode ser extraído D-limoneno, que é utilizado na indústria química e eletrônica. Do albedo pode ser recuperada a pectina que é utilizada como agente espessante na indústria de

alimentos, além do bagaço e outros resíduos que podem ser desidratados e servir de ração fibrosa para a alimentação animal (LOHBAUER, 2010; RINGBLOM, 2004).

3.1.2 Suco de laranja

No fruto fresco os constituintes químicos e os sistemas enzimáticos estão localizados em diferentes células, tecidos e outras porções do fruto e são capazes de desempenhar suas funções fisiológicas sem interferir ou reagir umas com as outras. No entanto, quando o suco é extraído por esmagamento ou pressão esses múltiplos constituintes são misturados, e podem reagir entre si provocando alterações indesejáveis de sabor, cor e aroma (ALBEROLA, 1978; USDA, 1956).

3.1.2.1 Principais componentes encontrados no suco de laranja

3.1.2.1.1 Açúcares e ácidos

Os citrinos são classificados como frutas ácidas, são compostos principalmente de ácidos orgânicos e açúcares redutores (frutose e glicose) e não redutores (sacarose) (USDA, 1956).

O teor de sólidos solúveis do suco de laranja é expresso em °Brix e dependendo da época da safra de colheita pode apresentar valores entre (9 e 14) °Brix (LOHBAUER, 2010; RINGBLOM, 2004).

Os açúcares representam (70 a 80) g/100 g dos sólidos solúveis presentes no suco de laranja dos quais: glicose, frutose e sacarose predominam (QUEIROZ; MENEZES, 2010). Há autores que sugerem que este percentual pode ser de (80 a 90) g/100 g dos sólidos totais encontrados em sucos cítricos (KIMBALL, 1991). À medida que o fruto amadurece o teor de ácido diminui ligeiramente, mas o teor de açúcares aumenta em especial a fração de sacarose, podendo chegar a uma proporção de 1:1:2 de glicose:frutose:sacarose, respectivamente (USDA, 1956). Estes três açúcares mencionados também são os principais açúcares solúveis presentes na casca de laranja (RIVAS et al., 2008).

O ácido cítrico é o principal ácido presente no suco de laranja, seguido do ácido málico em quantidades significativamente menores (USDA, 1956). A acidez do

suco de laranja apresenta valores entre (0,5 e 1,5) g/100 g de ácido cítrico (QUEIROZ; MENEZES, 2010).

3.1.2.1.1 Relação entre teor de sólidos solúveis / acidez

A relação entre teor de sólidos solúveis (expresso em °Brix) e acidez, comercialmente conhecida como *ratio*, é um parâmetro importante, pois define o equilíbrio da sensação entre amargo e azedo e indica o grau de maturação da laranja (RINGBLOM, 2004).

No Brasil, o valor mínimo de 7,0 é requerido pelos padrões de identidade e qualidade para suco de laranja (BRASIL, 2000), enquanto que na Califórnia (EUA) o valor mínimo de 10,0 é requerido para frutos destinados à fabricação de suco de laranja concentrado congelado (RINGBLOM, 2004).

Autores relatam que os valores para sucos comerciais de boa qualidade podem variar entre (12 e 14) para o mercado brasileiro (QUEIROZ; MENEZES, 2010) e entre (14 e 17) para o mercado americano (RINGBLOM, 2004).

Ringblom (2004) relata que valor em torno de 15 é preferido pelos consumidores americanos, *ratio* este obtido industrialmente através da mistura de laranjas com diferentes teores de sólidos solúveis. Kimball (1991) por sua vez relata valores mais abrangentes entre (15 e 18) para a Flórida, sendo que a indústria desta localidade requer um valor mínimo de 13 para processar.

3.1.2.1.2 Polissacarídeos

Os principais polissacarídeos insolúveis encontrados na laranja são celulose, hemicelulose e substâncias pécticas (entre elas a pectina) que estão presentes principalmente na parede celular da casca da laranja (RIVAS et al., 2008). A pectina está presente no suco em torno de 0,5 g/100 g e atua como estabilizador coloidal mantendo a polpa suspensa no suco (QUEIROZ; MENEZES, 2010).

3.1.2.1.3 Compostos nitrogenados

Segundo USDA (1956), o teor de constituintes nitrogenados varia entre (5 a 10) g/100 g dos sólidos totais no suco de laranja. E incluem proteínas

(principalmente enzimas), peptídeos simples, aminoácidos, betaínas, fosfatídeos e substâncias relacionadas. Queiroz e Menezes (2010) relatam que aproximadamente 0,7 g/100 g do suco de laranja consiste em compostos nitrogenados e que aminoácidos livres é a fração mais importante do nitrogênio presente representando 70 g/100 g do teor.

3.1.2.1.4 Minerais

Os minerais encontrados no suco podem variar dependendo da variedade, maturação, solo, práticas de fertilização e método de cultivo do fruto; são expressos como cinzas e a composição pode variar entre (0,3 a 0,7) g/100 g de suco (RINGBLOM, 2004).

O potássio e o nitrogênio representam 40 g/100 g do total dos minerais (QUEIROZ; MENEZES, 2010). Cálcio, magnésio e fósforo representam cerca de 5 g/100 g cada, sendo que a maior parte do cálcio e magnésio está na forma insolúvel em água combinada com pectina (USDA, 1956). Sódio, ferro, enxofre e cloro estão presentes em menores quantidades (QUEIROZ; MENEZES, 2010). São detectados traços de alumínio, níquel, bário, cromo, cobre, estanho, manganês, vanádio, silício, chumbo, estrôncio, titânio, zinco e zircônio; sendo relevante a presença de cobre (0,3 a 0,9) mg kg⁻¹ por desempenhar um papel importante na degradação do ácido ascórbico presente (USDA, 1956).

3.1.2.1.5 Componentes responsáveis pelo aroma

A complexidade do aroma do suco de laranja é explicada por Alberola (1978) pela presença de centenas de substâncias voláteis presentes no suco de laranja tais como: álcoois, aldeídos, ésteres, ácidos e cetonas. É derivado principalmente dos óleos essenciais voláteis presentes em maior quantidade nas bolsas de óleo da casca (flavedo) e também nas vesículas de suco da fruta (USDA, 1956). Durante a extração do suco de laranja as vesículas rompem-se e parte do óleo incorpora-se ao suco (QUEIROZ; MENEZES, 2010) acentuando o aroma característico.

3.1.2.1.6 Componentes responsáveis pelo sabor

Os compostos flavonoides estão relacionados à identificação do sabor característico do suco de laranja, são frequentemente encontrados combinados com moléculas de carboidratos como glicosídeos e podem compor até 10 g/100 g base seca de frutas cítricas (USDA, 1956). Em geral, os flavonoides podem contribuir com a qualidade do suco influenciando a sua aparência, sabor e o valor nutricional (GATTUSO et al., 2007). Como são muito mais abundantes na casca do que no suco são utilizados como um importante indicador da eficiência da extração (QUEIROZ; MENEZES, 2010).

As membranas de casca, núcleo e segmento de frutas cítricas contêm de (75 a 90) g/100 g dos flavonóides totais (GATTUSO et al., 2007).

A hesperidina e a limonina são os principais constituintes do amargor no suco de laranja (QUEIROZ; MENEZES, 2010).

3.1.2.1.7 Componentes responsáveis pela cor

A quantidade de pigmentos encontrada nas frutas cítricas varia com a espécie, estágio de maturação, variações sazonais e região em que aquelas são cultivadas (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2005).

A cor no suco de laranja é um parâmetro de qualidade importante e está relacionado à presença de carotenoides, deve apresentar tons entre amarelo e laranja avermelhado (RINGBLOM, 2004).

Em alguns países é permitida a adição e misturas de pequenas quantidades de sucos de diferentes variedades e maturação de laranjas com o intuito de obter uma cor mais intensa e melhorar a aparência dos sucos de cor clara (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2005).

Taylor; Witte (1938), reportaram conteúdo de carotenos entre (0,32 e 1,65) mg L⁻¹ para sucos de laranja na Flórida e Califórnia; valor condizente com o reportado por Queiroz; Menezes (2010) para betacaroteno presente no suco de laranja numa concentração de 0,5 mg L⁻¹.

3.1.2.1.8 Lipídios

Os lipídios no suco de laranja são constituídos principalmente por ácidos graxos e perfazem aproximadamente 0,07 g/100 g do total de suco. Os ácidos palmítico, palmitoleico, oleico, linoleico e linolênico totalizam 90 g/100 g dos ácidos graxos presentes (QUEIROZ; MENEZES, 2010).

3.1.2.1.9 Vitaminas

O ácido ascórbico ou vitamina C é um importante nutriente presente no suco de laranja e tem sido utilizado como outro parâmetro fundamental para avaliar a qualidade do suco (FENNEMA, 1996). É reconhecido por suas propriedades antioxidantes, e tem o conteúdo variável de acordo com o cultivar e condições de crescimento da planta (RINGBLOM, 2004; VIKRAM; RAMESH; PRAPULLA, 2005). De acordo com Lee; Kader (2000), a casca possui maior conteúdo de ácido ascórbico para proteger a fruta do estresse externo causado pela luz.

Valores típicos relatados para a vitamina C no suco fresco extraído são de 45 a 60 mg mL⁻¹ (KIMBALL, 1991, RINGBLOM, 2004). Donadio et al. (1999) afirmaram que o teor de vitamina C está associado com o cultivar da laranja, em que variedades precoces apresentaram valores de 50,55 mg mL⁻¹, as de meia estação valores de 47,26 mg mL⁻¹ e as tardias valores de 37,26 mg mL⁻¹.

Uma queda média de 3,4 % do conteúdo original de vitamina C foi observada em preparados de suco de laranja concentrado congelado (USDA, 1956). Perdas têm sido observadas durante a reconstituição e reprocessamento do suco nas fábricas de envase uma vez que o oxigênio é o responsável pela maior degradação de vitamina C, principalmente durante a estocagem (KIMBALL, 1991; RINGBLOM, 2004). Valores típicos de conteúdo de vitamina C para suco de laranja quando chegam ao consumidor variam entre (20 a 40) mg mL⁻¹ (RINGBLOM, 2004).

Perdas inferiores a 10 g/100 g foram observadas durante um período de um ano para o armazenamento de concentrados congelados a -17 °C. Quando armazenado a 5 °C por 4 dias apesar das amostras terem se deteriorado extensivamente no que diz respeito ao sabor, gelificação e perda de turbidez, o conteúdo de vitamina C permaneceu inalterado (KIMBALL, 1991; USDA, 1956).

3.1.2.1.1 Conteúdo nutricional

Kimball (1991) relata que o conteúdo nutricional médio de um copo de suco de laranja de aproximadamente 177 mL seria 376,56 kJ contendo 21 g de carboidratos, 1 g de proteína; 260 mg potássio; 7,4 mg cálcio; 73,3 mg vitamina C; 14 mg fósforo e 7,6 mg magnésio.

3.1.2.2 *Categorias e tipos de sucos de laranja*

As especificações comerciais, de nomenclatura e legislação do suco de laranja na cadeia de produção nem sempre são conhecidas pelos consumidores. No entanto, com o aumento do comércio global do suco de laranja, há também uma crescente pressão para harmonizar os termos utilizados (RINGBLOM, 2004).

Segundo Ringblom (2004), os produtos de suco de laranja no mercado mundial, em geral, podem ser divididos em duas categorias principais – sucos prontos para beber e sucos concentrados, os quais podem ter sua nomenclatura pormenorizada como segue:

3.1.2.2.1 Suco de laranja pronto para beber

O suco de laranja “pronto para beber” (RTD do inglês *Ready To Drink*) é o suco que será consumido sem a necessidade de nenhuma manipulação adicional, não requer diluição posterior. Exemplos são:

- Suco de laranja fresco: pode significar suco de laranja recém-espremido, ou suco distribuído refrigerado;
- Suco não-concentrado (NFC do inglês *Not From Concentrate*): suco que não sofreu concentração nem diluição durante a produção;
- Suco de laranja de concentrado: suco diluído a partir do concentrado de laranja com água potável.

Néctar de laranja, bebidas de suco de laranja, bebidas de sabor laranja não podem ser considerados sucos RTD.

3.1.2.2.2 Suco de laranja concentrado congelado (FCOJ)

O suco de laranja concentrado congelado (FCOJ do inglês *Frozen Concentrate Orange Juice*) é diluído a padrões de teor de sólidos solúveis específicos antes do consumo. O FCOJ com (65 a 66) °Brix é o produto padrão comercializado para o mercado internacional, seu transporte e armazenamento são realizados de (- 25 a - 6) °C (RINGBLOM, 2004).

Segundo Lohbauer (2010), no Brasil, o suco de laranja é apresentado ao consumidor em três formas distintas:

- Integral: suco de laranja sem adição de açúcares e na sua concentração natural, que seria o equivalente ao suco NFC internacional;
- Concentrado: suco de laranja concentrado
- Reconstituído: suco de laranja proveniente do suco concentrado em que é realizada a adição de água potável até alcançar a condição original da bebida desejada em termos de concentração de sólidos solúveis.

3.1.3 Importância da laranja para o mercado brasileiro

3.1.3.1 *Dados do setor da plantação de citros*

Os pomares de laranja mais produtivos do mundo estão localizados em regiões de clima tropical e subtropical (Brasil, Estados Unidos, Espanha, México, China e África) que possuem as condições climáticas propícias para o desenvolvimento desta fruta (QUEIROZ; MENEZES, 2010).

Segundo dados da USDA (2017) o Brasil é o maior produtor mundial de laranjas (28,80 % do total produzido), seguido dos Estados Unidos (15,15 %), China (12,80 %), México (6,23 %) e Espanha (4,06 %).

O Brasil destina 70 % da produção de laranjas para processamento industrial e os Estados Unidos destina 78 % para esse fim. O México possui pequena participação no mercado de suco de laranja, cerca de 60 mil toneladas por ano, tem foco na produção da fruta fresca, assim como a China que destina 93 % da produção para fornecimento de frutas para consumo *in natura*. A Espanha se

destaca pela produção e exportação de laranja fresca de alto valor agregado, sem sementes, com excelente cor e aparência externa (NEVES et al., 2011).

Apesar da plantação de laranjas ocorrer no Brasil há quatro séculos, a significativa transformação começou em 1920 quando no interior de São Paulo começou a se estruturar o cinturão citrícola que compreende uma região formada por aproximadamente 300 municípios (LOHBAUER, 2010) situada entre o estado de São Paulo, sudoeste e sul de Minas Gerais, no sudeste brasileiro (FUNDECRIUS, 2015). Nesta época surgiram os primeiros esboços da indústria processadora nesta região e aos poucos a região se consolidou como a principal produtora de laranjas no país (LOHBAUER, 2010).

A partir de 1980 o Brasil se firmou como o maior produtor mundial de laranjas (QUEIROZ; MENEZES, 2010) e a região compreendida no cinturão citrícola ficou responsável pela produção de 60 % do volume mundial de suco de laranja processado (NEVES et al., 2011).

A região produz 79 % da produção de frutos do país, porém a maior parte da produção é destinada à indústria de suco processado, o que representa 95 % do suco industrializado do país (QUEIROZ; MENEZES, 2010).

E embora a produção tenha caído nos últimos quinze anos, mesmo assim a previsão era de que o Brasil ainda possuísse a maior produção mundial de laranja para a colheita de 2016 / 2017 segundo dados da USDA (2017).

3.1.3.2 *Dados de exportação*

Há que ressaltar que do ponto de vista econômico mundial, tanto a produção quanto a oferta de suco de laranja estão concentrados em basicamente duas regiões: São Paulo no Brasil e Flórida nos Estados Unidos (BARROS; BARROS; CYPRIANO, 2016; QUEIROZ; MENEZES, 2010).

De acordo com Lohbauer (2011), até 1962 os Estados Unidos detinha a hegemonia no setor da produção de suco de laranja processado, porém na década de 80 o Brasil ganhou notoriedade na exportação do produto devido a geadas sucessivas que castigaram a produção norte-americana garantindo a expansão da indústria brasileira neste setor.

Na década de 1990 houve uma estagnação da exportação devido a diversos fatores complicadores, tais como a recuperação do parque citrícola da Flórida, baixa taxa de crescimento de consumo de suco de laranja nos mercados europeus e queda significativa de consumo nos Estados Unidos (LOHBAUER, 2011).

Na década de 2010 o mercado exportador sofreu mais alterações, principalmente porque o mercado Europeu modificou sua preferência. Neste período a associação dos citricultores brasileiros analisando dados fornecidos por *US Food Commodity Consumption Broken Down by Demographics* (1994-2008) de consumo suco de laranja industrializado, dos principais mercados europeus, observou que os consumidores estavam mais preocupados com escolhas saudáveis e estes passaram a buscar sucos integrais, com sabor próximo ao de laranja 100 % natural isentos de adição de açúcar (LOHBAUER, 2016).

Isso fez com que o mercado exportador de citros no Brasil novamente se adaptasse fornecendo ao mercado internacional, além do tradicional suco de laranja concentrado e congelado, suco de laranja integral não concentrado (NFC) que é visto pelo consumidor como um produto com qualidade superior, conseguindo assim manter o crescimento do setor que há uma década estava se recolhendo (NEVES et al., 2011).

Atualmente o setor apresenta crescimento de consumo inclusive em países que antes apresentavam baixo interesse na importação do produto.

3.1.4 Evolução da demanda por suco de laranja no mundo

Na última década o mercado de suco de frutas tem sofrido uma mudança significativa nos hábitos de consumo dos clientes. Uma sutil mudança em relação à preferência por sabores de outras frutas, bem como interesse crescente em sucos preparados a partir da mistura de vegetais naturais, principalmente nos mercados internacionais que estavam a priori dominados pela preferência ao suco de laranja industrializado (CITRUSB, 2017).

O interesse do consumidor por produtos com apelo mais natural e saudável tem incrementado a busca por produtos frescos e minimamente processados constantemente devido à consciência de saúde, associado ao bem-estar (ALLENDE et al., 2006).

Um exemplo disso é o mercado Europeu que nos últimos 15 anos têm apresentado uma mudança significativa na preferência dos consumidores, que passaram a substituir o uso dos sucos concentrados e reconstituídos por sucos de fruta NFC que são percebidos como mais saudáveis e naturais (AIJN, 2016).

Segundo CITRUSBR (2017) a conscientização no Reino Unido em relação à rejeição de adição de açúcar em sucos naturais tem sido bastante intensificada nos últimos anos. A tendência neste mercado tem sido associada à preferência por sucos de frutas, bem como sucos vegetais, isento de adição de açúcar, ainda que o preço destes produtos seja relativamente mais elevado quando comparado aos concentrados (AIJN, 2016; CITRUSBR, 2017).

Assim sendo, de acordo com as novas necessidades desses consumidores, é de vital importância para o crescimento da indústria de sucos a oferta de produtos com sabor e características próximos ao proveniente da fruta *in natura* no intuito de fornecer um meio de consumo mais conveniente para clientes mais seletivos.

3.1.4.1 *Preferência do consumidor brasileiro*

No Brasil o consumo per-capita de suco de laranja varia entre 12 e 20 L (LOHBAUER, 2011; QUEIROZ; MENEZES, 2010), dos quais apenas pouco mais de 1 L é de suco industrializado, o restante é suco fresco feito a partir da fruta em residências, restaurantes e lanchonetes (QUEIROZ; MENEZES, 2010). Segundo Valim et al. (2001) esta preferência do consumidor brasileiro por sucos com aroma e sabor próximos ao do suco recém-preparado está associada à disponibilidade de matéria prima durante todo o ano.

No entanto, a natureza perecível de sucos de frutas ou vegetais, requer um rápido consumo ou por outro lado, um processamento que venha a atender a demanda do consumidor, resguardando-o do ponto de vista de segurança alimentar. O número de surtos associados a sucos não pasteurizados identificaram a importância de uma solução térmica precisa (MILLER; SILVA, 2012) para produtos de suco laranja. Nesse contexto o uso de tecnologias diferenciadas que minimizem as perdas nutricionais e evite sobreprocessamento é benéfico e demandado.

3.1.5 Microbiologia do suco de laranja

Os micro-organismos que melhor se adaptam ao ambiente típico do suco de laranja, característico por acidez elevada e altas concentrações de açúcares, são bactérias ácido-láticas (BAL), leveduras e fungos (KIMBALL, 1991; PARISH; HIGGINS, 1988; RINGBLOM, 2004).

As bactérias ácido-láticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são as mais comumente encontradas no suco de laranja e são as principais causadoras de deterioração com condições ótimas de crescimento entre (20 a 40) °C e pH entre 5,5 e 6,5 (KIMBALL, 1991; PARISH; HIGGINS, 1988; RINGBLOM, 2004).

A temperatura de crescimento ideal para as leveduras comumente presentes em sucos cítricos está entre (20 e 30) °C, estes podem causar turbidez e floculação no produto final (RINGBLOM, 2004). Dentre as leveduras os gêneros mais representativos são *Saccharomyces* e *Candida* (PARISH, 1991; FAVILLE, 1951). E dentre os fungos podem ser citados: *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis spp*, *Fusarium spp*, *Geotrichum spp*, *Mucor spp*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium spp* and *Penicillium spp* (RINGBLOM, 2004).

Em geral os esporos bacterianos não crescem em sucos de frutas com pH abaixo de 4,5; porém foi relatado o isolamento de bactérias acidófilas termorresistentes (*Alicyclobacillus*) em sucos comerciais, com temperatura ótima ideal de crescimento em torno de 45 °C (RINGBLOM, 2004).

3.1.5.1 Padrões microbiológicos

A legislação brasileira atual para suco de frutas especifica padrões apenas para a presença de coliformes e *Salmonella* tanto para o suco *in natura* quanto para o pasteurizado.

Os seguintes limites são requisitados: suco *in natura*, Coliformes a 45 °C com limite máximo de 10^2 UFC mL⁻¹ e ausência de *Salmonella* sp/25 mL. No caso de sucos pasteurizados os padrões são respectivamente: Coliformes a 45 °C/mL com limite máximo de 10 UFC e ausência de *Salmonella* sp/25 mL (BRASIL, 2001).

3.2 Pectina

Pectinas fazem parte de um grupo de componentes conhecidos como substâncias pécticas que são carboidratos, em sua maioria polissacarídeos, estruturalmente interligados e são os principais componentes das paredes celulares e regiões intercelulares de plantas. Estão presentes em vários tecidos, particularmente em frutas e vegetais (CUI, 2005; KERTESZ, 1951; RAO; SILVA, 2006; VORAGEN et al., 1995). A textura das frutas e vegetais é regulada pelo conteúdo e a variedade das substâncias pécticas presentes (UHLIG, 1998).

Com base no tipo de modificações no esqueleto da cadeia, as substâncias pécticas são classificadas como: protopectina, ácido pectínico, pectinas e ácido péctico, apresentando-se como polissacarídeos complexos de alto peso molecular (BE MILLER, 1986; CAMPBELL; PENFIELD; GRISWOLD, 1979).

A textura das frutas e vegetais durante o crescimento, amadurecimento, e estocagem é fortemente influenciada pela quantidade e natureza da substância péctica presente (VORAGEN et al., 1995). Em frutas verdes as substâncias pécticas aparecem principalmente como protopectina insolúvel, que tem sua solubilização impedida pelo fato de estar ligada ao cálcio e magnésio. Com o amadurecimento ou armazenamento ocorre a solubilização da pectina e consequente amolecimento da fruta (CHITARRA; CHITARRA, 1990; KERTESZ, 1951; UHLIG, 1998).

O peso molecular da pectina dependerá do tipo de planta da qual provém e do estágio de maturação da mesma. Pectina com alto peso molecular é encontrada em maçãs e frutas cítricas (ENDRESS; MATTES, 2009).

3.2.1 *Estrutura química de pectinas isoladas*

As pectinas são um grupo complexo de heteropolissacarídeos estruturais que contêm principalmente unidades de ácido galacturônico e poligalacturônico na qual dois terços dos grupos carboxílicos estão esterificados com metanol (ESKIN, 1990). Estão presentes nas paredes celulares primárias e na lamela média de muitas plantas, onde são frequentemente associadas a outros componentes da parede celular, como celulose, hemicelulose, glicoproteínas e ligninas. Eles podem ser encontrados em diferentes tecidos, mas são particularmente abundantes em frutas e

tecidos jovens (ENDRESS; MATTES, 2009; CUI, 2005). São altamente heterogêneas com respeito ao seu peso molecular e estrutura química. O peso molecular médio de pectinas de frutas é tipicamente entre (10^4 a 10^5) Da (CUI, 2005).

Possuem cadeia estrutural linear, predominantemente com resíduos de ácido *D* galacturônico conectados em α (1 $\rightarrow$ 4) (ENDRESS; MATTES, 2009; VORAGEN et al., 1995). O grupo carboxílico existente nos resíduos de ácido urônico pode estar na forma livre ou em forma de sais de sódio, potássio, cálcio ou amônio ou naturalmente esterificado com metanol (SILVA; RAO, 2006). A estrutura esquemática da região linear da pectina pode ser visualizada na Figura 3.2.

Figura 3.2 - Estrutura química da pectina na cadeia linear
 Grupamento: 1) grupo carboxil; 2) grupo amido; 3) grupo metilester; 4) grupo acetil; 5) grupo ferolil

Fonte: adaptado de ENDRESS; MATTES (2009)

3.2.2 Degradação da pectina

Pode ocorrer por via enzimática ou por degradação física.

Segundo Voragen et al. (1995) a degradação enzimática das pectinas pode ocorrer naturalmente em plantas ou pela ação de micro-organismos, causando importantes mudanças na textura das frutas e vegetais durante o amadurecimento, estocagem e processamento. Estudos demonstram que a degradação da pectina é influenciada pelo grau de esterificação da molécula, e que aumenta com o decréscimo do grau de esterificação da pectina (ENDRESS; MATTES, 2009).

No suco de laranja perda da turbidez ocorrerá se enzimas endógenas provenientes do fruto degradarem a pectina ou causarem a sua precipitação sob a forma de pectato de cálcio após a desesterificação (VORAGEN et al., 1995).

3.2.3 Quantidade de pectina presente na laranja

A pectina presente na laranja está distribuída em média: 29 % na membrana, 20 % na casca, 16 % nas vesículas de suco (FOGARTY; KELLY, 1983 apud UHLIG, 1998) e (30 a 35) % no albedo (CANTERI et al., 2012). Na matéria seca do albedo a proporção de substâncias pécticas solúveis em água aumenta rapidamente durante a primeira fase de crescimento, mas após atingir a maturação avançada esta porção tende a diminuir (KERTESZ, 1951).

A pectina funciona como um emulsificante, ajudando a manter a suspensão do suco de laranja e desta forma proporciona sua turbidez (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). Pode formar uma rede tridimensional, que é estabilizada por interações entre moléculas de pectina gerando a gelificação da mesma (CUI, 2005; ENDRESS; MATTES, 2009).

3.2.4 Grau de metoxilação (DM)

O grau de metoxilação (DM do inglês *degree of methylation*) é definido pelo percentual de grupos carboxílicos esterificados com metanol na molécula de pectina extraída para fins comerciais (SILVA; RAO, 2006; VORAGEN et al., 1995).

São descritos três grupos de pectinas na literatura e a definição destas está associada ao grau de metoxilação (LAJOLO; MENEZES, 2006; LÖFGREN; HERMANSSON, 2007; SILVA; RAO, 2006; VORAGEN et al., 1995):

- i) pectinas altamente metoxiladas (HM do inglês *high methoxyl pectin*): se possuem mais de 50 % dos grupos carboxílicos metoxilados;
- ii) pectinas de baixa metoxilação (LM do inglês *low methoxyl pectin*): se possuem menos de 50 %;
- iii) pectinas amidadas: se possuem um nível entre (15 a 25) % de grupos carboxamidas (-CONH₂) e
- iv) ácido péctico: se possuem menos de 10 % de metoxilação.

3.3 Enzimas

As enzimas pécticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas, presentes principalmente nas plantas. Estão amplamente distribuídas na natureza em plantas superiores e também são produzidas por micro-organismos (bactérias, leveduras, fungos) (OUMER, 2017). Tem relevante importância para as plantas (JAYANI SAXENA; GUPTA, 2005) e no amolecimento de alguns tecidos vegetais durante a maturação e armazenamento (SAKAI et al., 1993).

Industrialmente as pectinases são usadas: em processos que envolvem a degradação de materiais vegetais; para acelerar a extração de suco de frutas (SHARMA; RATHORE; SHARMA, 2013), para catalisar a degradação de pectina, clarificação de sucos e para uso com efeito sinérgico em combinação com outras enzimas na maceração de produtos vegetais (UENOJO; PASTORE, 2007). Também são empregadas no pré-tratamento de águas residuais da indústria de processamento de cítricos (BEG et al., 2000).

3.3.1 *Enzimas presentes no suco de laranja*

Das enzimas que podem estar presentes no suco de laranja a pectinametilesterase (PME) se destaca por ser a responsável pela degradação da pectina através da hidrólise das ligações éster-metilicas e consequente perda da turbidez no suco que é um importante fator de qualidade para sua aceitação por parte dos consumidores (CASTALDO et al., 1991; VAN DEN BROECK et al., 2000). A estabilidade da suspensão coloidal também contribui para a turbidez, sabor, aroma e cor característicos dos sucos cítricos (VAN DEN BROECK et al., 2000).

A PME é mais resistente termicamente do que a maioria dos micro-organismos de deterioração vegetativos encontrados em sucos cítricos, razão pela qual a inativação desta enzima tem sido considerada como prova de efetividade do processo de pasteurização de suco de laranja (AGHAJANZADEH; ZIAIIFAR, 2018; AWUAH et al., 2007; CHEN; WU, 1998; DUVETTER et al., 2009).

Kertesz (1951) cita a ocorrência de atividade enzimática da pectinametilesterase em frutas cítricas (*grapefruit*, limão e laranjas) especialmente no flavedo e no albedo.

Rouse (1953) verificou que tanto a pectina quanto a PME estão distribuídas em diferentes concentrações nas diferentes partes da laranja. Segundo o autor para as variedades estudadas (*Hamlin*, *Pineapple*, *Temple* e *Valência*) os componentes com maior atividade da PME, (em base seca) em ordem decrescente são: vesículas de suco, membranas, flavedo, albedo, sementes e suco centrifugado. Enquanto que a pectina é encontrada em maior quantidade nas membranas e flavedo. As maiores atividades e também maiores concentrações de pectina foram observadas na polpa, cujos principais componentes são as vesículas de suco e resíduos de membranas. Ingallinera et al. (2005) corrobora o estudo confirmando que a atividade encontrada nas vesículas de suco (polpa) foi de 2 a 8 vezes maior quando comparado à ocorrência no suco centrifugado para as variedades estudadas (*Sanguinello*, *Moro*, *Tarocco* e *Navel*).

O mecanismo de ação da PME no suco de laranja, como citado anteriormente está basicamente relacionado com sua atuação sobre a desesterificação dos grupos metoxila na cadeia poligalacturônica da pectina. Esta enzima age preferencialmente no grupo metil éster da unidade galacturônica próxima à unidade não esterificada; apresenta valores ótimos de pH entre 4 e 8 e temperatura de (40 a 50) °C (UENOJO; PASTORE, 2007; UHLIG, 1998).

O suco contém uma mistura de várias partículas em suspensão contendo lipídios, proteínas, pectina, celulose, hemicelulose, que são oriundas da ruptura das células da laranja durante a extração. Quando a PME age, hidrolisa os grupos metil éster da pectina do suco de laranja, liberando metanol e convertendo este em pectato (polímero não esterificado). Esses compostos insolúveis formados precipitam-se, em virtude da acidez e presença de cátions, e carregam os compostos coloidais suspensos responsáveis pela turbidez, resultando num sistema de duas fases, (com um líquido clarificado na parte superior e um precipitado na parte inferior) produto pouco atrativo para o consumidor (CORRÊA NETO; FARIA 1999; QUEIROZ; MENEZES, 2010; UENOJO; PASTORE, 2007).

Se o produto for mantido a - 17 °C ou abaixo, a gelificação e a clarificação do suco, comumente associada à ação da PME, não ocorrem uma vez que a enzima permanece em estado inativo sob essas condições. A taxa de deterioração a temperaturas mais elevadas depende da utilização de tratamento térmico, variedade e maturação da fruta (UENOJO; PASTORE, 2007; USDA, 1956). Para evitar a precipitação do material em suspensão, a indústria aplica tratamento térmico para a inativação enzimática.

3.3.1.1 *As isoformas da PME*

Apesar da diversidade na quantidade de isoformas descritas na literatura, é comum vê-las classificadas em dois grupos principais, um representado pelas frações termolábeis e outro pelas termorresistentes, ambos com diferentes massas moleculares e níveis de identidade de aminoácidos entre as isoformas (CAMERON et al., 2005; CAMERON; GROHMANN, 1995; KOHLI; KALI; GUPTA, 2015; SAVARY et al., 2013; SEYMOUR et al., 1991; VERSTEEG et al., 1980; WICKER; TEMELLI, 1988).

Aghajanzadeh et al. (2016) relataram três isoformas de PME com diferentes resistências térmicas no suco de laranja tratado a 60 °C, enquanto que apenas duas isoformas foram detectadas para o processamento ocorrido a 70, 80 e 90 °C, sendo observada diferença significativa no comportamento de inativação de PME durante o tratamento térmico das amostras nas diferentes temperaturas empregadas.

Versteeg et al. (1980) relatam que as isoformas termossensíveis em laranja variedade *Navel*, foram inativadas à temperatura entre (60 e 70) °C, enquanto a fração termorresistente foi inativada em temperatura superior a 90 °C.

Rombouts et al. (1982) reportaram que a fração termorresistente contendo maior peso molecular está representada por 6 % do conteúdo total de PME na laranja variedade *Navel*. Tanto Van den Broeck et al. (2000), quanto Versteeg et al. (1980) relatam conteúdo similar da fração termorresistente em 5 % do conteúdo total. Savary et al. (2013) relatam a existência de duas isoformas termorresistentes em polpa de laranja. Wicker (1992) relata que a fração termorresistente da PME é preferencialmente extraída a pH baixos. Van Den Broeck et al. (2000) relatam que a

fração termorresistente da PME de laranja também se mostrou resistente à aplicação de pressão e foi inativada após 2 min a 900 MPa.

3.3.1.2 A influência do pH sobre a inativação térmica da PME

Van den Broeck et al. (1999b) revelaram que a PME de laranja é menos termorresistente em meio ácido, sendo inativada mais rapidamente a temperaturas mais baixas em meios mais ácidos quando comparados pHs de 3,7 e 4,5. Semelhante comportamento foi observado por Rothschild et al. (1975) que reduziram a temperatura de 90 para 80 °C com pH decrescente de 3,4 a 2,8 na inativação da PME em suco de toranja.

Rouse; Atkins (1953) descreveram a influência do pH sobre a cinética térmica da PME em sucos cítricos com pHs entre 2,4 a 3,8; em todos os casos observou-se uma inativação maior em pHs menores, quando comparados a mesma temperatura.

Tribess; Tadini (2006) também relataram inativação máxima de PME de acordo com o pH empregado em pasteurização de suco de laranja minimamente processado. Os autores sugerem que inativação maior e mais rápida foram encontradas em pH mais baixos (3,6 e 3,7) e temperaturas de (85,0 e 87,5) °C quando comparadas à inativação mais baixa e mais lenta no suco de laranja natural a pH 3,8.

Pilnik; Rombouts (1981) relataram uma interação sinérgica entre algumas pectinametilesterases e depolimerases em laranjas com ótima atividade entre pH 7,0 e 7,5 (VERSTEEG et al., 1980), com estabilidade térmica mesmo em pH baixos (2,0 a 2,5). Observaram também que a afinidade destas PMEs pela pectina aumentava com a redução do grau de esterificação do substrato péctico (PILNIK; ROMBOUTS, 1981).

3.3.2 Determinação da atividade da enzima PME em suco de laranja

Diferentes métodos são utilizados para determinar a atividade enzimática da pectinametilesterase em suco de laranja. O método tradicionalmente utilizado foi descrito por Rouse e Atkins (1955) e está baseado na medida, determinada por titulação, da razão de liberação de grupos carboxílicos de uma solução de pectina

1,0 g/100 g com 0,2 M de NaCl mantido nas condições ótimas de atuação da enzima que são pH 7,5 e 30 °C, adicionada de suco de laranja (KERTESZ, 1955; ROUSE; ATKINS, 1955).

A atividade da PME é expressa como PEU_{unit} , definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 meq de grupo carboxílico por min por mL na reação sob condições padrão (ROUSE; ATKINS, 1955; UHLIG, 1998; VERCE *T* et al., 1999), expressa como ($PEU\ mL^{-1}$) que representa a quantidade de miliequivalentes de éster hidrolisado por min por mL. Esta unidade também pode ser representada em relação ao conteúdo de sólidos solúveis determinado através de refratômetro ($PEU\ mL^{-1}\ ^\circ\text{Brix}^{-1}$) sendo calculada de acordo com a eq.(1) (ROUSE; ATKINS, 1955) é:

$$PEU_{unit} = \frac{V_s \times f}{V_a \times t \times \frac{x_s}{100}} \quad (1)$$

Em que: PEU_{unit} é a atividade enzimática por minuto por volume da amostra por sólidos solúveis ($PEU\ mL^{-1}\ ^\circ\text{Brix}^{-1}$); V_s é o volume de NaOH gasto na titulação (mL); f é a *normalidade da solução NaOH 0,05 N (N)*; V_a é o volume da amostra (mL); t é o tempo de reação (min); e x_s é o teor de sólidos solúveis ($^\circ\text{Brix}$).

3.3.3 Modelo da cinética de inativação enzimática

Uma conversão catalítica enzimática é um processo dinâmico que pode ser influenciado por diferentes fatores que incluem o tipo e a concentração das substâncias participantes, temperatura, pH e força iônica, e propriedades intrínsecas da enzima como a especificidade ou sua estabilidade sob certas condições (UHLIG, 1998).

3.3.3.1 Condições isotérmicas

As reações enzimáticas ocorrem a uma taxa limitada pela concentração das enzimas presentes e a inativação térmica segue uma cinética de primeira ordem descrita pela eq.(2) (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a); válida para condições isotérmicas:

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-k t) \quad (2)$$

Em que: A é a atividade enzimática a qualquer tempo (PEU mL^{-1}); A_0 é a atividade enzimática inicial (PEU mL^{-1}); k é a constante de velocidade de 1ª ordem (s^{-1}); e t é o tempo de processo (s).

Segundo Walstra et al. (2006), a inativação de enzimas, desnaturação de proteínas, bem como a eliminação de bactérias e esporos em geral têm sido descritas por uma equação de cinética de primeira ordem com parâmetros cinéticos D e z válidos para determinada faixa de temperatura e condições de processamento. Em que o parâmetro D representa o intervalo de tempo necessário, a uma dada temperatura de referência, para ter uma redução de 90 % (uma década logarítmica ou redução decimal) sobre a concentração de um atributo, e z representa o aumento de temperatura necessário para a redução de 90 % no valor de D (Toledo, 2007).

Rearranjando a equação (2) através da transformação do logaritmo natural para logaritmo de base 10 e usando a definição de D como o tempo de redução decimal a seguinte relação descrita na eq.(3) (TAJCHAKAVIT, RAMASWAMY, 1997b):

$$D = \frac{2,303}{k} \quad (3)$$

Em que: D é o tempo de redução decimal (s); k é a constante da cinética de inativação (s^{-1}).

Assim sendo, a eq. (2) pode também ser representada em função do tempo de redução de decimal (D) conforme descrito pela eq. (4) (CHEN; WU, 1998) válida para condições isotérmicas:

$$\frac{A}{A_0} = 10^{-\left(\frac{t}{D}\right)} \quad (4)$$

O modelo de 1ª ordem, porém com multicomponentes, foi sugerido para descrever a inativação térmica de enzimas que possuem isoformas com estabilidades térmicas distintas. Neste modelo a inativação se dará pela soma da

contribuição cinética de cada isoforma pressupondo-se que cada componente siga a inativação de 1ª ordem de maneira independente (Tribess; Tadini, 2006).

Chen; Wu (1998) demonstraram que o modelo log-linear convencional multicomponente se adequa melhor para a determinação dos valores D e z na cinética do tratamento térmico para a pasteurização de sucos cítricos quando comparado ao modelo convencional de apenas um componente.

Tribess; Tadini (2006) utilizaram modelo multicomponente para descrever a inativação da PME. Os autores consideraram duas isoformas da PME: uma termolábil e outra termorresistente (com alto peso molecular), ambas sendo inativadas de acordo com um modelo cinético de decaimento de 1ª ordem. Em que uma das frações é definida como α e a outra como $(1-\alpha)$ sendo que para cada fração foi considerada inativação independente do outro grupo, descrita pelo modelo da eq.(5) (TRIBESS; TADINI, 2006):

$$\frac{A}{A_0} = \alpha \exp(-k_1 t) + (1 - \alpha) \exp(-k_2 t) \quad (5)$$

Em que: α representa a fração termolábil no instante inicial; $(1-\alpha)$ representa a fração termorresistente no instante inicial; t é o tempo de retenção (s); k_1 e k_2 são as constantes da cinética de inativação das frações termolábil e termorresistente, respectivamente (s^{-1}).

Chen; Wu (1998) utilizaram o modelo multicomponente para descrever a inativação da PME, porém descrito em função do tempo de redução decimal conforme modelo apresentado na eq.(6) para condições isotérmicas:

$$\frac{A}{A_0} = \alpha 10^{-\left(\frac{t}{D_1}\right)} + (1 - \alpha) 10^{-\left(\frac{t}{D_2}\right)} \quad (6)$$

Em que: D_1 e D_2 são o tempo de redução de decimal das frações termolábil e termorresistente, respectivamente (s).

3.3.3.2 Condições não-isotérmicas

Para condições não isotérmicas outras premissas devem ser consideradas. Segundo Toledo (2007), no processamento de alimentos, em geral o valor de

esterilização (SV) é levado em consideração para o cálculo de inativação térmica. Segundo o autor, o valor de esterilização de um processo é definido como o número de reduções decimais da população inicial de micro-organismos ou atividade da enzima, sendo dado pela expressão (7) (TOLEDO, 2007):

$$SV = -\log\left(\frac{A}{A_0}\right) \quad (7)$$

Em que: SV é o valor de esterilização de um processo, definido como o número de reduções decimais;

O valor de esterilização está relacionado ao histórico de temperaturas e aos parâmetros cinéticos de inativação. E pode ser descrito através do conceito F , que é a letalidade integrada do processo, definido como tempo necessário para atingir o SV desejado na temperatura de referência (T_{ref}) (TOLEDO, 2007) na eq.(8):

$$F_{T_{ref}} = SV D_{ref} \quad (8)$$

Em que: F é a letalidade integrada do processo, definido como tempo necessário para atingir o SV desejado na temperatura de referência (s).

Para tratamento térmico sob condições não isotérmicas, é possível determinar um tempo isotérmico equivalente, a uma dada temperatura de referência, admitindo-se que o processo não-isotérmico é equivalente a uma sequência de processos isotérmicos de curta duração. Essa aproximação é realizada, experimentalmente, através da integração da curva do histórico de temperatura por uma sequência de processos isotérmicos de duração infinitesimal dt descritas através do cálculo da letalidade integrada.

Segundo Lewis e Heppell (2000), a letalidade integrada F pode ser considerada como o tempo de processo a uma temperatura de referência arbitrária (assumindo aquecimento e resfriamento instantâneos) no qual o processo completo é equivalente. O cálculo de F é dado pela eq.(9) (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a):

$$F = \int_0^t L dt = \int_0^t 10^{\left(\frac{T-T_{\text{ref}}}{z}\right)} dt \quad (9)$$

Em que: F é a letalidade integrada (s); L é a letalidade no tempo t ; T_{ref} é a temperatura de referência para a inativação da enzima ($^{\circ}\text{C}$); T é a temperatura no instante t do processo ($^{\circ}\text{C}$); e dt é o intervalo de tempo considerado (s).

Tajchakavit e Ramaswamy (1997a) demonstraram a importância de considerar o uso da letalidade integrada eq.(9) para o cálculo do tempo equivalente e dos parâmetros D e z em seu estudo (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1995).

Assim a eq.(5) pode ser reescrita para processos não isotérmicos levando em consideração o tempo de redução decimal (D) e o conceito F para dois componentes pela seguinte relação:

$$\left(\frac{A}{A_0}\right)_{\text{calc}} = \alpha 10^{-\left(\frac{F_1}{D_1}\right)} + (1-\alpha) 10^{-\left(\frac{F_2}{D_2}\right)} \quad (10)$$

Em que: $(A/A_0)_{\text{calc}}$ é a atividade residual predita pelo modelo; α representa a fração termolábil no instante inicial; $(1-\alpha)$ representa a fração termorresistente no instante inicial; F_1 e F_2 são as letalidades integradas (s); D_1 e D_2 são os tempos de redução de decimal (s); e os índices 1 e 2, referem-se a fração termolábil e termorresistente, respectivamente.

3.4 Tratamento térmico

O tratamento térmico nos alimentos tem por objetivo reduzir a flora presente de micro-organismos deterioradores (leveduras e fungos), destruir bactérias vegetativas patogênicas (*Escherichia coli*, *Listeria* e *Salmonella*), inativar enzimas (cuja atividade pode causar perda de cor e textura, produção de odores desagradáveis e mudanças nas características sensoriais como um todo), inativar toxinas e reduzir reações de deterioração, entre outras (MILLER; SILVA, 2012).

Num processo térmico são levados em consideração os parâmetros de tempo-temperatura aplicados. Estes podem ser classificados de acordo com a taxa de temperatura empregada. Quando a temperatura é inferior a 100°C , o processo é

chamado de pasteurização e quando é superior a 100 °C é nomeado esterilização (MILLER; SILVA, 2012).

No caso de suco de laranja comercial uma das principais razões do tratamento térmico, além da destruição de micro-organismos, é também a inativação da enzima pectinametilesterase (AHMED RAMASWAMY, 2007; QUEIROZ; MENEZES, 2010). A resistência térmica da PME tem sido reconhecida como superior a das bactérias e leveduras preponderantemente presentes nos sucos cítricos e, portanto, a atividade desta enzima tem sido utilizada para determinar a efetividade da pasteurização (AHMED; RAMASWAMY, 2007; CHEN; WU, 1998; RAMASWAMY; KOUTCHMA; TAJCHAKAVIT, 2002; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b).

Este mecanismo de inativação está baseado no fato das enzimas catalisarem reações químicas e possuírem atividade biológica determinada pela configuração tridimensional da molécula. Quando as enzimas são expostas a altas temperaturas podem ocorrer mudanças conformacionais (desnaturação) e consequente perda de atividade ou mudanças na sua funcionalidade (MILLER; SILVA, 2012).

O processo de pasteurização é o mais utilizado comercialmente para tratamento térmico de sucos líquidos. As de baixa temperatura com longo tempo (LTLT do inglês *low temperature long time*) e alta temperatura com curto tempo (HTST do inglês *high temperature short time*) são as técnicas mais utilizadas dentro do processo de pasteurização de suco (RUPASINGHE; YU, 2012).

Após a pasteurização, o suco não está estéril e, portanto, exige outras técnicas de preservação subsequentes (refrigeração, conservantes químicos, embalagens assépticas, etc) para evitar a deterioração do produto (LUND, 1975; QUEIROZ; MENEZES, 2010).

3.4.1 Processo térmico tradicional

3.4.1.1 Tratamento térmico convencional de suco de laranja

Para o processo convencional para suco de laranja a condição usual é de 90 °C por 1 min (POLYDERA; STOFOROS; TAOUKIS, 2005) para a inativação da fração da PME mais resistente.

Ingallinera et al. (2005) relataram que as condições de tratamento térmico utilizadas para pasteurização de suco de laranja e polpas (75 °C por 1 min) não foram suficientes para atingir a redução decimal de PME da ordem de pelo menos 1 *D* para nenhum dos cultivares de laranja estudados. No entanto, sugeriram condições mais drásticas capazes de garantir um produto com níveis microbiológicos e enzimáticos seguros (85 °C por 3 min), e relataram níveis de inativação de (93 a 98) % dependendo do cultivar (*Tarocco*, *Moro*, *Sanguinello* e *Navel*).

Versteeg et al. (1980) sugerem tratamento térmico de 90 °C por 48 s em suco de laranja, a fim de obter 99 % de inativação da PME de maior peso molecular e maior estabilidade térmica. Eagerman; Rouse (1976) por sua vez sugerem (90 a 95) °C por (60 a 90) s.

Rothschild et al. (1975), sugerem temperatura de 85 °C por 45 s para atingir atividade residual da PME menor do que $1,0 \times 10^{-4}$ PEU g⁻¹ de suco.

Atkins; Rouse e Moore (1956) sugerem tempo de retenção de 41 s para pasteurização utilizando trocador de calor tipo placas de suco de laranja variedade Valência (reconstituído a 12 °Brix). Relataram inativação da PME de (13; 39; 80; 91; 97; 99 e 100) % obtidas com o uso de (57,2; 62,8; 68,3; 73,9; 79,4; 85,0; 90,6) °C, respectivamente.

Van Den Broeck et al. (2000) em estudo da inativação de PME em processo térmico combinado com alta pressão observaram desestabilização do suco de laranja ainda que na presença de baixa concentração da fração termorresistente. Os autores observaram inativação da PME em temperaturas superiores a 75 °C, e aumento da inativação em pH baixos (3,7) tanto para a fração termolábil quanto para a fração termorresistente. Não observaram inativação completa da fração

termorresistente com este tratamento combinado, razão pela qual os autores sugerem uso de refrigeração como tratamento posterior à pasteurização.

Apesar da larga utilização destes métodos para a pasteurização, o processamento convencional causa impactos negativos na qualidade do suco de laranja, como perdas de cor, sabor, valores nutricionais (ESPACHS-BARROSO et al., 2006), qualidade e frescor do produto final (RUPASINGHE; YU, 2012).

Portanto, alguns métodos de pasteurização alternativos têm sido propostos nas últimas duas décadas, sendo um deles o assistido por micro-ondas.

3.4.2 *Pasteurização assistida por micro-ondas*

O interesse pelo uso da energia de micro-ondas para aquecimento, descongelamento, secagem, pasteurização e esterilização de alimentos e bebidas tem crescido muito na última década; aplicações em produtos como: leite, sucos, chás, sopas, frutas, legumes, nozes, grãos, carnes, entre outros são descritos na literatura (SALAZAR-GONZALEZ; MARTIN-GONZALEZ; SOSA-MORALES, 2012).

Esta tecnologia tem encontrado diversas aplicações motivadas pela diminuição de tempo de processo, alta eficiência energética, bem como pela capacidade de destruir micro-organismos, inativar enzimas, manter a qualidade nutricional do alimento e tem mostrado potencial para substituir pelo menos em parte as técnicas aplicadas para o tratamento térmico convencional (HEBBAR; RASTOGI, 2012). Segundo a revisão de Franco et al. (2015) esta tecnologia possui potencial quando comparada com os métodos convencionais de aquecimento para o processamento de alimentos líquidos, pois promove rápido aquecimento evitando a degradação da qualidade e perdas de atributos sensíveis associadas normalmente à etapa de aquecimento indireto em trocador de calor.

Estudos com o uso de pasteurização e esterilização assistidas por micro-ondas foram motivados pelo aquecimento rápido e efetivo verificado em alimentos contendo água ou sais (ROSENBERG et al., 1987).

Atualmente, alimentos líquidos tais como: leite, mel, sucos de frutas (maçã, laranja, *grapefruit*), água de coco, soluções salinas, sopas vegetais, purês (abacate, maçã, kiwi, batata) entre muitos outros, têm sido relatados como processados por

aquecimento assistido por micro-ondas (HEBBAR; RASTOGI, 2012; SALAZAR-GONZALEZ; MARTIN-GONZALEZ; SOSA-MORALES, 2012) e tem se mostrado eficiente principalmente em sistemas contínuos, nos quais a distribuição de temperatura é mais uniforme devido à melhor eficiência na mistura do líquido (GENTRY; ROBERTS, 2005; SALAZAR-GONZALEZ; MARTIN-GONZÁLEZ; SOSA-MORALES, 2012).

3.4.2.1 *Vantagens e desvantagens do aquecimento por micro-ondas*

As vantagens apontadas são rápida transferência de energia e, altas taxas de aquecimento (DORANTES-ALVAREZ et al., 2000) que por sua vez são traduzidas como economia de energia e redução do tempo de aquecimento (cerca de um quarto daquele utilizado em aquecimento convencional); redução da degradação térmica dos nutrientes, aumentando assim a retenção de fatores de qualidade (SUÁREZ et al., 2000), preservando vitaminas, sabor e cor dos alimentos (AHMED; RAMASWAMY, 2007); bem como baixo custo de manutenção e processo considerado ambientalmente limpo, uma vez que a geração de micro-ondas não produz gases de escape ou resíduos tóxicos (FU, 2004; AHMED; RAMASWAMY, 2007).

A principal desvantagem em aquecimento assistido por micro-ondas é a distribuição de temperatura não uniforme que resulta em pontos quentes e frios no produto (KUMAR et al, 2008; HEBBAR; RASTOGI, 2012; VADIVAMBAL; JAYAS, 2010). No entanto, essa distribuição não uniforme tem sido mais associada a alimentos sólidos (MANICKAVASAGAN; JAYAS; WHITE, 2006). Outra desvantagem é a necessidade de uso de energia elétrica que é considerada a energia mais cara de ser obtida do ponto de vista comercial (HEBBAR; RASTOGI, 2012; REGIER; SCHUBERT, 2001).

3.4.2.2 *Características das micro-ondas*

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas não ionizantes (se diferenciam das ondas gama e raio-X por não formarem átomos e moléculas carregados quando incididas em um material); fazem parte do espectro eletromagnético (Figura 3.3), no

intervalo de frequência entre 300 MHz a 300 GHz; e com comprimentos de onda entre 1 mm a 1 m no espaço livre (RAMASWAMY; TANG, 2008; TEWARI, 2007).

Figura 3.3 - Espectro eletromagnético com especificação das frequências e comprimentos de ondas eletromagnéticas, modo de ação na molécula e suas aplicações práticas industriais

Fonte: SCB (1998).

Quando penetram em um material, tem parte da sua energia transmitida, parte refletida e parte absorvida pelo material e dissipada como calor (HEBBAR RASTOGI 2012). Possuem comportamento similar às ondas de luz sendo refletidas por objetos metálicos; e absorvidas e/ou transmitidas por alguns materiais dielétricos; apresentam boa absorção para água e carbono, enquanto que boa transmitância (com pouca ou nenhuma absorção) para vidro, cerâmica e a maioria dos termoplásticos (TEWARI, 2007).

Tem sua regulamentação delimitada pelas agências governamentais por possuírem frequências próximas as de rádio e TV e causarem possíveis interferências. As frequências para aquecimento aprovadas e comumente reconhecidas internacionalmente para uso industrial, científico e médico são: 890 MHz (UK) ou 915 MHz (demais países); 2450 MHz; 5800 MHz e 24125 MHz (HEBBAR; RASTOGI, 2012). Sendo que as frequências de 915 e 2450 MHz para uso industrial, e a frequência de 2450 MHz para uso doméstico são as mais

comumente aplicadas (HEBBAR; RASTOGI, 2012; MILLER; SILVA, 2012; SALAZAR-GONZALEZ; MARTIN-GONZALEZ; SOSA-MORALES, 2012; TEWARI, 2007).

3.4.2.3 Mecanismos envolvidos no aquecimento por micro-ondas

O efeito de aquecimento no material exposto às micro-ondas decorre da interação do componente de campo elétrico da onda com as partículas carregadas do material. Existem dois mecanismos principais pelos quais a energia é gerada e se propaga em materiais dielétricos (condução iônica e rotação do dipolo) (HEBBAR; RASTOGI, 2012; TEWARI, 2007). A representação esquemática da condução iônica e da rotação dipolar são mostradas na Figura 3.4.

Figura 3.4 - Representação esquemática da condução iônica e da rotação dipolar quando um material é exposto a um campo eletromagnético

Fonte: adaptado de STALAM (2017)

A condução iônica ocorre quando os íons livres em solução, em resposta à aplicação de um campo elétrico, tendem a se alinhar na tentativa de se moverem na mesma direção em fase com o campo. Quando o campo elétrico muda a direção, os íons tendem novamente a acompanhar esta alternância na direção. As colisões resultantes entre eles causam a conversão de energia cinética em energia térmica dissipada em forma de calor (HEBBAR; RASTOGI, 2012; MILLER; SILVA, 2012; SALAZAR-GONZALEZ; MARTIN-GONZALEZ; SOSA-MORALES, 2012; TEWARI, 2007). A taxa de aquecimento de uma solução com maior concentração de íons será maior devido às colisões iônicas mais frequentes nesta solução (SALAZAR-GONZALEZ; MARTIN-GONZALEZ; SOSA-MORALES, 2012).

O mecanismo de rotação do dipolo (condução dipolar ou aquecimento dielétrico) é a interação mais relevante. Este mecanismo depende da existência de moléculas polares e ocorre quando as moléculas de água e outras moléculas

polares presentes no alimento tendem a se alinhar com o campo elétrico ao qual estão expostas (HEBBAR; RASTOGI, 2012; MILLER; SILVA, 2012).

Devido à alta frequência do campo (2450 MHz) e consequente alternância do ciclo de polaridade em $2,45$ bilhões de ciclos s^{-1} , o efeito térmico gerado pode levar a um aumento significativo de temperatura, reportado por Lew et al. (2002) atingindo até $10\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$.

3.4.2.4 Sistemas de micro-ondas (MW)

Os sistemas de micro-ondas (MW) consistem em três partes básicas: gerador (*magnetron*), guia de ondas e aplicador.

O *magnetron* é constituído por um tubo a vácuo com um cátodo central emissor de elétrons de potencial altamente negativo (Figura 3.5). Este cátodo é cercado por um ânodo estruturado com cavidades (REGIER; SCHUBERT, 2001). A diferença de potencial entre ambos produz um campo elétrico e o cátodo é aquecido para remover os elétrons ligados. Uma vez que os elétrons são removidos do cátodo, eles são acelerados radialmente em direção ao ânodo pelo campo elétrico e são desviados pelo campo magnético, produzindo um movimento em espiral. A energia eletromagnética produzida é acoplada por uma antena nas cavidades da guia de ondas, a frequência das oscilações depende do tamanho das cavidades (HEBBAR; RASTOGI, 2012; THOSTENSON; CHOU, 1999). À medida que os elétrons passam pelas cavidades ressonantes, estas configuram oscilações na nuvem de elétrons, cuja frequência depende do tamanho das cavidades. A potência de saída do *magnetron* pode ser controlada através do ajuste da corrente do cátodo ou pela intensidade do campo magnético (THOSTENSON; CHOU, 1999). A potência máxima geralmente é limitada pela temperatura do ânodo. Os limites práticos a $2,45\text{ GHz}$ são $1,5\text{ kW}$ e 25 kW para os ânodos refrigerados a ar ou a água, respectivamente. Os *magnetrons* de 915 MHz podem atingir maiores potências por unidade devido ao seu tamanho maior (REGIER; SCHUBERT, 2001).

Figura 3.5 - Vista esquemática superior interna do *magnetron*

Fonte: ILCE (2017)

As guias de ondas são condutores de seção transversal circular e os aplicadores de MW são classificados como unifocais ou multifocais. Dependendo do tipo de cavidade e da guia de ondas, a transferência pode ser: a) direta (unifocal) em que a micro-onda proveniente de uma antena ou de uma fenda atinge o produto diretamente sem refletir nas paredes dentro da cavidade; ou b) indireta (multifocal), aplicada tanto em fornos de micro-ondas domésticos quanto industriais, a micro-onda gerada sofrerá reflexão em diferentes direções dentro da cavidade até atingir o produto (Figura 3.6) (PICQUET; DEL-VALLE, 2005; HEBBAR; RASTOGI, 2012).

Figura 3.6 - Vista esquemática de aplicadores de micro-ondas:

Fonte: adaptado de PICQUET; DEL-VALLE, (2005)

3.4.2.5 Efetividade do aquecimento por micro-ondas

O aquecimento por micro-ondas ocorre devido à capacidade dos materiais de absorver a energia e convertê-la em calor (CHANDRASEKARAN; RAMANATHAN; BASAK, 2013) está baseado no efeito volumétrico e se processa através de mecanismos de convecção e radiação que causam aquecimento direto no alimento

(GUO et al., 2017). A efetividade está relacionada à profundidade de penetração no material e a taxa é inversamente proporcional à frequência (YAM; LAI, 2006), portanto, penetração mais profunda ocorre com frequências baixas e frequências altas resultam em maior aquecimento da superfície (WANG; WANG, 2009).

3.4.2.6 *Inativação da PME por micro-ondas*

Ingallinera et al. (2005) relataram que os valores de *D* necessários para a redução decimal da PME em laranjas são dependentes do cultivar. E que o tempo de redução decimal foi maior no suco do que na polpa das laranjas para todos os cultivares.

Cinquanta et al. (2010), em estudo da inativação de PME por aquecimento assistido por micro-ondas em batelada para suco de laranja com controle de temperatura IR (infravermelho), obtiveram inativação da fração termolábil após 1 min a 70 °C, com um valor *z* de 22,12 °C.

Villamiel et al. (1998) obtiveram 97,5 % de inativação de PME para tempo de residência de 24 s em processo de fluxo contínuo (98 mL min⁻¹) com temperatura de saída de 89,7 °C com aquecimento assistido por micro-ondas. Relataram também 98,8 % de inativação para tempo de residência de 27 s (com fluxo de 87,2 mL min⁻¹) para temperatura de saída de 96,4 °C. Valores de inativação similares foram obtidos pelos autores (98,8 %) para o processo convencional em trocador tubular com as temperaturas de saída idênticas às do processo assistido por micro-ondas.

Nikdel et al. (1993), também obtiveram inativação de 99 % de PME em suco de laranja fresco com tempo de retenção de 10 s e temperaturas entre (85 a 92) °C em aquecimento de fluxo contínuo assistido por micro-ondas. Resultados similares foram encontrados para tempo de residência de 15 s com 98,5 % a 75 °C e 99 % em temperaturas entre (87 e 97) °C. Comparáveis aos obtidos por aquecimento convencional em trocador de calor a placas.

Demirdöven; Baysal (2015) aplicando eletroplasmólise (EP) como tratamento anterior ao aquecimento assistido por micro-ondas obtiveram mais de 95 % de inativação de PME em temperatura moderada (69 a 75) °C. O método (EP) está

baseado no desenvolvimento de poros na membrana celular como resultado de aplicações de campo elétrico.

3.4.2.7 *Efeito das micro-ondas sobre outros componentes*

3.4.2.7.1 Vitamina C (ácido ascórbico)

Géczi et al. (2013) relataram não ter observado diminuição significativa do teor de vitamina C para o aquecimento contínuo assistido por micro-ondas mantido a 85 °C por 10 min em comparação com o grupo controle.

Villamiel et al. (1998) comparando aquecimento convencional com o assistido por micro-ondas em suco de laranja relataram que a concentração de ácido ascórbico permaneceu inalterada e se manteve estável em 0,58 g L⁻¹, de modo que a severidade e o tipo de aquecimento não afetaram o teor de ácido ascórbico presente.

Cinquanta et al. (2010) observaram uma diminuição do conteúdo de vitamina C quando compararam o aquecimento assistido por micro-ondas a outros métodos de aquecimento como ôhmico ou infravermelho em processamento de suco de laranja. Os autores relataram que o conteúdo atingiu perdas proporcionais ao aumento do tempo de exposição por aquecimento por MW. A retenção de vitamina C para o processo mantido a 70 °C variou de 92 % (após 2,5 min) a 82 % (após 5 min), enquanto que a 60 °C os valores diminuíram de 97 % (após 2,5 min), para 88 % após 5 min.

Vikram; Ramesh e Prapulla (2005) relataram menores índices de retenção de vitamina C em seus experimentos com aquecimento por micro-ondas. Porém há que ressaltar que os autores empregaram temperaturas de esterilização superiores a 100 °C em seus experimentos com micro-ondas; e temperaturas de pasteurização (50 a 90) °C em seus demais experimentos utilizando outros métodos de aquecimento como ôhmico, infravermelho e convencional. O que torna o comparativo não equivalente.

3.4.2.7.2 Perda de carotenóides

Cinquanta et al. (2010) observaram um decréscimo de 13 % no conteúdo de carotenoides após a pasteurização por micro-ondas. Os autores afirmaram que os carotenos com atividade de provitamina A (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina) apresentaram variações menores do que as xantofilas após a pasteurização nestas condições.

Fratianni; Cinquanta e Panfili (2010) detectaram a diminuição da concentração de carotenoides com variação na perda de acordo com as condições de tempo e temperatura empregados. De acordo com os autores perdas de violaxantina e anteraxantina foram claramente detectadas após 10 min de aquecimento a 60 °C e 70 °C, enquanto compostos com atividade da provitamina A (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina) e luteína foram mais estáveis a estas temperaturas, demonstrando sensibilidade apenas quando temperaturas superiores a 75 °C foram empregadas.

3.4.2.7.3 Alterações na cor

Garnacho et al. (2012) sugeriram não haver alteração da cor de suco de laranja estocado por 10 dias tratado por 85 °C durante 10 min, tanto para o tratamento por micro-ondas quanto o convencional.

Cinquanta et al. (2010) por sua vez relataram diferenças na cor de acordo com a temperatura empregada para a pasteurização de suco de laranja por MW durante 5 min. Em temperaturas superiores (75 e 85) °C as amostras apresentaram variações na cor do suco de laranja em relação as tratadas a temperaturas mais amenas (60 e 70) °C em que este atributo ficou preservado.

Vikram; Ramesh e Prapulla (2005) relataram menor índice de degradação de cor (usualmente utilizada como índice do conteúdo de carotenoides) em suco de laranja tratado por processo assistido por micro-ondas quando comparado a outros métodos de aquecimento, como o convencional, ôhmico e infravermelho, mesmo em tempos longos de exposição ao aquecimento que variaram de (1 a 15) min dependendo da temperatura empregada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O diagrama a seguir descreve as etapas do processo de pasteurização assistida por micro-ondas e convencional de suco de laranja conduzidas no trabalho.

Figura 4.1 - Diagrama descritivo do procedimento experimental

Fonte: O próprio autor

Testes preliminares foram executados para se familiarizar com a metodologia e definir as condições de processo.

4.1 Testes preliminares

4.1.1 *Matéria-prima (laranjas)*

A extração de suco foi realizada em máquina extratora, marca FMC FRESH, de laranjas variedade Pera adquiridas no comércio, em fevereiro de 2014 (safra 2013/14, colheita em maio 2013 a fevereiro 2014), provenientes de diferentes fornecedores.

4.1.2 *Caracterização do suco de laranja*

As características físico-químicas do suco de laranja foram determinadas em duplicata de acordo com os seguintes métodos:

- pH, medido diretamente no pHStat (Radiometer, PHM290, França);
- Acidez titulável, expressa como ácido cítrico, conforme descrito no método 942.15 da AOAC (2005) em pHStat (Radiometer, PHM290, França), (g ácido cítrico/100 g);
- Teor de sólidos solúveis medido em refratômetro (CarlZeiss Jena, mod. I, Alemanha) e corrigido em relação à temperatura conforme método 315 /IV do IAL (2008); para valores de acidez superiores a 1 g/100 g, o teor de sólidos solúveis também deve ser corrigido, (°Brix);
- Teor de sólidos totais conforme descrito no método 920.151 da AOAC (2005) em estufa a vácuo sob pressão $\leq 13,3$ kPa (Marconi, MA 030, Brasil) e balança analítica (Chyo, JK 200, Japão), (g/100 g);
- Teor de cinzas conduzido em mufla (Quimis, Q318D24, Brasil) conforme método 018 /IV descrito em IAL (2008), (g/100 g);
- Teor de polpa segundo método descrito por KIMBALL (1991) em centrífuga (Tominaga, TD-65, Brasil), (g/100 g);
- Teor de ácido ascórbico (teor de vitamina C) por titulação, conforme método 365 /IV descrito em IAL (2008), (mg AA/100 mL);

- Atividade da enzima pectinametilesterase (PME) conforme descrito em ROUSE; ATKINS (1955) em pHStat (Radiometer, PHM290, França), (PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹).

Relações

- Relação teor de sólidos solúveis / acidez total calculada de acordo com o método 316 /IV descrito em IAL (2008);
- Teor de carboidratos conforme descrito por KIMBALL (1991) calculado de acordo com os sólidos solúveis da amostra (°Brix), (g carboidratos/mL);
- Rendimento calculado com base no suco extraído da fruta integral *in natura*, (g/100 g).

4.1.3 Análise da atividade enzimática da PME

Para medir a eficiência do processo a atividade da enzima PME foi determinada em duplicata, antes e após o processo, em todas as condições estudadas de acordo com o método apresentado no item 3.3.2.

O método descrito por Rouse e Atkins (1955) consiste na medida da quantidade de solução de hidróxido de sódio por titulação, necessária para manter o pH em 7,5, a 30 °C por 30 min, em razão da liberação de grupos carboxila decorrentes da hidrólise de ésteres metílicos da pectina, pela PME, de uma solução de pectina 1,0 g/100 g com 0,2 M de NaCl, adicionada de suco de laranja.

A unidade de PME (PEU) definida na eq.(1) foi expressa em função do teor de sólidos solúveis: PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹ (ROUSE; ATKINS, 1955).

A atividade residual da enzima foi calculada a partir da eq.(11)

$$\text{Atividade residual} = \frac{A}{A_0} \quad (11)$$

Em que: *A* é a atividade da enzima no suco de laranja tratado termicamente; e *A*₀ é a atividade enzimática no suco de laranja fresco sem tratamento.

$$\text{Inativação} = \left[1 - \left(\frac{A}{A_0} \right) \right] \times 100 \quad (12)$$

Em que: Inativação é dada em percentual em função da inativação enzimática

4.1.3.1 Fontes de pectina utilizadas para medição da atividade enzimática PME

Foram realizados testes com o intuito de avaliar a possibilidade de utilização de diferentes fontes de pectina para medição da atividade enzimática da PME. Foram testadas: pectina obtida no laboratório a partir de bagaço de laranja (subproduto do processamento de suco de laranja), pectina cítrica comercial de grau alimentício e pectina de grau analítico.

4.1.3.1.1 Pectina líquida obtida a partir do bagaço da laranja

A pectina líquida foi obtida conforme o método sugerido por McCreedy e McComb (1952). O processo de obtenção está mostrado na Figura 4.2.

Figura 4.2 - Processo de obtenção da pectina líquida a partir do bagaço da laranja: (a) bagaço triturado, (b) solução aquecida e (c) solução filtrada

Fonte: O próprio autor

O albedo presente no bagaço, proveniente do descarte da produção de suco de laranja em extratora FMC foi utilizado como matéria-prima. Foram mantidos o albedo e pequena quantidade de casca, porém as fibras da laranja e a parte central foram descartadas. Este bagaço (1 kg) foi triturado em processador de alimentos (Walita, Master Super, Brasil) até a obtenção de uma pasta homogênea. A esta pasta foram adicionado 1,8 kg de água e 100 mL de suco de limão, seguido de aquecimento a 70 °C por 30 min. Após filtração em coador de papel (Método, 103,

Brasil), o filtrado foi coletado em béquer e transferido para recipiente de vidro com tampa previamente esterilizado. Esta solução foi armazenada em geladeira a 15 °C para posterior uso.

4.1.3.1.2 Pectina em gel obtida a partir do bagaço da laranja

A pectina em forma de gel foi também obtida conforme McCready e McComb (1952), utilizando 250 g de albedo de laranja, 500 mL de água, 20 mL de suco de limão e álcool etílico para a formação de grumos. Após a extração da pectina líquida (conforme item 4.1.3.1.1), porções de 100 mL da solução foram colocadas dentro de um béquer com álcool etílico 92,8 °GL. A solução foi agitada com movimentos circulares até formar grumos. Os grumos formados foram retirados do béquer e colocados sobre peneiras, expostos ao sol para a evaporação do álcool e desidratação. Após esse processo de secagem dos grumos obteve-se um gel como pode ser visualizado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Processo de obtenção da pectina em gel a partir do bagaço da laranja

Fonte: O próprio autor

4.1.3.1.3 Pectina cítrica comercial DANISCO – RS400

Foram realizados experimentos com a pectina cítrica comercial Grindsted Pectin RS400 (DANISCO, Brasil) grau alimentício, com grau de metoxilação de 60 %.

4.1.3.1.4 Pectina cítrica comercial SIGMA – P9436

Foram realizados experimentos com pectina cítrica comercial SIGMA P-9436 (SIGMA-ALDRICH, EUA) grau analítico, com grau de esterificação entre (55 a 70) %.

4.1.3.2 *Medição da atividade enzimática segundo o método de Rouse e Atkins (1955)*

O método de Rouse e Atkins (1955) é o método clássico utilizado na literatura para medição de atividade enzimática da PME de sucos cítricos. As condições ideais para medição de atividade desta enzima, indicadas pelo método são: i) (1 a 5) mL de amostra de suco cítrico; ii) (10 a 50) mL de substrato (pectina cítrica) a concentração de 1 g/100 g de solução com 0,2 M NaCl; iii) ajuste rápido do pH da solução com a amostra para 7,5 através da adição de solução de NaOH 0,2 N; iv) manter o pH da solução em 7,5 durante a análise, por titulação com a adição de solução de NaOH 0,05 N; v) manter a temperatura durante a titulação em 30 °C; vi) o tempo da titulação é de até 30 min.

Da eq.(1) o tempo de reação, os volumes gastos e as concentrações das soluções são fatores que influenciam a determinação da atividade da enzima. Há na literatura estudos que empregam condições diferentes de pH, temperatura e tempo de reação estipulado pelo método de Rouse e Atkins (1955) (AGHAJANZADEH et al., 2016; ARMANJI et al, 2016; DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2015; SAMPEDRO; RODRIGO; HENDRICKX, 2008; VAN DEN BROECK et al., 1999a).

Sampedro; Rodrigo e Hendrickx (2008) determinaram a atividade enzimática da PME em pH 7,0; temperatura de 22 °C; volume de amostra de 2,5 mL; volume de solução de pectina de 30 mL; com período de reação variando entre 10 a 15 min. Aghajanzadeh et al. (2016) relataram a atividade da PME nas seguintes condições: pH 7,7; temperatura de 30 °C; volume de amostra de 5 mL; volume de solução de pectina de 20 mL; período de reação foi o tempo necessário para recuperar o pH 7,7. Demirdöven e Baysal (2015) mediram a atividade da PME em pH 7,0; temperatura 30 °C; volume de solução de pectina de 25 mL; sem especificar tempo máximo para o período de reação. Armanji et al., (2016) e Van den Broeck et al. (1999a) determinaram a atividade enzimática da PME em pH 7,0; temperatura de 22 °C; volume de amostra de 250 µL; volume de solução de pectina de 30 mL; com período de reação de 10 min.

Assim sendo, nos ensaios do estudo padronizado, a medição da atividade enzimática da PME foi realizada em pHStat (Radiometer, PHM290, França) com sistema automático de titulação acoplado ao banho de água termostático e

temperatura controlada (LAUDA, Eco Gold, Alemanha), com amostras de suco de laranja natural não processado e solução de 1 g/100 g de pectina SIGMA P-9436 (SIGMA-ALDRICH, EUA) grau analítico como substrato; com as seguintes condições de análise: temperatura = 30 °C; substrato = 25 mL de solução de pectina cítrica (de alto grau de metoxilação 55 a 77 %) a concentração de 1 g/100 g contendo 0,2 M de NaCl; pH da solução ajustado rapidamente através da adição de solução de NaOH 0,2 N até atingir pH 7,5 e mantido nestas condições por titulação com solução de NaOH 0,05 N. A diminuição de pH causada pela desesterificação dos grupos carboxílicos da solução de pectina pela PME durante a titulação foi registrada durante 15 min.

4.2 Estudo padronizado

Após o estudo realizado através dos testes preliminares, foram selecionadas as melhores condições de processamento e análises para uso no estudo padronizado que foi conduzido conforme Figura 4.1 a partir das seguintes condições:

4.2.1 *Matéria-prima (laranjas)*

Foram adquiridos três sacos de 20 kg de laranja da variedade Pera em julho de 2014 (safra 2014/15, colheita em maio 2014 a fevereiro 2015), do fornecedor Moises Henrique Sentinelo – ME. O lote, totalizando 60 kg, foi processado com intuito de padronizar a matéria-prima em um único lote, produzindo suco suficiente para todo o estudo evitando variações decorrentes de safra e colheita.

4.2.2 *Etapas da preparação e armazenamento do suco de laranja*

Após recepção, as laranjas foram lavadas, selecionadas e pesadas antes da extração do suco (Figura 4.4). O suco de laranja foi obtido em máquina extratora (FMC, Fresh'n squeeze®, USA). Seu princípio de extração permite a separação da casca e das partes internas da laranja, de forma que o óleo essencial da casca não se mistura ao suco.

Figura 4.4 - Processo de: (a) lavagem, (b) seleção e (c) envase do suco extraído

(a) lavagem das laranjas

(b) seleção das laranjas

(c) envase do suco extraído

Fonte: O próprio autor

O suco extraído foi envasado em garrafas PET de 300 mL e armazenado a - 22 °C em freezer horizontal (Consul, CHB42DB, Brasil).

4.2.3 Descongelamento

Previamente às etapas de caracterização e/ou processamento, o suco de laranja engarrafado passou pela etapa de descongelamento. As garrafas foram mergulhadas em banho de água a temperatura ambiente e mantidas nessa condição até que o suco fosse completamente descongelado.

4.2.4 Caracterização do suco de laranja

As características físico-químicas do suco de laranja foram determinadas em duplicata de acordo com os métodos descritos no item 4.1.2.

4.2.5 Análise da atividade enzimática da PME

A eficiência do processo foi determinada baseada na atividade residual da enzima PME antes e após o processo em todas as condições estudadas seguindo a metodologia descrita no item 4.1.3. utilizando a pectina cítrica comercial SIGMA – P9436 como substrato.

4.2.6 Processamento Térmico

O processamento térmico convencional e o assistido por micro-ondas foram conduzidos em batelada.

4.2.6.1 Tratamento térmico convencional em batelada (BT)

Foi conduzido em banho de água termostático (Marconi, MA-184, Brasil) exibido na Figura 4.5a, com temperatura estável e verificando a termo estabilidade da enzima em diferentes temperaturas. As embalagens de plástico de polietileno transparente, com gramatura 0,15 mm, foram previamente confeccionadas em formato retangular com três lados selados e uma abertura superior, nas dimensões de 2 cm de largura por 10 cm de altura, em seladora térmica (Framac, modelo 2000, Brasil), conforme método descrito por Aguiar; Yamashita e Gut (2012) exibidas na Figura 4.5b.

As embalagens plásticas, contendo 5 mL de amostra, foram submersas no banho de água termostático a temperatura desejada e mantida constante. O intervalo de temperatura testado foi de (40 a 95) °C, e o tempo de residência variou de (0 a 60) s.

Figura 4.5 - (a) banho de água termostático; (b) embalagens em polietileno (2x10) cm

Fonte: O próprio autor

A temperatura das amostras, em duplicata, foi registrada por um termopar tipo T, previamente calibrado (InstruTherm, modelo TH-060, Brasil). O tempo de residência foi considerado após a amostra atingir a temperatura desejada. As embalagens plásticas contendo as amostras foram agitadas manualmente de maneira constante durante todo o processamento. Depois de atingido o tempo de residência, a amostra foi retirada do banho e imersa imediatamente em banho de gelo por no mínimo 30 min (a fim de evitar a continuidade da degradação da pectina

presente na amostra pela PME), seguido de armazenamento a - 22 °C até posterior análise. O histórico da temperatura foi adquirido em tempo real pelo software interno do termopar InstruTherm e descarregado em computador para tratamento posterior.

4.2.6.2 *Tratamento térmico assistido por micro-ondas*

Nesta fase o procedimento experimental foi dividido em duas etapas: Nos testes preliminares (primeira etapa) fez-se uso de um digestor equipado com energia de micro-ondas por incidência unifocal para aquecimento do suco de laranja (item 4.2.6.2.1). No estudo padronizado (segunda etapa) fez-se uso de um reator de bancada (item 4.2.6.2.2) que utiliza energia de micro-ondas focalizadas e possui monitoramento interno de temperatura e potência para maior controle de processo em batelada.

4.2.6.2.1 Tratamento térmico por micro-ondas em digestor (MW)

O processo descontínuo foi conduzido em digestor de micro-ondas unifocal (CEM, Star System 2, EUA), mostrado na Figura 4.6. O digestor contém duas cavidades para introdução individual das amostras em frascos de vidro (comprimento: 310 mm, diâmetro: 41 mm) com volume de 20 mL. As amostras foram submetidas à incidência das micro-ondas em diferentes condições de temperatura e de tempo de exposição.

Figura 4.6 - (a) Forno de micro-ondas unifocal CEM, Star System 2; (b) Tubo de vidro inserido na cavidade

(a)

(b)

Fonte: O próprio autor

O digestor de micro-ondas focalizadas caracteriza-se por incidir de maneira não contínua, porém uniforme, as ondas de energia. Possui sensor interno de infravermelho para registro da temperatura da amostra. Através do painel de controle, localizado na parte externa frontal do equipamento, é possível programar e monitorar a temperatura e o tempo de processo. A partir desses parâmetros a incidência das micro-ondas é controlada internamente pelo equipamento e a aquisição de dados ocorre através do termômetro digital de fibra ótica (Luxtron, 812, EUA) com sensor (LumaSense, STF-1M, EUA).

O intervalo de temperatura estudado foi de (40 a 80) °C, a tempos de retenção entre (0 a 60) s. A amostra foi agitada manualmente de maneira constante durante todo o processamento através de bastão de vidro (1,0 x 30 cm) (Plena Lab, Brasil) inserido centralmente no tubo de vidro.

Assim como no processo convencional, após o tratamento, a amostra foi imersa imediatamente em banho de gelo por 30 min, seguida por congelamento a - 22 °C e mantida nestas condições até posterior análise.

4.2.6.2.2 Tratamento térmico por micro-ondas focalizadas em reator de síntese química e enzimática (WDsc)

Nesta etapa o processo descontínuo foi conduzido em reator de síntese química e enzimática de micro-ondas focalizadas (CEM, Discover, EUA), mostrado na Figura 4.7a. Neste reator a energia de micro-ondas é incidida de maneira unifocal, porém existe uma guia de onda circular, com sete fendas em volta da cavidade, por onde entram as micro-ondas (Figura 4.7b). Com isso, a cavidade apresenta uma homogeneidade de distribuição de micro-ondas quando comparada a de outros sistemas. Segundo o fabricante, o equipamento possui controle de temperatura interna a partir de sensor infravermelho e possui arrefecimento simultâneo mantendo temperaturas controladas no processo. Possui também monitoramento preciso de potência. Todo o processo é controlado e monitorado pelo software Synergy.

Figura 4.7 - (a) Reator de síntese química e enzimática por micro-ondas focalizadas CEM, Discover; (b) Representação da guia de onda circular e as sete fendas em vista superior

(a)

Fonte: <http://www.autoanalitica.com.br> (Set, 2015).

(b)

Fonte: Discover CEM Manual

A amostra, com volume de 15 mL, foi introduzida individualmente na cavidade do reator em tubo de ensaio de vidro (comprimento: 200 mm, diâmetro: 20 mm), e submetida à incidência das micro-ondas em diferentes condições de exposição, nos mesmos intervalos de tempo e temperatura empregados nos processos anteriores. O histórico de temperatura foi registrado pelo sistema interno do reator e também teve aquisição simultânea através do termômetro digital de fibra ótica (Luxtron, 812, EUA) com sensor (LumaSense, STF-1M, EUA).

A amostra foi agitada constantemente em agitador magnético durante todo o processamento através de barra magnética recoberta de teflon lisa (0,3 x 1,0 mm) (Synth, Brasil) inserida centralmente no tubo de ensaio.

Assim como nos processos anteriores, após aquecimento, a amostra foi imersa imediatamente em banho de gelo por 30 min, antes de congelamento e armazenamento a - 22 °C.

4.2.6.2.3 Tratamento térmico por micro-ondas focalizadas em reator de síntese química e enzimática em diferentes volumes (volumWDsc)

Nesta etapa o processo descontínuo foi conduzido no mesmo reator citado na Figura 4.7. As amostras, com volume de (15, 30, 50 e 100) mL, foram submetidas às

condições de incidência das micro-ondas com temperatura fixa em 80 °C e tempos de retenção entre (0 a 60) s.

4.2.6.3 Cinética de inativação da PME

Na Figura 4.8, o diagrama esquemático do procedimento de determinação dos parâmetros da cinética de inativação enzimática é apresentado.

Partindo do histórico da temperatura obtido de cada ensaio conduzido em batelada por aquecimento convencional ou micro-ondas, a letalidade do processo foi calculada por integração numérica (método de Simpson), adotando como valores de chutes iniciais os parâmetros de $z = 11$ °C, $D = 0,22$ s e temperatura de referência de 90 °C (VERSTEEG et al., 1980).

Para cada condição de processo testada, a partir do cálculo da letalidade integrada (F) a atividade residual da enzima (A/A_0) foi calculada. Do histórico de temperaturas e com os dados experimentais da atividade residual $(A/A_0)_{exp}$, foi possível, por meio de uma regressão não linear utilizando o método de Marquardt, no programa Statgraphics, obter as frações iniciais da isoformas termossensíveis (α) e as constantes de velocidades (k_1 e k_2) referentes às isoformas termossensíveis e termorresistentes, respectivamente conforme eq.(5) (TRIBESS; TADINI, 2006).

Desses valores obtidos (k_1 e k_2) foram calculados (D_1 e D_2) conforme a eq.(3) (TAJCHAKAVIT, RAMASWAMY, 1997b).

Novos valores para os parâmetros z , levando em conta as isoformas termolábil e termorresistente, foram considerados da literatura com o intuito de se ter um chute inicial mais preciso para o modelo multicomponente de duas frações. Os valores foram $z_1 = 10,8$ °C e $z_2 = 6,5$ °C (WICKER; TEMELLI, 1988).

Os parâmetros α , z_1 , z_2 , D_1 , D_2 (obtidos conforme descrito) foram usados como valores primários iniciais mais acurados para a regressão no modelo, e o método de solução GRG (Gradação Reduzida Generalizada) não linear foi aplicado com a função objetivo de minimizar a soma dos desvios médios quadrados entre os valores obtidos experimentalmente e os respectivos valores calculados pelo modelo por meio da eq.(10).

A eq.(10) (CHEN; WU, 1998), descrita para processos isotérmicos, serviu como base para a obtenção do modelo multicomponente descrito pela eq.(10) que pode ser aplicado para processos não isotérmicos, visto que este leva em consideração o cálculo de todo o tempo equivalente de processo obtido a partir do cálculo da letalidade integrada para cada isoforma conforme eq.(9) descrito por (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMI, 1997b).

A partir de iterações sucessivas o valor mínimo da soma da diferença da media quadrática dos desvios entre os valores experimentais e os calculados pelo modelo foi calculado com convergência de 0,0001 utilizando a ferramenta Solver do Programa Excel (Microsoft Office) (MATSUI et al., 2008).

Os valores de α , z_1 , z_2 , D_1 , D_2 obtidos da convergência foram considerados como os parâmetros finais da cinética da PME.

A qualidade da convergência foi verificada pelos gráficos de paridade entre os valores experimentais $\left(\frac{A}{A_0}\right)_{exp}$ e os calculados $\left(\frac{A}{A_0}\right)_{calc}$ da atividade residual.

4.2.7 Tratamento de dados

Os dados foram submetidos a tratamento estatístico usando o programa Statgraphics Centurion XVI v.16.1.15.

Análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos resultados para detectar diferenças significativas, no intervalo de confiança de 95 % e verificadas pelo teste de Tukey.

Figura 4.8 - Diagrama esquemático da determinação dos parâmetros da cinética de inativação enzimática.

1. VERSTEEG *et al.* (1980); 2. TRIBESS & TADINI (2006). 3. WICKER & TEMELLI (1988); 4. CHEN & WU (1998); 5. TAJCHAKAVIT & RAMASWAMY¹, (1997b).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do suco de laranja não processado

Os resultados dos testes físico-químicos do suco de laranja não processado estão apresentados na Tabela 5.1, e são similares aos da literatura para a variedade Pera. Esses resultados também são condizentes com os valores reportados por fabricantes da região de Jales – SP de onde as laranjas foram adquiridas (LUCATO, [ca. 2014]).

O rendimento do suco de laranja tanto para o lote de laranjas da safra 2013/14, quanto para o lote da safra 2014/15 são similares aos relatados por fabricantes da região (LUCATO, [ca. 2014]). Segundo o Programa brasileiro para a modernização da horticultura (2011), embora a legislação brasileira não estabeleça padrão mínimo para o rendimento de suco de laranja recomenda-se valor mínimo de 45 g/100 g para a comercialização de suco de boa qualidade.

Para o teor de vitamina C, valores similares aos relatados para a variedade Pera (Tabela 5.1) também foram descritos para a variedade *Navel*: (55,4±0,04) mg AA/100 mL (DERMIDÖVEN; BAYSAL, 2016) e (58,0±0,02) mg AA/100 mL (VILLAMIEL et al., 1998).

O teor de vitamina C do suco extraído do lote de laranjas da safra 2013/14 foi inferior ao obtido do suco extraído da safra 2014/15. Um dos fatores que pode ter influenciado este baixo teor de ácido ascórbico foi que as laranjas do primeiro lote foram adquiridas em Fevereiro de 2014 no final do período da safra 2013/14. Enquanto que as laranjas para o estudo padronizado foram adquiridas em Julho de 2014, no início do período da safra 2014/15). Esta tendência de laranjas colhidas no início de safra apresentar maiores teores de ácido ascórbico já foi observada por outros autores, e essa mesma tendência foi observada para os teores de acidez e sólidos solúveis, de acordo com a época da colheita (KIMBALL, 1991; NAGY, 1980; OLIVA, 2002).

Tabela 5.1- Teores de sólidos solúveis (SS), sólidos totais (ST), polpa (P), cinzas (C), pH, acidez titulável (AT), rendimento (R), vitamina C (vit C) e razão do suco de laranja não processado da variedade Pera de acordo com a safra e comparativo com valores reportados pela literatura

	O próprio autor Safra 2013/14	O próprio autor Safra 2014/15	SUGAI et al. (2002)	BADOLATO (2000)	ROUSE; ATKINS (1952)	BISCONSIN JR. et al. (2015)	SOUCI; FACHMANN ; KRAUT (1999)	LUCATO (2014)	Legislação BRASIL
pH	3,55 ± 0,01	3,63 ± 0,11	3,85 ± 0,06	3,44 a 4,40	3,2 a 4,1	4,18 ± 0,01			
AT ¹	0,680 ± 0,016	0,879 ± 0,073	0,65 ± 0,02	0,37 a 0,92		0,58±0,03		0,89	
SS (°Brix)	7,67 ± 0,20	10,28 ± 0,25	10,9±0,16			9,03±0,00		9,8	>10,5
ST (g/100 g)	8,12 ± 0,06	10,58 ± 0,21	11,4 ± 0,20	10,11 a 12,86					
P (g/100 g)	10,2 ± 0,24	14,5 ± 0,71	14,4 ± 0,62	13,63 a 19,00					
C (g/100 g)	0,201± 0,012	0,205± 0,012							
R (g/100 g)	52,6± 0,4	51,1± 0,2						54,2	45
vit C ²	23,8 ± 2,9	51,4 ± 3,6					36 a 50	48,5	25
Razão ³	11,29 ± 0,27	11,76 ± 0,96		11,92 a 33,62		15,57		11,00	>7,00

¹ expressa como (g de ác. cítrico/100 g)

² expressa como (mg AA/100 mL)

³ razão: (teor sólidos solúveis / acidez)

Ramalho (2005) comenta que a composição da laranja varia de acordo com a fase de desenvolvimento do fruto, e na terceira fase, (fruto completamente maduro) ocorre o desenvolvimento de sabores e odores específicos, bem como o aumento de açúcares e acidez. Neste trabalho, os resultados obtidos nos testes preliminares (safra 2013/14), com laranjas nitidamente mais verdes com teor de sólidos solúveis = $(7,67 \pm 0,20)$ °Brix e acidez titulável = $(0,680 \pm 0,016)$ g de ác. cítrico/100 g, indicaram um estágio de maturação inferior se comparado com os obtidos das laranjas do estudo padronizado (safra 2014/15), visivelmente mais amareladas, com o teor de sólidos solúveis = $(10,28 \pm 0,25)$ °Brix e acidez titulável = $(0,879 \pm 0,073)$ g de ác. cítrico/100 g, corroborando as afirmações de Ramalho (2005).

5.2 Atividade enzimática

5.2.1 Substrato

5.2.1.1 Testes preliminares

A solução de pectina, produzida do bagaço, apresentou atividade enzimática de $9,517 \times 10^{-6}$ PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹. A atividade residual da PME proveniente da pectina comercial RS400 (DANISCO, BRASIL) foi de $1,783 \times 10^{-6}$ PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹. A solução de pectina produzida no laboratório apresentou valor de atividade superior quando comparada às pectinas comerciais devido à presença da PME no flavedo e albedo do bagaço. Razão pela qual seu uso foi abandonado no estudo padronizado.

5.2.1.2 Estudo padronizado

No estudo padronizado, a pectina P9436 (SIGMA-ALDRICH, EUA) apresentou atividade residual da PME de $1,817 \times 10^{-6}$ PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹. Esta foi usada como substrato em todas as análises de determinação da atividade enzimática na fase de estudo padronizado por possuir padrão analítico de pureza e consequentemente garantir menos erros por interferências por atividade endógena da PME nas análises experimentais.

5.2.2 Medição da atividade enzimática

Para as medições da atividade enzimática no estudo padronizado o método com 15 min de tempo de reação, 4 mL de suco de laranja, 25 mL de solução de pectina a concentração de 1 g/100 g, com pH a 7,5 e 30 °C de temperatura foi o adotado.

5.2.3 Atividade enzimática do suco não processado

A atividade da PME obtido para o suco de laranja não processado, com teor de polpa de 10,17 g/100 g de laranjas da safra 2013/14 foi de $4,35 \times 10^{-2}$ PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹, enquanto que variou entre $(4,83 \text{ e } 6,25) \times 10^{-2}$ PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹ para o suco com teor de polpa de 14,5 g/100 g de laranjas da safra 2014/15.

Há que se ressaltar que uma amostra controle de suco não processado foi estocada com cada batelada processada. Assim sendo, a cada vez que o suco processado era analisado também uma amostra de suco não processado foi avaliada, sendo considerada A_0 para aquele experimento para compor a atividade residual de cada batelada. Este fato também proporcionou a possibilidade de avaliar a atividade da PME durante estocagem do suco congelado a – 22 °C.

A atividade da enzima pectinametilesterase geralmente é expressa na literatura com a unidade (PEU mL⁻¹), embora haja alguns autores que preferem apresentá-la em função do teor de sólidos solúveis do suco apresentado a unidade (PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹). O resultado da atividade enzimática está apresentado em ambas unidades no comparativo com a literatura na Tabela 5.2.

O suco de laranja com menor teor de polpa apresentou menor atividade enzimática. Este comportamento foi observado por Rouse (1953) que relatou maiores teores de atividade da PME nas vesículas de suco (conteúdo principal da polpa) seguida pela membrana, flavedo, albedo, sementes e suco.

Rouse e Atkins (1952) corroboram este comportamento descrevendo atividade enzimática mais baixa para suco com menor teor de polpa (5 g/100 g) (ROUSE; ATKINS, 1952).

Tabela 5.2 - Atividade enzimática (A_0), teor de polpa (P) e pH de suco de laranja não processado de acordo com a safra da laranja, em comparação com os dados da literatura

Autor	A_0 (PEU mL ⁻¹)	A_0 (PEU mL ⁻¹ °Brix ⁻¹)	P (g/100 g)	pH	Variedade
O próprio autor Safra 2013/14	$(4,35 \text{ a } 6,71) \times 10^{-3}$	$(4,33 \text{ a } 4,36) \times 10^{-2}$	10,2	3,6	Pera
O próprio autor Safra 2014/15	$(4,94 \text{ a } 6,71) \times 10^{-3}$	$(4,83 \text{ a } 6,25) \times 10^{-2}$	14,5	3,6	Pera
BADOLATO (2000)		$(0,30 \text{ a } 2,7) \times 10^{-3}$			Pera
TRIBESS; TADINI (2006)		$(0,20 \text{ a } 0,43) \times 10^{-3}$		3,6	Pera
BISCONSIN-JR. et al (2015)	$1,67 \times 10^{-3}$				Pera
ROUSE; ATKINS (1952)		$(3,31 \text{ a } 4,00) \times 10^{-2}$	10,0	4,1	Valência
ROUSE; ATKINS (1952)		$(1,72 \text{ a } 2,02) \times 10^{-2}$	5,0		Valência
ROUSE; ATKINS (1953)		$(5,41 \text{ a } 5,72) \times 10^{-2}$	10,0	3,8	Hamlin
ROUSE; ATKINS (1953)		$(3,62 \text{ a } 3,83) \times 10^{-2}$	10,0	3,8	Pineapple
SIO et al. (2001)	$5,0 \times 10^{-3}$				Sanguinello
VILLAMIEL et al. (1998)	$1,4 \times 10^{-3}$				Navel
INGALLINERA et al. (2005)	$3,7 \times 10^{-3}$				Navel

Para a variedade Pera, foram relatados por Bisconsin-Junior et al. (2015), valores para a atividade enzimática de suco de laranja não processado da mesma ordem de grandeza aos descritos no estudo padronizado safra 2014/15, porém menores valores foram descritos por Badolato (2000) e, por Tribess e Tadini (2006), conforme comparativo na Tabela 5.2. Essas variações podem estar associadas a fatores como: estágio de maturação, características físico químicas da fruta *in natura*; variedade da laranja e safra (AGHAJANZADEH; ZIAIIFAR, 2018; EAGERMAN; ROUSE, 1976; NEVES et al, 2011).

De acordo com Rouse (1953) a atividade enzimática da PME em suco de laranja fresco geralmente apresenta valores de $(1 \text{ a } 4) \times 10^{-2}$ PEU mL⁻¹ °Brix⁻¹ e o suco é considerado estável quando a atividade tem a magnitude de 10^{-4} PEU mL⁻¹ (EAGERMAN; ROUSE, 1976; ROUSE, 1953; SIO et al., 2001).

Segundo Irwe e Olsson (1994), o nível de inativação em sucos de laranja pasteurizados refrigerados é considerado aceitável se a atividade residual for igual ou menor do que 10 % da atividade inicial de PME no suco fresco.

5.3 Processo térmico convencional (BT)

Foram conduzidos ensaios a temperaturas entre (40 e 95) °C e o histórico da temperatura foi registrado através de termopar tipo T (Instrutherm, TH-060, Brasil); (a calibração realizada para o termopar está descrita no Apêndice A).

Na Figura 5.1, o histórico da temperatura obtido para o processamento térmico convencional a 70 °C é apresentado como exemplo.

Figura 5.1 - Histórico da temperatura durante o processamento térmico convencional (BT) em batelada do suco de laranja processado a 70 °C, em diferentes tempos

Fonte: O próprio autor

Para o experimento realizado a temperatura de 40 °C foi observado baixo grau de inativação, com valores entre (4 a 21) %, em comparação aos conduzidos em temperaturas superiores em que foi obtido grau de inativação entre (65 a 97) %.

Conforme apresentado na Figura 5.2 foi observado aumento da atividade da enzima até 20 s, o que pode ser explicada pelo fato desta faixa inicial de aquecimento ocorrer na temperatura ótima de atividade da PME que está entre (30 e 35) °C. Uhlig (1998) verificou uma faixa de temperatura ótima de atividade da PME entre 30 e 40 °C em pectinesterase comercial e atividade residual enzimática de 80 % a 50 °C. Assim sendo, os resultados obtidos para inativação a 40 °C não foram considerados para o ajuste do modelo de cinética de inativação.

Figura 5.2 - Atividade enzimática residual de suco de laranja em processo térmico convencional com temperatura de processo de 40 °C e respectivas barra de erros a 5 %

Fonte: O próprio autor

Na Tabela 5.3 pode ser observado que com o aumento da temperatura maior grau de inativação foi atingindo, como esperado.

Para suco com pH de 3,63 processado a 5 s de tempo de retenção a atividade da PME diminuiu de $(2,7 \text{ a } 1,4) \times 10^{-3} \text{ PEU mL}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{Brix}^{-1}$ resultando em grau de inativação de (95,3 a 97,5) % nas temperaturas entre (85,0 a 95,0) °C, respectivamente.

Valores similares foram relatados por Rouse e Atkins (1952) entre $(2,4 \text{ a } 0,3) \times 10^{-3} \text{ PEU mL}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{Brix}^{-1}$ e grau de inativação de (92,8 a 99,2) % para suco de laranja variedade Valência com pH de 3,6 nas temperaturas entre (85,0 a 96,0) °C.

Tabela 5.3 – Valores médios da atividade da enzima com seus respectivos desvios e grau de inativação em suco de laranja Pera tratado termicamente pelo processo convencional (BT) em batelada em diferentes binômios tempo-temperatura

T (°C)	t (s)	Atividade (PEU mL ⁻¹)	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$ (%)	T (°C)	t (s)	Atividade (PEU mL ⁻¹)	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$ (%)
NP	0	$5,86 \times 10^{-3} \pm 4,85 \times 10^{-4}$	0				
95	5	$1,01 \times 10^{-4} \pm 8,39 \times 10^{-6}$	97,5	70	5	$4,48 \times 10^{-4} \pm 3,71 \times 10^{-5}$	92,2
	10	$1,15 \times 10^{-4} \pm 9,05 \times 10^{-6}$	97,2		10	$3,63 \times 10^{-4} \pm 3,00 \times 10^{-5}$	93,7
	15	$1,01 \times 10^{-4} \pm 8,36 \times 10^{-6}$	97,5		15	$2,96 \times 10^{-4} \pm 2,45 \times 10^{-5}$	94,8
	20	$1,17 \times 10^{-4} \pm 9,67 \times 10^{-6}$	97,0		20	$3,55 \times 10^{-4} \pm 2,94 \times 10^{-5}$	93,7
	30	$1,11 \times 10^{-4} \pm 9,22 \times 10^{-6}$	97,1		30	$2,70 \times 10^{-4} \pm 2,24 \times 10^{-5}$	95,3
	60	$1,23 \times 10^{-4} \pm 1,02 \times 10^{-5}$	96,9		60	$2,97 \times 10^{-4} \pm 2,46 \times 10^{-5}$	94,8
90	5	$1,19 \times 10^{-4} \pm 9,84 \times 10^{-6}$	97,0	60	5	$1,54 \times 10^{-3} \pm 1,27 \times 10^{-4}$	72,4
	10	$1,40 \times 10^{-4} \pm 1,16 \times 10^{-5}$	96,4		10	$1,49 \times 10^{-3} \pm 1,23 \times 10^{-4}$	74,0
	15	$1,31 \times 10^{-4} \pm 1,08 \times 10^{-5}$	96,6		15	$1,98 \times 10^{-3} \pm 1,64 \times 10^{-4}$	65,2
	20	$1,02 \times 10^{-4} \pm 8,42 \times 10^{-6}$	97,4		20	$2,23 \times 10^{-3} \pm 9,23 \times 10^{-5}$	59,3
	30	$1,17 \times 10^{-4} \pm 9,67 \times 10^{-6}$	97,0		30	$9,98 \times 10^{-4} \pm 8,27 \times 10^{-5}$	81,7
	60	$1,17 \times 10^{-4} \pm 4,61 \times 10^{-5}$	97,0		60	$7,43 \times 10^{-4} \pm 6,16 \times 10^{-5}$	86,9
85	5	$1,88 \times 10^{-4} \pm 1,56 \times 10^{-5}$	95,3	50	5	$4,97 \times 10^{-3} \pm 4,12 \times 10^{-4}$	20,9
	10	$1,92 \times 10^{-4} \pm 1,59 \times 10^{-5}$	95,4		10	$5,02 \times 10^{-3} \pm 4,16 \times 10^{-4}$	17,2
	15	$1,84 \times 10^{-4} \pm 1,53 \times 10^{-5}$	95,4		15	$5,06 \times 10^{-3} \pm 4,19 \times 10^{-4}$	16,4
	20	$1,67 \times 10^{-4} \pm 1,38 \times 10^{-5}$	96,0		20	$4,95 \times 10^{-3} \pm 4,10 \times 10^{-4}$	16,5
	30	$1,16 \times 10^{-4} \pm 9,60 \times 10^{-6}$	97,3		30	$4,34 \times 10^{-3} \pm 3,60 \times 10^{-4}$	30,7
	60	$8,50 \times 10^{-5} \pm 7,04 \times 10^{-6}$	97,9		60	$3,87 \times 10^{-3} \pm 3,21 \times 10^{-4}$	37,1
80	5	$2,98 \times 10^{-4} \pm 2,47 \times 10^{-5}$	94,8				
	10	$2,90 \times 10^{-4} \pm 2,40 \times 10^{-5}$	94,9				
	15	$2,93 \times 10^{-4} \pm 2,42 \times 10^{-5}$	94,7				
	20	$3,23 \times 10^{-4} \pm 2,68 \times 10^{-5}$	94,3				
	30	$2,93 \times 10^{-4} \pm 2,43 \times 10^{-5}$	94,8				
	60	$3,64 \times 10^{-4} \pm 3,01 \times 10^{-5}$	93,6				

Fonte: O próprio autor

Um exemplo da curva de inativação térmica está apresentado na Figura 5.3, para a temperatura de processo a 70 °C com a indicação da presença das duas isoformas da PME, em que tanto a fração termolábil quanto a termorresistente tem contribuições distintas. Conforme esperado, a fração termolábil é inativada em tempos menores. O mesmo comportamento foi observado nas demais temperaturas, com exceção à temperatura de 40 °C como já foi comentado.

Figura 5.3 - Atividade enzimática residual da PME em função do tempo de processo equivalente com T_{ref} a 90 °C ($F_{90^{\circ}\text{C}}$) em suco de laranja processado pelo processo convencional a 70 °C, correspondente a isoforma termolábil (F_1) e a termorresistente (F_2)

Fonte: O próprio autor

Os valores dos tempos equivalentes F_1 (s) e F_2 (s) para cada condição de temperatura – tempo de retenção, (seguindo modelo cinético e diagrama de cálculo descrito no item 4.2.6.3) estão apresentados na Tabela 5.4. Para a temperatura de 95 °C e tempo de retenção de 5 s, os valores de tempo equivalente de processo isotérmico a $T_{ref} = 90$ °C ($F_{90^{\circ}\text{C}}$) para as duas isoformas foram calculados do histórico da temperatura. Para a mais termossensível (F_1) o valor foi de 22,0 s e para a mais termorresistente (F_2) foi de 22,9 s. Nestas condições a atividade residual medida foi de $2,51 \times 10^{-2}$ e assim sucessivamente.

A qualidade do ajuste dos dados pode ser verificada tanto pela curva quanto pelo gráfico de paridade entre os dados experimentais e os calculados pelo modelo representado na Figura 5.4. O eixo F (s) do gráfico do modelo é apenas representativo, pois expressa ambas as frações F_1 e F_2 (s).

Tabela 5.4 – Letalidade da isoforma termolábil (F_1) e termorresistente (F_2); atividade residual enzimática da PME em suco de laranja tratado termicamente por processo convencional (BT) em batelada obtida experimentalmente $(A/A_0)_{exp}$; a calculada pelo modelo $(A/A_0)_{calc}$; e o respectivo desvio entre ambas

T (°C)	t (s)	F_1 (s)	F_2 (s)	$(A/A_0)_{exp}$	$(A/A_0)_{calc}$	Desvio
95	5	22,0	22,9	$2,51 \times 10^{-2}$	$4,27 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-4}$
	10	49,4	46,7	$2,79 \times 10^{-2}$	$2,43 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-5}$
	15	60,7	57,6	$2,51 \times 10^{-2}$	$1,88 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-5}$
	20	69,4	63,4	$2,98 \times 10^{-2}$	$1,64 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-4}$
	30	77,0	70,7	$2,85 \times 10^{-2}$	$1,38 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-4}$
	60	120,4	109,5	$3,14 \times 10^{-2}$	$5,48 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-4}$
90	5	16,8	22,4	$3,00 \times 10^{-2}$	$4,32 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-4}$
	10	21,6	27,4	$3,64 \times 10^{-2}$	$3,84 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-6}$
	15	20,4	27,0	$3,40 \times 10^{-2}$	$3,87 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-5}$
	20	26,4	33,0	$2,56 \times 10^{-2}$	$3,36 \times 10^{-2}$	$6,4 \times 10^{-5}$
	30	32,2	39,5	$2,99 \times 10^{-2}$	$2,88 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-6}$
	60	52,9	62,7	$2,99 \times 10^{-2}$	$1,66 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-4}$
85	5	6,4	11,7	$4,71 \times 10^{-2}$	$5,58 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-5}$
	10	6,2	11,5	$4,63 \times 10^{-2}$	$5,59 \times 10^{-2}$	$9,3 \times 10^{-5}$
	15	8,6	14,7	$4,58 \times 10^{-2}$	$5,19 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-5}$
	20	11,2	18,7	$3,96 \times 10^{-2}$	$4,72 \times 10^{-2}$	$5,7 \times 10^{-5}$
	30	13,6	22,8	$2,74 \times 10^{-2}$	$4,29 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-4}$
	60	23,6	37,7	$2,13 \times 10^{-2}$	$3,01 \times 10^{-2}$	$7,8 \times 10^{-5}$
80	5	3,4	8,2	$5,20 \times 10^{-2}$	$6,05 \times 10^{-2}$	$7,2 \times 10^{-5}$
	10	4,9	11,4	$5,10 \times 10^{-2}$	$5,61 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-5}$
	15	5,5	12,7	$5,25 \times 10^{-2}$	$5,44 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-6}$
	20	4,2	9,8	$5,71 \times 10^{-2}$	$5,83 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-6}$
	30	7,4	16,7	$5,15 \times 10^{-2}$	$4,95 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-6}$
	60	12,7	27,1	$6,40 \times 10^{-2}$	$3,86 \times 10^{-2}$	$6,4 \times 10^{-4}$
70	5	0,6	2,8	$7,83 \times 10^{-2}$	$7,37 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-5}$
	10	0,7	3,0	$6,34 \times 10^{-2}$	$7,13 \times 10^{-2}$	$6,2 \times 10^{-5}$
	15	0,9	3,6	$5,23 \times 10^{-2}$	$6,79 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-4}$
	20	1,0	4,2	$6,27 \times 10^{-2}$	$6,66 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-5}$
	30	1,3	5,2	$4,75 \times 10^{-2}$	$6,50 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-4}$
	60	2,6	9,6	$5,23 \times 10^{-2}$	$5,85 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-5}$
60	5	0,10	1,0	$2,76 \times 10^{-1}$	$4,36 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{-2}$
	10	0,13	1,2	$2,60 \times 10^{-1}$	$3,69 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-2}$
	15	0,17	1,5	$3,48 \times 10^{-1}$	$2,70 \times 10^{-1}$	$6,1 \times 10^{-3}$
	20	0,19	1,7	$4,39 \times 10^{-1}$	$2,46 \times 10^{-1}$	$3,7 \times 10^{-2}$
	30	0,23	2,0	$1,83 \times 10^{-1}$	$1,88 \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-5}$
	60	0,40	3,3	$1,31 \times 10^{-1}$	$9,46 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-3}$

continua

T (°C)	t (s)	F_1 (s)	F_2 (s)	(A/A_o) exp	(A/A_o) calc	Desvio
50	5	0,016	0,28	$7,91 \times 10^{-1}$	$8,78 \times 10^{-1}$	$7,6 \times 10^{-3}$
	10	0,020	0,34	$8,28 \times 10^{-1}$	$8,51 \times 10^{-1}$	$5,6 \times 10^{-4}$
	15	0,025	0,42	$8,36 \times 10^{-1}$	$8,16 \times 10^{-1}$	$4,1 \times 10^{-4}$
	20	0,027	0,46	$8,35 \times 10^{-1}$	$8,00 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-3}$
	30	0,040	0,66	$6,93 \times 10^{-1}$	$7,24 \times 10^{-1}$	$9,6 \times 10^{-4}$
	60	0,071	1,13	$6,29 \times 10^{-1}$	$5,66 \times 10^{-1}$	$3,9 \times 10^{-3}$

Fonte: O próprio autor

Figura 5.4 - Atividade enzimática residual da PME em função do tempo de processo equivalente (T_{ref} a 90 °C) em suco de laranja processado pelo tratamento térmico convencional, correspondente a isoforma termolábil (F_1) e a termorresistente (F_2)

Fonte: O próprio autor

Os parâmetros da cinética de inativação da PME, obtidos no ajuste final do modelo multicomponente de cinética de 1ª ordem, para cada temperatura estudada considerando $T_{\text{ref}} = 90\text{ °C}$, estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Parâmetros obtidos para o modelo da cinética de inativação de PME em suco de laranja no processo térmico convencional (BT). Os valores de z_1 e z_2 são válidos para o intervalo de temperatura entre (50 e 95) °C

T_{ref} (°C)	α	z_1 (°C)	z_2 (°C)	D_1 (s)	D_2 (s)
90	0,93	13,1	21,7	0,258	97,1

Fonte: O próprio autor

Os valores de D e z reportados na literatura para tratamento térmico em suco de laranja tem variação relacionada com: as diferentes isoformas presentes (JOLIE et al., 2010), propriedades físico-químicas do suco e grau de maturação do fruto (AGHAJANZADEH; ZIAIIFAR, 2018), variedade da laranja (EAGERMAN; ROUSE, 1976), pH do suco (TRIBESS; TADINI, 2006) e condições de processo empregadas (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a).

Eagerman e Rouse (1976) reportaram valores de z entre (8,7 a 12,2) °C dependendo da variedade de laranja em suco com pH de 4,1.

Sio et al. (2001) por sua vez relataram valor z de 16,4 °C no intervalo de temperatura entre 85 a 95 °C para o tratamento térmico de suco de laranja da variedade *Sanguinello*.

Tajchakavit e Ramaswamy (1997b) relataram valores de z_1 de 17,6 °C para as frações termossensíveis da PME e z_2 de 31,1 °C para as frações termorresistentes em suco de laranja reconstituído (10 °Brix) aplicando tratamento térmico em batelada.

Wicker e Temelli (1988) encontraram valores de $D_1 = 0,225\text{ s}$ e $D_2 = 32,3\text{ s}$ a 90 °C, com $z_1 = 10,8\text{ °C}$ e $z_2 = 6,5\text{ °C}$ para as frações termolábil e termorresistente, respectivamente. Os autores relataram valores de D_1 entre (0,225 a 137,9) s e D_2 entre (32,3 e valores superiores a 174) s para as frações termolábil e termorresistente, respectivamente no intervalo de temperatura entre (60 a 90) °C, conforme pode ser verificado na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Valores D e z obtidos da cinética de inativação da PME em suco de laranja processado por tratamento térmico convencional comparados aos relatados na literatura

T (°C)	D_1 (s)	D_2 (s)	D_1 (s)	D_2 (s)	D_1 (s)	D_2 (s)	D_1 (s)	D_2 (s)
95	0,108	57,1	-	-	-	-	-	-
90	0,258	97,1	6,3	33,0	2,85	109,3	0,225	32,3
85	0,621	165	22,1	270	6,53	328,9	0,650	173,5
80	1,49	283	70,4	1809	8,45	892,8	1,89	> 174
75	-	-	204,8	14438	-	-	-	-
70	8,61	813	-	-	37,2	1200	15,97	> 174
65	-	-	-	-	-	-	41,52	> 174
60	49,7	1382	-	-	60	154	137,9	> 174
50	287	6801	-	-	-	-	-	-
z (°C)	13,1	21,7	5,75	9,92	17,6	31,1	10,8	6,5
O próprio autor			Lee et al. (2003)		Tajchakavit; Ramaswamy (1997b)		Wicker; Temelli (1988)	

Em que: os índices 1 e 2 se referem as frações termossensível e termorresistente, respectivamente.

Neste trabalho os valores de D_1 e z_1 obtidos a 90 °C para a isoforma termossensível são da mesma ordem de grandeza aos citados por Wicker e Temelli (1988) as variações se devem a variabilidade da matéria prima e condições.

Tribess e Tadini (2006) relatam valores de $D_1 = 0,565$ s e $D_2 = 1152,0$ s a 87,5 °C com $\alpha = 0,996$ para suco de laranja variedade Pera com pH de 3,6 e valores de $D_1 = 3,10$ s e $D_2 = 2303$ s a 87,5 °C com $\alpha = 0,998$ para valores de pH de 4,1.

Os autores também correlacionaram o pH inicial do suco à cinética de inativação da PME e relataram que em pH de 3,6 foram atingidas inativações maiores e mais rápidas em relação ao pH de 3,8. A mesma dinâmica foi relatada por Rouse e Atkins (1952) entre os pHs 3,2 e 4,1.

Versteeg et al. (1980) obtiveram 5 % do conteúdo da isoforma termorresistente, enquanto Rombouts et al. (1982) relataram 7 % e Tajchakavit e Ramaswamy (1995) em 8 % da fração total de PME, mesma ordem de grandeza obtida neste estudo, de 7 % da fração termorresistente a 90 °C.

Lee et al. (2003) relataram as frações de PME termorresistente e termolábil nos valores de (6,6 e 93,4) %, respectivamente, da atividade total enzimática em suco de laranja tratado por aquecimento convencional nas temperaturas entre (75 e 90) °C. Valores similares aos encontrados neste trabalho que representam

(7 e 93) % das isoformas termorresistente e termolábil, respectivamente com temperaturas entre (50 e 95) °C.

5.4 Processo térmico por micro-ondas

5.4.1 Testes preliminares

Exemplos das curvas do histórico da temperatura obtidos nos testes preliminares no processo assistido por micro-ondas em digestor CEM Star 2 estão apresentados na Figura 5.5.

Figura 5.5 - Histórico da temperatura no suco de laranja durante o processamento térmico por micro-ondas em digestor CEM Star 2 em diferentes temperaturas (70, 75, 85 e 95) °C com tempo de retenção de 5 s

Fonte: O próprio autor

Na Tabela 5.7, os valores de F (s) foram calculados utilizando o modelo de cinética de 1ª ordem de apenas um componente com $T_{ref} = 90$ °C, $z = 11$ °C e $D = 0,22$ s conforme Versteeg et al. (1980). Foi possível verificar experimentalmente que à temperaturas menores a atividade residual da enzima foi maior, como esperado.

Tabela 5.7 - Atividade enzimática residual da PME e letalidade integrada a $T_{ref} = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ com $z = 11\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $D = 0,22\text{ s}$ em suco de laranja para o processo de pasteurização assistido por micro-ondas em digestor CEM Star 2 entre (40 a 95) $^{\circ}\text{C}$ com tempo de retenção de 5 s

T ($^{\circ}\text{C}$)	F (s)	(A/A_0)
95	154,4	$4,19 \times 10^{-2}$
85	97,5	$7,44 \times 10^{-2}$
75	66,3	$1,12 \times 10^{-1}$
70	62,4	$1,34 \times 10^{-1}$
50	42,3	$5,35 \times 10^{-1}$
40	41,6	$9,35 \times 10^{-1}$

Fonte: O próprio autor

5.4.1.1 *Tratamento térmico assistido por micro-ondas em digestor CEM Star System 2 (MW)*

Na Figura 5.6 exemplos de histórico da temperatura registrada pelo sensor infravermelho do digestor de micro-ondas CEM Star System 2 são mostrados. A calibração para o sensor IR está apresentada no Apêndice A.

Os resultados obtidos experimentalmente para a atividade residual enzimática e respectivo grau de inativação estão apresentados na Tabela 5.8. A qualidade da iteração e do ajuste do modelo aos dados experimentais está apresentada na curva e no gráfico de paridade representados na Figura 5.7.

Alguns dos desafios encontrados durante o uso do digestor de micro-ondas para a pasteurização de suco de laranja foi alcançar a temperatura máxima estipulada e manter a mesma durante o tempo de retenção. Devido ao difícil controle da taxa de aquecimento inicial no digestor o perfil do histórico de temperaturas do processo geralmente apresentava picos de temperaturas com máximas acima da estabelecida inicialmente.

Assim sendo, devido às incertezas, difícil controle de temperatura e potência e aos impedimentos para obter as condições ideais para o processamento da pasteurização do suco de laranja através do uso do digestor de micro-ondas CEM Star 2, o uso desse equipamento foi descontinuado.

Figura 5.6 - Histórico da temperatura durante o processamento térmico assistido por micro-ondas no suco de laranja processado a 70 °C em digestor CEM Star System 2, em diferentes tempos de retenção

Fonte: O próprio autor

Tabela 5.8 - Atividade residual enzimática experimental da PME e respectivo grau de inativação em suco de laranja Pera após processo térmico assistido por micro-ondas (MW) em digestor

T (°C)	t (s)	Atividade (PEU mL ⁻¹)	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$ %	T (°C)	t (s)	Atividade (PEU mL ⁻¹)	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$ %
NP	0	$5,86 \times 10^{-3} \pm 4,85 \times 10^{-4}$	0				
80	5	$1,41 \times 10^{-4} \pm 1,17 \times 10^{-5}$	96,0	50	5	$4,35 \times 10^{-3} \pm 3,60 \times 10^{-4}$	26,4
	10	$7,00 \times 10^{-5} \pm 1,16 \times 10^{-5}$	98,0		10	$4,30 \times 10^{-3} \pm 3,56 \times 10^{-4}$	27,5
	15	$1,18 \times 10^{-4} \pm 9,74 \times 10^{-6}$	96,7		15	$3,90 \times 10^{-3} \pm 3,23 \times 10^{-4}$	34,0
	20	$1,24 \times 10^{-4} \pm 1,03 \times 10^{-5}$	96,5		20	$3,70 \times 10^{-3} \pm 3,07 \times 10^{-4}$	37,1
	30	$1,44 \times 10^{-4} \pm 1,19 \times 10^{-5}$	96,0		30	$3,45 \times 10^{-3} \pm 2,86 \times 10^{-4}$	39,9
	60	$1,14 \times 10^{-4} \pm 9,46 \times 10^{-6}$	96,8		60	$3,25 \times 10^{-3} \pm 2,69 \times 10^{-4}$	44,3
70	5	$2,78 \times 10^{-4} \pm 2,30 \times 10^{-5}$	92,6				
	10	$1,77 \times 10^{-4} \pm 1,47 \times 10^{-5}$	95,1				
	15	$1,71 \times 10^{-4} \pm 1,42 \times 10^{-5}$	95,3				
	20	$8,50 \times 10^{-5} \pm 1,41 \times 10^{-5}$	97,7				
	30	$1,04 \times 10^{-4} \pm 1,73 \times 10^{-5}$	97,3				
	60	$1,03 \times 10^{-4} \pm 1,71 \times 10^{-5}$	97,2				

Fonte: O próprio autor

Figura 5.7 - Atividade enzimática residual da PME em função do tempo de processo equivalente a 90 °C ($F_{90^{\circ}\text{C}}$) em suco de laranja processado por micro-ondas (MW) a (50, 70 e 80) °C, correspondente a isoforma termolábil (F_1) e a termorresistente (F_2) e o respectivo gráfico da paridade

5.4.2 Estudo padronizado

5.4.2.1 Tratamento térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada CEM Discover (WDsc)

O processamento térmico assistido por micro-ondas focalizadas para o estudo padronizado foi realizado em reator de bancada (CEM, Discover, EUA) com temperaturas entre (40 e 90) °C registradas por sensor de fibra ótica (FO) inserido na amostra. A mistura da amostra foi realizada por agitador magnético através de barra magnética inserida centralmente no tubo de ensaio. A calibração para o sensor FO está apresentada no Apêndice A.

A fim de evitar o mesmo problema de picos de temperatura máxima enfrentado no digestor de micro-ondas, devido ao controle instável da taxa de aquecimento, diferentemente no reator de micro-ondas focalizadas o aquecimento foi realizado com controle de potência através de dois estágios no software Synergy do reator de bancada.

No primeiro estágio a taxa rápida de aquecimento foi controlada através da emissão de uma potência mais alta (300 W) resultando no aumento rápido da temperatura. À medida que a temperatura se aproximava da máxima estipulada o segundo estágio era acionado em que uma potência baixa foi emitida (30 W) durante um tempo estipulado, o que permitia que o sistema mantivesse a temperatura atingida durante o tempo de retenção. Após o término do tempo de retenção a emissão da potência era desligada e o sistema passava para uma fase de arrefecimento. Com este protocolo foi possível gerar históricos de temperatura mais próximos ao perfil ideal isotérmico (com rápido aquecimento e resfriamento).

O histórico de temperaturas exibidos na Figura 5.8 é um comparativo para o mesmo processo gerado a 80 °C por 20 s. Na curva “auto” a taxa de aquecimento foi gerada automaticamente pelo equipamento sem o controle por estágios e na curva “em fases” a taxa foi limitada pelo protocolo descrito.

Figura 5.8 – Comparativo do histórico de temperatura do mesmo processo realizado em reator de micro-ondas a 80 °C obtido sob controle automático e obtido por fases de aquecimento

Fonte: O próprio autor

É possível verificar que o processo em fases (aquecimento em estágios) atingiu perfis com patamares de máxima temperatura com menor variação do que aqueles obtidos pelo processo automático.

Esta diferença na geração dos históricos de temperatura pode ter sido um dos fatores que influenciou positivamente na inativação enzimática superior obtida no processo realizado a 80 °C quando comparado aquele efetuado a 90 °C, segundo Tabela 5.9. Pois o processo a 90 °C foi a único realizado com taxa de aquecimento automática sem o uso do protocolo com estágios descrito anteriormente.

O histórico de temperaturas apresentado na Figura 5.9 é um exemplo dos perfis gerados pelo protocolo com estágios registrado pelo sensor de fibra ótica para o processo assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada a 80 °C com diferentes tempos.

Figura 5.9 - Histórico da temperatura durante o processamento térmico de suco de laranja assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada CEM Discover (WDsc) a 80 °C, em diferentes tempos

Fonte: O próprio autor

Os dados experimentais de atividade residual da PME, assim com os graus de inativação, estão apresentados na Tabela 5.9 para cada tempo e temperatura estudados.

Tabela 5.9 - Atividade residual da enzima PME com respectivos desvios e grau de inativação em suco de laranja variedade Pera após processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc)

T (°C)	t (s)	Atividade (PEU mL ⁻¹)	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$ (%)	T (°C)	t (s)	Atividade (PEU mL ⁻¹)	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$ (%)
NP	0	$5,86 \times 10^{-3} \pm 4,85 \times 10^{-4}$	0				
90	5	$3,68 \times 10^{-4} \pm 3,05 \times 10^{-5}$	93,8	60	5	$6,39 \times 10^{-4} \pm 5,29 \times 10^{-5}$	89,1
	10	$2,05 \times 10^{-4} \pm 1,70 \times 10^{-5}$	96,5		10	$4,78 \times 10^{-4} \pm 3,96 \times 10^{-5}$	91,9
	15	$1,68 \times 10^{-4} \pm 1,39 \times 10^{-5}$	97,1		15	$3,84 \times 10^{-4} \pm 3,19 \times 10^{-5}$	93,2
	20	$1,47 \times 10^{-4} \pm 1,22 \times 10^{-5}$	97,5		20	$3,71 \times 10^{-4} \pm 3,08 \times 10^{-5}$	93,6
	30	$1,38 \times 10^{-4} \pm 1,14 \times 10^{-5}$	97,7		30	$3,59 \times 10^{-4} \pm 2,98 \times 10^{-5}$	93,8
	60	$1,23 \times 10^{-4} \pm 1,02 \times 10^{-5}$	97,9		60	$2,12 \times 10^{-4} \pm 1,75 \times 10^{-5}$	96,4
80	5	$1,44 \times 10^{-4} \pm 1,19 \times 10^{-5}$	97,6	50	5	$3,21 \times 10^{-3} \pm 2,66 \times 10^{-4}$	45,5
	10	$1,28 \times 10^{-4} \pm 1,06 \times 10^{-5}$	97,8		10	$2,30 \times 10^{-3} \pm 1,91 \times 10^{-4}$	60,9
	15	$7,79 \times 10^{-5} \pm 6,46 \times 10^{-6}$	98,7		15	$1,95 \times 10^{-3} \pm 1,61 \times 10^{-4}$	66,9
	20	$5,23 \times 10^{-5} \pm 4,33 \times 10^{-6}$	99,1		20	$1,61 \times 10^{-3} \pm 1,33 \times 10^{-4}$	72,7
	30	$5,83 \times 10^{-5} \pm 4,83 \times 10^{-6}$	99,0		30	$1,04 \times 10^{-3} \pm 8,61 \times 10^{-5}$	82,5
	60	$5,58 \times 10^{-5} \pm 4,63 \times 10^{-6}$	99,1		60	$1,03 \times 10^{-3} \pm 8,51 \times 10^{-5}$	82,6
70	5	$3,18 \times 10^{-4} \pm 2,64 \times 10^{-5}$	94,6				
	10	$3,83 \times 10^{-4} \pm 3,17 \times 10^{-5}$	93,5				
	15	$3,50 \times 10^{-4} \pm 2,90 \times 10^{-5}$	94,1				
	20	$3,24 \times 10^{-4} \pm 2,69 \times 10^{-5}$	94,5				
	30	$4,63 \times 10^{-4} \pm 3,84 \times 10^{-5}$	92,1				
	60	$3,47 \times 10^{-4} \pm 2,88 \times 10^{-5}$	94,1				

Fonte: O próprio autor

Na literatura não há estudos que comparam os resultados de inativação da PME em condições similares às conduzidas neste trabalho. Os relatos encontrados envolvendo aplicação de micro-ondas em suco de laranja para inativação de PME fazem uso de sistemas com fluxo contínuo (DERMIDOVEN; BAYSAL, 2016; NIKDEL et al., 1993; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1995; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b; VILLAMIEL et al., 1998); e os trabalhos realizados em batelada (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997a; CINQUANTA et al., 2010), embora descrevam a existência de duas isoformas da PME com resistências térmicas diferente, referem apenas um valor para os parâmetros cinéticos D e z .

Nikdel et al. (1993) apresentam percentuais de inativação de: 98,5 % a 75 °C, e 99,0 % a 90,5 °C para os ensaios realizados a 15 s; e de 98,7 % a 87 °C e 99 % a 85 °C para os ensaios realizados a 10 s.

Cinquanta et al. (2010) relataram redução da atividade enzimática de $1,4 \times 10^{-4}$ PEU mL⁻¹ para $5,5 \times 10^{-5}$ PEU mL⁻¹ atingindo inativação de 60,7 % para a PME após tratamento assistido por micro-ondas em batelada a 70 °C durante 1 min para suco de laranja, valores inferiores aos encontrados neste estudo que em condições similares alcançou 94,1 % de inativação a 70 °C em 1 min.

Villamiel et al. (1998) relatam inativação da PME de 97,5 % para tratamento de suco de laranja assistido por micro-ondas em fluxo contínuo de 98,0 mL min⁻¹ a 24 s a 89,7 °C, e grau de inativação de 98,8 % em fluxo de 87,2 mL min⁻¹ a 96,4 °C por 27 s.

Math et al. (2014) citaram atividade da PME ser reduzida de $9,83 \times 10^{-3}$ PEU mL⁻¹ para $1,87 \times 10^{-3}$ PEU mL⁻¹ após aquecimento em fluxo contínuo assistido por micro-ondas com as condições de: fluxo de 250 mL min⁻¹, temperatura de 95 °C e tempo de retenção de (20 a 30) s atingindo 81,0 % de inativação para sucos de cenoura e beterraba.

Quando comparando resultados citados pela literatura com os resultados obtidos no estudo padronizado (WDsc) de uma maneira ampla, percebe-se que maior grau de inativação foi atingido a temperaturas mais brandas. Ou seja, no processo a 60 °C foi obtida inativação de 89,1 % a 5 s e de 91,9 % a 10 s, e para o processo a 80 °C foi atingido 99,1 % a 20 s.

O ajuste do modelo cinético de 1ª ordem com dois componentes aos dados experimentais foi realizado conforme descrito no item 4.2.6.3. Os valores obtidos para F_1 e F_2 referente às isoformas termossensível e termorresistente, respectivamente; e a atividade residual calculada pelo modelo para cada condição de temperatura – tempo de retenção, estão apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Letalidade da isoforma termolábil (F_1) e termorresistente (F_2); atividade residual enzimática da PME em suco de laranja tratado termicamente por processo assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc) obtida experimentalmente e a calculada pelo modelo de dois componentes; e o respectivo desvio entre ambas

T (°C)	t (s)	F_1 (s)	F_2 (s)	(A/A_0) exp	(A/A_0) calc	Desvio
NP	0	0	0	1,00	1,00	
90	5	22,8	30,8	$6,24 \times 10^{-2}$	$3,04 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-3}$
	10	30,7	42,1	$3,52 \times 10^{-2}$	$2,49 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-4}$
	15	54,1	60,2	$2,85 \times 10^{-2}$	$1,81 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-4}$
	20	33,1	43,9	$2,50 \times 10^{-2}$	$2,41 \times 10^{-2}$	$7,4 \times 10^{-7}$
	30	41,6	56,1	$2,34 \times 10^{-2}$	$1,95 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-5}$
	60	50,6	74,7	$2,10 \times 10^{-2}$	$1,40 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-5}$
80	5	9,5	16,6	$2,45 \times 10^{-2}$	$3,91 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-4}$
	10	16,8	25,9	$2,18 \times 10^{-2}$	$3,31 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-4}$
	15	21,5	31,1	$1,32 \times 10^{-2}$	$3,03 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-4}$
	20	33,5	44,3	$8,88 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-4}$
	30	39,5	52,4	$9,91 \times 10^{-3}$	$2,08 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-4}$
	60	53,2	75,3	$9,48 \times 10^{-3}$	$1,39 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-5}$
70	5	1,6	5,6	$5,41 \times 10^{-2}$	$4,74 \times 10^{-2}$	$4,5 \times 10^{-5}$
	10	3,3	9,2	$6,50 \times 10^{-2}$	$4,45 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-4}$
	15	3,8	10,5	$5,95 \times 10^{-2}$	$4,34 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-4}$
	20	3,1	9,7	$5,51 \times 10^{-2}$	$4,41 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-4}$
	30	3,9	11,9	$7,87 \times 10^{-2}$	$4,24 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-3}$
	60	5,8	17,5	$5,90 \times 10^{-2}$	$3,85 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-4}$
60	5	0,42	2,2	$1,09 \times 10^{-1}$	$6,47 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$
	10	0,38	2,3	$8,11 \times 10^{-2}$	$7,14 \times 10^{-2}$	$9,4 \times 10^{-5}$
	15	0,33	2,2	$6,79 \times 10^{-2}$	$8,73 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-4}$
	20	0,33	2,1	$6,36 \times 10^{-2}$	$8,73 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-4}$
	30	0,46	2,7	$6,22 \times 10^{-2}$	$5,93 \times 10^{-2}$	$8,6 \times 10^{-6}$
	60	0,82	4,6	$3,60 \times 10^{-2}$	$4,85 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-4}$
50	5	0,069	0,78	$5,45 \times 10^{-1}$	$5,30 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^{-4}$
	10	0,104	1,08	$3,91 \times 10^{-1}$	$3,87 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-5}$
	15	0,124	1,08	$3,31 \times 10^{-1}$	$3,26 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-5}$
	20	0,136	1,17	$2,73 \times 10^{-1}$	$2,97 \times 10^{-1}$	$5,6 \times 10^{-4}$
	30	0,210	1,64	$1,75 \times 10^{-1}$	$1,67 \times 10^{-1}$	$6,2 \times 10^{-5}$
	60	0,259	2,26	$1,74 \times 10^{-1}$	$1,22 \times 10^{-1}$	$2,7 \times 10^{-3}$

Fonte: O próprio autor

A qualidade da iteração e do ajuste do modelo multicomponente de 1ª ordem aos dados experimentais pode ser verificada tanto pela curva quanto pelo gráfico de paridade representados na Figura 5.10. O eixo F (s) do gráfico do modelo é apenas representativo, pois expressa ambas as frações F_1 e F_2 (s).

Figura 5.10 - Atividade enzimática residual da PME em função do tempo de processo equivalente a 90 °C ($F_{90^{\circ}\text{C}}$) em suco de laranja para processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas (WDsc) a (50, 60, 70, 80 e 90) °C, correspondente a isoforma termolábil (F_1) e a termorresistente (F_2)

Fonte: O próprio autor

Os parâmetros da cinética de inativação da PME, apresentados na Tabela 5.11 foram obtidos através do ajuste do modelo multicomponente conforme eq.(10), a $T_{\text{ref}} = 90^{\circ}\text{C}$.

Tabela 5.11 - Parâmetros da cinética de inativação de PME em suco de laranja no processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc)

T_{ref} (°C)	α	z_1 (°C)	z_2 (°C)	D_1 (s)	D_2 (s)
90	0,95	13,7	20,3	0,231	131

Fonte: O próprio autor

O valor z de 13,7 °C obtido para o processo assistido por micro-ondas em suco de laranja com atividade inicial de $5,9 \times 10^{-3}$ PEU mL⁻¹, exibido na Tabela 5.11, está de acordo com os relatados por Tajchakavit e Ramaswamy (1997b), de 13,4 °C em suco de laranja com atividade inicial de (4 a 6) $\times 10^{-3}$ PEU mL⁻¹.

Cinquanta et al. (2010), relatam valor de z igual a 22,12 °C em inativação de PME em suco de laranja por aquecimento assistido por micro-ondas com controle de temperatura IR (infravermelho), e inativação da fração sensível em 1 min a 70 °C. Conforme Tabela 5.9 o grau de inativação de 94,6 % foi obtida a 70 °C por 5 s, resultado promissor tendo em vista a redução do tempo de processo.

Versteeg et al. (1980), aplicando tratamento convencional em suco de laranja, citam valores z_1 de 11 °C para a fração termossensível e z_2 de 6,5 °C para a fração termorresistente. Wicker e Temelli (1988) corroboram esses valores relatando z_1 de 10,8 °C e z_2 de 6,5 °C para variedade Valência. Enquanto que Aghajanzadeh et al. (2016) relatam valor z de 36,9 °C para a fração da PME termorresistente, indicando a alta resistência desta enzima ao tratamento térmico. Ingallinera et al. (2005) reportam valor z de 21,5 °C; 16,7 °C; 34,7 °C e 17,2 °C para os cultivares *Navel*, *Sanguinello*, *Tarocco* e *Moro*, respectivamente em experimento similar.

Tajchakavit e Ramaswamy (1997b) em processo assistido por micro-ondas para inativação de PME de suco de laranja comercial relataram valor z de 13,4 °C, valor comparável para a fração termossensível obtido neste trabalho que foi de 13,7 °C. Os autores comentam que os valores de D , tanto para a fração termossensível quanto para a fração termorresistente, diminuem com o aumento do teor de sólidos solúveis descrevendo valores D_1 de 6,53 s e D_2 de 329 s para suco com conteúdo de sólidos totais de 11,7 °Brix.

Wicker e Temelli (1988) descrevem valor de $D_{90\text{ °C}}$ 0,225 s para a fração termossensível da PME e $D_{90\text{ °C}}$ de 32,3 s para a fração termorresistente similar ao encontrado neste trabalho. Na Tabela 5.12 os valores de D_1 e D_2 para a PME no intervalo de temperatura entre (50 e 90) °C são apresentados.

Tabela 5.12 - Parâmetros D e z para inativação de PME em suco de laranja por tratamento térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc)

T_{ref} (°C)	D_1 (s)	D_2 (s)	α	R^2
90	0,231	131	0,95	0,99
80	1,25	407	0,95	0,99
70	6,74	1203	0,95	0,99
60	36,4	3748	0,95	0,99
50	197	12303	0,95	0,99
z (°C)	13,7	20,3		

Fonte: O próprio autor

Há na literatura diversos autores que mencionam os valores de z e D da cinética de inativação da PME em suco de laranja relacionados com vários fatores entre eles: as múltiplas isoformas presentes (JOLIE et al., 2010), propriedades físico-químicas do suco e grau de maturação da laranja (AGHAJANZADEH; ZIAIIFAR, 2018), variedade do cultivar (EAGERMAN; ROUSE, 1976), pH do suco (TRIBESS; TADINI, 2006) e condições de processo empregadas (TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997b), razão pela qual há diferenças nos valores reportados.

Embora haja na literatura diversos relatos descrevendo a cinética da PME em suco de laranja sob aquecimento convencional considerando as frações termossensível e termorresistente, há um menor número de relatos descrevendo aquecimento assistido por micro-ondas, e, no entanto estes descrevem o modelo de cinética de inativação considerando apenas uma isoforma (DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2016; TAJCHAKAVIT; RAMASWAMY, 1997B; VILLAMIEL et al., 1998).

Dermidöven e Baysal (2016) reportam valor $D = 39,24$ s a $83\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $D = 38,76$ s a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ após processo térmico com micro-ondas em fluxo contínuo considerando cinética de 1ª ordem com apenas um componente. Tajchakavit e Ramaswamy (1995) sob condições similares em fluxo contínuo com $z = 17,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ reportaram valor $D = (3,48; 9,94; 36,4; \text{ e } 153)$ s a $(90, 80, 70, 60)\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Tajchakavit e Ramaswamy (1997b) em processo térmico assistido por micro-ondas em batelada reportaram valor D de $(2,96; 7,37; 11,7; \text{ e } 40,5)$ s a $(65; 60; 55 \text{ e } 50)\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente com valor z de $13,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cinquanta et al. (2010), por sua vez em condições similares relataram valor D de $(23,2; 10,6; 2,9 \text{ e } 1,7)$ a $(60; 70; 75 \text{ e } 85)\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente com valor de z igual a $22,12\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4.2.2 *Tratamento térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator CEM Discover com diferentes volumes (volumWDsc)*

A inativação da PME foi avaliada em amostras com volumes de $(15, 30, 50 \text{ e } 100)$ mL de suco de laranja tratado termicamente em reator (CEM, Discover, EUA) a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperatura foi registrada através de sensor de fibra ótica (FO) inserido nas amostras como nos processos anteriormente citados e o controle de aquecimento foi realizado por passos (estágios) como citado no item 5.4.2.1.

Exemplos do histórico da temperatura estão representados na Figura 5.11 para o mesmo binômio tempo-temperatura (80 °C - 30 s) para os volumes variando entre (15 a 100) mL. Nestas condições é possível observar que o processo com maior volume possui taxa mais lenta de aquecimento conforme o esperado.

Figura 5.11 - Histórico da temperatura durante o processamento térmico de suco de laranja assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada CEM Discover a 80 °C para o tempo de retenção de 60 s com volumes variando entre (15 e 100) mL

Fonte: O próprio autor

Os dados experimentais de atividade da PME, conforme apresentados na Tabela 5.13, apresentaram valores entre $2,94 \times 10^{-4}$ a $9,90 \times 10^{-5}$ PEU mL⁻¹ similares aos anteriormente obtidos para o processo assistido por micro-ondas em reator (WDsc) a temperatura de 80 °C (entre $1,44 \times 10^{-4}$ a $7,79 \times 10^{-5}$ PEU mL⁻¹).

Foi observado que em volumes menores, maior grau de inativação foi obtido no mesmo tempo de retenção (Tabela 5.13). Esse fato pode ter relação com a melhor agitação e uniformidade na homogeneização dos volumes menores, indicando um aquecimento mais uniforme na mistura devido à agitação mais eficiente nestes volumes nestas condições e consequente maior inativação da PME.

A análise de variância (ANOVA) aplicada aos resultados da atividade enzimática da Tabela 5.13 indica que tanto o volume da amostra quanto o tempo de

retenção tem efeito sobre a inativação da PME, no intervalo de confiança de 95 % (Tabela 5.14).

Tabela 5.13 - Atividade residual da enzima da PME e respectivo grau de inativação em suco de laranja variedade Pera para processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada com diferentes volumes (volumWDsc)

V	t	Atividade	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$
(mL)	(s)	PEU mL⁻¹	%
NP	0	$5,86 \times 10^{-3}$	0
100	5	$2,19 \times 10^{-4}$	95,7
	10	$2,52 \times 10^{-4}$	95,7
	15	$2,42 \times 10^{-4}$	95,9
	20	$1,85 \times 10^{-4}$	96,9
	30	$1,06 \times 10^{-4}$	98,2
	60	$1,64 \times 10^{-4}$	97,2
50	10	$2,29 \times 10^{-4}$	96,1
	30	$2,65 \times 10^{-4}$	95,5
	60	$2,94 \times 10^{-4}$	98,5
30	10	$1,82 \times 10^{-4}$	96,9
	30	$1,13 \times 10^{-4}$	98,1
	60	$9,90 \times 10^{-5}$	98,3
15	5	$1,44 \times 10^{-4}$	97,5
	10	$1,28 \times 10^{-4}$	97,8
	15	$7,79 \times 10^{-5}$	98,6
	20	$5,23 \times 10^{-5}$	99,1
	30	$5,83 \times 10^{-5}$	99,0
	60	$5,58 \times 10^{-5}$	99,1

Fonte: O próprio autor

Tabela 5.14 - Análise de variância aplicada nos valores obtidos para atividade enzimática da PME no estudo padronizado com diferentes volumes em reator assistido por micro-ondas (volumWDsc) a 80 °C com volumes variando entre (15 e 100) mL

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Razão F	Valor de p
Efeitos principais					
A: volume	30,054	3	10,0178	18,14	0
B: tempo	10,078	5	2,0156	3,65	0,0129
Resíduo	13,808	25	0,55234		
Total (corrigido)	51,267	33			

Fonte: O próprio autor

Os dados de atividade enzimática obtidos para o maior tempo de retenção (60 s) a diferentes volumes foram comparados entre si através da aplicação de análise de variância para essa situação em específico (Tabela 5.15).

Tabela 5.15 - Análise de variância aplicada ao processamento (volumWDsc) para a condição de 60 s a 80 °C com volumes variando entre (15 e 100) mL

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Razão F	Valor de <i>p</i>
Entre grupos	5,157	3	1,719	0,76	0,581
Dentro dos grupos	6,82	3	2,273		
Total (corrigido)	11,977	6			

Fonte: O próprio autor

Foi observado que para esta condição o volume da amostra não apresentou efeito sobre a inativação da PME, no intervalo de confiança de 95 %. Baseado na ANOVA, conclui-se que para tempos mais prolongados há um intervalo de tempo suficiente para ocorrer mistura mais efetiva e uniforme e assim consequentemente o volume não apresenta efeito nesta condição.

O ajuste do modelo cinético de 1ª ordem com dois componentes aos dados experimentais foi realizado conforme descrito no item 4.2.6.3. Os valores obtidos para F_1 e F_2 referente às isoformas termossensível e termorresistente, respectivamente; e a atividade residual calculada pelo modelo para cada condição de temperatura – tempo de retenção, está apresentado na Tabela 5.16. Esses dados não foram usados para validação do modelo porque o diagrama de paridade (Figura 5.12) não apresenta distribuição satisfatória.

Figura 5.12 - Gráfico de paridade entre a atividade residual experimental e a calculada pelo modelo multicomponente conforme eq.(10) para tratamento térmico de suco de laranja em micro-ondas com análise de diferentes volumes (volumWDsc)

Fonte: O próprio autor

Tabela 5.16 - Letalidade da isoforma termolábil (F_1) e termorresistente (F_2); atividade residual enzimática da PME em suco de laranja tratado termicamente por processo assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada a diferentes volumes (volumWDsc) obtida experimentalmente e a calculada pelo modelo de dois componentes; e o respectivo desvio entre ambas

V (mL)	t (s)	F_1 (s)	F_2 (s)	(A/A_0) exp	(A/A_0) calc	Desvio
NP	0	0	0	1,00	1,00	
100	5	13,3	22,2	$3,7 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-4}$
	10	12,3	22,0	$4,3 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-4}$
	15	13,3	24,4	$4,1 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-4}$
	20	23,1	36,7	$3,1 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-4}$
	30	41,5	58,0	$1,8 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-5}$
	60	43,7	68,2	$2,8 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-4}$
50	10	10,1	17,9	$3,1 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-5}$
	30	16,3	30,3	$1,9 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-5}$
	60	27,7	49,2	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-6}$
30	10	8,9	16,4	$3,1 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-6}$
	30	19,4	33,2	$1,9 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$	$4,5 \times 10^{-6}$
	60	27,5	48,5	$1,7 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-7}$
15	5	9,5	16,6	$2,47 \times 10^{-2}$	$2,86 \times 10^{-2}$	$1,52 \times 10^{-5}$
	10	16,8	25,9	$2,17 \times 10^{-2}$	$2,42 \times 10^{-2}$	$6,62 \times 10^{-6}$
	15	21,5	31,1	$1,38 \times 10^{-2}$	$2,21 \times 10^{-2}$	$6,98 \times 10^{-5}$
	20	33,5	44,3	$8,95 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-2}$	$7,39 \times 10^{-5}$
	30	39,5	52,4	$1,01 \times 10^{-2}$	$1,52 \times 10^{-2}$	$2,61 \times 10^{-5}$
	60	53,2	75,3	$9,48 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-2}$	$4,62 \times 10^{-7}$

Fonte: O próprio autor

5.5 Comparativo entre processos: convencional (BT) e micro-ondas (WDsc) reator

Na Tabela 5.17 é possível observar que maior grau de inativação foi obtido para o processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator (WDsc) quando comparado ao processo convencional (BT) no mesmos binômios tempo-temperatura. Mesmo em temperaturas mais baixas (60 °C) o processo por micro-ondas (WDsc) apresentou inativação da PME acima de 90 %, enquanto que o convencional (BT) em mesma condição atingiu apenas 74,0 %.

Tabela 5.17 – Comparativo da inativação enzimática para os processos (WDsc) e (BT)

T (°C)	t (s)	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$ (%)		T (°C)	t (s)	$\left[1 - \left(\frac{A}{A_0}\right)\right] \times 100$ (%)	
		WDsc	BT			WDsc	BT
90	5	93,8	97,0	60	5	89,1	72,4
	10	96,5	96,4		10	91,9	74,0
	15	97,1	96,6		15	93,2	65,2
	20	97,5	97,4		20	93,6	59,3
	30	97,7	97,0		30	93,8	81,7
	60	97,9	97,0		60	96,4	86,9
80	5	97,6	94,8	50	5	45,5	20,9
	10	97,8	94,9		10	60,9	17,2
	15	98,7	94,7		15	66,9	16,4
	20	99,1	94,3		20	72,7	16,5
	30	99,0	94,8		30	82,5	30,7
	60	99,1	93,6		60	82,6	37,1
70	5	94,6	92,2				
	10	93,5	93,7				
	15	94,1	94,8				
	20	94,5	93,7				
	30	92,1	95,3				
	60	94,1	94,8				

Fonte: O próprio autor

Observando os valores do grau de inativação a 70 °C, é possível constatar que não há uma relação de aumento linear de inativação enzimática com o aumento do tempo de retenção. Outros autores citam esta como uma temperatura limite intermediária para a inativação das isoformas termolábeis (CINQUANTA et al., 2010; DUVETTER et al., 2009; VAN DEN BROECK et al., 1999b; VERSTEEG et al., 1980).

Duvetter et al. (2009) verificaram que a isoforma termolábil da PME perdeu 20 % de sua atividade após exposição a 70 °C por 5 min, enquanto que o mesmo percentual foi obtido para isoforma termorresistente somente após 80°C a 1 min.

É relatado na literatura que o número de isoformas presentes no suco depende das propriedades físico-químicas da fruta *in natura* (AGHAJANZADEH; ZIAIIFAR, 2018) e que a razão entre as diferentes isoformas presentes pode variar consideravelmente de acordo com o estágio de maturação da laranja (JOLIE et al., 2010). Cada isoforma tem seu pH ótimo de atividade (KOHLI et al., 2015) caracterizado por um intervalo de estabilidade de temperatura para diferentes fontes e isoformas de PME (DUVETTER et al., 2009; UHLIG, 1998).

Há, portanto uma série de fatores que podem estar envolvidos para descrever a variação, e torna-se necessário um estudo experimental mais detalhado da composição estrutural das isoformas para conclusões mais precisas deste comportamento nesta temperatura em questão. Versteeg et al. (1980) descrevem que a existência de uma fração de resistência térmica intermediária que é inativada a 70 °C, enquanto que a inativação da fração termossensível ocorre a 60 °C e da fração termorresistente à 90 °C.

Os valores de atividade experimentais da PME de $1,3 \times 10^{-4}$ PEU mL⁻¹ após 30 s a 70 °C e $9,0 \times 10^{-5}$ PEU mL⁻¹ após 60 s a 70 °C, são aceitáveis do ponto de vista de estabilidade do suco que requer um valor mínimo da ordem de 10^{-4} (EAGERMAN; ROUSE, 1976; ROTHSCILD et al., 1975; ROUSE, 1953; SIO et al., 2001). Inativação de 99 % foi obtida para o processo WDsc em 20 s a 80 °C com valor de atividade de $5,22 \times 10^{-5}$ PEU mL⁻¹, enquanto que para BT este percentual não foi alcançado nem mesmo na temperatura de 90 °C.

Na Tabela 5.18 está apresentado o comparativo entre os parâmetros gerados pelo modelo cinético de 1ª ordem multicomponente para os processos convencional (BT) e assistido por micro-ondas (WDsc). É possível observar que o processo por micro-ondas requer menor aumento de temperatura necessário para a redução de 90 % no valor de *D* (representado pelo parâmetro *z*); visto que o processo por micro-ondas (WDsc) apresenta $z_2 = 20,3$ °C, menor do que o requerido pelo convencional (BT) de $z_2 = 21,7$ °C. O intervalo de tempo necessário para atingir essa redução de 90 % sobre a concentração da isoforma termorresistente da PME (representado pelo

parâmetro D), no entanto, é maior no processo por micro-ondas (WDsc) para a isoformas termorresistente que apresenta $D_2 = 131$ s quando comparado ao convencional (BT) com $D_2 = 97,1$ s.

Tabela 5.18 - Parâmetros da cinética de inativação de PME em suco de laranja no processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas em reator de bancada (WDsc)

Processo	T_{ref} (°C)	α	z_1 (°C)	z_2 (°C)	D_1 (s)	D_2 (s)
BT	90	0,93	13,1	21,7	0,258	97,1
WDsc	90	0,95	13,7	20,3	0,231	131

Fonte: O próprio autor

Na Tabela 5.19 está apresentado o comparativo entre as frações das isoformas da PME relatadas na literatura e as encontradas nos estudos padronizados, tanto para o processo convencional (BT) quanto para o processo assistido por micro-ondas (WDsc), mostrando valores similares aos relatados na literatura para a fração termorresistente.

Tabela 5.19 - Comparação das frações das isoformas da enzima pectinametilesterase menos e mais resistentes conforme encontradas na literatura

Autor	Intervalo de T (°C)	α	(1- α)
O próprio autor convencional (BT)	50 - 95	0,93	0,07
O próprio autor micro-ondas (WDsc)	50 - 90	0,95	0,05
VERSTEEG et al. (1980)	60 - 90	0,95	0,05
LEE et al. (2003)	75 a 90	0,934	0,066
HAN; NIELSEN; NELSON (1998)	90	0,985	0,015
TRIBESS; TADINI (2006)	82,5 – 87,5	0,995 – 0,996	0,015 – 0,004

Fonte: O próprio autor

Na Figura 5.13 está apresentada graficamente a comparação entre os modelos de cinética de 1ª ordem multicomponente para a inativação da PME ajustados para o tratamento convencional (BT) e o tratamento assistido por micro-ondas focalizadas (WDsc) obtidos neste estudo.

É possível observar pela descrição dos modelos que mesmo grau de inativação da PME será atingido para o processo assistido por micro-ondas (WDsc)

em menor tempo quando comparado ao convencional (BT) em todos os intervalos de temperatura estudado neste trabalho, indicando possíveis efeitos não térmicos.

Figura 5.13 - Comparativo entre a atividade enzimática residual da PME em suco de laranja entre o processo convencional (BT) e o assistido por micro-ondas (WDsc) predito pelo modelo de dois componentes em função do tempo equivalente (F) a $T_{ref} = 90\text{ °C}$ a (60, 70, 80 e 90) °C

Fonte: O próprio autor

6 CONCLUSÕES

O modelo multicomponente de cinética de 1ª ordem considerando duas frações da PME, uma termolábil e outra termorresistente, apresentou bom ajuste aos dados obtidos experimentalmente para todas as temperaturas de pasteurização estudadas nos diferentes processos considerados.

Os parâmetros gerados para a cinética da PME no processo convencional (BT) foram: z_1 13,1 °C, z_2 21,7 °C, com valor D_1 de (0,258; 1,49; 8,61 e 49,7) s e D_2 de (97,1; 283,3; 819,5 e 2371) s para as temperaturas (90; 80; 70 e 60) °C, respectivamente, com α de 0,93. E para o processo assistido por micro-ondas focalizadas em reator (WDsc) foram: z_1 13,65 °C, z_2 20,27 °C, com valor D_1 de (0,231; 1,23; 6,66 e 36,0) s e D_2 de (130,8; 386,4; 1203; e 3748) s para as temperaturas (90; 80; 70 e 60) °C, respectivamente, com α de 0,95.

O ajuste sugere a existência de 7 % da isoforma termorresistente no processamento convencional (BT) e 5 % no processo assistido por micro-ondas (WDsc).

O comparativo entre os processos demonstrou que o processo térmico assistido por micro-ondas focalizadas (WDsc) atinge o mesmo grau de inativação da pectinametilesterase (PME) em tempos menores do que o processo convencional (BT) para todas temperaturas testadas entre (50 – 90) °C.

O processo assistido por micro-ondas focalizadas (WDsc), quando comparado ao processo convencional (BT) foi o único a atingir 90 % de inativação da PME em suco de laranja processado a 60 °C, sendo requerido no mínimo 10 s nestas condições. Assim sendo, o processo assistido por micro-ondas focalizadas (WDsc) seria uma excelente alternativa para pasteurização de suco de laranja a fim de evitar sobreprocessamento, e em consequência perdas de nutrientes e de características sensoriais. O processo também se mostrou capaz de atingir 99 % de inativação da PME em suco de laranja quando exposto a 80 °C por no mínimo 20 s não encontrando condições similares no processo térmico convencional.

Foi observado em ensaios conduzidos com diferentes volumes (15, 30, 50 e 100) mL no processo assistido por micro-ondas (volumWDsc) que a volumes menores, maior grau de inativação foi obtido no mesmo tempo de retenção,

indicando um aquecimento mais uniforme na mistura devido à agitação mais eficiente em volumes menores nestas condições.

7 CONTINUIDADE DO TRABALHO

Reconhecendo a influência de vários fatores para a cinética de inativação das diferentes frações da PME fica como sugestão para a continuidade do trabalho realizar as seguintes avaliações:

- Estudar a condição de 80 °C a 20 s no pasteurizador de micro-ondas de fluxo contínuo por ser a condição que obteve maior grau de inativação no reator de bancada;
- Estudar a inter-relação da temperatura de 70 °C com as diferentes frações da PME em outras variedades de laranja e as melhores condições para inativação nesta condição específica;
- Avaliar o uso da temperatura de 60 °C para o processo contínuo já que esta apresentou grau de inativação suficiente e tem potencial para evitar a perda das características nutricionais e organolépticas do suco de laranja quando exposto a temperaturas mais altas na pasteurização;
- Avaliar em nível molecular o possível efeito não térmico das micro-ondas sobre as enzimas do suco de laranja.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANZADEH, S.; ZIAIIFAR, A. M.; KASHANINEJAD, M.; MAGHSOUDLOU, Y.; ESMAILZADEH, E. Thermal inactivation kinetic of pectin methylesterase and cloud stability in sour orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 185, p. 72-77, 2016.

AGHAJANZADEH, S.; ZIAIIFAR, A. M. A review of pectin methylesterase inactivation in citrus juice during pasteurization. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 1-12, 2018.

AGUIAR, H. F.; YAMASHITA, A. S.; GUT, J. A. W. Development of enzymic time temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, p. 110–116, 2012.

ALLENDE, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I. Minimal processing for healthy traditional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 513–519, 2006.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. Microwave pasteurization and sterilization of foods. In: RAHMAN, M. S. (ed.), **Handbook of food preservation**. 2. ed. Boca Ratón, FL: CRC Press, 2007. p. 691–712.

AIJN – Associação Europeia de Sucos de Frutas. Relatório de Mercado 2016. 2016. 43 p. Disponível em: [http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/AIJN_Market_Report_por-BR\(002\).pdf](http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/AIJN_Market_Report_por-BR(002).pdf). Acesso em: Ago, 2017.

ALBEROLA, J.; IZQUIERDO, L. J. The volatile fraction of orange juice: methods for extraction and study of composition. In: CHARALAMBOUS, G. (ed). **Flavor of foods and beverages: chemistry and technology**. New York, Academic Press, 1978. p. 283-304.

AMSTALDEN, L. C. **Estudo sobre a ação de pectinaesterase em suco de laranja**. 1992. 188 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18. ed. Washington DC., 2005.

ARJMANDI, M.; OTÓN, M.; ARTÉS, F.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; GÓMEZ, P. A.; AGUAYO, E. Continuous microwave pasteurization of a vegetable smoothie improves its physical quality and hinders detrimental enzyme activity. **Food Science and Technology International**, v. 23, n. 1, p. 36-45, 2016.

ATKINS, C. D.; ROUSE, A. H.; MOORE, E. L. Effect of thermal treatment and concentration on pectinesterase, cloud and pectin in citrus juices using a plate type heat exchanger. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, 1956.

AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, v.6, n.6, p.584-602, 2007.

BADOLATO, G. G. **Tratamento térmico mínimo do suco de laranja natural: cinética da inativação da pectinametilesterase**. 2000. 157p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BARROS, J. R. M.; BARROS, A. L. M.; CYPRIANO, M. P. **O mercado da citricultura no Brasil e suas novas perspectivas**. São Paulo: CitrusBR, 2016. 66 p.

BE MILLER, J. N. An introduction to pectins: Structure and properties. In: FISHMAN, M. L., JEM, J. J.(eds.). **Chemistry and Functions of Pectins**, ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society, 1986. v. 310, p. 2-12.

BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Production and Characterization of Thermostable Xylanase and Pectinase from *Streptomyces* Sp. QG-11-3. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 396–402, 2000.

BISCONSIN-JUNIOR, A.; ALVARENGA, J. F. R.; ROSENTHAL, A.; MONTEIRO, M. Effect of High Hydrostatic Pressure on Ascorbic Acid, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Pera Rio Orange Juice. **Journal Food Processing & Technology**, v. 6, n. 2, 2015. DOI: 10.4172/2157-7110.1000416.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Brasília, Brasil, DF.

BRITO, C. S.; ROSSI, D. A. Bolores e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja in natura e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia-MG. **Biosci. J., Uberlândia**, v. 21, n. 1, p. 133-140, 2005.

BUFFLER, C. R. **Microwave Cooking and Processing**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993.

CAMERON, R. G.; BAKER, R. A.; GROHMANN, K. Multiple forms of pectinmethylesterase from citrus peel and their effects on juice cloud stability. **Journal of Food Science**, v.63, n.2, p. 253-255, 1998.

CAMERON, R. G.; GROHMANN, K. Partial purification and thermal characterization of pectinmethylesterase from red grapefruit finisher pulp. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 821-825, 1995.

CAMERON, R. G.; NIEDZ, R. P.; GROHMANN, K. Variable heat stability for multiple forms of pectinmethylesterase from citrus tissue culture cells. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 42, p. 903-908, 1994.

CAMERON, R. G.; SAVARY, B. J.; HOTCHKISS, A. T.; FISHMAN, M. L. Isolation, characterization, and pectin-modifying properties of a thermally tolerant pectin methylesterase from *Citrus sinensis* var. Valência. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 2255–2260, 2005.

CAMPBELL, A. M.; PENFIELD, M. P.; GRISWOLD, R. M. **The Experimental Study of Food**. 2. ed. Boston: Houghton Mifflin Company, 1979. 513 p.

CAÑUMIR, J. A.; CELIS, J. E.; BRUIJN, J.; VIDAL, L. V. Pasteurization of apple juice by using microwaves. **Lebensm Wiss Technology**, v. 35, p. 389–392, 2002.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACK, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, São Carlos: SP, 2012.

CASTALDO, D.; LOVOI, A.; QUAGLIUOLO, L.; SERVILLO, L.; BALESTRIERI, C.; GIOVANE, A. Orange Juices and Concentrates Stabilization by a Proteic Inhibitor of Pectin Methylesterase. **Journal of Food Science**. v. 56, n. 6, p. 1632–1634, 1991.

CAVALCANTE, T. A. B. B.; FUNCIA, E. S.; GUT, J. A. W. Investigação de efeitos térmicos e não-térmicos de micro-ondas focalizadas na inativação da enzima polifenoloxidase. In: Congresso brasileiro de engenharia química, 21., 2016, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: COBEQ, 2016. Disponível em: <https://proceedings.galoa.com.br/cobeq/cobeq-2016/autores/tiago-augusto-bulhoes-bezerra-cavalcante>. Acesso em: Jan, 2018.

CHAMARRO, J.; ALONSO, J. M.; GARCIA-MARTINEZ, J. L. Enzymes in citrus fruits. In: FOX, P.F., (ed.). **Food enzymology**. London: Elsevier, 1991. v.1, p.599-624.

CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave food processing—A review. **Food Research International**, v. 52, p. 243–261, 2013.

CHEN, C. S.; WU, M. C. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterase in citrus juices. **Journal of Food Science**, v.63, n.5, p. 747-750, 1998.

CHEN, C. S.; WU, M. C. Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 1-4, 1988.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças**. Lavras, MG: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1990.

CINQUANTA, L.; ALBANESE, D.; CUCCURULLO, G.; Di MATTEO, M. Effect on orange juice of batch pasteurization in an improved pilot-scale microwave oven. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. 46–50, 2010.

CITRUSBR. São Paulo: Quartetto, ano 3, n. 9, Maio 2017. 55 p. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/revista/maio2017/>. Acesso em: 12 Set. 2017.

CORONEL, P., SIMUNOVIC, J., SANDEEP, K. P.; KUMAR, P. Dielectric properties of pumpable food materials at 915 MHz. **International Journal of Food Properties**, v. 11, p. 508–518, 2008.

CORRÊA NETO, R. S.; FARIA, J. A. F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p.153-60, 1999.

CUI, S. **Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.

DEMIRDÖVEN; A.; BAYSAL, T. Effects of electrical pre-treatment and alternative heat treatment applications on orange juice production and storage. **Food and bioproducts processing**, v. 94, p. 443–452, 2015.

DEMIRDÖVEN; A.; BAYSAL, T. Inactivation effect of microwave heating on pectin methylesterase in orange juice. **Ukrainian Food Journal**, v. 5, n. 2, p. 248-261, 2016.

DONADIO, L. C.; STUCHI, S. E.; POZZAN, M.; SEMPIONATO, O. R. **Novas variedades e clones de laranja doce para indústria**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. v. 1. 42 p.

DORANTES-ALVAREZ, L., BARBOSA-CÁNOVAS, G.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. Blanching of fruits and vegetables using microwaves. In: G. V. Barbosa-Cánovas; G. W. Gould (eds.). **Innovations in Food Processing**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. p. 149–162.

DUVETTER, T.; SILA, D. N.; VAN BUGGENHOUT, S.; JOLIE, R.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part I—Stability and Catalytic Activity of Pectinases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 75-85, 2009.

EAGERMAN, B.A.; ROUSE, A.H. Heating inactivation temperature-time relationships for pectinametilsterase inactivation in citrus juice. **Journal of Food Science**, v.41, p. 1396-1397, 1976.

ENDRESS, H. U.; MATTES, F. Pectin. In: CHO, S. S.; SAMUEL, P. **Fiber Ingredients: Food Applications and Health Benefits**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. p. 135-171.

ESKIN, N. A. M. **Biochemistry of Foods**. Londres: Academic Press, 2012. 539 p.

ESPACHS-BARROSO, A.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M.; MARTIN-BELLOSO, O. Inactivation of plant pectin methylesterase by thermal or high-intensity pulsed electric field treatments. **Innovative Food Science Emerging Technologies**, v. 7, p. 40–48, 2006.

FAVILLE, L.W. Survival of microorganisms in concentrated orange juice. **Food Technology**, v. 5, p. 3–36, 1951.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker Press, 1996.

FRATIANNI, A.; CINQUANTA, L.; PANFILI, G. Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 867–871, 2010.

FU, Y.C. Fundamentals and industrial applications of microwave and radio frequency in food processing. **Food processing: principles and applications**. In J.S. Smith; Y.H. Hui (eds.). pp. 79–100. Iowa, Blackwell. 2004.

FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.263–271, 1996.

FRANCO, A. P.; YAMAMOTO, L. Y.; TADINI, C. C.; GUT, J. A. W. Dielectric properties of green coconut water relevant to microwave processing: Effect of temperature and field frequency. **Journal of Food Engineering**, v. 155, p. 69–78, 2015.

FUNDECITRUS: Fundo de Defesa da Citricultura. Reestimativa da safra de laranja 2017/18 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro – cenário em fevereiro/2018. Disponível em:

[http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/3%C2%AA_Reestimativa_da_safra_de_laranja_201718_\(Fevereiro_2018\).pdf](http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/3%C2%AA_Reestimativa_da_safra_de_laranja_201718_(Fevereiro_2018).pdf). Acesso em: Fev., 2018.

GARNACHO G., KASZAB T., HORVÁTH M., GÉCZI G. Comparative Study Of Heat-treated Orange Juice. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 2, p. 446–457, 2012.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoid Composition of Citrus Juices. **Molecules**, v. 12, p. 1641–1673, 2007.

GÉCZI, G.; HORVÁTH, M.; KASZAB, T.; ALEMANY, G. G. No Major Differences Found between the Effects of Microwave-Based and Conventional Heat Treatment Methods on Two Different Liquid Foods. **PLoS One**, v. 8, n. 1, e53720, 2013.

GENTRY, T.S.; ROBERTS, J.S. Design and evaluation of a continuous flow microwave pasteurization system for apple cider. **LWT - Food Science and Technology**, 38(3), 227–238, 2005.

GUO, Q.; SUN, D-W.; CHENG, J-H; HAN, Z. Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 236–247, 2017.

HAN, Y., NIELSEN, S. S., NELSON P. E. Isolation of thermostabile and thermolabile orange pectinametilsterases. In: **IFT'S 1998 Annual Meeting**. Atlanta, Georgia, 1998. Resumos. Atlanta, 1998.

HATCHER, W.S.; WEIHE, J. L.; SPLITTSTOESSER, D. F.; HILL, E. C.; PARISH, M. E. Fruit beverages. In: VANDERZAN, C.; SPLITTSTOESSER, D.F., eds. **Compendium of methods for the microbiological examinations of foods**. 3. ed. Washington, American Public Health Association, 1992. p.953–60.

HEBBAR, H. U.; RASTOGI, N. K. Microwave heating of fluid foods. In: CULLEN, P. J. TIWARY, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P. (eds.). **Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods**. London: Academic Press, 2012. p. 369–409.

HELLMEISTER, C. F. L. P. **Boas práticas de fabricação (BPF) aplicadas nas etapas de beneficiamento de um Packing House de laranjas**: Estudo de Caso. 2012. 104 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2012.

HOLLAND, R. R.; REEDER, S. K.; PRITCHETT, D. E. Cloud Stability Test For Pasteurized Citrus Juices. **Journal of Food Science**, v. 41, p. 812-815, 1976.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, 2008. p. 1020.

ILCE. Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa. La ciencia para todos: **El magnetron. Las micro-ondas**. Biblioteca digital. Disponível em: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/scienciavolumen3/ciencia3112.htm#sec_28 Acesso em: Out, 2017.

INGALLINERA, B., BARBAGALLO, R. N., SPAGNA, G., PALMERI, R., TODARO, A. Effects of thermal treatments on pectinesterase activity determined in blood oranges juices. **Enzyme Microb. Technol.** v. 36, n. 2, p. 258-263, 2005.

IRWE, S.; OLSSON, I. Reduction of pectinesterase activity in orange juice by highpressure treatment. In: SINGH, R. P.; OLIVEIRA, F. A. R. (eds.). **Minimal Processing of Foods and Process Optimisation – An Interface**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 35-42.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931–2944, 2005.

JOLIE R. P.; DUVETTER T.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. **Carbohydrate Research** v. 345, p. 2583–2595, 2010.

KIMBALL, D.A. **Citrus processing quality control and technology**. New York: Chapman & Hall-ITP, 1991. p. 103-116.

KERTESZ, Z. I. Pectic enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 158-166, 1955.

KERTESK, Z. I. **The pectic substances**. London: Interscience Publishers Ltd., 1951. 628 p.

KOHLI, P.; KALIA, M.; GUPTA, R. Pectin methylesterases: A review. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 5, 1000227, 2015.

KUMAR, P.; CORONEL, P.; SIMUNOVIC, J.; SANDEEP, K. P. Feasibility of aseptic processing of a low-acid multiphase food product (salsa con queso) using a continuous flow microwave system. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 3, p.121–124, 2007.

KUMAR, P.; CORONEL, P.; TRUONG, V. D.; SIMUNOVIC, J.; SWARTZEL, K. R.; SANDEEP, K. P.; CARTWRIGHT, G.; Overcoming issues associated with the scale-up of a continuous flow microwave system for aseptic processing of vegetable purees. **Food Research International**, v. 41, p. 454-461, 2008.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. **Carboidratos en alimentos regionales Iberoamericanos**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 2006.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207–220, 2000.

LEE, J. Y.; LIN, Y. S.; CHANG, H. M.; CHEN, W.; WU, M. C. Temperature–time relationships for thermal inactivation of pectinesterases in orange juice. **J. Sci. Food Agric**, v.83, p.681–684, 2003.

LEW, A.; KRUTZIK, P. O.; HART, M. E.; CHAMBERLIN, A. R. Increasing rates of reaction: microwave-assisted organic synthesis for combinatorial chemistry. **J. Comb. Chem.**, v. 4, n. 2, p. 95-105, Mar.-Apr. 2002.

LEWIS, M. J.; HEPPELL, N. **Continuous Thermal Processing of Foods: Pasteurization and UHT Sterilization**. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 2000. 447 p.

LIN, M.; RAMASWAMY, H. S. Evaluation of phosphatase inactivation kinetics in milk under continuous flow microwave and conventional heating conditions. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 1, p. 110-123, 2011.

LÖFGREN, C.; HERMANSSON, A. M. Synergistic rheological behavior of mixed HM/LM pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 3, p. 480-486, 2007.

LOHBAUER, C. **A indústria brasileira de suco de laranja**. São Paulo: CitrusBr, 2010. 69 p.

LOHBAUER, C. O contencioso do suco de laranja entre Brasil e Estados Unidos na OMC. In: SORJ, B.; FAUSTO, S. O papel atual do Brasil na América do Sul: estratégias e percepções mútuas. **Política Externa**, v. 20, n. 2, Set.-Nov. 2011.

LUCATO CITRICOLA. **Característica das laranjas variedade Bahia, Pera Rio, Natal, Valência, Folha Murcha, Charmute, Lima verde ou Laranja Lima**. [ca.2014]. Disponível em: <http://www.citricolalucato.com.br/p/laranjas.aspx>. Acesso em: Set. 2014.

LUND, D. Heat processing. In: FENNEMA, O. R. (ed.). **Principles of Food Science: Physical Principles of Food Preservation**. New York: Marcel Dekker, 1975.

MACRAE, R.; ROBINSON, R. K.; SADLER, M. J. Citrus fruits. In: _____. **Encyclopaedia of food science, food technology, and nutrition**. San Diego: Academic, 1993. v.2, p.994-1023.

MANICKAVASAGAN, A.; JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G. Non-uniformity of surface temperatures of grain after microwave treatment in an industrial microwave dryer. **Drying Technology**, v. 24, n. 12, p. 1559-1567, 2006.

MARSZAŁEK, K.; MITEK, M.; SKĄPSKA, S. Effect of continuous flow microwave and conventional heating on the bioactive compounds, colour, enzymes activity, microbial and sensory quality of strawberry purée. **Food and bioprocess technology**, v. 8, n. 9, p. 1864-1876, 2015.

MATH, R.; NAGENDER, A.; NAYANI, S.; SATYANARAYANA, A. Continuous microwave processing and preservation of acidic and non-acidic juice blends. **International Journal of Agriculture and Food Science Technology**, v. 5, n. 2, p. 81–90, 2014.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros: principais informações e recomendações de cultivo**. São Paulo: Boletim Técnico 200 do Instituto Agrônomo de Campinas, Mar. 2005.

MATSUI, K. N.; GUT, J. A. W.; DE-OLIVEIRA, P. V.; TADINI, C. C. Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 2, p. 169-176, 2008.

McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, 1952.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Instrumental measurement of orange juice colour: A review. **J. Sci. Food Agric.**, v. 85, p. 894–901, 2005.

MILLER, F. A.; SILVA, C. L. M. In: RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. **Advances in fruit processing technologies**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012. p. 363-386.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>. Acesso em: Ago. 2013.

NAGY, S. Vitamin C contents of citrus fruits and their products: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 8-18, 1980.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O Retrato da Citricultura Brasileira**, São Paulo: CitrusBR, 2011. 138p.

NIKDEL, S.; CHEN, C.S.; PARISH, M.E.; MACKELLAR, D.G.; FRIEDRICH, L.M. Pasteurization of citrus juice with microwave energy in a continuous-flow unit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.2116-2119, 1993.

OLIVA, P. B. **Influência das variedades cítricas (Citrus sinensis L. Osbeck) Natal, Pera-río e Valência na qualidade do suco de laranja pasteurizado**. 2002. 162 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

OUMER, O. J. Pectinase: substrate, production and their biotechnological applications. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 2, n. 3, May. 2017.

PARISH, M.E. Microbiological concerns in citrus juice processing. **Food Technol.**, v. 45, p. 128-132, 1991.

PARISH, M.E.; HIGGINS, D. Isolation and identification of lactic acid bacteria from samples of citrus molasses and unpasteurized orange juice. **J. Food Sci.**, v. 53, p. 645-646, 1988.

PILNIK, W. ROMBOUTS, F. M. In: BIRCH, G. BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K .J. **Enzymes and food processing**. London: Appl. Science Publ, 1981. p. 105.

PICQUET, P.; DEL-VALLE, V. Aplicaciones de las ondas electromagnéticas en productos alimenticios. TECA. **Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació**, n. 8, nov. 2005. p. 26-33.

POLYDERA, A. C.; STOFOROS, N. G.; TAOUKIS, P. S. Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 1–9, 2005.

PROGRAMA BRASILEIRO PARA MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA. **Normas de Classificação de Citros de Mesa. Centro de Qualidade em Horticultura**. São Paulo: CEAGESP, 2011. 12p. Disponível em: <http://www.hortibrasil.org.br/images/stories/folders/citros.pdf> Acesso em: Nov, 2017.

QUEIROZ, E. C.; MENEZES, H. C. Suco de Laranja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Bebidas não alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. v. 2. p. 243-267.

RAMALHO, A. S. T. M. **Sistema funcional de controle de qualidade a ser utilizado como padrão na cadeia de comercialização de laranja Pera Citrus sinensis L. Osbeck**. 1993. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

RAMASWAMY, H. S.; ABDELRAHIM, K.; SMITH, J. P. Thermal Processing and Computer Modelling. In: HUI, Y. H. **Encyclopedia of food science and technology**. New York: John Wiley and sons Inc., 1992.

RAMASWAMY, H.; TANG, J. Microwave and Radio Frequency Heating. **Food Science Technology International**, v. 14, n. 5, p. 423–427, 2008.

RAMASWAMY, H. S.; KOUTCHMA, T.; TAJCHAKAVIT, T. Enhanced Thermal Effects under Microwave Heating Conditions. In: WELTI-CHANGES, J.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; AGUILERA, J. M. (eds.). **Engineering and Food for the 21st Century**. Boca Raton FL: CRC Press, 2002.

REGIER, M.; SCHUBERT, H. Microwave processing. In: RICHARDSON, P. (ed.) **Thermal technologies in food processing**. Cambridge, GB: CRC, Woodhead publishing limited, 2001. p. 178–207.

RIBEIRO, I. F.; ACHÉ L. O pH das frutas nacionais. **Rev. Fac. Med. Vet. S. Paulo**, V. 4, fase. 2, 1950.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007. p. 33–75.

RINGBLOM, U. **The Orange Book**. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB., 2004. 218p.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2380–2387, 2008.

RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. **Citricultura Brasileira**, 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991.

ROMBOUTS F. M.; VERSTEEG, C.; KARMAN, A. H.; PILNIK, W. Pectinesterase in components parts of citrus fruits related to problems of cloud loss and gelation in citrus products. In: DUPUY, P. Edt. **Use of enzymes in food technology**, Paris, France Technique et documentation Lavoisier, p. 483–487, 1982.

ROSENBERG, U.; BÖG, W. Microwave Pasteurization, Sterilization, Blanching and Pest Control in the Food Industry. **Food Technology**, June 1987, p. 92–121.

ROTHSCHILD, G.; VLIET, C.V.; KARSENTY, A. Pasteurization conditions for juices and comminuted products of Israeli citrus fruits. **Journal of Food Technology**, v.10, p.29–38, 1975.

ROUSE, A. H. Distribution of pectinametilsterase and total pectin in component parts of citrus fruits. **Food Technology**, v.7, n.9, p.360–362, 1953.

ROUSE, A. H.; ATKINS, C. D. Heat inactivation of pectinametilsterase in citrus juice. **Food Technology**, v.6, n.8, p. 291–294, 1952.

ROUSE, A. H.; ATKINS, C. D. Further results from a study on heat inactivation of pectinametilsterase in citrus juice. **Food Technology**, v.6, n.8, p.221–223, 1953.

ROUSE, A. H.; ATKINS, C. D. Pectinesterase and pectin in commercial citrus juices as determined by methods used at the citrus experiment station. **Bulletin University of Florida. Agricultural Experiment Stations**, n. 570, dec., 1955. 19 p.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification. **Tetrahedron**, v. 59, p. 5431–5436, 2003.

RUPASINGHE, H. P. V.; YU, L. J. (2012). Emerging Preservation Methods for Fruit Juices and Beverages. In: EL-SAMRAGY, Y. (ed.). **Food Additive**, InTech, 2012. DOI: 10.5772/32148. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/food-additive/emerging-preservation-methods-3-for-fruit-juices-and-beverages>. Acesso em: Set, 2015.

RUSCHEL, C. K.; CARVALHO, H. H.; SOUZA, R. B.; TONDO, E. C. Qualidade Microbiológica e Físico-Química de Sucos de Laranja Comercializados nas Vias Públicas de Porto Alegre/RS. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 94-97, jan.-abr. 2001.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E.J. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C.; MARTÍN-GONZÁLEZ, M. F. S.; LÓPEZ-MALO, A.; SOSA-MORALES, M. E. Recent Studies Related to Microwave Processing of Fluid Foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 1, p.31-46, 2012.

SAMPEDRO, F.; RODRIGO, D.; HENDRICKX, M. Inactivation kinetics of pectin methyl esterase under combined thermal-high pressure treatment in an orange juice-milk beverage. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 133-139, 2008.

SANTOS, A. A.; SANTOS, E. H. L.; LIMA, R. A. SOUZA, J.; PRADO, A. A. O.; SOUZA, J. F. Caracterização físico-química e microbiológica dos sucos de laranja, manga e mangaba não pasteurizados comercializados na região central de Aracaju. In: Congresso Norte Nordeste de pesquisa e inovação, 7., 2012, Tocantins. **Anais...** Disponível em: <http://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/3055/3012>. Acesso em: Nov. 2017.

SAVARY, B. J.; VASU, P.; CAMERON, R. G.; MCCOLLUM, T. G., NUÑEZ, A. Structural characterization of the thermally tolerant pectin methylesterase purified from citrus sinensis fruit and its gene sequence. **J Agric Food Chem.**, v. 61, n. 51, p. 12711-12719, 2013. doi: 10.1021/jf403914u.

SCB. Sociedade Criacionista Brasileira. Nossa visão das cores e o espectro eletromagnético. In: VIEIRA, R. C. C.; VIEIRA, R. C. (eds.). **Folha Criacionista**, n. 58, ano 28, mar. 1988. Disponível em: http://www.revistacriacionista.org.br/fc/FC58_19.htm. Acesso em: Out, 2017.

SEYMOUR, T. A.; PRESTON, J. F.; WICKER, L.; LINDSAY, J. A.; MARSHALL, M. R. Purification and properties of pectinesterases of Marsh white grapefruit pulp. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 1080-1085, 1991.

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 12, n. 45. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9276-9>.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1971. 529 p.

SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Pectins: structure, functionality and uses In: STEPHEN, A. M. PHILLIPS, G. O. WILLIAMS, P. A. **Food polysaccharides and their applications**. 2. Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. p. 353-411.

SIO, F., PALMIERI, A., SERVILLO, L., GIOVANE, A., CASTALDO, D., 2001. Thermoresistance of pectin methylesterase in Sanguinello orange juice. **J. Food Biochem.**, v. 25, n. 2, p. 105-115.

SOSA-MORALES, M. E.; TIWARI, G.; WANG, S.; TANG, J.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Dielectric heating as a potential postharvest treatment of disinfesting mangoes I: Relation between dielectric properties and ripening. **Biosystems Engineering**, v. 113, p. 297-303, 2009.

STALAM. Dielectric_heating.gif (online). Nove, Italy: Stalam S.p.A, 2013 (cit. 18.5. 2015). Disponível em: http://www.stalam.it/images/grafici/Dielectric_heating.gif. Acesso em: Out, 2017.

STRATAKOS, A. C., DELGADO-PANDO, G., LINTON, M., PATTERSON, M. F.; KOIDIS, A. Industrial scale microwave processing of tomato juice using a novel continuous microwave system. **Food Chemistry**, v. 190, p. 622–628, 2016.

SUÁREZ, C.; VIOLLAZ, P. E.; ROVEDO, C. O.; TOLABA, M. P.; HAROS, M. Improved drying techniques and microwave food processing. In: S. M. Alzamora, M. S. Tapia,; A. López-Malo (eds.), *Minimally processed fruits and vegetables* (p. 175–188). Gaithersburg: Aspen, 2000.

SUGAI, A. Y., SHIGEOKA, D. S., BADOLATO, G. G.; TADINI, C. C. Análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 233 - 238, set.-dez., 2002.

TAJCHAKAVIT, S.; RAMASWAMY, H. S. Continuous-flow microwave heating of orange juice? Evidence of nonthermal effects. **J. Microwave Power**, v. 30, n. 3, p. 141-148, 1995.

TAJCHAKAVIT, S.; RAMASWAMY, H. S. Thermal vs. Microwave Inactivation Kinetics of Pectin Methylsterase in Orange Juice under Batch Mode Heating Conditions. **Lebensmittel-Wissenschaft Und – Technologie - Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p 85-93, fev., 1997a.

TAJCHAKAVIT, S.; RAMASWAMY, H. S. Continuous-flow microwave inactivation kinetics of pectin methyl esterase in orange juice **Journal of Food Processing and Preservation**. v.21, n.5, p. 365–378, 1997b.

TAYLOR, A. L., and WITTE, J. P. Carotene in Oranges. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 30, p. 110-111, 1938.

TEWARI, G. Microwave and Radio-Frequency Heating. In: TEWARI, G.; JUNEJA, V. K. (ed.). **Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation**. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2007. p. 91-98.

THOSTENSON, E. T.; CHOU, T-W. Microwave processing: fundamentals and applications. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 30, n. 9, p. 1055-1071, sep. 1999.

TOLEDO, R. T. **Fundamentals of food process engineering**. 3. ed. New York: Springer US, 2007.

TRIBESS, T. B.; TADINI, C.C. Inactivation kinetics of pectin methylsterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1328–1335, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UHLIG, H. **Industrial enzyme and their applications**. USA: John Wiley & Sons, 1998. 472 p.

USDA. United States Department of Agriculture. **Chemistry and Technology of Citrus, Citrus Products, and Byproducts**. Agriculture Handbook n. 98. Washington DC: Nov. 1956.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. **Basic Report 09206, Orange juice raw, Release 28**, Oct., 2016. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2289?format=Abridged&reportfmt=pdf&pdfQvs=%7B%7D>. Acesso em: Ago. 2017.

USDA. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Citrus: World Markets and Trade**. Jul., 2017. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> Acesso em: Set. 2017.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**, 2. Ed. Boca Raton, FL: CRC Press Book, 2006.

WANG, Y.; WANG, J. Computer simulation of radio frequency heating. In: JUN, S.; IRUDAYARAJ, J. M. (eds.), **Food processing operations modeling**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. p. 81-112.

WICKER, L. Selective extraction of thermostable pectinesterase. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 534-535, 1992.

WICKER, L.; TEMELLI, F. Heat inactivation of pectinametilsterase in orange juice pulp. **Journal of Food Science**, v.53, n.1, p.162-164, 1988.

VADIVAMBAL, R.; JAYAS, D. S. Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials—A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 161–171, 2010.

VALIM, M. F.; MARCELLINI, P. S.; CAVALHEIRO, S.; DEMARCHI, R.; SERAFIM, E. Preference Mapping to Assess Consumers' Orange Juice Preferences. **Fruit Processing**, Schönborn, Germany, v. 11, n. 3, p. 90-94, 2001.

VAN DEN BROECK, I.; LUDI KHUYZE, L. R.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Inactivation of orange pectinesterase by combined high pressure and temperature treatments: A kinetic study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1960–1970, 2000.

VAN DEN BROECK, I.; LUDI KHUYZE, L. R.; VAN LOEY, A. M.; WEEMAES, C. A.; HENDRICKX, M. E. Thermal and Combined Pressure-Temperature Inactivation of Orange Pectinesterase: Influence of pH and Additives. **American Chemical Society**, v. 47, n. 7, p. 2950–2958, 1999a.

VAN DEN BROECK, I. V. D.; LUDI KHUYZE, L. R.; WEEMAES, C. A.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Thermal Inactivation of pectinesterase extracted from oranges. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 23, p. 391–406, 1999b.

VERCET, A.; LOPEZ, P.; BURGOS, J. Inactivation of heat-resistant pectinmethylesterase from orange by manothermosonication. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.432-437, 1999.

VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, F. M.; SPAANSEN, C. H.; PILNIK, W. Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinametilsterases from orange. **Journal of Food Science**, v.45, p.969-71, 1980.

VIKRAM, V.B.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 31-40, 2005.

VILLAMIEL, M.; DEL CASTILLO, M. D.; SAN MARTÍN, C.; CORZO, N. Assessment of the Thermal Treatment of Orange Juice during Continuous Microwave and Conventional Heating. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 78, p. 196-200, 1998.

VORAGEN, A.G. J.; PILNIK, W.; THIBAUT, J-F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. Pectins In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995. p. 287-339.

YAM, K. L.; LAI, C. C. Microwavable frozen food or meals. In: Hui, Y. H. (ed.). **Handbook of food science, technology and engineering**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. p. 1131–1138.

YAMANAKA, H. T. **Sucos cítricos**. São Paulo: CETESB, 2005. 45 p.

APÊNDICE A

Calibração do termopar tipo T:

O termopar foi calibrado seguindo as (13) e (14):

$$T_{1\text{ corrigido}}(^{\circ}\text{C}) = 1,0202 T_1 + 0,464$$

$$R^2 = 0,9996 \quad (13)$$

$$T_{2\text{ corrigido}}(^{\circ}\text{C}) = 1,0146 T_2 + 0,601$$

$$R^2 = 0,9998 \quad (14)$$

Em que: $T_{\text{corrigido}}$ é a temperatura corrigida ($^{\circ}\text{C}$); T é a temperatura medida durante o processo ($^{\circ}\text{C}$). Os índices 1 e 2 referem-se aos termopares 1 e 2, respectivamente.

Calibração do sensor de infravermelho (IR):

O sensor infravermelho foi calibrado seguindo a eq.(15):

$$T_{\text{corrigido}}(^{\circ}\text{C}) = 0,995 T + 1,635$$

$$R^2 = 0,9996 \quad (15)$$

Calibração do sensor de fibra ótica (FO):

O sensor de fibra ótica foi calibrado seguindo a eq.(16) e demonstrou uma variação muito pequena entre a temperatura medida e a corrigida:

$$T_{\text{corrigido}}(^{\circ}\text{C}) = 1,01 T + 0,127$$

$$R^2 = 1,0 \quad (16)$$