UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANA TOMIE KUNITAKE

Processamento e estabilidade de caldo de cana acidificado

Pirassununga
2012

MARIANA TOMIE KUNITAKE

Processamento e estabilidade de caldo de cana acidificado

"Versão Corrigida"

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador:
Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus

Pirassununga
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Kunitake, Mariana Tomie
K96p Processamento e estabilidade de caldo de cana acidificado / Mariana Tomie Kunitake. -- Pirassununga, 2012.
129 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus.

1. Caldo de cana 2. Tecnologia dos obstáculos 3. Envase asséptico 4. Vida de prateleira. I. Título.

Aos meus queridos pais Brasilio e Lucia,

que com todo amor e esforço sempre investiram na minha educação

e me apoiaram em todas as minhas decisões;

Ao querido Professor Rodrigo,

que sempre incentivou esse meu interesse na área da pesquisa

e me proporcionou a oportunidade de ingressar no mestrado e,

mais uma vez, a honra ser sua orientada.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA pela oportunidade de realizar o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e auxílios concedidos para este projeto.

À pós-graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos que sempre se prontificou em minhas dúvidas durante o programa.

Ao meu orientador, Prof. Rodrigo Rodrigues Petrus, por sua dedicação em transmitir seus conhecimentos para a elaboração e execução desta pesquisa e, fundamentalmente, pela confiança e conselhos que me foram dados.

À Tecnocana Tecnologia em Cana Ltda, representada pelo Sr. Ângelo, pela doação da matéria prima.

À Thech Desinfecção pela doação de ácido peracético.

À Sandet pela doação de detergentes para uso industrial.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela compreensão e disponibilidade do Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos.

À Profa. Dra. Maria Teresa de Alvarenga Freire pela atenção e compartilhamento de conhecimentos durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores da pós-graduação pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e convívio durante estes anos.

Aos estagiários Daniel, Felipe, Luana, Carolina, Marcela, Thamires e Thalita pela colaboração e dedicação na condução dos experimentos.

Aos técnicos dos laboratórios, Roice, Graziane, Ednelí e Keila, pela paciência, amizade e ajuda nas análises laboratoriais.

Às minhas amigas, moradoras e agregadas da República Sagatiba que sempre estiveram presentes nesta etapa da minha vida, compartilhando angústias e alegrias, com muitas lágrimas e gargalhadas.

À minha família e amigos, pelo apoio e incentivo dado durante esse período e compreensão nos momentos de ausência, em especial, meus avós e o Mauro.

A todos que de alguma forma participaram e contribuíram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, o meu agradecimento.

Obrigada.

RESUMO

KUNITAKE, M. T. **Processamento e estabilidade de caldo de cana acidificado.** 2012. 129 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O caldo de cana adicionado de polpa ou suco de fruta é uma bebida bastante apreciada no Brasil. O presente trabalho consistiu na elaboração, no processamento em escala piloto e no estudo da vida de prateleira de caldo de cana com polpa de maracujá. Processaram-se nove lotes de caldo de cana adicionado de 4% (m/m) de polpa de maracujá, a 85, 90 e 95 °C/30 s, em triplicata. A bebida pasteurizada foi envasada assepticamente em garrafas de polietileno tereftalato (PET) e estocada a 7 °C, na ausência de luz. Testes físico-químicos foram empregados na caracterização da bebida. Procedeu-se à análise do teor de vitamina C no caldo *in natura* e na bebida processada. Determinaram-se as atividades das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) antes e após o processamento. A estimativa da vida útil do produto foi fundamentada em testes microbiológicos e sensoriais. A avaliação da estabilidade microbiológica baseou-se na enumeração de bactérias e fungos psicrotróficos. Testes de escala hedônica de sete pontos para avaliação da aparência, aroma, sabor e aceitação global foram empregados na análise da estabilidade sensorial. As médias dos valores de pH, sólidos solúveis e acidez titulável variaram entre 3,9 e 4,0; 17 e 23 °Brix; e 0,15 e 0,19% de ácido cítrico, respectivamente. A polpa de maracujá não incrementou o teor de ácido ascórbico da bebida que ficou entre 2,6 a 2,8 mg/ 100 mL de bebida. A atividade da PPO variou entre 3,1 e 40,3 U/mL para os nove lotes do caldo acidificado, antes da pasteurização. Os três binômios empregados no processamento foram efetivos na inativação da enzima. A atividade da POD oscilou entre 69,8 e 220,4 U/mL; contudo, apenas o processamento a 95 °C atingiu 100% de inativação. As contagens de bactérias e fungos em todos os nove lotes processados foram inferiores a 2 log UFC/mL ao longo de 90 dias de estocagem. A bebida atingiu médias de notas entre 5 e 6 para todos os atributos avaliados após 30 dias de estocagem. As médias dos tempos de vida útil da bebida processada a 85, 90 e 95 °C/30 s atingiram 31, 39 e 52 dias, respectivamente. Concluiu-se que o aumento da temperatura de pasteurização afetou positivamente a estabilidade da bebida. Contudo, o decréscimo da aceitação sensorial limitou a sua vida útil, no qual o sabor foi o principal atributo limitante.

Palavras chave: caldo de cana, tecnologia dos obstáculos, envase asséptico, vida de prateleira.

ABSTRACT

KUNITAKE, M. T. **Processing and stability of acidified sugarcane juice.** 2012. 129 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Sugarcane juice, either pure or with fruit pulp addition, is an appreciated beverage in Brazil. The aim of this research was to evaluate the shelf-life of sugarcane juice mixed with passion fruit pulp (4% w/w). Nine batches were processed at 85, 90 and 95 °C/30 s, in three replicates. The pasteurized beverage was aseptically filled into polyethylene terephthalate (PET) bottles and stored at 7 °C without light exposure. pH, soluble solids and titrable acidity were measured during storage. The content of vitamin C was analyzed both in fresh sugar cane juice and pasteurized beverage. Polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) activities were determined both before and after processing. Microbiological stability evaluation was based on psychrotrophic bacteria and fungi counts. Sensory acceptance was estimated by assigning a liking score on a 7-point hedonic scale to the attributes appearance, flavor, taste and overall appreciation. The mean values for pH, soluble solids and titratable acidity ranged from 3.8 to 4.3, 15 to 24 °Brix, and 0.13 to 0.17% of citric acid, respectively, for all processed batches. The passion fruit pulp did not increase the ascorbic acid content in the pasteurized product which ranged from 2.6 to 2.8 mg / 100 mL of beverage. The PPO activity varied from 3.1 to 40.3 U/mL for the nine acidified sugarcane juice batches before pasteurization. The three pasteurization binomials were effective for enzyme inactivation. The POD activity ranged from 69.8 to 220.4 U/mL. However, only processing at 95 °C achieved complete inactivation. The bacteria and fungi counts in all nine pasteurized batches were lower than 2 log CFU/mL up to 90 days of storage. The product achieved scores between 5 and 6 for all sensory attributes evaluated after 30 days of storage. The estimated shelf-life for beverage processed at 85, 90 and 95 °C/30 s was 31, 39 and 52 days, respectively. It was concluded that pasteurization temperature had a positive effect on beverage stability. Nevertheless, the decrease in flavor acceptance was the main limiting factor for the product's shelf-life.

Keywords: sugarcane juice, hurdle technology, aseptic filling, shelf-life.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio com formação de tetraguaiacol.....27
Figura 2. Ciclo catalítico da peroxidase, R^+: radical protoporfirina, S: substrato doador de elétrons. 27
Figura 3. Mecanismo proposto para a oxidação do catecol pela PPO 29
Figura 4. Estados de oxidação de fenóis decorrentes da atividade de catecolase de PPOs.....29
Figura 5. Representação do sólido colorido para o espaço colorimétrico L* a* b* 32
Figura 6. Fluxograma de produção experimental de caldo de cana acidificado com polpa de maracujá.....45
Figura 7. Ficha de avaliação para teste de escala hedônica de 7 pontos. 50
Figura 8. Ficha de avaliação para teste de diferença do controle. 51
Figura 9. Amostras dos lotes de caldo de cana com polpa de maracujá processados a 85 °C/ 30 s e estocado a 6,5 ± 0,5 °C na ausência de luz. 72
Figura 10. Amostras dos lotes de caldo de cana com polpa de maracujá processados a 90 °C/ 30 s e estocado a 6,5 ± 0,5 °C na ausência de luz. 73
Figura 11. Amostras dos lotes de caldo de cana com polpa de maracujá processados a 95 °C/ 30 s e estocado a 6,5 ± 0,5 °C na ausência de luz. 74
Figura 12. Evolução dos índices de cor calculados para os lotes de caldo de cana acidificado com polpa de maracujá, pasteurizado e estocados a 6,5 ± 0,5 °C na ausência de luz. 75
Figura 13. Caldo de cana adicionado de polpa de maracujá com indícios de deterioração. 77
Figura 14. Imagem de colônias desenvolvidas em amostras de caldo de cana com polpa de maracujá.....85
Figura 15. Desenvolvimento de bactérias psicrotróficas em caldo de cana adicionado de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C. 86
Figura 16. Desenvolvimento de fungos psicrotróficos em caldo de cana adicionado de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C. 86
Figura 17. Vida de prateleira estimada para caldo de cana adicionado de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado sob refrigeração na ausência de luz. 100

Figura 18. Intenção de compra de caldo de cana com polpa de maracujá pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 ℃ para a Replicata R1.....102
Figura 19. Intenção de compra de caldo de cana com polpa de maracujá pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 ℃ para a Replicata R2.....103
Figura 20. Intenção de compra de caldo de cana com polpa de maracujá pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 ℃ para a Replicata R3.....104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal do caldo de cana *in natura*. 19
Tabela 2. Padrões de identidade e qualidade para polpa de maracujá.....24
Tabela 3. Caracterização físico-química da matéria prima e do caldo de cana acidificado antes do processamento. 54
Tabela 4. Médias dos três lotes processados em cada replicata para caracterização físico-química da matéria prima e do caldo de cana acidificado, antes do processamento.....56
Tabela 5. Valores de pH de caldo de cana adicionado de 4% de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C. 58
Tabela 6. Médias de sólidos solúveis (°Brix) em caldo de cana acidificado, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C. 59
Tabela 7. Médias de acidez titulável (g ácido cítrico/100 mL) de caldo de cana adicionado de 4% de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C. 61
Tabela 8. Determinação de ácido ascórbico (mg/100 mL). 62
Tabela 9. Médias do ratio (% sólidos solúveis/acidez titulável) do caldo de cana acidificado, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C. 64
Tabela 10. Atividade da polifenoloxidase (U/mL) em caldo de cana *in natura* e na bebida acidificada antes e após a pasteurização. 65
Tabela 11. Atividade da peroxidase (U/mL) em caldo de cana *in natura* e na bebida acidificada antes e após a pasteurização.....66
Tabela 12. Parâmetros L, a e b detectados pelo colorímetro Hunterlab Ultra-Scan e os deltas ΔL, Δa e Δb das amostras de caldo de cana acidificada antes e após a pasteurização. 68
Tabela 13. Médias do índice de cor[1] de caldo de cana com polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C. 71
Tabela 14. Resultados das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios (UFC/mL)[a]. 78
Tabela 15. Contagens de bolores e leveduras (UFC/mL)[a]. 80
Tabela 16. Contagens microbianas (UFC/mL) em caldo de cana com polpa de maracujá pasteurizado e envasado assepticamente. 82

Tabela 17. Contagem de micro-organismos psicrotróficos (UFC/mL)[a] em caldo de cana acidificado, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C.....84
Tabela 18. Aceitação sensorial de caldo de cana acidificado e pasteurizado a 85 °C/30 s. 89
Tabela 19. Teste de diferença do controle (Dunnett) para caldo de cana acidificado pasteurizado a 85 °C/30 s. 91
Tabela 20. Aceitação sensorial de caldo de cana acidificado pasteurizado a 90 °C/30 s. 93
Tabela 21. Teste de diferença do controle (Dunnett) para caldo de cana acidificado e pasteurizado a 90 °C/30 s. 95
Tabela 22. Aceitação sensorial de caldo de cana acidificado pasteurizado a 95 °C/30 s. 97
Tabela 23. Teste de diferença do controle (Dunnett) para caldo de cana acidificado e pasteurizado a 95 °C/30 s. 99
Tabela 24. Teste de diferença do controle (Dunnett) para verificação da ação residual de ácido peracético (APA) nas embalagens. 106

SUMÁRIO

RESUMO.....5
ABSTRACT.....6
1 INTRODUÇÃO.....14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....17
2.1 Aspectos gerais da cana de açúcar.....17
2.2 Caracterização do caldo de cana.....19
2.3 Mercado e consumo de caldo de cana.....20
2.4 Caldo de cana adicionado de polpa de fruta.....22
2.4.1 Polpa de fruta.....22
2.5 Mecanismos de deterioração de caldo de cana.....24
2.5.1 Reações enzimáticas.....26
2.5.2 Degradação microbiológica.....30
2.6 Qualidade sensorial do produto.....32
2.7 Tecnologias de processamento de caldo de cana.....33
2.7.1 Métodos convencionais.....34
2.7.2 Métodos não convencionais ou emergentes.....35
2.8 Sistemas de embalagem.....37
2.8.1 Envase asséptico.....38
2.9 Vida de prateleira de caldo de cana.....39
2.9.1 Tecnologia dos obstáculos.....40
3 OBJETIVOS.....41
3.1 Objetivo geral.....41
3.2 Objetivos específicos.....41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....42
4.1 Material e equipamentos.....42

4.1.1 Matéria prima 42
4.1.2 Embalagem 42
4.1.3 Sanificante químico 42
4.1.4 Moenda de cana 43
4.1.5 Pasteurizador 43
4.1.6 Homogeneizador 43
4.1.7 Cabina de fluxo de ar unidirecional 43
4.1.8 Dosadora 43
4.1.9 Estufa incubadora BOD 44
4.2 Procedimento experimental 44
4.2.1 Preparo da bebida 44
4.2.2 Processamento 44
4.2.3 Envase asséptico 46
4.2.4 Testes físico-químicos, enzimáticos e análise de cor 46
4.2.5 Avaliação microbiológica e sensorial para estimativa da vida útil 48
4.2.6 Análise das embalagens 51
4.2.7 Análise estatística dos resultados 52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
5.1 Caracterização físico-química da matéria prima 53
5.2 Testes físico-químicos e enzimáticos na bebida processada 57
5.3 Análise de cor 67
5.4 Testes microbiológicos 76
5.4.1 Avaliação da estabilidade microbiológica 83
5.5 Avaliação sensorial 87
5.5.1 Estimativa da vida de prateleira 100
5.5.2 Intenção de compra 101
5.6 Análise das embalagens 106

5.6.1 Testes microbiológicos 106
5.6.2 Avaliação sensorial para verificação de ácido peracético residual 106
6 CONCLUSÕES 107
7 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS 108
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109
APÊNDICE A – Fotos do processamento. 125
APÊNDICE B – Foto panorâmica da planta piloto 126
ANEXO A – Protocolo de análise de *Salmonella*. 128

1 INTRODUÇÃO

Os últimos anos têm sido assinalados por uma elevada taxa de crescimento do poder aquisitivo dos consumidores brasileiros, destacando-se o setor de alimentos, que visa à obtenção de produtos mais seguros, saudáveis, estáveis a temperatura ambiente, isentos de conservadores químicos, práticos e de vida de prateleira estendida. Neste cenário, a aplicação combinada e racional de tecnologias de processamento é imperativa para se obter a devida eficiência industrial, promovendo a segurança e estabilidade dos alimentos; possibilitando sua comercialização em âmbitos local e global de acordo com os critérios estabelecidos pela legislação alimentar vigente.

O Brasil é um país que se destaca por sua grande vocação agrícola, sendo reconhecido como principal produtor mundial de cana de açúcar. O consumo de caldo de cana, bastante apreciado em diversas regiões do país, poderia ser explorado com maior eficiência se o seu grau de conveniência e qualidade higiênico-sanitária fosse estendido aos consumidores, por meio do seu processamento e envase em embalagens para o consumo final; assegurando a sua inocuidade, ampliando sua vida útil e facilitando a sua utilização em redes de alimentação (OLIVEIRA, A., 2007).

O caldo de cana ou garapa é altamente perecível; por isso, recomenda-se o seu consumo imediato após a extração. A perecibilidade da bebida pode ser atribuída às más condições higiênico-sanitárias durante a obtenção do caldo, à sua elevada concentração de açúcar, à alta atividade de água e à baixa acidez. Assim, as tecnologias de conservação são extremamente relevantes no que concerne à proteção contra agentes físicos (luz, calor), químicos (O_2), bioquímicos (enzimas) e biológicos (micro-organismos, insetos) responsáveis por alterações que comprometem as características químicas (composição), físicas (turbidez, separação de fases), sensoriais (odor, sabor, cor, textura) e nutricionais (proteínas, vitaminas) da bebida, influenciando a sua vida de prateleira (GRAUMLICH; MARCY; ADAMS, 1986).

O mercado informal de caldo de cana para consumo final é constituído, majoritariamente, por vendedores ambulantes, atuando quase sempre em precárias condições higiênicas (SILVA; FARIA, 2006). Oliveira et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica de caldo de cana *in natura* comercializado por ambulantes

no interior de São Paulo, constatando que 25% das amostras apresentaram-se insatisfatórias, com níveis de coliformes termotolerantes superiores aos permitidos pelos padrões legais brasileiros.

A venda de caldo de cana em quiosques localizados em áreas litorâneas e em *shopping centers* do país é crescente. No entanto, esta prática tem exigido a instalação de moendas nos pontos de venda, frequentemente mal higienizadas; a necessidade de descontaminação da cana de açúcar antes da moagem (procedimento muitas vezes omitido) e a geração de grande volume de resíduo (bagaço).

Até a corrente data não se tem notícia da comercialização de caldo de cana industrializado, pronto para consumo, no mercado nacional. As vantagens proporcionadas por uma eventual industrialização relacionam-se à disponibilização de uma bebida segura e de elevada qualidade, em qualquer época do ano, independente do período de safra; ao aumento da vida útil e extensão do consumo a locais distantes da região de plantio, com a diminuição do volume de matéria prima transportado, resultando na diminuição de custos de transporte.

A tecnologia dos obstáculos ou dos processos combinados é um conceito amplamente empregado no processamento de alimentos em virtude as importantes vantagens que oferece, a exemplo da redução da intensidade de determinado tratamento, quando associado a outras tecnologias de conservação. Tal prática assegura a produção de alimentos de qualidade superior e vida de prateleira estendida. Os obstáculos atuantes na estabilização do caldo de cana processado no desenvolvimento do presente trabalho incluíram a acidificação do produto, o tratamento térmico, o envase asséptico da bebida pasteurizada seguidos pela estocagem refrigerada do produto final.

Prati (2004) avaliou a adição de sucos de maracujá, limão e abacaxi ao caldo de cana em diferentes proporções, tendo sido a bebida adicionada de 5% de suco de maracujá a de melhor aceitação sensorial; resultado que motivou a escolha da polpa de maracujá pasteurizada a ser adicionada ao caldo de cana processado ao longo desta pesquisa.

Posto isto, a proposta de estudo de um produto com grande potencial de industrialização, como o caldo de cana adicionado de polpa de fruta, é uma forma de incrementar a literatura pertinente ao tema, atualmente disponível, e estimular o desenvolvimento de micro e pequenos processadores da bebida. A pesquisa que

originou o presente trabalho visou ao processamento e estudo da estabilidade de caldo de cana adicionado de polpa de maracujá, pasteurizado, acondicionado assepticamente em garrafas plásticas e estocado sob refrigeração.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da cana de açúcar

A cana de açúcar, pertencente ao gênero *Saccharum* L., foi introduzida no estado de São Paulo no período colonial e transformou-se em uma das principais culturas da economia brasileira (ORZARI, 2010). As variedades de cana de açúcar existentes atualmente são originadas da seleção e do cruzamento entre espécies e híbridos do gênero, para a obtenção de uma variedade mais resistente a pragas e doenças, mais produtiva e de boa adaptação ao solo e clima, no local de cultivo (ROSSETTO, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, com mais de 8 milhões de hectares plantados, tendo produzido aproximadamente 625 milhões de toneladas de cana na safra de 2010/2011. Este feito coloca o país na liderança mundial em tecnologia de produção de etanol e açúcar, além de subprodutos e resíduos utilizados para cogeração de energia elétrica, fabricação de ração animal e fertilizante para as lavouras, como o bagaço, a torta de filtro, o melaço e a vinhaça, entre outros (CONAB, 2011). Portanto, a cana de açúcar pode ser integralmente aproveitada.

Essa matéria prima de grande versatilidade e viabilidade econômica é produzida em quase todo o território nacional, sendo 54,23% em São Paulo, seguido por Minas Gerais (8,10%), Goiás (7,46%), Paraná (7,25%), Alagoas (5,46%), Mato Grosso do Sul (4,93%) e Pernambuco (4,32%). Nos demais Estados produtores as áreas são menores com bons índices de produtividade (CONAB, 2011). Esse êxito produtivo deve-se à disponibilidade de terras cultiváveis para o plantio da cana, justificado pela fácil adaptação ao clima e solo, sem prejuízo aos outros alimentos, tecnologia de produção e estrutura na distribuição (DEMATTÊ, 2004).

O Governo Federal desenvolveu uma política para orientar a expansão sustentável da cana de açúcar no Brasil que tem como base, critérios ambientais, econômicos e sociais. A referida política foi definida a partir de um estudo inédito e minucioso, denominado “Zoneamento Agroecológico da Cana de Açúcar” (ZAECana), que estipulou as áreas mais propícias ao plantio da cultura considerando tipos de clima, solo, biomas, declividade do terreno e necessidade de irrigação, entre outras características (MAPA, 2011).

Segundo Ripoli e Ripoli (2004), a qualidade da cana de açúcar era determinada exclusivamente pelo teor de sacarose aparente (POL); entretanto, as características físico-químicas e microbiológicas dessa matéria prima também podem afetar significativamente a qualidade do produto final. Por esta razão, incluíram-se análises complementares visando à uma avaliação mais abrangente da matéria prima. Considera-se ainda que a qualidade da cana é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos, a saber:

- Os *fatores intrínsecos* relacionam-se aos teores de sacarose, açúcares redutores, fibras, compostos fenólicos, amido, ácido aconítico e minerais; influenciados pela variedade da cana, variações de clima (temperatura, umidade relativa do ar, chuva), solo e tratos culturais.
- Os *fatores extrínsecos* estão associados à presença de materiais estranhos no colmo (terra, pedra, resíduos de cultura, plantas invasoras etc.) ou compostos produzidos por micro-organismos devido à sua ação sobre os açúcares do colmo.

Outros fatores que afetam a qualidade da matéria prima incluem a contaminação microbiana; o teor de álcool no caldo da cana; a concentração de amido na cana; ocorrência de pragas e doenças; índice de *Honig-Bogstra*; teores de palhiço e ácido aconítico; acidez, produzida pela ação de micro-organismos; concentração de dextrana, composto formado a partir da hidrólise da sacarose por bactérias, e associada, portanto, à deterioração da cana (RIPOLI; RIPOLI, 2004).

O setor agroindustrial canavieiro iniciou, sobretudo nas últimas décadas, pesquisas sobre a qualidade da matéria prima. Neste sentido, desenvolveram-se trabalhos em parceria com usinas e destilarias possibilitando a melhoria da qualidade e produtividade tanto para a área agrícola como para a industrial. Assim, as usinas de cana de açúcar estão procurando adequar-se ao cenário da economia nacional por meio de inovações, a fim de integrar áreas agrícolas e industriais. Acrescenta-se a necessidade de implantação de técnicas, equipamentos e recursos para beneficiar o planejamento e o controle do processo produtivo decorrente do aumento da competitividade no setor, evitando o desperdício (VIAN; MARIN, 2011). O investimento em pesquisa e desenvolvimento é extremamente importante para aumentar a produtividade das usinas e destilarias, uma vez que o mercado tende a ser cada vez mais competitivo.

Outro aspecto relevante a ser considerado é a variabilidade de preço observada ao longo do tempo, referente aos diferentes níveis constatados em anos-safras consecutivos, e as variações observadas entre os diferentes meses do ano-safra. A flutuação dos níveis de preço no mercado, em anos consecutivos, está diretamente relacionada à quantidade de cana de açúcar produzida e à sua destinação (produção de açúcar ou álcool, principalmente). Verifica-se, portanto, que as variações ao longo do ano estão associadas ao ciclo produtivo da cana de açúcar. Durante os meses de safra (abril a dezembro) há mais competição entre os produtores, o que gera queda do preço, comparado aos meses de entressafra (BACCHI, 2006).

2.2 Caracterização do caldo de cana

O caldo de cana, popularmente reconhecido como garapa, obtido pela moagem da cana de açúcar é caracterizado como uma bebida energética não alcoólica de gosto doce e agradável, opaca, de baixa acidez (pH 5,0 - 5,5), com coloração que varia de parda a verde escura, composição variável em função da variedade, idade e sanidade da cana, solo, condições climáticas e práticas agrícolas (OLIVEIRA et al., 2007).

A Tabela 1 mostra a composição centesimal do caldo de cana *in natura*, determinada por alguns pesquisadores, confirmando a inconstância da composição da matéria prima.

Tabela 1. Composição centesimal do caldo de cana *in natura*.

	IBGE (1999)	**Oliveira A. (2007)**	**Rezzadori (2010)**
Valor calórico (Kcal)	82,00	73,80	80,82
Umidade (%)	78,80	81,14	79,47
Carboidratos (%)	20,50	18,20	19,95
Açúcares totais (%)	---	17,68	---
Proteínas (%)	0,30	0,21	0,26
Cinzas (%)	0,30	0,41	0,33
Sólidos solúveis (ºBrix)	---	22,74	19,35
Vitamina C (mg/100 mL)	2,00	2,98	5,64

Conforme Fava (2004), o caldo *in natura* é constituído basicamente por água e sólidos totais, no qual a sacarose responde por 70 a 91% do total de sólidos solúveis. Além de preservar os nutrientes presentes na cana de açúcar, entre eles, minerais (ferro, cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio), vitaminas do complexo B e vitamina C.

A garapa não é considerada uma boa fonte de vitamina C, mas este nutriente pode ser adicionado a fim de enriquecer o produto e atrair o consumidor (PRATI, 2004).

O caldo de cana é considerado um ótimo substrato para o desenvolvimento de amplo espectro microbiano, por conter nutrientes orgânicos e inorgânicos, apresentar alta atividade de água e pH entre 5,0 e 5,5 (GALLO; CANHOS, 1991). Os micro-organismos mais importantes presentes no caldo de cana são essencialmente oriundos do solo e do ambiente atmosférico, dentre os quais se destacam leveduras e fungos filamentosos, bactérias láticas e esporuladas (OLIVEIRA et al., 2007).

Segundo Yusof et al. (2000), o caldo de cana *in natura* sofre deterioração de sabor e aparência 24 horas após a sua extração, mesmo sob refrigeração. Essa perda de qualidade é ocasionada pela fermentação do caldo, resultando em produtos ácidos de origem microbiana (BHUPINDER; SHARMA; HARINDER, 1991).

Os micro-organismos presentes no caldo extraído podem ser originados não só da cana como também de focos de contaminação nas moendas e em outros equipamentos e utensílios (SILVA; CANHOS, 1990). Neste contexto, os manipuladores assumem importante papel ao atuarem como potencial fonte de disseminação de micro-organismos patogênicos (VANZO; AZEVEDO, 2003), sendo estes um grupo de relevância epidemiológica na transmissão de enteropatógenos (LORENÇO; UCHOA; BASTOS, 2002).

2.3 Mercado e consumo de caldo de cana

O consumo de alimentos vendidos nas ruas é um hábito disseminado mundialmente. Notadamente no Brasil, encontram-se vendedores de biju, puxa-puxa, cachorro quente, pastel, acarajé, tapioca, churros, coco verde, pamonha, caldo de cana, entre outros (LUBATTI, 1999).

A garapa é consumida frequentemente por pessoas de diferentes faixas etárias e classes sociais, especialmente nos períodos mais quentes do ano (PRATI;

MORETTI; CARDELLO, 2005). O caldo é obtido por um processo físico de separação do bagaço pela moagem da cana em moendas elétricas ou manuais, coado em peneiras metálicas e servido com gelo, podendo ser consumido puro ou adicionado de suco de frutas ácidas, sendo normalmente comercializado por vendedores ambulantes, denominados garapeiros, em vias públicas, parques, praças e feiras (LUBATTI, 1999).

O caldo comercializado em vias públicas apresenta algumas vantagens como preço inferior e maior conveniência, comparado à bebida comercializada em lanchonetes e quiosques em *shoppings centers* (WIRNANO; ALLAIN, 1991). No entanto, o comércio da garapa na rua reúne aspectos negativos relacionados às questões higiênico-sanitárias (YASMEEN, 2001).

Os pontos de venda nas ruas apresentam uma grande diversidade de formas, dimensões e materiais de construção. Em geral, as instalações são precárias, não dispondo de sanitários, de rede de energia elétrica e de sistema de abastecimento de água potável, o que dificulta a higienização das mãos e dos utensílios utilizados no preparo da bebida e a manutenção da temperatura adequada da matéria prima. A água residuária e o lixo muitas vezes são descartados próximo ao ponto de venda, o que atrai insetos e roedores (BRYAN et al., 1988). As precárias condições higiênico-sanitárias do local, aliadas à falta de treinamento e conhecimento dos vendedores, no que tange às boas práticas de manipulação de alimentos, trazem consigo sérios riscos à saúde pública, decorrentes da presença de perigos de natureza biológica e física (SILVA JÚNIOR, 1995).

Pesquisas que investigaram alimentos comercializados em vias públicas, em vários países na América Latina, evidenciaram a possibilidade de ocorrência de distúrbios gastro-intestinais em função da presença de micro-organismos patogênicos, devido às más condições higiênicas, associadas a temperaturas ambientais elevadas (BRYAN et al., 1992; MOSUPYE; VON HOLY, 2000).

No Brasil, estudos realizados em diversas regiões, envolvendo alimentos comercializados em vias públicas, demonstraram que este tipo de produto pode representar um severo risco à saúde da população (SOCCOL; SCHWAB; KATSOKA, 1990; OLIVEIRA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2003; KITOKO et al., 2004). Sabe-se que a comercialização do caldo de cana destinado ao consumo humano é praticada, predominantemente, no mercado informal; o que dificulta o acesso a estatísticas acerca de seu consumo.

2.4 Caldo de cana adicionado de polpa de fruta

A adição de suco ou polpa de frutas ácidas, em pequenas proporções, ao caldo de cana, tem por finalidade aprimorar a qualidade sensorial da bebida, conferindo ao produto um sabor diferenciado e suavizando a sua doçura, por promover alteração na relação entre o teor de sólidos solúveis e a acidez titulável (MATSUURA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007). Além disso, o aumento da acidez favorece a estabilidade microbiológica da bebida (VERA et al., 2003).

A determinação da razão entre o teor de sólidos solúveis e acidez titulável (SS/AT), denominada *ratio*, é um método prático para avaliar o sabor e a palatabilidade de uma bebida. Do ponto de vista industrial, o teor elevado de AT diminui a necessidade de adição de acidificantes e propicia melhoria nutricional, segurança alimentar e qualidade sensorial (ROCHA et al., 2001).

O decreto n.º 6.871 de 04/06/2009 regulamenta a Lei n.º 8.918 de 14/07/1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas (BRASIL, 2009). Conforme a Seção II do Capítulo VII da padronização das bebidas, o caldo de cana adicionado de polpa de maracujá pode ser considerado um suco misto, segundo a descrição: “Bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da parte do vegetal de origem por processamento tecnológico adequado e combinação de polpa de fruta. Esta mistura é submetida a tratamento que assegura a sua apresentação e conservação até o momento do consumo”.

Prati (2004) analisou amostras de caldo de cana acidificado com suco de limão, abacaxi e maracujá, sendo a bebida adicionada de 5% de suco de maracujá a atingir melhor aceitação sensorial. Rezzadori (2010) também obteve uma aceitação sensorial satisfatória para esta formulação de bebida mista.

2.4.1 Polpa de fruta

A indústria de polpa de frutas tem como objetivo a obtenção de produtos seguros com características sensoriais e nutricionais próximas da fruta *in natura*, visando atender aos padrões de identidade fixados pela legislação brasileira e às exigências do consumidor (AMARO; BONILHA; MONTEIRO, 2002; BRASIL, 2000). Por vezes, contudo, estes objetivos não são alcançados.

A vida útil da polpa de fruta é limitada e reduzida dependendo da temperatura de estocagem, do oxigênio residual e da permeabilidade da embalagem ao oxigênio, entre outros fatores. Por isso, a pasteurização seguida pelo congelamento são tecnologias empregadas industrialmente para manter a qualidade da polpa. Conforme Monteiro, Amaro e Bonilha (2005), a polpa de fruta, mesmo pasteurizada e congelada, pode sofrer degradação com alteração de seu valor nutricional, do aroma e do sabor. Este autor analisou a polpa de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) em três faixas de temperatura de pasteurização (69-72, 73-76 e 77-82 ℃/30 s) e mantida sob refrigeração durante 180 dias.

O maracujá amarelo é um fruto não climatérico, de elevada acidez, fonte de niacina, riboflavina e vitaminas A e C; mostrando-se interessante ao processamento de bebidas mistas (MEDINA et al., 1980; GARRUTI, 1989). Em pequenas proporções já confere seu aroma e sabor intensos, sendo vantajoso em produção de grande escala, pois no caso de outros sucos, seriam necessárias maiores quantidades dos mesmos para realçar seu sabor (SOUZA; SANDI, 2001).

Fruticultores mostram grande interesse na produção do maracujá-amarelo, face à sua rápida produção em relação a outras frutíferas e à sua grande penetração e aceitação no mercado nacional e internacional, fazendo do Brasil seu maior produtor (PIO et al., 2003; ROSSI, 2005). A sazonalidade da produção do maracujá e as perdas ocasionadas por condições climáticas adversas, pela colheita, pela distância em que é transportado e a perecibilidade das frutas têm estimulado a produção industrial de polpas, pois o mercado tem se tornado cada vez mais atraente, aliado ao maior valor agregado do produto (MONTEIRO; AMARO, BONILHA, 2005).

Conforme o Anexo I, a Instrução Normativa n.º 01 de 07/01/2000, que aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta (BRASIL, 2000), polpa de maracujá é definida como um produto não fermentado e não diluído, obtido da parte comestível do maracujá (*Passiflora* spp.), através de processo tecnológico adequado, com teor mínimo de sólidos totais. Esta deve apresentar cor variando de amarelo a alaranjado, gosto ácido e aroma próprio, além de obedecer aos padrões de identidade e qualidade mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Padrões de identidade e qualidade para polpa de maracujá (BRASIL, 2000).[1]

	Valor mínimo	Valor máximo
Sólidos solúveis (°Brix, a 20 °C)	11,0	---
pH	2,7	3,8
Acidez total expressa em ácido cítrico (g/100g)	2,50	---
Açúcares totais naturais do maracujá (g/100g)	---	18,00
Sólidos totais (g/100g)	11,0	---

2.5 Mecanismos de deterioração de caldo de cana

A qualidade e estabilidade de bebidas de origem vegetal são afetadas por reações oxidativas que dependem das condições de processo, presença de oxigênio no espaço livre da embalagem ou dissolvido no produto, taxa de permeabilidade a gases da embalagem, tempo e temperatura de estocagem, presença de luz e catalisadores (GRAUMICH; MARCY; ADAMS, 1986; ALVES; GARCIA, 1993).

Pigmentos escuros são formados durante o processamento da cana de açúcar iniciando-se com a etapa de extração do caldo. Os mecanismos responsáveis pelo escurecimento são de natureza enzimática, por oxidação de compostos fenólicos culminando com a formação de melaninas, e de natureza não enzimática, via reação de *Maillard*, oxidação de ácido ascórbico, degradação térmica, alcalina e condensação de açúcares. No tocante às transformações enzimáticas, verifica-se a atuação da polifenoloxidase (PPO/EC 1.10.3.1), principal enzima atuante no caldo de cana (BUCHELI; ROBINSON, 1994; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

Segundo Almeida (2007), os compostos fenólicos ou polifenóis presentes em quase todos os vegetais possuem grupos hidroxila (-OH) ligados diretamente a um anel aromático e vários grupos substituintes, como carboxilas, metoxilas, estruturas cíclicas não-aromáticas, entre outras. Assim, os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com o tipo e número de anéis fenólicos e em subclasses de acordo com substituições específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas. Polifenóis podem oxidar ou reagir com o ferro e

[1] http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1617

oxigênio formando compostos escuros, justificando a importância do uso de material inerte no contato com o alimento, como o aço inoxidável.

O escurecimento do caldo (*browning*) também pode derivar da polimerização e/ou reação de radical carbonila com grupos amino provindos da oxidação do ácido ascórbico, causando perdas nutricionais (SHAW; MOSHONAS, 1991). A reação de *Maillard* ou a oxidação de açúcares que formam aldeídos ativos são formas de escurecimento não enzimático que podem ocorrer na bebida, além da perda de cor característica do produto decorrente da oxidação de pigmentos, como clorofila, xantofila, caroteno e antocianina (SIMÃ0, 1985).

De acordo com Riffer (1988), a tendência à cor amarela pode ocorrer devido a oxidação dos carboidratos, que é evidenciada pela mudança de cor, tendendo frequentemente para a tonalidade ligeiramente parda/amarelada ou marrom, com o decorrer da estocagem do caldo de cana. Neste sentido, a pasteurização e a acidificação são tecnologias aplicadas com o intuito de retardar a degradação da cor da bebida.

No que concerne à oxidação de proteínas, esta não se relaciona a alterações no sabor, pois tais componentes são hidrolisados por enzimas proteolíticas e desnaturados por aquecimento e reações enzimáticas (SIMÃO, 1985).

Outro fator que limita a vida de prateleira é a floculação de colóides presentes no caldo. A solução coloidal é composta por substâncias de elevada massa molar, como o caramelo, as melanoidinas e as melaninas (KOBLISH; MORETTI, 1999), podendo sofrer separação de fases, prejudicando a aceitação sensorial da bebida, notadamente a aparência.

Como mencionado anteriormente, o caldo de cana é uma bebida altamente perecível, sendo bastante vulnerável à deterioração microbiana durante as etapas de processamento, acondicionamento, distribuição e estocagem; resultando em mudanças nas características químicas, físicas, sensoriais e nutricionais. Contudo, a utilização de uma matéria prima de elevada qualidade, aliada a aplicação racional de tecnologias de processamento e embalagem garantem um produto seguro, de boa qualidade e vida útil estendida (WILLARD, 2002).

2.5.1 Reações enzimáticas

A degradação do caldo de cana provindo das enzimas se deve principalmente ao seu escurecimento e a alteração de sua viscosidade com possível separação de fase. Segundo Qudsieh et al. (2002), o escurecimento enzimático contribui significativamente na cor do caldo de cana e se inicia logo após a extração do caldo.

As enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) são responsáveis por reações oxidativas e biodegradação, que podem ocasionar alterações associadas ao sabor, à cor, à textura e à qualidade nutricional dos alimentos (ROMANO, 2006). As reações enzimáticas que as envolvem estão relacionadas ao escurecimento de frutas, hortaliças, cereais e leguminosas, durante o processamento e armazenamento (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; WHITAKER, 1994).

Bucheli e Robinson (1994) demonstraram que, embora a peroxidase (POD/EC 1.11.1.7) apresente atividade no caldo de cana e seja termorresistente, a PPO é a principal enzima responsável pelo escurecimento da bebida; permitindo a aplicação de um tratamento térmico mais brando, visto que a PPO é uma enzima relativamente termossenssível. Neste sentido, a inativação térmica da PPO poderá proporcionar maior estabilidade à bebida.

Peroxidase (POD)

A peroxidase, presente em plantas, está envolvida em diversas reações, a saber: ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa contra patógenos, regulação da elongação de células e outras (CAMPOS et al., 2004). As peroxidases pertencem à classe das oxirredutases e possuem no sítio ativo um grupo Fe^{3+} protoporfirínico, catalisando reações de oxidação de vários substratos doadores de prótons, como monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis na presença de peróxido de hidrogênio (LEHMKUHL, 2006). A Figura 1 ilustra a reação entre o guaiacol e o peróxido de hidrogênio.

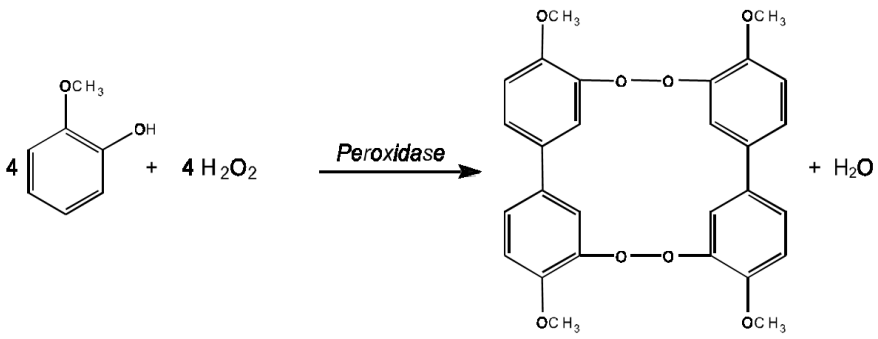


Figura 1. Reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio com formação de tetraguaiacol (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

A Figura 2 mostra o mecanismo de reação da peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio e do substrato doador de elétrons (S). Na primeira etapa (a) ocorre a transferência de dois elétrons, referente à oxidação do grupo prostético Fe^{3+} da enzima nativa pelo peróxido de hidrogênio, gerando o composto I, que consiste no ferro oxiferrila (Fe^{4+} =O) e o radical protoporfirina (R+). A etapa (b) consiste na oxidação de uma molécula do substrato (S_{red}) com consequente formação do substrato oxidado (S_{ox}) e geração do composto II (Fe^{4+} =O). Na última etapa do processo (c), a enzima reage com uma segunda molécula do substrato retornando ao seu estado nativo (LEHMKUHL, 2006).

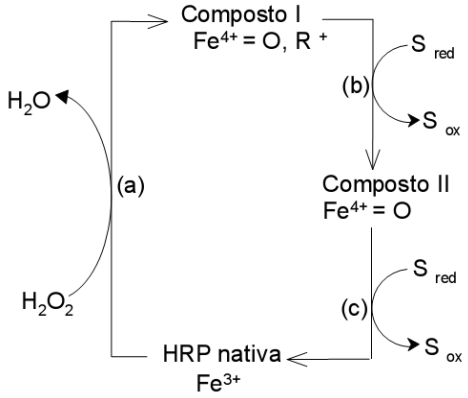


Figura 2. Ciclo catalítico da peroxidase, R^+: radical protoporfirina, S: substrato doador de elétrons (red: reduzido, ox: oxidado) (OLIVEIRA, I., 2007).

Alexander (1966) estudou a presença de POD e suas propriedades na cana de açúcar, porém, a relação desta enzima com o escurecimento do caldo não foi investigada.

Polifenoloxidase (PPO)

A polifenoloxidase é encontrada numa variedade de tecidos e órgãos, com maior atividade em tecidos nos estágios iniciais de desenvolvimento, na qual a quantidade de fenóis também é alta (AGRIOS, 1997). Da mesma maneira, é elevada em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência (AGRIOS, 1997). Essas enzimas, pertencentes à classe das oxidorredutases, contêm cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenóis (atividade de cresolase, tirosinase ou monoferol monoxigenase) e a oxidação (desidrogenação) desses compostos para respectivas *o*-quinonas (atividade de catecolase) (SHIMIZU, 2004). As polifenoloxidases atuam sobre uma variedade de substratos: p-cresol, tirosina e ácido p-cumárico como substratos monofenólicos, catecol, diidroxifenilalanina e ácido clorogênico como substratos difenólicos (GOMES et al., 2001).

Segundo Lehmkuhl (2006), a atividade enzimática observada em vegetais varia em relação à espécie, cultivar, período do ano, clima, solo, estado de amadurecimento e local de plantio. Nos tecidos vegetais, esta enzima localiza-se nos cloroplastos e é responsável pelo escurecimento de frutas e legumes quando cortados e expostos ao ar atmosférico, causado pela oxidação de compostos fenólicos naturais às correspondentes *o*-quinonas na presença de oxigênio atmosférico e da PPO (LEHMKUHL, 2006).

O sítio ativo da PPO consiste em dois centros metálicos de cobre, na forma oxidada e encontrada como Cu(II)-OH-Cu(II), em que cada cobre está coordenado por três átomos de nitrogênio, resíduos de histidina e um grupo hidróxido formando uma ponte entre os dois centros metálicos (LEHMKUHL, 2006).

A Figura 3 mostra um mecanismo simplificado dessa enzima na presença de catecol e oxigênio molecular. O ciclo catalítico se inicia na forma *met*, em que o substrato liga-se após a desprotonação de um de seus grupos hidroxilas de forma monodentada ao átomo de Cu(II). Esse processo é seguido pela oxidação do substrato com formação da primeira quinona e a consequente forma reduzida da enzima (ROMANO, 2006). A incorporação de oxigênio molecular gera o estado *oxy* da enzima, a qual reage com a segunda molécula de substrato que se coordena após a desprotonação de uma de suas hidroxilas. Na oxidação do difenol a quinona regenera o estado *met* da enzima encerrando o ciclo catalítico (ROMANO, 2006).

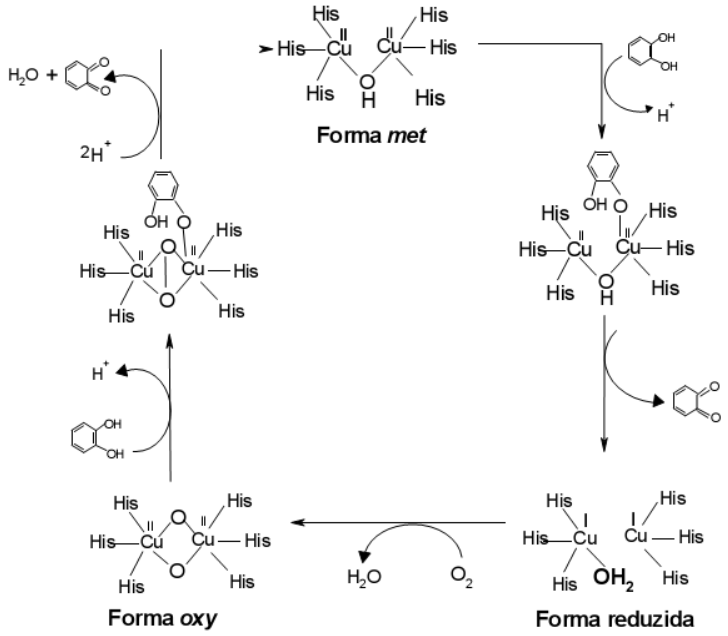


Figura 3. Mecanismo proposto para a oxidação do catecol pela PPO (OLIVEIRA, I., 2007).

Shimizu (2004) demonstrou que a atividade de catecolase leva à formação de diferentes estados de oxidação de fenóis, apresentada na Figura 4, na qual a forma fenólica permite a ligação com proteínas por interação hidrofóbica e por pontes de hidrogênio, que são ligações reversíveis de baixa energia. Em contrapartida, a forma iônica e as quinonas interagem covalentemente com proteínas, formando ligações irreversíveis (SHIMIZU, 2004). A partir disso, observa-se que a PPO possui grande afinidade com o oxigênio.

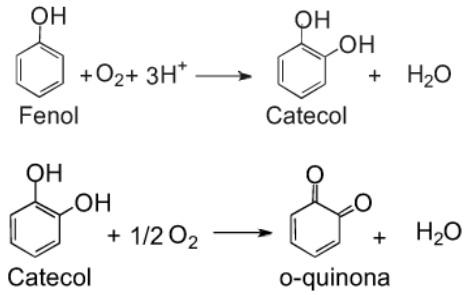


Figura 4. Estados de oxidação de fenóis decorrentes da atividade de catecolase de PPOs (FATIBELLO-FLHO; VIEIRA, 2002).

Bucheli e Robinson (1994) observaram que o escurecimento enzimático depende do oxigênio disponível no meio, e sua indisponibilidade cessa o escurecimento.

As oxidações enzimáticas, geralmente, terminam em polimerização, cujos produtos finais são pigmentos escuros. Esse tipo de reação pode ser inibido pela inativação enzimática por meio de processamento térmico ou tratamento químico (SIMÃO, 1985).

A partir do isolamento de uma PPO ativa com alta especificidade ao ácido clorogênico de um tecido foliar da cana, estudos sugeriram que a PPO contribui significativamente para a formação da coloração escura do caldo de cana (COOMBS; BALDRY, 1978; COOMBS; GOODACRE; VANE, 1980).

Portanto, o escurecimento no caldo de cana é iniciado pela oxidação enzimática dos compostos fenólicos pelo sistema PPO. O produto intermediário da oxidação é a quinona, que rapidamente se condensa, formando pigmentos escuros insolúveis, denominado melaninas. A ação dessa enzima resulta na formação de pigmentos escuros, frequentemente acompanhados de mudanças indesejáveis na aparência a nas propriedades sensoriais do produto, resultando na diminuição da vida útil e do valor de mercado (ROMANO, 2006).

Enzimas pécticas

Normalmente, sucos de fruta *in natura* possuem enzimas pécticas, sendo a poligalacturonase a mais resistente ao tratamento térmico, com atividade ótima em pH 4,5 (IADEROZA; DRAETTA, 1991). De acordo com Prati (2004), a enzima pectinesterase pode existir no caldo e sua inativação é desejada, pois ao desdobrar as pectinas em ácidos pécticos e pectínicos ocorre alteração da viscosidade e separação de fases do líquido.

2.5.2 Degradação microbiológica

A ocorrência do surto de mal de Chagas em 2005, no Estado de Santa Catarina, ocasionado pela ingestão de caldo de cana contaminado pelo *Trypanossoma cruzi* (BRASIL, 2011), motivou a Resolução RDC 218 de 29/07/2005 da ANVISA que dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos higiênico-sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais, incluindo, o caldo da cana (BRASIL, 2005).

A estabilidade e a segurança do caldo de cana são baseadas em muitos fatores, os quais visam evitar o desenvolvimento dos micro-organismos contaminantes impedindo a deterioração e a veiculação de doenças de origem alimentar.

A presença de substratos e a alta atividade de água da garapa favorecem o desenvolvimento de fungos e bactérias deteriorantes. A presença de oxigênio gera um potencial de oxirredução positivo (Eh > 0), proporcionando o desenvolvimento de bolores na superfície da bebida (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

O caldo de cana adicionado de suco de frutas ácidas oferece um obstáculo ao desenvolvimento de espécies patogênicas e deteriorantes; notadamente a germinação e produção de toxina por esporos de *Clostridium botulinum*, devido à redução do pH a níveis inferiores a 4,6. Entretanto, num meio ácido verifica-se o desenvolvimento de bolores, leveduras e bactérias láticas. (FRANCO; LANDGRAF, 2005; LEITÃO, 1991).

Os micro-organismos existentes na cana de açúcar, logo após a extração do caldo, encontram um meio rico em açúcar, de baixa acidez; o que propicia a fermentação da bebida. Isso resulta em substâncias que alteram as características físicas e sensoriais do produto, levando à sua rejeição (EGGLESTON, 2002; PRATI, 2004; OLIVEIRA, A., 2007).

Os grupos de micro-organismos responsáveis pela deterioração da garapa incluem (OLIVEIRA, A., 2007; PRATI, 2004; SILVA et al., 2007; YUSOF et al., 2000):

- Bactérias esporogênicas, que são anaeróbicas facultativas, mesófilas, produtoras de ácidos butírico e acético, CO_2 e H_2;
- Bactérias não esporogênicas, como as bactérias láticas e acéticas que são mesófilas e microaerófilas;
- Bolores e leveduras, que são aeróbicos, mesófilos e apresentam baixa resistência térmica.

O resultado imediato da deterioração da garapa é a redução de sua vida de prateleira. Técnicas de conservação são estudas e desenvolvidas (YUSOF et al., 2000; MAO; XU; QUE, 2007; OLIVEIRA et al., 2007; REZZADORI, 2010), junto com a conscientização da importância da higienização da matéria prima e do local de processamento, para a criação de obstáculos ao desenvolvimento microbiano. Essas metodologias impactam na segurança, no aumento da vida útil e na

manutenção da integridade física, química e microbiológica do produto final (GAVA, 1984).

2.6 Qualidade sensorial do produto

Testes sensoriais podem ser utilizados no controle de qualidade e estudo de vida de prateleira (*shelf-life*) e possuem vantagens como a capacidade de detectar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis pelo consumidor, definirem características sensoriais importantes de um produto de forma rápida, e serem capazes de detectar particularidades dificilmente detectadas por outros procedimentos analíticos (MUÑOZ; CIVILLE; CARR, 1992).

O surgimento de coloração escura e alteração do sabor no caldo de cana são os principais fatores responsáveis pela rejeição da bebida (YUSOF et al., 2000), motivando a realização de testes para análise de cor e testes sensoriais.

Dessa forma, o uso da colorimetria que utiliza instrumentos ópticos para a sua medição no espaço tridimensional, de modo que a cor descrita torna-se inconfundível e as suas coordenadas indicam um ponto no espaço de cor (FRANCIS, 1988), é um meio apropriado para avaliar a cor do caldo de cana durante a sua estocagem. Essa medição pode ser feita por um colorímetro que adota o sistema de escala CIE 1976 (L* a* b*), também referido como CIELab, no qual o parâmetro L* representa a escala de luminosidade de 0 a 100, +a ao -a representa a escala do vermelho ao verde, +b ao -b representa a escala do amarelo ao azul do produto (FRANCIS, 1988). A Figura 5 mostra um sistema de escala de cor da CIE L* a* b*.

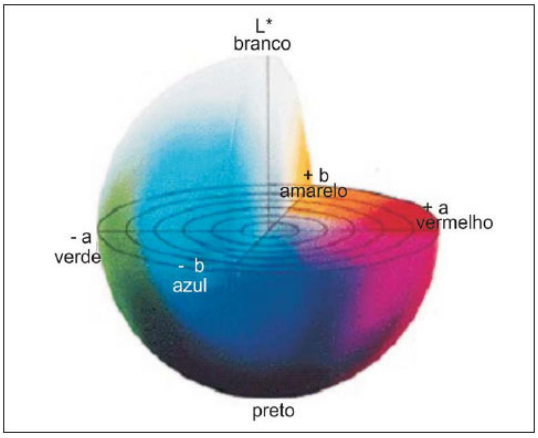


Figura 5. Representação do sólido colorido para o espaço colorimétrico L* a* b* (SILVA; PETTER; SCHNEIDER, 2007).

Os métodos empregados em análise sensorial se dividem em discriminativos ou de diferença, descritivos ou analíticos e afetivos (FERREIRA et al., 2000), a saber:

- Métodos discriminativos ou de diferença: determinam se existe uma diferença sensorial perceptível entre as amostras e estimam o tamanho de uma eventual diferença.
- Métodos descritivos ou analíticos: utilizados para descrever as amostras qualitativamente e avaliar a intensidade dos atributos sensoriais por meio de provadores treinados.
- Métodos afetivos: avaliam a preferência ou aceitação de uma amostra junto aos consumidores indicando o quanto gostou ou não por meio de uma escala sensorial.

A avaliação de aceitação pelo consumidor é crucial no processo de desenvolvimento ou melhoramento de produtos, pois a aceitabilidade infere a preferência; ou seja, as amostras mais aceitas são as mais preferidas e vice-versa. Dessa forma, uma triagem inicial ou uma avaliação preliminar da aceitação é realizada em condições laboratoriais, com uma equipe de 30 a 50 julgadores não treinados (FERREIRA et al., 2000). Para estudos mais representativos, simula-se uma situação mais próxima do mercado real, recrutando-se uma equipe mais numerosa (100 provadores, aproximadamente) em locais de grande trânsito de consumidores, como os supermercados (DUTCOSKI, 1996).

A escala hedônica está entre os métodos mais empregados para medida da aceitação ou necessidade de conhecer o "*status* afetivo" dos consumidores com relação ao produto (FERREIRA et al., 2000). O provador expressa sua preferência pelo produto, seguindo uma escala previamente estabelecida, com variação gradativa para cada atributo analisado pela base "gosta e desgosta" (CHAVES; SPROESSER, 1996; DUTCOSKI, 1996).

2.7 Tecnologias de processamento de caldo de cana

As tecnologias aplicadas ao processamento de alimentos visam à obtenção de um produto inócuo ao consumidor, com atributos nutricionais e sensoriais próximos ao alimento *in natura* e vida útil estendida. O processamento deve ainda assegurar a inativação de enzimas que catalisam a degradação do produto (RASO;

PAGÁN; CANDÓN, 2005), e apresentar uma relação custo-benefício vantajosa (TAPIA; ARISPE; MARTINEZ, 2005; BRUHN, 2007).

Conforme argumentado na introdução desta dissertação, não foram localizadas informações acerca de eventual industrialização de caldo de cana no país. Contudo, as tecnologias de processamento compatíveis com a bebida, pura ou acidificada, são múltiplas, incluindo métodos térmicos convencionais, como a pasteurização e a esterilização comercial, e métodos não convencionais ou emergentes, a exemplo do aquecimento ôhmico, da irradiação (raios gama), separação por membranas, ultrassom, campo elétrico pulsado e alta pressão hidrostática (APH).

2.7.1 Métodos convencionais

Uma das tecnologias de processamento mais difundidas é a pasteurização (T<100 °C), cujo binômio tempo/temperatura é delineado de acordo com os parâmetros de resistência térmica do micro-organismo ou enzima alvo que se pretende inativar (FONSECA, 1984). Neste processo, alguns micro-organismos são destruídos e outros injuriados (BANWART, 1989). Contudo, a população microbiana remanescente limita o tempo de estocagem do alimento quando comparado aos produtos comercialmente esterilizados. Por esta razão, a pasteurização é frequentemente associada a outros métodos de preservação, como estocagem refrigerada, redução do pH, incorporação de aditivos químicos, complementados pelo emprego de embalagens herméticas de alta barreira, no intuito de aumentar a vida útil do alimento (POTTER; HOTCHKISS, 1995).

Trabalhos realizados por Bhupinder, Sharma e Harinder (1991) mostraram que a pasteurização a 80 °C/10 min seguida da adição de 140 mg/L de metabissulfito de potássio, 3% de suco de limão e 1% de extrato de gengibre, conferiu uma estabilidade de 24 semanas ao caldo de cana engarrafado e um bom índice de aceitação sensorial.

Em contrapartida, tratamentos térmicos mais severos (T>100 °C) podem causar efeitos colaterais indesejáveis ao produto final, afetando as propriedades sensoriais e nutricionais, consequência da degradação de componentes termossensíveis, que resulta na rejeição do produto pelo consumidor final (RASO; PAGÁN; CANDÓN, 2005). Notadamente, em caldo de cana, observa-se o

surgimento de um sabor “cozido”, devido à grande quantidade de açúcar presente na bebida.

Estudos realizados por Sivasubramanian e Pai (1994) demonstraram que o melhor resultado sensorial para o tratamento do caldo de cana foi obtido quando o mesmo foi submetido ao processo *high temperature short time* (HTST), devido às altas taxas de transferência de calor envolvidas no aquecimento e resfriamento do produto, minimizando a formação de produtos de degradação.

Prati, Moretti e Cardello (2005) estudaram as características microbiológicas, físicas, químicas e sensoriais de caldo de cana parcialmente clarificado-estabilizado e misturas de caldo de cana com sucos de frutas ácidas como limão, abacaxi e maracujá. Os autores observaram variações nas características físico-químicas, com boa retenção de vitamina C após o tratamento térmico (75 °C/15 s) nas diferentes misturas. As análises microbiológicas indicaram boas condições higiênicas da bebida processada, adequadas ao consumo. A garapa parcialmente clarificada-estabilizada adicionada de 5% de suco de maracujá foi identificada como o produto de maior preferência pela equipe de provadores.

2.7.2 Métodos não convencionais ou emergentes

A fim de garantir a segurança alimentar e preservar a qualidade sensorial e nutricional do produto, estudos de novas tecnologias que utilizam métodos não convencionais vêm crescendo promissoramente; embora não tenham sido localizados trabalhos científicos que descrevessem a aplicação de alguns dos métodos não convencionais mencionados, na estabilização de caldo de cana. Salienta-se a relevância do desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao mecanismo e à cinética de destruição/inativação de micro-organismos e enzimas que permitam a escolha correta dos parâmetros de processo (RASO; PAGÁN; CANDÓN, 2005).

O aquecimento ôhmico é um processo térmico alternativo, com o objetivo de aquecer o alimento de forma rápida e uniforme, reduzindo a severidade da aplicação do calor no produto (SASTRY, 2005). Wang e Sastry (2002) relataram o uso dessa tecnologia como um pré-tratamento para o aumento do rendimento na extração de sucos e maior eficiência energética durante o processamento, com a utilização de uma temperatura moderada e baixa frequência.

A aplicação do campo elétrico pulsado em sucos associada ao emprego de temperaturas moderadas e tempos reduzidos de operação, atinge alta eficiência na inativação de esporos, micro-organismos patogênicos e enzimas, enquanto retém a qualidade nutricional e sensorial do produto (RIVAS et al., 2006; PALOMEQUE et al., 2001; JIN et al., 2001). Acrescentam-se vantagens de custo-benefício favorável, aumento de rendimento na extração de líquido e liberação de compostos que aprimoram a qualidade nutricional e físico-química do produto após o tratamento e a estocagem (ELEZ-MARTÍNEZ; SUÁREZ-RECIO; MARTÍN-BELLOSO, 2007; AGUILÓ-AGUAYO et al., 2008; RIENER et al., 2008).

A combinação do processamento por homogeneização a alta pressão hidrostática (APH) com temperaturas amenas gera um produto seguro, com boas qualidades nutricionais e sensoriais e de vida de prateleira estendida (DELIZA et al., 2005; BULL et al., 2004). Essa associação promove, notadamente, a inativação de bactérias altamente resistentes à pressão, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7, isolados de sucos de fruta (BAYINDIRLI et al, 2006; BUZRUL et al., 2008). Além de aprimorar a qualidade do suco industrializado, em relação aos métodos convencionais, devido à destruição de micro-organismos sem a ação de calor. O teor vitamínico, de compostos voláteis e a cor do alimento não são afetados (COELHO, 2002; WELTI-CHANES et al., 2005). Contudo, apresenta um custo elevado.

Oliveira et al. (2007) estudaram os efeitos do processamento térmico (70 °C/20 min) e da radiação gama (2,5 kGy) na estabilidade físico-química e sensorial de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. Ambos os tratamentos não alteraram a composição físico-química, o aroma e o sabor da bebida. No entanto, o teor de vitamina C no caldo de cana puro foi afetado pelo processo de irradiação isolado e combinado com o tratamento térmico. Houve redução microbiana em ambos os tratamentos; entretanto, o processo de irradiação apresentou-se como o menos eficiente na redução da população de micro-organismos.

A interação entre o tratamento térmico e a radiação gama apresentou maior eficácia na inativação da PPO. As porcentagens de inativação enzimática alcançadas pela combinação do tratamento térmico com a radiação gama, pela pasteurização e pela radiação gama foram 76,37; 47,90 e 35,60%, respectivamente, em comparação com o controle (OLIVEIRA et al., 2007).

A microfiltração, a ultrafiltração e a osmose inversa chamadas, também, de pasteurização a frio, podem ser utilizadas para substituir os processos térmicos tradicionais (VAN DER HORST; HANEMAAIJER, 1990). Rezzadori (2010) estudou a aplicação da microfiltração para clarificação de caldo de cana adicionado de polpa de maracujá tendo obtido resultados satisfatórios. O autor concluiu que a microfiltração é uma alternativa viável aos processos térmicos na conservação de caldo de cana, visto que as propriedades físico-químicas foram pouco alteradas e a bebida obtida apresentou boa aceitação sensorial. As principais vantagens deste processo relacionam-se ao emprego de baixas temperaturas, resultando em menores custos energéticos e na manutenção das características nutricionais. A análise microbiológica do caldo de cana microfiltrado mostrou uma redução de 3 a 6 log UFC/ mL na contagem microbiana, indicando que este se encontra dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira.

Poucos estudos empregam ultrassom para a inativação microbiana; no entanto, essa tecnologia favorece a inativação enzimática e a qualidade sensorial dos alimentos (CANDÓN; RASO; PAGÁN, 2005; TEREFE et al., 2009; TIWARI et al, 2009; ADEKUNTE et al., 2010). Caliari et al. (2004) irradiou caldo de cana de açúcar de primeira extração com ondas ultrassônicas visando à redução da população de *Leuconostoc mesenteroides*. Os resultados mostraram que a maior taxa de mortalidade (10,55%) foi obtida com a potência de 50 W, por 225 s, em caldo de cana com 18 °Brix, pH 4,5 e 45 °C. Alguns trabalhos, realizados em Cuba, relataram o uso de ondas ultrassônicas como um método alternativo para reduzir a população microbiana no caldo de cana (FERNÁNDEZ; CRUZ; GONZALEZ, 1982, RODRIGUEZ; LODOS; MENESES, 1984).

2.8 Sistemas de embalagem

As possibilidades de sistemas de embalagem para caldo de cana, puro ou acidificado, são múltiplas e dependem do tempo de vida de prateleira pretendido e das condições de distribuição, estocagem e comercialização. Alguns exemplos incluem o sistema de envase asséptico, o enchimento a quente e o envase a temperatura ambiente com prévia incorporação de conservadores químicos ao produto.

O caldo de cana puro ou adicionado de suco ou polpa de frutas pode ser acondicionado em garrafas plásticas, frascos de vidro, laminados cartonados, latas de alumínio, *bag-in-box* (mais difundido no segmento institucional) e filmes flexíveis tipo “almofada”. Destaca-se que as possibilidades de incorporação de agentes e/ou camadas de alta barreira são igualmente múltiplas, a exemplo da utilização de folha de alumínio e nanocompósitos.

O acondicionamento de caldo de cana, a embalagem e o sistema de fechamento, devem proteger a bebida da exposição ao oxigênio e à luz, apresentando baixa taxa de permeabilidade a estes agentes, uma vez que são promotores dos mecanismos de escurecimento enzimático e da oxidação de pigmentos e vitaminas (BUCHELI; ROBINSON, 1994).

A relação custo/benefício do sistema de embalagem, a vida de prateleira pretendida assim com a faixa de temperatura praticada durante as etapas distribuição, estocagem e comercialização do produto também são fatores primordiais a serem considerados na escolha de uma embalagem (GAVA, 1984).

A literatura investigada relata o depósito de uma patente originada a partir do desenvolvimento de uma embalagem descartável para cana de açúcar, que permite a extração do caldo retendo o bagaço no interior da embalagem. Salienta-se que esta inovação reduz os índices de contaminação da matéria prima (REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, 2011).

2.8.1 Envase asséptico

A tecnologia de embalagem para alimentos fluidos de maior destaque nas últimas décadas, em escala global, é o sistema de envase asséptico, que consiste no acondicionamento do produto em uma embalagem previamente esterilizada. O grau de eficiência do envase depende da qualidade do ar; que deve ser rigorosamente controlado, seguido de fechamento asséptico e hermético (HOLDSWORTH, 1992; BUCHNER, 1993). De acordo com Klaus (2002), as principais vantagens atribuídas ao uso de sistemas assépticos são o aumento da vida de prateleira, prescindindo da cadeia do frio para conservação do produto e da utilização de conservadores químicos; controle de processo mais confiável e melhoria da qualidade do produto.

O sistema asséptico destaca-se por permitir o uso de embalagens termossensíveis, como os termoplásticos, que são leves e podem ser moldados em diversos formatos. Os principais termoplásticos utilizados incluem o polietileno de baixa densidade (PEBD), polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno tereftalato (PET) e policloreto de vinila (PVC) (ALVES; GARCIA, 1993). Estes frascos podem utilizar rótulos opacos ou ser pigmentados na tentativa de impedir a interação do produto com a luz, aumentando a barreira de proteção. A garrafa de PET é uma opção interessante ao atraente mercado atual porque permite o envase de praticamente qualquer tipo de bebida (CAMILO, 2010), incluindo caldo de cana.

Silva e Faria (2006) estudaram o processamento de caldo de cana em escala piloto, envasado em garrafas de vidro, a quente e assepticamente (em sala limpa). Avaliou-se a qualidade do caldo produzido pelos dois processos e estocado a temperatura ambiente. Em relação aos aspectos sensoriais, microbiológicos e físico-químicos, as análises pós-processo mostraram que o caldo de cana, quando processado assepticamente, apresentou-se estável durante 30 dias, enquanto que o caldo de cana processado e envasado a quente atingiu uma vida útil de 60 dias.

2.9 Vida de prateleira de caldo de cana

O tempo de vida útil de um produto é basicamente determinado por meio de testes físico-químicos, enzimáticos, microbiológicos e sensoriais. No caldo de cana, o escurecimento e o surgimento de sabores estranhos são os principais fatores associados à rejeição do produto, deflagrado por mecanismos de natureza química, enzimática e microbiológica.

A procura por alimentos que conservam suas características depois de submetidos ao processamento térmico tem conquistado a preferência do mercado consumidor; a exemplo dos sucos processados, refrigerados e prontos para beber (ALVES; GARCIA, 1993; CORRÊA NETO, 1998).

A combinação entre as tecnologias de processamento incluindo agentes oxidantes, como peróxido de hidrogênio e ozônio, calor, refrigeração, entre outras pode atingir uma sinergia que favoreça a estabilidade do produto (WALKLING-RIBEIRO et al., 2008; UKUKU et al., 2010).

2.9.1 Tecnologia dos obstáculos

Interações entre os fatores extrínsecos e intrínsecos originaram o conceito dos obstáculos de Leistner, que visa à estabilidade bioquímica e microbiológica do alimento em escala industrial (CHIRIFE; FAVETTO, 1992). Os obstáculos normalmente considerados na conservação dos alimentos são: temperatura (alta ou baixa), atividade de água, pH, potencial de oxirredução, conservadores químicos, atmosfera modificada e micro-organismos competitivos (bactérias láticas e produtos do seu metabolismo), podendo também ser incluído a adequação da embalagem. Dentre eles, o pH figura como obstáculo de grande relevância estabelecendo limites de segurança para os alimentos. A aplicação sinérgica desses fatores amplia a estabilidade e a qualidade do alimento, tornando-o inócuo à saúde do consumidor (SENAI/SEBRAE, 1999).

A aplicação do tratamento térmico brando combinada à pH ácido, envase asséptico e estocagem refrigerada cria obstáculos que favorecem a estabilização microbiológica, enzimática e sensorial do caldo de cana. Ademais, a seleção do binômio tempo/temperatura deve ser norteada pela composição, características físico-químicas e pH do alimento, devendo ser suficiente para inativar os micro-organismos patogênicos e deteriorantes termorresistentes (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998; AZEREDO, 2004).

Chauhan et al. (2002) submeteram caldo de cana ao processo de pasteurização (70 °C/10 min), adicionado de ácido cítrico (40 mg/100 mL de suco), ácido ascórbico (40 mg/100 mL) e de metabissulfito de potássio (150 mg/L), isoladas ou combinadas, estocadas as temperaturas de 30 °C e refrigeração de 4 °C. Estas condições conferiram ao produto, acondicionado em garrafas de vidro previamente esterilizadas, estabilidade de 90 dias e qualidade sensorial aceitável, principalmente para as amostras mantidas sob refrigeração.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desta pesquisa baseou-se no processamento e no estudo da vida de prateleira de caldo de cana acidificado, pasteurizado, acondicionado assepticamente em garrafas plásticas e estocado sob refrigeração.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Analisar a estabilidade microbiológica e sensorial de caldo de cana adicionado de 4% de polpa de maracujá, pasteurizado e acondicionado assepticamente em garrafas de polietileno tereftalato (PET).
- Investigar o impacto de diferentes binômios de pasteurização (85, 90 e 95 °C / 30 s) na inativação das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), na qualidade microbiológica e sensorial da bebida, como também, na vida de prateleira.
- Estimar o tempo de vida útil do caldo de cana acidificado estocado a 7 °C, na ausência de luz.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e equipamentos

A matéria prima, os principais materiais e equipamentos utilizados na pesquisa estão relacionados a seguir.

4.1.1 Matéria prima

A cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), cultivar SP 3250, foi fornecida pela Tecnocana Tecnologia em Cana Ltda, Santa Cruz das Palmeiras/SP, cidade localizada a 40 km, aproximadamente, do local de processamento, no campus da USP de Pirassununga.

A polpa congelada de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) foi adquirida no mercado local, em Pirassununga/SP.

4.1.2 Embalagem

Foram utilizadas garrafas de polietileno tereftalato (PET) cristal de 320 mL, com terminação de 45 mm e tampa de rosca de polipropileno (PP). Tais embalagens foram adquiridas da Emplas®, São Paulo – SP, em uma unidade paletizada da qual foram retiradas para descontaminação e acondicionamento do produto.

4.1.3 Sanificante químico

O agente químico utilizado na descontaminação da linha de processamento e das embalagens foi o produto Proxitane® 1512 AL, solução aquosa constituída por 15% de ácido peracético (APA), fornecido pela Thech Desinfecção Ltda, São Paulo/SP.

O ácido peracético (APA) é um agente que possui amplo espectro microbicida, atuando em baixas concentrações a temperatura ambiente. A decomposição do APA resulta em produtos inócuos à saúde e ao meio ambiente, tais como o ácido acético e oxigênio (ANVISA, 2003).

Os testes toxicológicos com ácido acético conduzidos pelo *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA/FAO/WHO), estabeleceram uma ingestão

diária aceitável (IDA) “não limitada”, significando que o seu uso está limitado à quantidade necessária para atender às Boas Práticas de Fabricação (BPF); ou seja, à quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário (ANVISA, 2003).

4.1.4 Moenda de cana

O caldo de cana foi extraído em uma moenda elétrica com rolos de aço inoxidável, modelo Cana Shop 200 (200 L/h), de fabricação Maqtron, Joaçaba/SC.

4.1.5 Pasteurizador

O caldo de cana adicionado de polpa de maracujá foi pasteurizado em um trocador de calor a placas elétrico com vazão nominal de 150 L/h, equipado com válvula pneumática de retorno de produto não pasteurizado, de fabricação Sumá Indústria e Comércio Ltda, Campinas/SP.

4.1.6 Homogeneizador

A bebida foi homogeneizada a 150 Bar em homogeneizador de um estágio com vazão nominal de 150 L/h, fabricado pela Artepeças P&B Ind. Com. Ltda. Esta operação unitária foi incluída com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas de polpa de maracujá, visando à melhor estabilidade física da bebida.

4.1.7 Cabina de fluxo de ar unidirecional

Para assegurar o envase asséptico do produto utilizou-se uma cabina de fluxo de ar unidirecional (ISO classe 5) horizontal de fabricação Veco do Brasil, Campinas/SP.

4.1.8 Dosadora

O envase da bebida em garrafa plástica foi conduzido por meio de uma dosadora gravimétrica microprocessada semi-automática de fabricação Polienva-Movitron, São Paulo/SP.

4.1.9 Estufa incubadora BOD

Equipamento utilizado na estocagem refrigerada dos lotes processados, de fabricação Fanem®, São Paulo/SP.

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 Preparo da bebida

A cana de açúcar foi cortada, raspada e higienizada por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) por 20 minutos a temperatura ambiente, contendo 30 mg/L de cloro residual livre (CRL). Imediatamente em seguida procedeu-se à extração do caldo em moenda elétrica, ao qual foram adicionados 4% (m/m) de polpa de maracujá, em relação à massa de caldo extraído; seguido da homogeneização manual da mistura. A adição da polpa congelada foi feita imediatamente após a extração do caldo para atenuar a ação da enzima polifenoloxidase (PPO).

4.2.2 Processamento

Após a extração e acidificação do caldo, a bebida foi filtrada, misturada, pré-aquecida, homogeneizada, pasteurizada, resfriada a 8 °C, aproximadamente, e bombeada para um tanque pulmão isotérmico antes do envase asséptico em garrafas de PET previamente descontaminadas.

Processaram-se nove lotes de caldo de cana, contendo 4% de polpa de maracujá, a 85, 90 e 95 °C/30 s (três replicatas para cada binômio). Os processamentos foram realizados com uma frequência mensal, aproximadamente, alternando-se as temperaturas de pasteurização, a fim de se atenuar a influência sazonal, que altera a composição da matéria prima, sobre a pesquisa. O processamento e envase foram conduzidos em uma linha descontaminada imediatamente antes de seu uso com solução de ácido peracético 0,1% (v/v) a 55 °C durante 30 minutos. Ao término da descontaminação da linha esta foi enxaguada com água aquecida à mesma temperatura de pasteurização da bebida, para

remoção do residual de ácido peracético. Após o processamento foi realizada a limpeza *clean in place* (CIP) com detergentes alcalino e ácido. O fluxograma, as imagens do processamento e da planta piloto estão ilustrados na Figura 6, Apêndice A e Apêndice B, respectivamente.

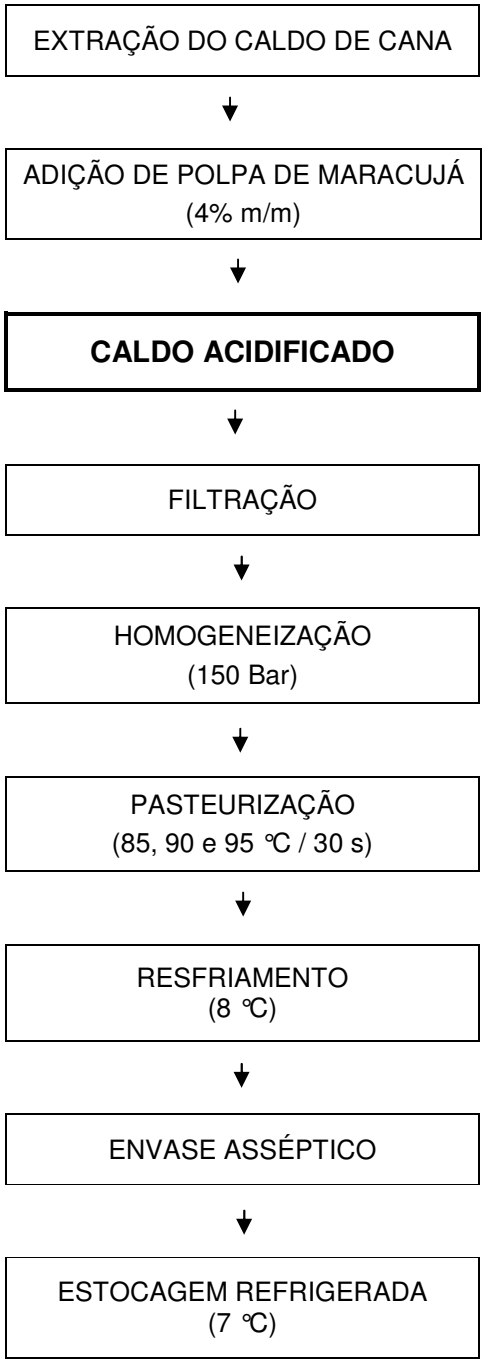


Figura 6. Fluxograma de produção experimental de caldo de cana acidificado com polpa de maracujá.

4.2.3 Envase asséptico

A bebida acidificada foi envasada assepticamente em garrafas de PET descontaminadas por imersão em solução de ácido peracético 0,05% (v/v) a 50 °C, durante 30 min. Para este fim, foi utilizada uma cabina de fluxo de ar unidirecional ISO classe 5, construída em aço inoxidável.

4.2.4 Testes físico-químicos, enzimáticos e análise de cor

Os testes físico-químicos, enzimáticos e de cor foram realizados na bebida adicionada de polpa de maracujá, antes e após o processamento, e durante o período de estocagem a 7 °C, com frequência mensal.

Os testes físico-químicos foram executados conforme metodologia determinada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1997).

Atividade de água

A atividade de água foi determinada pelo equipamento Aqualab da Decagon Devices, Inc do modelo Series 3 TE.

pH

Para a determinação do pH foi utilizado um medidor digital *Analyser* modelo 300M. Soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 foram utilizadas para a calibração do equipamento.

Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis (expresso em °Brix) foi determinado por um refratômetro portátil digital Reichert modelo AR 200.

Acidez total titulável

A acidez total titulável (expressa em % de ácido cítrico) foi determinada utilizando-se NaOH 0,1 M e fenolftaleína, sendo o ponto de viragem aquele no qual a coloração rosa persistiu por mais de 30 s.

Determinação de ácido ascórbico

As análises de ácido ascórbico foram realizadas nas amostras do caldo de cana *in natura*, na polpa de maracujá pasteurizada e congelada, na bebida acidificada, antes e após o tratamento térmico. Para tanto, empregou-se o método de Tillmans, conforme descrito no Manual do Instituto Adolfo Lutz/ método 365IV (ANVISA, 2005).

Ratio

O cálculo do *ratio* se deu por meio da razão entre sólidos solúveis e acidez titulável (expresso em °Brix/% de ácido cítrico).

As análises supracitadas foram empregadas na caracterização do caldo de cana *in natura*, da polpa de maracujá e do caldo acidificado, antes e após o processamento. As análises do caldo de cana *in natura* foram realizadas imediatamente após a sua extração.

Parâmetros de cor

Os parâmetros de cor instrumental foram determinados apenas na bebida processada, ao longo do período de estocagem. Para tanto, utilizou-se um colorímetro Hunterlab Ultra-Scan, Modelo SN7877, em sistema de cor CIELab, para monitoração do grau de escurecimento da bebida. Os valores foram expressos como luminosidade 'L', esverdeado 'a' e amarelado 'b'. A mudança de cor durante a estocagem foi calculada por meio da Equação (1), conforme proposto por Yusof et al. (2000).

$$cor = (L^2 + a^2 + b^2)^{1/2} \quad (1)$$

Determinação de atividade enzimática

As atividades da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) foram determinadas conforme metodologias descritas por Campos e Silveira (2003).

Para análise da atividade da PPO foram adicionados tampão fosfato (pH 6,0) e catecol a uma alíquota da amostra incubada a 30 °C por 30 min. Após a

paralisação da reação com ácido perclórico prosseguiu-se à leitura da absorbância, em espectrofotômetro, a 395 nm.

Para análise da atividade da POD foram utilizados tampão fosfato (pH 5,0), peróxido de hidrogênio e solução alcoólica de guaiacol incubados a 30 °C por 15 min e o inibidor da reação metabissulfito de sódio. A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm. Como branco, foi utilizado o caldo correspondente da análise, caldo de cana *in natura* e a bebida antes e após processamento, por apresentar cor, substituindo-se os reagentes por tampão.

A atividade enzimática foi expressa em unidades U/mL, sendo uma unidade equivalente a variação de 0,001 na absorbância, por minuto, por mL de amostra. Para o cálculo de atividade foi aplicada a Equação (2).

$$Atividade(U/mL) = \frac{(Ab_{amostra} - Ab_{branco})}{0{,}001 \times t} \quad (2)$$

Sendo:

$Ab_{amostra}$ = absorbância da amostra.

Ab_{branco} = absorbância do branco.

t = tempo (min).

4.2.5 Avaliação microbiológica e sensorial para estimativa da vida útil

Testes microbiológicos

Realizaram-se análises microbiológicas, com frequência mensal, para quantificação de bactérias e fungos psicrotróficos na bebida estocada sob refrigeração. Definiu-se esta frequência porque a taxa de desenvolvimento dos referidos grupos microbianos foi bastante reduzida no produto estocado a 7 °C. Para este fim, adotou-se a metodologia descrita por Silva et al. (2007).

A avaliação da estabilidade microbiológica foi fundamentada na quantificação de bactérias e fungos psicrotróficos; considerando que o pH final do produto foi próximo a 3,9 e que a bebida foi estocada sob refrigeração (6,5 ± 0,5 °C). Para tanto, foram analisadas três embalagens de cada lote e período. Os limites pré-estabelecidos para contagem de bactérias e fungos psicrotróficos foram 10^4 e 10^3

UFC/mL, respectivamente. Ou seja, níveis superiores aos referidos valores apontaram o término da vida útil do produto.

Conforme a resolução RDC n.º12 de 2 de janeiro de 2001, que fixa padrões microbiológicos para caldo de cana (puro) pasteurizado e refrigerado, a bebida deve apresentar uma contagem não superior a 10 coliformes a 45 ºC/mL e ausência de *Salmonella sp*/25 mL (BRASIL, 2001). Outros grupos de micro-organismos não são incluídos na referida RDC. A fim de complementar as análises microbiológicas, na caracterização da matéria prima e da bebida formulada foram realizadas a quantificação de mesófilos aeróbicos, bactérias láticas e bolores e leveduras, segundo a metodologia descrita por Silva et al. (2007).

Para a análise de *Salmonella* utilizaram-se cinco amostras, resultantes da composição dos nove lotes processados, visando a uma maior representatividade e confiabilidade na amostragem. Para aquele fim, empregou-se o 1-2 Test®, kit de análise rápida para detecção de espécies móveis de *Salmonella* em alimentos, baseado no método oficial 989.13 da AOAC. O teste baseia-se na imobilização da *Salmonella* no meio de motilidade por meio de anticorpos polivalentes H (flagelar). A imobilização das espécies móveis de *Salmonella* resulta na formação de uma banda visível e bem definida. O "kit" de análise, endossado pela AOAC, foi adquirido da BIOCONTROL; sendo o protocolo de análise apresentado no Anexo A.

Testes sensoriais

A metodologia descrita a seguir foi adaptada da *American Society for Testing and Materials* (ASTM E 18.06.07), que se baseia em testes afetivos para estimar a vida de prateleira de alimentos (ASTM, 1981).

Os testes sensoriais aplicados incluíram escala hedônica e diferença do controle, conforme procedimento descrito por Stone e Sidell (1985). A primeira sessão de análise sensorial, iniciada por testes de escala hedônica, foi realizada no dia seguinte ao processamento, sendo este considerado o ponto de partida ou "tempo zero" do estudo. Após trinta dias, contados a partir da data do processamento, acrescentou-se à avaliação sensorial, o teste de diferença do controle a fim de detectar eventual diferença significativa entre as amostras.

A estabilidade sensorial da bebida foi determinada utilizando-se uma escala hedônica de 7 pontos. Uma equipe de 50 provadores não treinados, apreciadores de

caldo de cana, julgou a aparência, o aroma, o sabor e a impressão global do produto, servido monadicamente a uma temperatura aproximada de 12 ℃. Os testes foram conduzidos em cabines individuais climatizadas a 24-25 ℃, com luz branca.

As sessões foram realizadas com frequência mensal, introduzindo-se uma amostra controle (estocada a -18 ℃, 2-3 h após o processamento), descongelada em geladeira, naturalmente, 24 horas antes da avaliação sensorial.

No teste de escala hedônica o valor 4 (nem gostei/nem desgostei) foi adotado como nota de corte na escala de 1 (desgostei muito) a 7 (gostei muito). Estabeleceu-se uma porcentagem de aceitação superior a 60%, para os atributos avaliados, como critério complementar para definição do término da estabilidade sensorial do produto. Na ficha do teste de escala hedônica incluiu-se a avaliação da intenção de compra (Figura 7).

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DE CALDO DE CANA COM POLPA DE MARACUJÁ

Nome: _____ Data: _____

Por favor, avalie a amostra de caldo de cana com polpa de maracujá e indique, utilizando a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou em relação aos atributos apresentados.

7. Gostei muito
6. Gostei moderadamente
5. Gostei ligeiramente
4. Nem gostei/nem desgostei
3. Desgostei ligeiramente
2. Desgostei moderadamente
1. Desgostei muito

AMOSTRA	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global
_____	_____	_____	_____	_____

Se encontrasse esse produto no mercado, você:

( ) certamente compraria
( ) provavelmente compraria
( ) talvez compraria
( ) provavelmente não compraria
( ) certamente não compraria

Comentários: _____

Figura 7. Ficha de avaliação para teste de escala hedônica de 7 pontos.

O teste de diferença do controle consistiu na apresentação de uma amostra padrão (P) e duas amostras codificadas (uma delas idêntica a P), simultaneamente. Utilizou-se uma escala de 5 pontos, sendo o valor 0 = nenhuma diferença de P e o valor 4 = extremamente diferente de P. Posicionadas de modo que formassem um triângulo, as amostras foram oferecidas aos provadores, que receberam orientações de como realizar a análise e preencher a ficha disponibilizada, como mostrado na Figura 8. O referido teste compara as amostras em análise com P e evidencia eventual diferença entre a amostra e o controle/padrão (P), além de estimar o tamanho de tal diferença.

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DE CALDO DE CANA COM POLPA DE MARACUJÁ

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e duas amostras codificadas de caldo de cana com polpa de maracujá. Prove o padrão e em seguida, cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere, em termos globais, da amostra padrão.

(0) Nenhuma diferença
(1) Ligeiramente diferente de P
(2) Moderadamente diferente de P
(3) Muito diferente de P
(4) Extremamente diferente de P

Amostra	Grau de diferença
_____	_____
_____	_____

Comentários: _____

Figura 8. Ficha de avaliação para teste de diferença do controle.

4.2.6 Análise das embalagens

Avaliação microbiológica

Procedeu-se à análise microbiológica das garrafas plásticas para verificar a eficácia da etapa de descontaminação das embalagens por imersão em solução de APA, nas condições operacionais anteriormente descritas. Para tanto, empregou-se o método da solução de enxágue, conforme descrito por Silva et al. (2007).

Utilizaram-se cinco garrafas tratadas com APA e cinco garrafas sem tratamento. Preparou-se uma solução de enxágue contendo *tween* 80 (tenso ativo), tiossulfato de sódio (neutralizante de APA) e água peptonada 0,1%. As embalagens foram enxaguadas vigorosamente, de forma padronizada, e a solução foi filtrada à vácuo utilizando uma membrana com poros de 0,22 µm, seguindo-se ao plaqueamento em ágar PCA (*plate count agar*), incubado a 35 °C / 48 h.

Verificação do residual de solução de ácido peracético (APA)

O residual da solução de APA nas embalagens foi verificado por meio do teste de diferença do controle, utilizando-se caldo de cana com maracujá, acondicionado em garrafas tratadas com APA e garrafas apenas enxaguadas com água mineral (P). Portanto, o procedimento descrito visou assegurar que o residual da solução presente nas garrafas não interferisse na qualidade sensorial do produto final.

4.2.7 Análise estatística dos resultados

Os resultados da pesquisa foram processados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias entre as amostras dos diferentes lotes produzidos e as amostras analisadas durante a sua estocagem. Adicionalmente, o teste Dunnett foi incluído para analisar os resultados do teste sensorial de diferença do controle. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SAS (*Statistical Analysis Software*), versão 9.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados gerados a partir do processamento e do estudo de estabilidade dos nove lotes de caldo de cana acidificado e pasteurizado a 85, 90 e 95 °C/30 s, em triplicata.

5.1 Caracterização físico-química da matéria prima

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos na caracterização físico-química da matéria prima e da bebida acidificada, antes do processamento. Os valores em destaque representam índices mínimos e máximos obtidos.

Tabela 3. Caracterização físico-química da matéria prima e do caldo de cana acidificado antes do processamento.

	R1			R2			R3		
	L1	**L2**	**L3**	**L4**	**L5**	**L6**	**L7**	**L8**	**L9**
CALDO DE CANA *IN NATURA* (recém extraído)									
Rendimento obtido na extração (%)*	57,61	**61,04**	57,68	58,16	52,72	52,55	48,29	50,80	**45,94**
pH	5,30	5,36	**5,63**	5,19	5,21	5,06	**4,98**	5,23	5,13
Sólidos solúveis (°Brix)	20,5	16,8	20,5	**23,6**	22,8	23,4	19,3	**15,2**	17,1
Acidez titulável (% ácido cítrico)	0,048	0,052	0,043	**0,038**	**0,038**	**0,038**	**0,071**	0,061	0,059
POLPA DE MARACUJÁ									
pH	3,42	3,21	**3,46**	2,98	**2,92**	3,18	2,97	3,12	2,77
Sólidos solúveis (°Brix)	**8,0**	9,3	10,2	10,1	10,0	9,0	9,1	9,3	**10,6**
Acidez titulável (% ácido cítrico)	2,37	2,35	2,64	2,80	1,66	**1,27**	3,16	3,11	**3,77**
CALDO ACIDIFICADO									
pH	3,83	3,95	**3,77**	**4,29**	3,83	4,03	4,00	4,22	3,77
Sólidos solúveis (°Brix)	18,90	20,8	19,4	23,0	**24,4**	22,4	18,3	**15,2**	17,4
Acidez titulável (% ácido cítrico)	**0,142**	0,146	0,163	**0,216**	0,176	0,180	0,165	0,167	0,160

R – replicata.
L – lote.
*rendimento em relação à massa da cana de açúcar raspada.

Comparando-se os dados dos nove lotes de matéria prima entre si, verifica-se uma considerável diferença entre as características físico-químicas do caldo de cana *in natura* (recém extraído). Essa observação também foi notada para os dados da polpa de maracujá industrializada. As diferenças observadas na composição do caldo de cana podem ser atribuídas às variações na composição do vegetal em virtude de diferentes períodos de plantio, época de colheita, condições climáticas e eventual estágio de maturação, apesar da matéria prima ter sido originada do mesmo cultivar e da mesma fonte de produção; uma vez que os ensaios experimentais estenderam-se por um período aproximado de 12 meses. Supõe-se que as mesmas justificativas apresentadas possam explicar as variações observadas na polpa de maracujá industrializada e congelada, adquirida no mercado local, em Pirassununga/SP.

O rendimento obtido na extração do caldo de cana, considerando todos os lotes de matéria prima, oscilou entre 45,94 e 61,04%, supostamente devido às variações climáticas ocorridas no transcorrer da pesquisa, incluindo períodos de seca e chuva. Em estudo realizado por Mao, Xu e Que (2007), o rendimento obtido na extração foi de 70,83 ± 2,9%. A diferença encontrada em relação ao presente estudo pode estar relacionada à variedade de cana utilizada, ao estágio de maturação e ao método de extração do caldo. Teores superiores são normalmente obtidos em escala industrial, propiciado pelo tratamento enzimático do bagaço. A variação observada no rendimento é estatisticamente evidenciada entre as médias das replicatas R1 e R3, na Tabela 4.

A Tabela 4 apresenta as médias calculadas para os três lotes de cada replicata, incluindo os desvios e a comparação estatística entre as médias, complementando a Tabela 3.

Tabela 4. Médias dos três lotes processados em cada replicata para caracterização físico-química da matéria prima e do caldo de cana acidificado, antes do processamento.

	R1	R2	R3
CALDO DE CANA *IN NATURA* (recém extraído)			
Rendimento obtido na extração (%)*	59 ± 2[a]	54 ± 3[ab]	48 ± 2[b]
pH	5,4 ± 0,2[a]	5,15 ± 0,08[a]	5,1 ± 0,1[a]
Sólidos solúveis (°Brix)	19 ± 1[ab]	23,3 ± 0,4[a]	17 ± 2[b]
Acidez titulável (% ácido cítrico)	0,05 ± 0,05[b]	0,04 ± 0,00[b]	0,064 ± 0,006[a]
POLPA DE MARACUJÁ			
pH	3,4 ± 0,1[a]	3,0 ± 0,1[ab]	2,9 ± 0,2[b]
Sólidos solúveis (°Brix)	9 ± 1[a]	9,7 ± 0,6[a]	9,7 ± 0,8[a]
Acidez titulável (% ácido cítrico)	2,4 ± 0,2[ab]	1,9 ± 0,8[b]	3,3 ± 0,4[a]
CALDO ACIDIFICADO			
pH	3,85 ± 0,09[a]	4,0 ± 0,2[a]	4,0 ± 0,2[a]
Sólidos solúveis (°Brix)	20± 1[b]	23 ± 1[a]	17 ± 2[b]
Acidez titulável (% ácido cítrico)	0,150 ± 0,011[b]	0,19 ± 0,02[a]	0,164 ± 0,004[ab]

Médias (três lotes) seguidas pelo mesmo expoente não diferem entre si a 5% de significância.
* rendimento em relação à massa da cana de açúcar raspada.

Nos estudos de Oliveira et al. (2007), o caldo de cana *in natura* apresentou pH próximo a 5,28; teor de sólidos solúveis de 22,74 °Brix e acidez titulável de 0,04% de ácido cítrico; valores semelhantes àqueles determinados nesta pesquisa.

A replicata R2 apresentou o maior valor para sólidos solúveis, provavelmente por ter sido cultivada e colhida no período de seca, modificando sua composição centesimal, principalmente em relação ao teor de umidade. As análises sensoriais realizadas no referido período demonstraram que os provadores identificaram um gosto doce mais acentuado conferido pela bebida processada.

Para a polpa de maracujá as variações entre os resultados obtidos foram inferiores àqueles observados para o caldo *in* natura. Os teores de sólidos solúveis da polpa não diferiram estatisticamente entre si, cujas médias geraram um desvio padrão relativamente baixo.

Rezzadori (2010) estudou o caldo de cana puro e acidificado pela adição de 5% de polpa de maracujá pasteurizada. A polpa de maracujá analisada apresentou

um pH equivalente a 2,95 e teor de sólidos solúveis de 10,30 °Brix, valores semelhantes ao suco de maracujá analisado por Prati (2004) e a polpa de maracujá utilizada nesta pesquisa.

O caldo de cana acidificado apresentou um decréscimo do pH e aumento da acidez em relação ao caldo *in natura*, justificados pela adição da polpa de fruta ácida. O pH inferior a 4,6 classifica o caldo de cana adicionado de polpa de maracujá como uma bebida acidificada. Esta condição favorece a estabilidade microbiológica, restringindo o desenvolvimento bacteriano, e a estabilidade enzimática, inibindo a ação de enzimas, notadamente o sistema PPO, cujo pH ótimo de atividade é próximo a 7,2 (YON; JAAFAR, 1994). Ademais, o ácido cítrico da polpa de maracujá complexa com o cobre (Cu^{2+}), presente no sítio ativo da polifenoloxidase, responsável pelo escurecimento enzimático do caldo.

5.2 Testes físico-químicos e enzimáticos na bebida processada

As Tabelas 5 a 9 reúnem os resultados obtidos na avaliação físico-química dos nove lotes estocados a 6,5 ± 0,5 °C. As análises foram interrompidas quando as amostras atingiram os critérios de "corte", estabelecidos nos testes sensoriais.

A atividade de água determinada em amostras dos lotes processados foi próxima a 0,99; mantendo-se estável ao longo do período de estocagem.

Os resultados de pH das bebidas, nos distintos lotes, em diferentes tempos de estocagem são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de pH de caldo de cana adicionado de 4% de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C.

	85 °C/30 s		90 °C/30 s		95 °C/30 s	
	Estocagem (dias)	**L1**	Estocagem (dias)	**L2**	Estocagem (dias)	**L3**
R1	0	$4,31 \pm 0,02^{Aa}$	0	$4,17 \pm 0,03^{Aab}$	0	$4,12 \pm 0,13^{Ab}$
	30	$4,13 \pm 0,02^{Ba}$	29	$4,15 \pm 0,01^{Aa}$	30	$3,92 \pm 0,02^{ABb}$
			59	$4,15 \pm 0,01^{A}$	65	$3,83 \pm 0,01^{B}$
					93	$4,0 \pm 0,1^{AB}$
					130	$3,93 \pm 0,01^{AB}$
	Estocagem (dias)	**L4**	Estocagem (dias)	**L5**	Estocagem (dias)	**L6**
R2	0	$4,29 \pm 0,02^{Aa}$	0	$3,85 \pm 0,01^{Ac}$	0	$4,00 \pm 0,02^{Bb}$
	30	$4,25 \pm 0,01^{Ba}$	32	$3,78 \pm 0,02^{Bc}$	33	$4,03 \pm 0,00^{Bb}$
			59	$3,78 \pm 0,02^{B}$	62	$4,12 \pm 0,03^{A}$
			90	$3,85 \pm 0,01^{A}$		
	Estocagem (dias)	**L7**	Estocagem (dias)	**L8**	Estocagem (dias)	**L9**
R3	0	$4,08 \pm 0,02^{Ab}$	0	$4,23 \pm 0,01^{Aa}$	0	$3,91 \pm 0,08^{Ac}$
	30	$4,07 \pm 0,01^{Ab}$	34	$4,22 \pm 0,03^{Aa}$	30	$3,96 \pm 0,01^{Ac}$
	63	$4,07 \pm 0,03^{A}$				

*Médias (três amostras) seguidas pelo mesmo expoente maiúsculo, na mesma coluna (comparação entre tempos de estocagem considerando cada replicata independentemente) ou pelo mesmo expoente minúsculo na mesma linha (comparação entre os tratamentos térmicos) não diferem entre si a 5% de significância.

Comparando-se os tratamentos térmicos observou-se diferença estatisticamente significativa entre os valores de pH. Possivelmente, pela variabilidade da matéria prima utilizada ao longo do experimento.

Nota-se pela Tabela 5, que os tratamentos a 85 °C tenderam a apresentar maiores valores de pH entre as replicatas, sendo o máximo de 4,31 na primeira replicata e 4,29 na segunda. A terceira replicata foi a exceção, pois o tratamento a 90 °C apresentou o maior valor de pH (4,23). Em contrapartida, o tratamento a 95 °C apresentou menores valores de pH com mínimo de 3,83 em R1 e 3,91 em R3, com exceção de R2 em que o tratamento a 90 °C apresentou o menor pH (3,78).

As pequenas variações observadas ao longo do tempo de estocagem para alguns lotes podem estar associadas às reações de natureza microbiológica, ocasionadas pelo desenvolvimento de bactérias e bolores psicrotróficos, ou mesmo, às reações de natureza química e bioquímica.

As médias obtidas na determinação de sólidos solúveis estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Médias de sólidos solúveis (°Brix) em caldo de cana acidificado, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C.

	85 °C/30 s		**90 °C/30 s**		**95 °C/30 s**	
	Estocagem (dias)	**L1**	Estocagem (dias)	**L2**	Estocagem (dias)	**L3**
R1	0	$19,0 \pm 0,2^{Aa}$	0	$18,9 \pm 0,4^{Aa}$	0	$19,4 \pm 0,1^{Ba}$
	30	$18,90 \pm 0,06^{Ab}$	29	$18,9 \pm 0,1^{Ab}$	30	$19,43 \pm 0,06^{Ba}$
			59	$18,67 \pm 0,06^{A}$	65	$19,23 \pm 0,2^{B}$
					93	$20,1 \pm 0,3^{A}$
					130	$19,33 \pm 0,06^{B}$
	Estocagem (dias)	**L4**	Estocagem (dias)	**L5**	Estocagem (dias)	**L6**
R2	0	$22,97 \pm 0,06^{Ab}$	0	$24,5 \pm 0,1^{Aa}$	0	$22,1 \pm 0,0^{Bc}$
	30	$22,73 \pm 0,01^{Bb}$	32	$24,13 \pm 0,06^{Ba}$	33	$22,2 \pm 0,0^{Bc}$
			59	$24,17 \pm 0,06^{B}$	62	$22,4 \pm 0,1^{A}$
			90	$24,3 \pm 0,0^{B}$		
	Estocagem (dias)	**L7**	Estocagem (dias)	**L8**	Estocagem (dias)	**L9**
R3	0	$18,37 \pm 0,06^{Aa}$	0	$15,4 \pm 0,3^{Ac}$	0	$17,0 \pm 0,3^{Ab}$
	30	$17,93 \pm 0,06^{Ba}$	34	$15,1 \pm 0,1^{Ac}$	30	$17,37 \pm 0,06^{Ab}$
	63	$18,0 \pm 0,2^{B}$				

*Médias (três amostras) seguidas pelo mesmo expoente maiúsculo, na mesma coluna (comparação entre tempos de estocagem considerando cada replicata independentemente) ou pelo mesmo expoente minúsculo na mesma linha (comparação entre os tratamentos térmicos) não diferem entre si a 5% de significância.

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam uma tendência de redução dos teores de sólidos solúveis ao longo do tempo de estocagem, que pode estar associada à degradação da sacarose presente no caldo. Os teores de sólidos solúveis em R1 não diferiram estatisticamente entre si até 60 dias de estocagem, para os diferentes tratamentos térmicos; comportamento que não se confirmou em R2 e R3, que após 30 dias de estocagem apresentaram diferença estatística.

As variações encontradas entre as amostras submetidas aos diferentes tratamentos térmicos devem-se, provavelmente, à falta de padronização do teor de sólidos solúveis da matéria prima.

Oliveira, A. (2007) e Prati (2004) em seus estudos sobre a vida útil de caldo de cana com adição de suco de fruta, pasteurização a 70 °C/25 min e 75 °C/15 s, respectivamente, também observaram que o teor de sólidos solúveis diminuiu durante 30 dias de estocagem refrigerada (4–6 °C). Segundo Andrade, Porto e Spoto (2008) uma eventual queda do teor de sólidos solúveis pode estar associada ao desenvolvimento de micro-organismos, principalmente bolores e leveduras, os quais consomem os açúcares disponíveis por meio do processo de fermentação. Contudo, as contagens de fungos psicrotróficos determinadas nesta pesquisa não atingiram 3.10^1 UFC/mL, para todos os lotes, durante o período de estocagem.

Segundo Eggleston (2002), os micro-organismos são os principais deteriorantes do caldo de cana, sendo responsáveis por 93% da degradação da sacarose e 5,7% por ação enzimática. Neste sentido, supõe-se que os três binômios empregados no tratamento térmico atingiram um desempenho satisfatório no que tange à estabilização microbiológica da bebida estocada sob refrigeração (Figuras 14 e 15); uma vez que os valores de sólidos solúveis permaneceram praticamente inalterados.

As médias de acidez titulável obtidas durante a estocagem do produto estão expostas na Tabela 7, que evidencia variações significativas, comparando-se os lotes entre si e os diferentes tempos de estocagem, em cada replicata, independentemente.

Tabela 7. Médias de acidez titulável (g ácido cítrico/100 mL) de caldo de cana adicionado de 4% de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C.

	85 °C/30 s		90 °C/30 s		95 °C/30 s	
	Estocagem (dias)	**L1**	Estocagem (dias)	**L2**	Estocagem (dias)	**L3**
R1	0	$0,145 \pm 0,001^{Bb}$	0	$0,146 \pm 0,001^{Ab}$	0	$0,146 \pm 0,001^{Aa}$
	30	$0,155 \pm 0,001^{Aa}$	29	$0,133 \pm 0,002^{Bb}$	30	$0,105 \pm 0,005^{Dc}$
			59	$0,130 \pm 0,008^{B}$	65	$0,117 \pm 0,002^{C}$
					93	$0,133 \pm 0,004^{B}$
					130	$0,120 \pm 0,003^{C}$
	Estocagem (dias)	**L4**	Estocagem (dias)	**L5**	Estocagem (dias)	**L6**
R2	0	$0,224 \pm 0,007^{Aa}$	0	$0,175 \pm 0,001^{Ab}$	0	$0,173 \pm 0,001^{Ab}$
	30	$0,207 \pm 0,001^{Ba}$	32	$0,165 \pm 0,003^{Bc}$	33	$0,172 \pm 0,003^{Ab}$
			59	$0,162 \pm 0,003^{B}$	62	$0,173 \pm 0,001^{A}$
			90	$0,130 \pm 0,001^{C}$		
	Estocagem (dias)	**L7**	Estocagem (dias)	**L8**	Estocagem (dias)	**L9**
R3	0	$0,166 \pm 0,001^{Aa}$	0	$0,168 \pm 0,001^{Ba}$	0	$0,162 \pm 0,001^{Ab}$
	30	$0,155 \pm 0,003^{Bc}$	34	$0,173 \pm 0,001^{Aa}$	30	$0,161 \pm 0,001^{Ab}$
	63	$0,157 \pm 0,004^{B}$				

*Médias (três amostras) seguidas pelo mesmo expoente maiúsculo, na mesma coluna (comparação entre tempos de estocagem considerando cada replicata independentemente) ou pelo mesmo expoente minúsculo na mesma linha (comparação entre os tratamentos térmicos) não diferem entre si a 5% de significância.

Conforme apresentado na Tabela 7, verificou-se diferença significativa entre as médias das amostras processadas a 85 e 95 °C, para as três replicatas. Os lotes processados a 90 °C ora diferiram de 85 °C (R2), ora diferiram de 95 °C (R1 e R3). Tais resultados demonstram a dificuldade de se correlacionar a influência da temperatura de pasteurização devido a variabilidade da composição da matéria prima.

Para a maioria dos lotes verificou-se uma redução da acidez titulável ao longo do tempo de estocagem. O aumento daquele parâmetro observado em alguns lotes pode ser atribuído à síntese de ácido acético e lático pelos micro-organismos resistentes ao tratamento térmico. Oliveira, A. (2007) e Yusof et al. (2000)

observaram um aumento na acidez de caldo de cana adicionado de 4% de suco de limão e de caldo de cana puro, respectivamente.

Prati (2004) avaliou a vida útil de caldo de cana adicionado de suco de maracujá, seguido de pasteurização a 75 ℃/15 s. Durante a estocagem refrigerada a 4-6 ℃ observou-se redução significativa da acidez titulável da bebida; comportamento também verificado em alguns dos lotes processados no presente estudo. A redução da acidez titulável observada, pode estar associadas às reações de natureza bioquímica e química, como a degradação do ácido ascórbico.

As determinações de ácido ascórbico foram realizadas em amostras do caldo de cana *in natura*, polpa de maracujá pasteurizada e congelada, bebida não processada e bebida pasteurizada. Como os teores de ácido ascórbico foram muito próximos nas três replicatas, calculou-se a média para cada binômio a fim de facilitar a visualização e interpretação dos resultados, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8. Determinação de ácido ascórbico (mg/100 mL).

	85 ºC/30 s	**90 ºC/30 s**	**95 ºC/30 s**
Caldo de cana *in natura*	$2,7 \pm 0,3^{Ba}$	$3,1 \pm 0,5^{Ba}$	$2,8 \pm 0,4^{Ba}$
Polpa de maracujá	$13,2 \pm 0,5^{Aa}$	$13,1 \pm 1,0^{Aa}$	$12,6 \pm 0,4^{Aa}$
Bebida não processada	$2,6 \pm 0,4^{Ba}$	$2,8 \pm 0,3^{Ba}$	$2,8 \pm 0,4^{Ba}$
Bebida pasteurizada	$2,6 \pm 0,4^{Ba}$	$2,8 \pm 0,3^{Ba}$	$2,8 \pm 0,5^{Ba}$

Bebida – caldo de cana adicionado de 4% (m/m) de polpa de maracujá.
*Médias (três amostras) seguidas pela mesma letra minúscula, na mesma linha (comparação entre os lotes) ou pela mesma letra maiúscula, na mesma coluna, não diferem entre si a 5% de significância.

Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstraram que os binômios empregados na pasteurização da bebida não impactaram no teor de ácido ascórbico. Notou-se que a adição de polpa de maracujá não incrementou o teor de ácido ascórbico no caldo de cana, já que os teores determinados no caldo *in natura* e na bebida acidificada não diferiram entre si a 5% de significância. Este resultado pode ser devido ao provável tratamento térmico sofrido pela polpa na indústria fornecedora, que reduziu de modo significativo o teor que se situa na faixa de 20 mg/100 mL quando está sob a forma de suco *in natura* (MEDINA et al., 1980; PRATI, 2004).

Como os teores de ácido ascórbico determinados na bebida pasteurizada foram bastante reduzidos (2,5-3,0 mg/100 mL), não procedeu-se à continuidade das análises ao longo do período de estocagem do produto. Destaca-se que a oxidação é o principal mecanismo de degradação da vitamina C em alimentos. Posto isto, espera-se uma redução no seu conteúdo durante o período de estocagem.

Amaro, Bonilha e Monteiro (2002) analisaram o teor de ácido ascórbico em polpa de maracujá pasteurizada e congelada, tendo obtido teores entre 14,2 e 14,9 mg/100 mL, próximos aqueles detectados nesta pesquisa.

Em relação ao teor de vitamina C no caldo de cana, Prati (2004) obteve resultados próximos a 3,2 mg/100 mL, coerente com a determinação feita no presente estudo. Verifica-se, portanto, que o caldo de cana não é boa fonte de vitamina C.

A despeito da importância deste micronutriente no valor nutricional de alimentos, a bebida formulada e processada nesta pesquisa não se apresentou como fonte de vitamina C.

A Tabela 9 apresenta os valores do *ratio*, calculado a partir dos resultados obtidos na determinação do teor de sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT).

Segundo Thé et al. (2001), o sabor dos frutos é determinado, em grande parte, pelo balanço de ácidos e açúcares e avaliado pela relação entre sólidos solúveis e acidez titulável. De acordo com Benassi Jr. (2001, 2005) o *ratio* reflete o grau de doçura e é utilizado como indicador da qualidade e maturação da fruta.

Tabela 9. Médias do ratio (% sólidos solúveis/acidez titulável) do caldo de cana acidificado, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C.

	85 °C/30 s		90 °C/30 s		95 °C/30 s	
	Estocagem (dias)	**L1**	Estocagem (dias)	**L2**	Estocagem (dias)	**L3**
R1	0	131 ± 2^{Aa}	0	129 ± 2^{Ba}	0	132 ± 1^{Da}
	30	122 ± 1^{Bc}	29	146 ± 1^{ABb}	30	185 ± 8^{Aa}
			59	144 ± 9^{A}	65	165 ± 2^{B}
					93	151 ± 4^{C}
					130	161 ± 4^{BC}
	Estocagem (dias)	**L4**	Estocagem (dias)	**L5**	Estocagem (dias)	**L6**
R2	0	102 ± 3^{Bc}	0	140 ± 1^{Ca}	0	128 ± 1^{Ab}
	30	$110{,}0 \pm 0{,}7^{Ac}$	32	147 ± 2^{Ba}	33	129 ± 2^{Ab}
			59	149 ± 3^{B}	62	129 ± 2^{A}
			90	186 ± 2^{A}		
	Estocagem (dias)	**L7**	Estocagem (dias)	**L8**	Estocagem (dias)	**L9**
R3	0	110 ± 1^{Ba}	0	91 ± 1^{Ac}	0	105 ± 2^{Ab}
	30	116 ± 2^{Aa}	34	$87{,}4 \pm 0{,}3^{Bc}$	30	$107{,}7 \pm 0{,}6^{Ab}$
	63	115 ± 2^{AB}				

*Médias (três amostras) seguidas pelo mesmo expoente maiúsculo, na mesma coluna (comparação entre tempos de estocagem, considerando cada replicata independentemente) ou pelo mesmo expoente minúsculo na mesma linha (comparação entre os tratamentos térmicos) não diferem entre si a 5% de significância.

Observou-se variação significativa no *ratio* da bebida, comparando-se os lotes entre si. Tal comportamento deve-se à grande variação observada na acidez da bebida devido à variabilidade da matéria prima. Ao longo do tempo de estocagem houve um aumento do *ratio,* que era esperado devido à diminuição da acidez titulável já mencionada.

Prati, Moretti e Cardello (2005) detectaram valores próximos aos encontrados nesta pesquisa para pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis e *ratio* (4,02; 0,16% ácido cítrico; 22,6 °Brix e 141,2 °Brix/% de ácido cítrico; respectivamente) em caldo de cana adicionado de maracujá, pasteurizado a 75 °C/15 s.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos na determinação da atividade da polifenoloxidase (PPO) no caldo de cana com polpa de maracujá, antes e após a pasteurização e no caldo de cana *in natura*.

Tabela 10. Atividade da polifenoloxidase (U/mL) em caldo de cana *in natura* e na bebida acidificada antes e após a pasteurização.

	Lote	Caldo de cana *in natura*	Antes da pasteurização	Após a pasteurização
R1	L1 (85 °C/30 s)	7,97	3,10	0,00
	L2 (90 °C/30 s)	---	40,33	0,00
	L3 (95 °C/30 s)	33,56	37,44	0,00
R2	L4 (85 °C/30 s)	17,11	11,44	0,00
	L5 (90 °C/30 s)	---	3,22	0,00
	L6 (95 °C/30 s)	9,33	7,11	0,00
R3	L7 (85 °C/30 s)	95,78	37,11	0,03 ± 0,88[a]
	L8 (90 °C/30 s)	40,33	31,00	0,08 ± 0,14[a]
	L9 (95 °C/30 s)	79,89	38,78	0,00[a]

*Médias (três amostras da bebida pasteurizada) seguidas pelo mesmo expoente na mesma coluna (comparação entre os tratamentos térmicos, para cada replicata independentemente) não diferem entre si a 5% de significância.
--- indisponível.

Bucheli e Robinson (1994) verificaram que a cor escura desenvolvida no caldo de cana deve-se, principalmente, à quantidade e disponibilidade de compostos fenólicos e à presença de oxigênio. Contudo, uma alta atividade enzimática aumenta a velocidade de escurecimento diminuindo a aceitação da bebida. Portanto, a inativação das enzimas presentes no caldo é imperativa para a manutenção de sua qualidade sensorial.

A Tabela 10 evidencia a diferença entre as atividades da PPO detectadas antes da pasteurização dos diferentes lotes; o que pode ser atribuído às variações na composição da matéria prima utilizada no decorrer da pesquisa. Não obstante, os três binômios empregados na pasteurização da bebida (85, 90 e 95 °C/ 30 s) foram considerados efetivos na inativação do sistema PPO, indicando a

termossensibilidade desta enzima. Vámos-Vigyázó (1981) relatou que as enzimas PPO são inativadas em tratamentos térmicos a 80 °C.

Mao, Xu e Que (2007) citam que o escurecimento observado no caldo de cana em presença de atividade de PPO é consequência de sua interação com os compostos fenólicos, que são convertidos a polímeros de coloração escura quando a cana de açúcar é moída. Contudo, uma leve perda de cor é persistente em bebidas com PPO inativa, sugerindo que o escurecimento também pode estar relacionado à degradação de clorofila.

Os resultados obtidos a partir da determinação da atividade da peroxidase (POD) são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Atividade da peroxidase (U/mL) em caldo de cana *in natura* e na bebida acidificada antes e após a pasteurização.

	Lote	**Caldo de cana *in natura***	**Antes da pasteurização**	**Após a pasteurização**
R1	L1 (85 °C/30 s)	84,44	97,78	17,31 ± 1,92[b]
	L2 (90 °C/30 s)	---	203,78	50,57 ± 1,78[a]
	L3 (95 °C/30 s)	57,33	118,44	0,00[b]
R2	L4 (85 °C/30 s)	157,78	172,00	9,20 ± 3,64[a]
	L5 (90 °C/30 s)	112,22	69,78	0,27 ± 0,38[b]
	L6 (95 °C/30 s)	88,67	99,56	0,00[b]
R3	L7 (85 °C/30 s)	436,00	220,44	4 ± 7[a]
	L8 (90 °C/30 s)	97,56	86,22	3 ± 4[a]
	L9 (95 °C/30 s)	154,44	105,78	0,4 ± 0,6[a]

*Médias (três amostras pasteurizadas) seguidas pelo mesmo expoente, na mesma coluna, para cada replicata independentemente (comparação entre os tratamentos térmicos), não diferem entre si a 5% de significância.

A Tabela 11 demonstra a termorresistência da POD, contrastando com a PPO, tendo a peroxidase sido inativada apenas pelo binômio mais severo (95 °C/ 30 s). Bucheli e Robinson (1994) demonstraram que, embora a peroxidase apresente atividade no caldo de cana e seja termorresistente, a polifenoloxidase é a principal enzima responsável pelo escurecimento da bebida. Tal fato permite a

aplicação de um tratamento térmico mais brando, visto que a PPO é uma enzima relativamente termossensível.

As diferenças observadas nos valores de atividade da PPO e da POD podem ser atribuídas às variações na composição do vegetal resultantes de diferentes períodos de plantio, época de colheita, condições climáticas e estágio de maturação. Contudo, destaca-se que a matéria prima utilizada nos três processamentos foi do mesmo cultivar, originada da mesma fonte de produção e cultivada segundo as mesmas práticas agrícolas.

5.3 Análise de cor

Os parâmetros L, a e b detectados pelo colorímetro são apresentados na Tabela 12. Quanto menor o parâmetro L (luminosidade), maior a intensidade do escurecimento da bebida. Destaca-se, também, a escala de cor dos parâmetros +a ao –a e +b ao –b, que representam a recorrência do tom vermelho ao verde e do amarelo ao azul, respectivamente. A interpretação dos parâmetros de cor e seus deltas indicam a tendência de coloração da bebida durante sua estocagem em comparação ao tempo inicial (t_0).

Tabela 12. Parâmetros L, a e b detectados pelo colorímetro Hunterlab Ultra-Scan e os deltas ΔL, Δa e Δb das amostras de caldo de cana acidificado antes e após a pasteurização.

		Tempo de estocagem	L	a	b	ΔL	Δa	Δb
R1	L1 85 °C/30 s	Bebida não pasteurizada	17,03	-1,42	1,28			
		0	18,94 ± 0,93	-1,31 ± 0,17	2,45 ± 0,17	2,59	-0,04	1,33
		30	16,87 ± 2,57	-1,35 ± 0,16	3,57 ± 0,27	-2,07	-0,04	1,12
	L2 90 °C/30 s	Bebida não pasteurizada	8,67	-0,5	0,78			
		0	19,14 ± 0,88	-0,89 ± 0,17	1,53 ± 0,59			
		29	15,99 ± 1,03	-1,46 ± 0,20	2,92 ± 0,23	-3,15	-0,58	1,40
		59	12,74 ± 0,53	-1,83 ± 0,21	3,25 ± 0,29	-6,4	-0,95	1,73
	L3 95 °C/30 s	Bebida não pasteurizada	13,2	-2,78	3,32			
		0	20,43 ± 0,96	-2,11 ± 0,08	3,17 ± 0,08			
		30	15,18 ± 0,01	-2,26 ± 0,19	2,51 ± 0,24	-5,25	-0,14	-0,66
		65	14,36 ± 0,14	-1,90 ± 0,66	1,96 ± 0,27	-6,07	0,22	-1,21
		93	14,47 ± 0,14	-1,71 ± 0,10	1,88 ± 0,33	-5,96	0,40	-1,29
		130	16,16 ± 0,62	-1,89 ± 0,11	2,95 ± 0,18	-4,27	0,22	-0,21
R2	L4 85 °C/30 s	Bebida não pasteurizada	10,49	-1,83	3,96			
		0	11,83 ± 2,16	-1,67 ± 0,27	2,86 ± 1,64			
		30	16,08 ± 1,97	-0,99 ± 0,18	0,66 ± 0,98	4,25	0,68	-2,21

		Tempo de estocagem	L	a	b	ΔL	Δa	Δb
R2	L5 90 ℃/30 s	Bebida não pasteurizada	8,42	-2,14	3,32			
		0	13,55 ± 1,68	-2,14 ± 0,32	4,83 ± 1,75			
		32	15,48 ± 0,91	-0,93 ± 0,14	3,79 ± 0,36	1,93	1,21	-1,03
		59	11,23 ± 1,64	-1,51 ± 0,28	3,37 ± 0,74	-2,32	0,63	-1,45
		90	12,95 ± 0,66	-0,68 ± 0,30	3,19 ± 0,77	-0,6	1,46	-1,64
	L6 95 ℃/30 s	Bebida não pasteurizada	12,62	-1,84	3,51			
		0	19,39 ± 0,79	-2,01 ± 0,01	3,82 ± 0,56			
		33	13,46 ± 0,13	-1,81 ± 0,09	4,38 ± 0,29	-5,93	0,20	0,56
		62	12,53 ± 0,56	-1,35 ± 0,18	3,96 ± 0,30	-6,85	0,66	0,14
R3	L7 85 ℃/30 s	Bebida não pasteurizada	9,11	-1,58	2,89			
		0	12,61 ± 1,51	-2,16 ± 0,47	4,52 ± 1,17			
		30	10,90 ± 0,20	-0,77 ± 0,20	3,94 ± 0,14	-1,71	1,39	-0,58
		63	11,30 ± 0,71	-1,70 ± 0,48	3,58 ± 0,19	-1,31	0,46	-0,94
	L8 90 ℃/30 s	Bebida não pasteurizada	7,6	-1,62	1,14			
		0	10,40 ± 1,77	-2,01 ± 0,12	1,92 ± 0,94			
		30	9,10 ± 1,97	-1,35 ± 0,83	2,56 ± 0,37	-1,30	0,67	0,64
	L9 95 ℃/30 s	Bebida não pasteurizada	10,76	-1	2,31			
		0	14,16 ± 0,85	-1,67 ± 0,20	2,16 ± 0,51			
		30	13,07 ± 1,82	-2,41 ± 0,28	4,57 ± 1,09	-1,09	-0,75	2,42

Os dados apresentados na Tabela 12 apontaram o escurecimento da bebida ao longo do tempo de estocagem, devido à diminuição do parâmetro L e valores negativos de ΔL para todos os lotes. Nota-se, também, uma tendência a coloração vermelha, devido ao aumento dos valores do parâmetro a e $\Delta a > 0$.

A peroxidase catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio liberando O_2 que reage com os compostos fenólicos. Considerando-se que esta enzima não foi inativada a temperaturas de 85 e 90 °C/30 s (Tabela 11), a sua atividade pôde ser evidenciada pelo desenvolvimento de uma a coloração marrom avermelhada durante o período de estocagem.

Analisando-se o parâmetro b, para os lotes L3, L4, L5 e L7, notou-se uma tendência ao tom azul ao longo do tempo de estocagem, confirmada pelos valores de $\Delta b < 0$. Para os lotes L1, L2, L6, L8 e L9 obsevou-se uma tendência ao tom amarelo em que o parâmetro b aumenta ao longo do tempo e $\Delta b > 0$.

Conforme Yusof et al. (2000), que avaliaram caldo de cana não pasteurizado, estocado a 10 e 27 °C, a clorofila contribui para a aparência “verde fresco” do caldo, modificando-se para a cor amarela e marrom ao longo do tempo de estocagem. Este pigmento degrada-se com o aumento da temperatura, presença de oxigênio, luz e enzimas.

Os parâmetros L, a e b detectados pelo colorímetro foram traduzidos em índices de cor, apresentados na Tabela 13. Destaca-se que quanto menor o índice de cor, maior a intensidade do escurecimento.

Tabela 13. Médias do índice de cor[1] de caldo de cana com polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C.

	85 °C/30 s		90 °C/30 s		95 °C/30 s	
	Estocagem (dias)	**L1**	Estocagem (dias)	**L2**	Estocagem (dias)	**L3**
R1	0	$19,1 \pm 0,9^{Aa}$	0	$19,2 \pm 0,9^{Aa}$	0	$20,8 \pm 0,9^{Aa}$
	30	$14,2 \pm 0,2^{Bb}$	29	16 ± 1^{Ba}	30	$15,56 \pm 0,08^{BCab}$
			59	$13,3 \pm 0,5^{C}$	65	$14,6 \pm 0,2^{C}$
					93	$14,7 \pm 0,2^{C}$
					130	$16,5 \pm 0,6^{B}$
	Estocagem (dias)	**L4**	Estocagem (dias)	**L5**	Estocagem (dias)	**L6**
R2	0	12 ± 2^{Ab}	0	14 ± 2^{Aab}	0	$19,9 \pm 0,7^{Aa}$
	30	16 ± 2^{Aa}	32	$16,0 \pm 0,8^{Aa}$	33	$14,3 \pm 0,2^{Ba}$
			59	12 ± 2^{A}	62	$13,2 \pm 0,5^{B}$
			90	$13,4 \pm 0,5^{A}$		
	Estocagem (dias)	**L7**	Estocagem (dias)	**L8**	Estocagem (dias)	**L9**
R3	0	14 ± 2^{Aa}	0	11 ± 2^{Aa}	0	$14,4 \pm 0,8^{Aa}$
	30	$11,6 \pm 0,2^{Aa}$	34	10 ± 2^{Aa}	30	14 ± 2^{Aa}
	63	$12,0 \pm 0,8^{A}$				

[1] $cor = (L^2+a^2+b^2)^{1/2}$

*Médias (três amostras) seguidas pelo mesmo expoente maiúsculo, na mesma coluna (comparação entre tempos de estocagem, considerando cada replicata independentemente) ou pelo mesmo expoente minúsculo na mesma linha (comparação entre os tratamentos térmicos) não diferem entre si a 5% de significância.

O escurecimento foi observado em todos os tratamentos térmicos aplicados nas três replicatas, verificando-se um rápido decréscimo dos índices de cor durante os 30 primeiros dias de estocagem, para a maioria dos lotes processados. No que diz respeito aos lotes L3 e L6 (processados a 95 °C/30 s), observou-se uma coloração mais clara (maior índice de cor), o que pode estar relacionado à inativação da enzima POD, alcançada somente nesta temperatura de pasteurização, uma vez que está enzima também contribui para o escurecimento do produto.

Os fungos filamentosos existentes na microbiota natural de matérias primas vegetais são capazes de se desenvolverem em uma ampla faixa de pH e de atividade de água, sendo pouco exigentes em nutrientes. São fundamentalmente

aeróbios e apresentam baixa resistência térmica; portanto, são facilmente eliminados pela pasteurização (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Contudo, a deterioração por estes fungos manifesta-se pela produção de CO_2 e etanol, podendo ocorrer a formação de películas e floculação, que diminui a turvação do caldo de cana (PRATI, 2004; OLIVEIRA, A., 2007); justificando, supostamente, o aumento da luminosidade observada em L3, cujo período de estocagem estendeu-se a 130 dias. Nesta pesquisa foram notados os referidos produtos de degradação em alguns lotes, depreciando a qualidade sensorial da bebida

As Figuras 9, 10 e 11 ilustram amostras de caldo de cana com maracujá, para diferentes temperaturas de pasteurização e tempos de estocagem refrigerada. Nestas ilustrações pode-se observar o escurecimento da bebida ao longo do tempo de estocagem variando da cor amarela a parda/marrom.

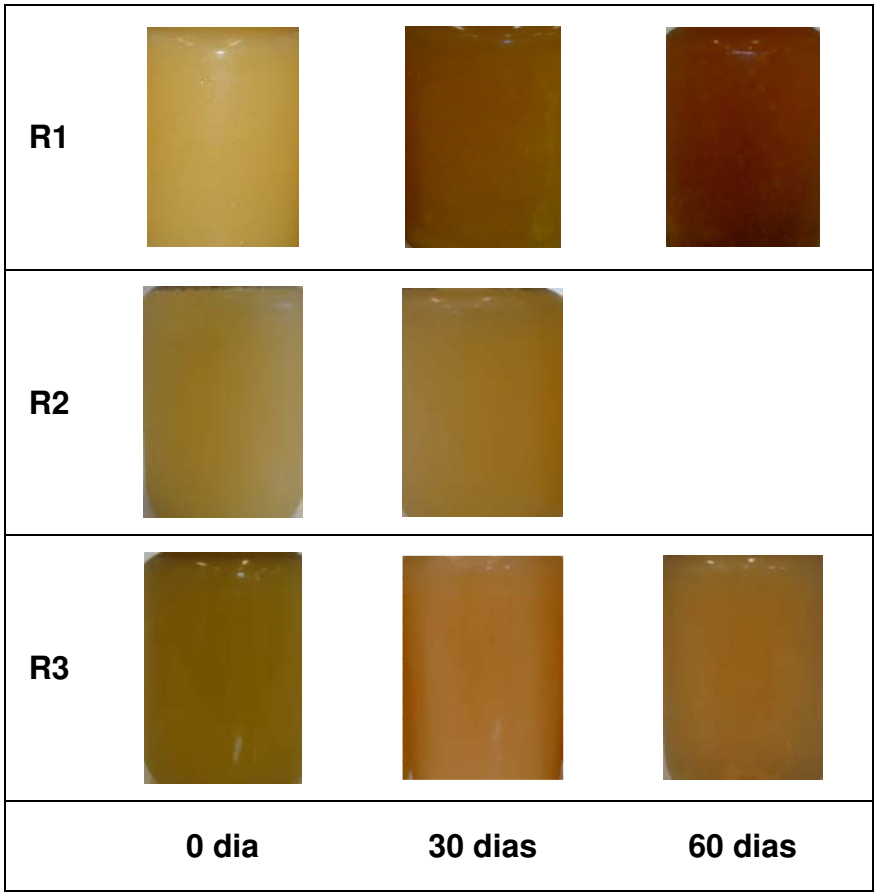


Figura 9. Amostras dos lotes de caldo de cana com polpa de maracujá processados a 85 ℃/ 30 s e estocado a 6,5 ± 0,5 ℃ na ausência de luz.

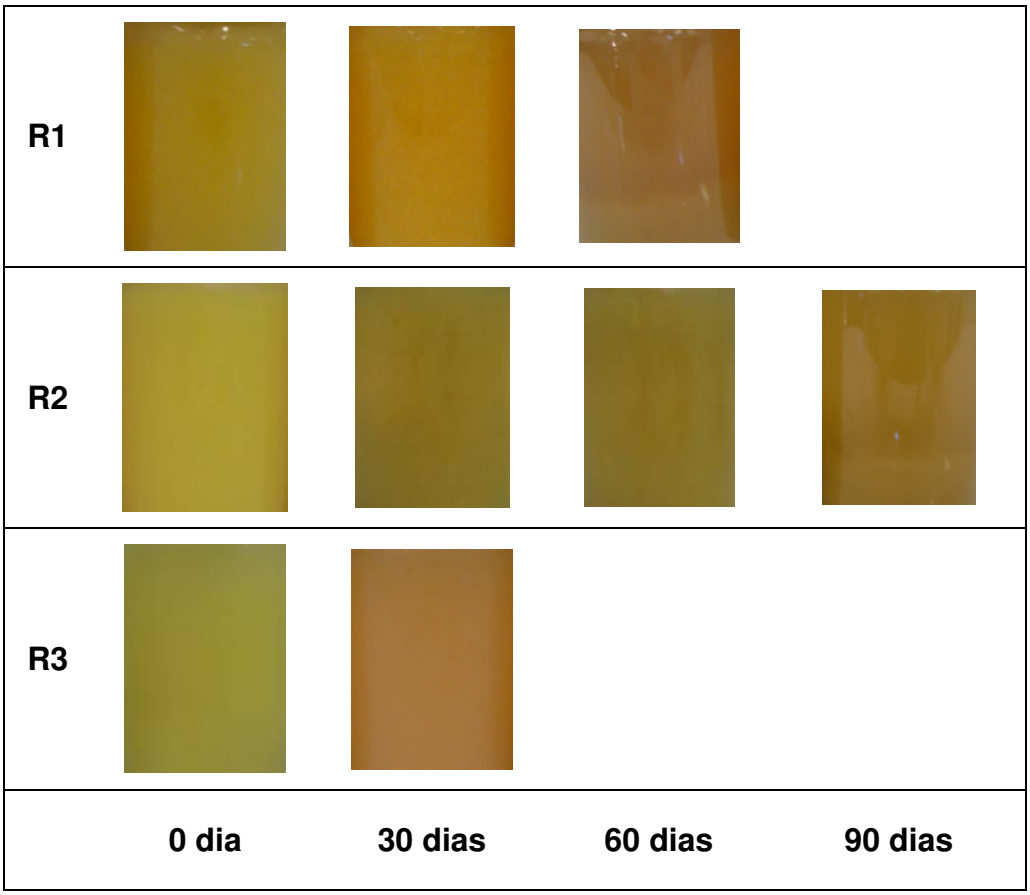


Figura 10. Amostras dos lotes de caldo de cana com polpa de maracujá processados a 90 ℃/ 30 s e estocado a 6,5 ± 0,5 ℃ na ausência de luz.

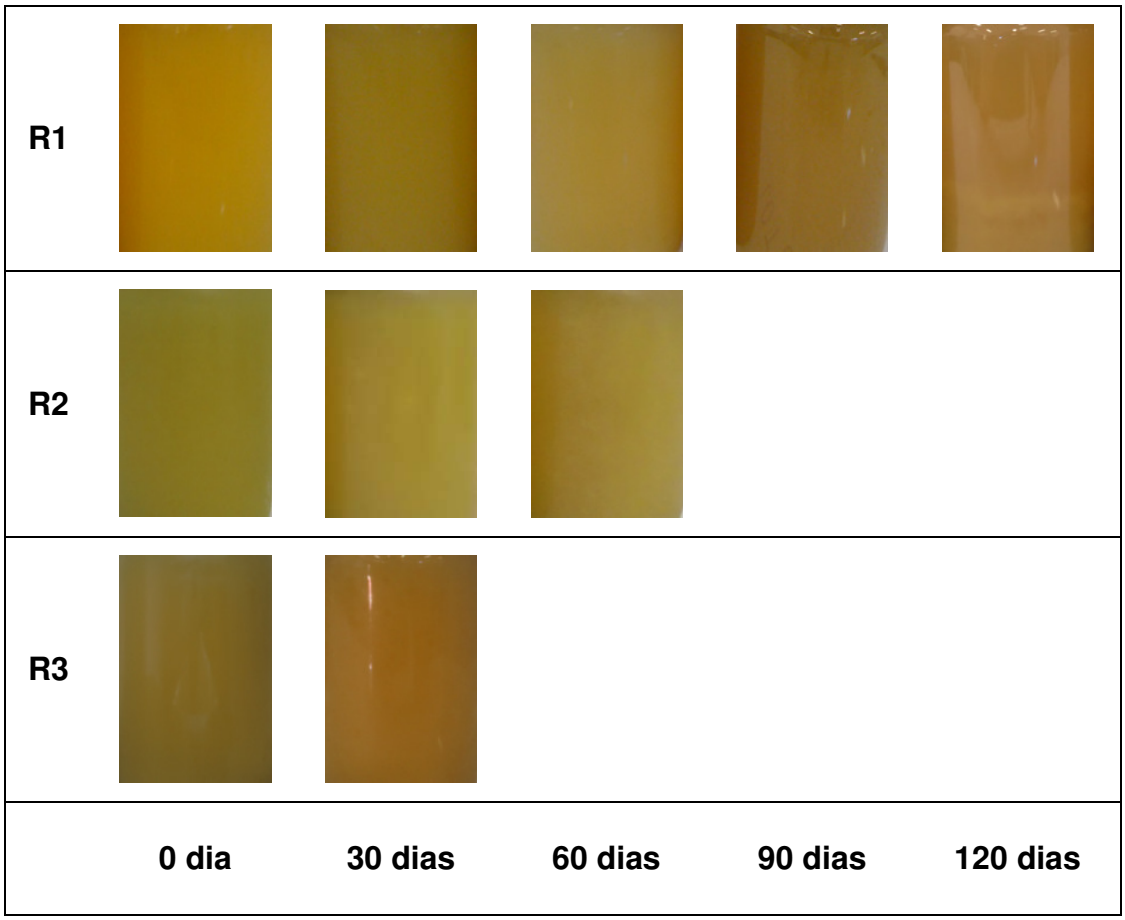


Figura 11. Amostras dos lotes de caldo de cana com polpa de maracujá processados a 95 ℃/ 30 s e estocado a 6,5 ± 0,5 ℃ na ausência de luz.

Os gráficos da Figura 12 complementam os resultados da determinação dos índices de cor, apresentados anteriormente.

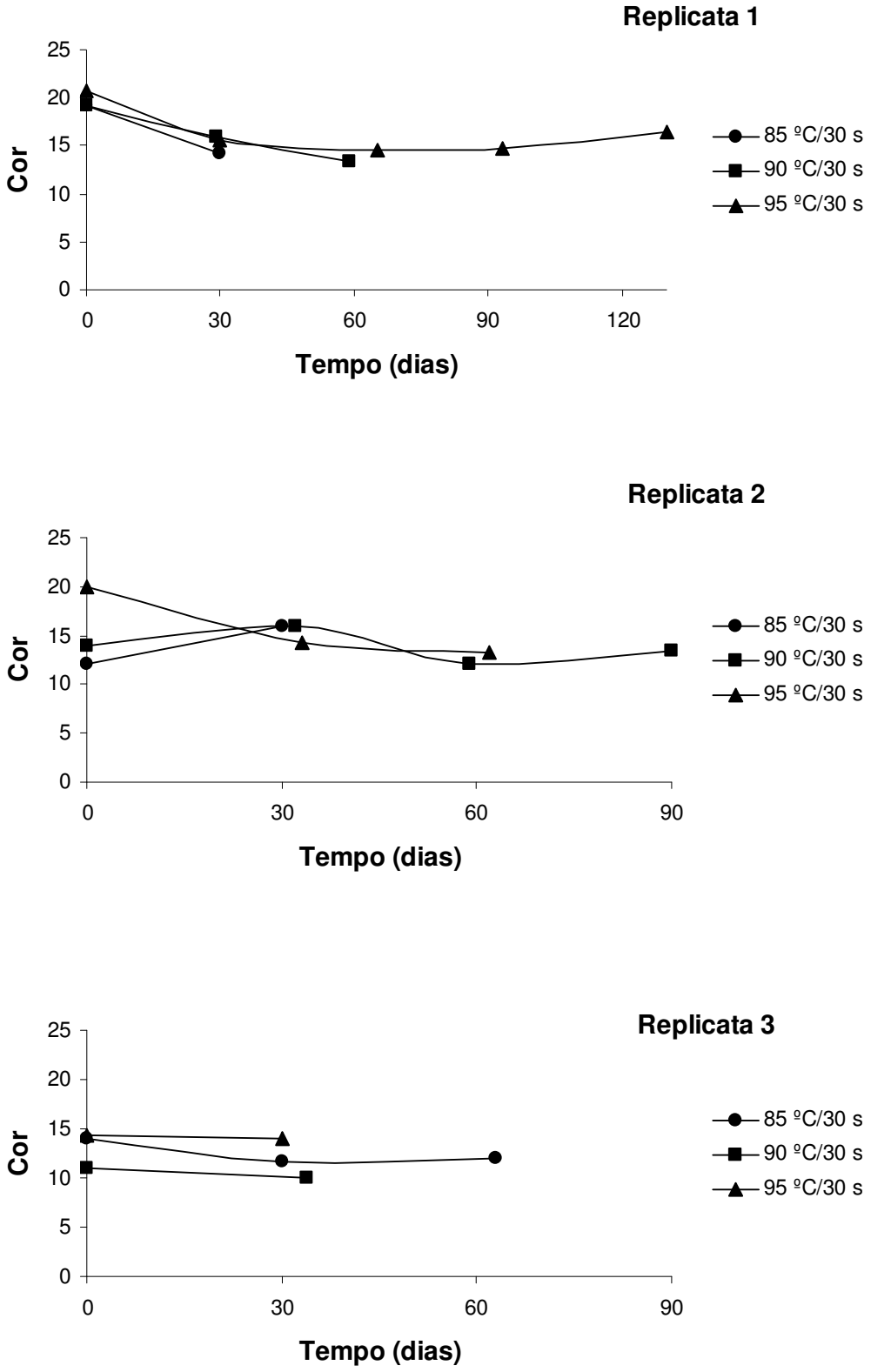


Figura 12. Evolução dos índices de cor calculados para os lotes de caldo de cana acidificado com polpa de maracujá, pasteurizado e estocados a 6,5 ± 0,5 ℃.

Na primeira replicata (R1) verificou-se que todos os lotes apresentaram um índice de cor próximo a 20, no início do estudo de estabilidade (tempo zero), observando-se um decaimento mais acentuado no primeiro mês de estocagem. Oliveira, A. (2007) apresentou valores de luminosidade (L) de 29,01 a 27,51 ao longo do tempo de estocagem de 42 dias a 5 °C para o caldo de cana adicionado de 4% de suco de limão pasteurizado (70 °C/25 min). Prati (2004) obteve luminosidade de 85,14 a 84,87 durante os 30 dias de estocagem refrigerada de 4-6 °C no caldo de cana parcialmente clarificado-estabilizado adicionado de 12,5 mg/100 mL de ácido ascórbico.

Contudo, esta tendência não se confirmou para os lotes processados em R2 (exceto para o lote pasteurizado a 95 °C) e R3. No decorrer da pesquisa todos os lotes atingiram índices de cor entre 20 a 10. Em R3, os lotes mantiveram-se relativamente estáveis, no intervalo entre 15 e 10.

Segundo Bucheli e Robinson (1994), a coloração escura do caldo de cana se inicia desde a extração com formação de pigmentos escuros oriundos das reações enzimáticas. Por essa razão, nesta pesquisa a extração foi feita a temperatura ambiente, em torno de 26 °C, seguido de acidificação do caldo pela polpa de maracujá e pasteurização, a fim de retardar seu escurecimento. Os índices iniciais de luminosidades foram baixos e se mantiveram quase que inalterados devido à inativação enzimática conseguida neste estudo.

5.4 Testes microbiológicos

Micro-organismos deteriorantes presentes no caldo de cana são os principais responsáveis pela alteração do produto estocado, resultando em sensível degradação das características químicas, físicas e sensoriais da bebida.

O mecanismo de deterioração microbiológica da cana de açúcar pode ser acelerado se as condições de armazenamento não forem adequadas, podendo ocorrer aumento da acidez titulável, dos índices de pH e do teor de gomas (SILVA; CESAR; SILVA, 2003), resultado de algumas bactérias, fungos filamentosos e leveduras que têm habilidade de transformar açúcares em ácidos e gomas, substâncias indesejáveis à industrialização de alguns alimentos. Durante as análises físico-químicas e sensoriais foram observados os referidos produtos em algumas

amostras. A Figura 13 apresenta algumas amostras da bebida processada com indícios de deterioração, com separação de fases e formação de precipitado e floculação.

Figura 13. Caldo de cana adicionado de polpa de maracujá com indícios de deterioração.

Yusof et al. (2000) estudaram o caldo de cana *in natura* e notaram um aumento da viscosidade durante a estocagem refrigerada; atribuído ao desenvolvimento de dextrana, substância gomosa provavelmente produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*.

A resolução RDC n.º 12 de 2 de janeiro de 2001 apresenta os padrões microbiológicos para caldo de cana (puro) pasteurizado e refrigerado, segundo os quais a contagem de coliformes a 45 °C não deve ultrapassar 10 NMP/mL (BRASIL, 2001). A mesma resolução estabelece a ausência de *Salmonella sp* em 25 mL de amostra. Outros grupos de micro-organismos não são incluídos na referida RDC.

Para fins de estimativa da estabilidade microbiológica da bebida processada, estocada sob refrigeração, estabeleceu-se os limites máximos de 10^4 e 10^3 UFC/mL para enumeração de bactérias e fungos psicrotróficos, respectivamente. Ou seja, níveis superiores aos referidos valores apontariam o término da vida de prateleira do produto.

Neste estudo, a garapa *in natura*, apresentou elevada contagem de mesófilos aeróbios. A cana contém naturalmente muitos micro-organismos em seus colmos, raízes e folhas (KITOKO et al., 2004; MELO et al., 2007). Segundo Duncan e Colmer (1964), esta matéria prima pode conter entre 10^1 a 10^8 colônias de bactérias por grama de colmo e 10^1 a 10^3 colônias de fungos.

As Tabelas 14 e 15 apresentam os resultados dos testes microbiológicos realizados na bebida antes e após o processamento.

Tabela 14. Resultados das contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios (UFC/mL)[a].

	R1			**R2**			**R3**		
	L1	**L2**	**L3**	**L4**	**L5**	**L6**	**L7**	**L8**	**L9**
Caldo de cana *in natura*	$3,8x10^3$	$3,8x10^4$	$6,7x10^3$	$1,2x10^3$	$1,0x10^3$	$5,8x10^4$	$1,6x10^5$	incontável	$2,0x10^5$
Polpa de maracujá	$2,4x10^3$	$5,7x10^4$	$5,2x10^3$	---	---	---	---	---	---
Bebida formulada (BF)[b]	$1,9x10^4$	$1,1x10^4$	$6,4x10^3$	$4,0x10^3$	$5,2x10^3$	$8,8x10^4$	$1,9x10^5$	incontável	$2,7x10^5$
	85 °C	**90 °C**	**95 °C**	**85 °C**	**90 °C**	**95 °C**	**85 °C**	**90 °C**	**95 °C**
Bebida pasteurizada (BP)[b]	$1,0x10^1$	$1,3x10^1$	$5,3x10^1$	$2,5x10^2$	$1,9x10^1$	$2,8x10^1$	$3,0x10^2$	$2,8x10^1$	$1,4x10^2$
Redução decimal (log BF – log BP)	3,3	2,9	2,1	1,2	2,4	3,5	2,8	---	3,3

[a]média de três amostras.
[b]caldo de cana adicionado de 4% (m/m) de polpa de maracujá.
--- não quantificado.
Tempo de retenção da pasteurização: 30 s.

A Tabela 14 mostra que as populações de mesófilos aeróbios quantificadas no caldo de cana *in natura* e na bebida formulada antes do processamento foram próximas entre si. Contudo, alguns incrementos observados, a exemplo de L1 (de $3,8x10^3$ para $1,9x10^4$) podem ter sido ocasionados pela manipulação do caldo e da bebida nas etapas que antecederam a sua pasteurização.

O fato do lote L3 ter apresentado a menor redução decimal em R1, mesmo aplicando-se o binômio mais severo (95 °C/30 s), pode ser um indício da presença de micro-organismos termorresistentes e/ou recontaminação. Contudo, pôde-se constatar a relativa eficiência dos três binômios de pasteurização na redução da população de mesófilos aeróbios.

Na replicata R2 pôde-se notar um aumento gradativo da redução logarítmica com o aumento da temperatura de pasteurização. Na terceira replicata (R3), o tratamento térmico atingiu 2,8 e 3,3 reduções logarítmicas para L7 e L9, em consonância com R2.

Suzart (2009) avaliou a estabilidade microbiológica de caldo de cana adicionado de dimetil dicarbonato, agente de controle de micro-organismos para a conservação de bebidas com pH entre 2,0 e 4,2. Essa bebida foi pasteurizada a 90 °C/40 s, obtendo-se valores de contagem padrão em placas semelhantes aos quantificados neste estudo, com número de reduções decimais próximas a 4,0.

Rezzadori (2010) analisou amostras de caldo de cana com 5% de polpa de maracujá, pasteurizado a 90 °C/30 s (P1) e 95 °C/30 s (P2). O controle da bebida não processada apresentou contagens de mesófilos e bolores e leveduras equivalentes a $1,2x10^6$ e $1,7x10^4$ UFC/mL, respectivamente. Os tratamentos P1 e P2 alcançaram reduções decimais próximas a 3 e 4, respectivamente.

A Tabela 15 apresenta os resultados da contagem de bolores e leveduras, grupo reduzido a níveis próximos a zero após o processamento de todos os lotes, exceto L4. Supõe-se que os micro-organismos remanescentes no produto sejam fungos termorresistentes.

Tabela 15. Contagens de bolores e leveduras (UFC/mL)[a].

	R1			R2			R3		
	L1	**L2**	**L3**	**L4**	**L5**	**L6**	**L7**	**L8**	**L9**
Caldo de cana *in natura*	$6,6x10^2$	$3,3x10^3$	$6,2x10^2$	$4,0x10^2$	$3,2x10^2$	$1,8x10^3$	$7,2x10^3$	$3,0x10^3$	$5,4x10^3$
Polpa de maracujá	$< 10_{est}$	$3,8x10^3$	$7,1x10^2$	---	---	---	---	---	---
Bebida formulada (BF)[b]	$1,6x10^3$	$3,9x10^2$	$7,4x10^2$	$2,9x10^3$	$8,1x10^2$	$2,7x10^3$	$7,2x10^3$	$6,1x10^3$	$1,0x10^4$
	85 °C	**90 °C**	**95 °C**	**85 °C**	**90 °C**	**95 °C**	**85 °C**	**90 °C**	**95 °C**
Bebida pasteurizada (BP)[b]	6,7	5,0	5,3	$2,5x10^2$	$< 1_{est}$	$< 1_{est}$	$< 1_{est}$	1,3	$< 1_{est}$
Redução decimal (log BF – log BP)	2,3	1,9	2,1	1,1	2,9	3,4	3,8	3,7	4,0

[a]média de três amostras.
[b]caldo de cana adicionado de 4% (m/m) de polpa de maracujá.
est – contagem estimada.
--- não quantificado.
Tempo de retenção da pasteurização: 30 s.

Oliveira et al. (2007) obtiveram contagens de fungos filamentosos e leveduras no caldo de cana *in natura* próximas a 10^6 UFC/mL. Após o processamento a 70 °C/ 25 min verificaram-se 5 reduções logarítmicas. O caldo de cana adicionado de suco de fruta (limão ou abacaxi) apresentou uma população inicial de 10^5 a 10^6 UFC/mL, reduzindo-se entre 10^1 a 10^2 UFC/mL, após a pasteurização.

Segundo Leitão (1973) e Uboldi-Eiroa (1989), a ocorrência de fungos filamentosos em sucos termoprocessados deve-se, geralmente, ao subprocessamento ou à recontaminação, pois as leveduras utilizam ácidos orgânicos para seu desenvolvimento, resultando em elevação do pH, produção de CO_2, etanol e acetaldeído, que contribuem para o odor fermentado. Nesse estudo, foram detectadas algumas embalagens com indícios de presença de gás e odor fermentado, sugerindo a atuação de fungos filamentosos.

Os resultados obtidos a partir da análise de bactérias láticas, coliformes e *Salmonella* em amostras da bebida pasteurizada são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Contagens microbianas (UFC/mL) em caldo de cana com polpa de maracujá pasteurizado e envasado assepticamente.

	R1			**R2**			**R3**		
	L1 85 °C	**L2** 90 °C	**L3** 95 °C	**L4** 85 °C	**L5** 90 °C	**L6** 95 °C	**L7** 85 °C	**L8** 90 °C	**L9** 95 °C
Bactérias láticas	$2,3x10^2$	$1,4x10^2$	$3,8x10^1$	$1,9x10^1$	5,5	4,8	$3,1x10^2$	$8,8x10^1$	6,6
Coliformes a 35 °C (NMP/mL)	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	5,7	5,4	< 3,0
Coliformes a 45 °C (NMP/mL)	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0
***Salmonella sp* (em 25 mL)**	---	---	---	---	---	---	---	---	---

(---) ausente.
Tempo de retenção da pasteurização: 30 s.

De acordo com Geraldini et al. (1979) as bactérias láticas são microaerófilas, toleram pH ácido e apresentam baixa resistência ao tratamento térmico; o que justifica a baixa contagem deste grupo observada no presente estudo.

O diacetil é o produto resultante da degradação do caldo pelas bactérias láticas, originando odor forte e sabor desagradável, além de CO_2, ácido lático e dextranas, que alteram a viscosidade do produto (GERALDINI et al., 1979).

As contagens de coliformes a 35 e 45 °C foram inferiores a 3,0 NMP/mL para a maioria dos lotes processados, com exceção de L7 e L8, que atingiram níveis ligeiramente superiores.

Prati (2004) em seu estudo de garapa com suco de maracujá clarificado e refrigerado a 4-6 °C obteve valores menores que 0,03 NMP/mL de coliformes a 35 °C. Rezzadori (2010) obteve valores de coliformes a 45 °C menores que 0,3 NMP/mL e ausência de *Salmonella* para o caldo de cana adicionado de polpa de maracujá.

Salienta-se que todos os lotes processados nesta pesquisa atenderam aos padrões legais vigentes, em conformidade com o item 1.1 do Anexo II do Regulamento RDC n.º 12 (BRASIL, 2001), segundo os quais a bebida deve apresentar uma contagem de coliformes a 45 °C/mL não superior a 10 NMP/mL e ausência de *Salmonella sp*/25 mL de amostra.

5.4.1 Avaliação da estabilidade microbiológica

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos na quantificação de bactérias e fungos psicrotróficos na bebida pasteurizada e estocada sob refrigeração, visando ao estudo de sua estabilidade microbiológica. Os resultados apresentados a seguir demonstram que todas as contagens obtidas foram inferiores aos limites pré-estabelecidos para bactérias (4 log UFC/mL) e fungos psicrotróficos (3 log UFC/mL), ao longo do estudo. Ressalta-se que os testes microbiológicos foram interrompidos na análise de lotes que sofreram um declínio da aceitação sensorial abaixo dos limites pré-fixados.

Tabela 17. Contagem de micro-organismos psicrotróficos (UFC/mL)[a] em caldo de cana acidificado, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 °C.

	R1			R2			R3		
	Estocagem (dias)	**Bactérias**	**Bolores e leveduras**	Estocagem (dias)	**Bactérias**	**Bolores e leveduras**	Estocagem (dias)	**Bactérias**	**Bolores e leveduras**
85 °C/ 30 s (L1, L4 e L7)	**0**	$< 10_{est}$	7,0	**0**	$< 1_{est}$	$< 1_{est}$	**0**	$< 1_{est}$	$< 1_{est}$
	30	$3,8x10^1$	8,0	**30**	3,0	2,0	**30**	$4,7x10^1$	$< 1_{est}$
							63	$2,7x10^1$	$1,1x10^1$
90 °C/ 30 s (L2, L5 e L8)	**0**	$< 10_{est}$	$< 10_{est}$	**0**	$< 1_{est}$	$< 1_{est}$	**0**	$1,2x10^1$	$< 1_{est}$
	29	5,0	5,0	**32**	$1,0x10^1$	5,0	**34**	$3,3x10^1$	$1,9x10^1$
	59	5,0	5,0	**59**	9,0	$2,1x10^1$			
				90	$< 1_{est}$	1,0			
95 °C/ 30 s (L3, L6 e L9)	**0**	$< 10_{est}$	5,0	**0**	$< 1_{est}$	$< 1_{est}$	**0**	$< 1_{est}$	$< 1_{est}$
	30	5,0	5,0	**33**	1,0	1,0	**30**	$< 1_{est}$	$< 1_{est}$
	65	2,0	2,0	**62**	3,0	$2,3x10^1$			
	93	2,0	5,0						
	130	$1,3x10^1$	$< 1_{est}$						

[a] Média de três amostras.
est – estimado (abaixo do limite inferior para contagem em placas).
Limites superiores para contagem de bactérias e fungos psicrotróficos: 10^4 e 10^3 UFC/mL, respectivamente.

Todos os lotes apresentaram boa estabilidade microbiológica quando estocados sob refrigeração, durante o período investigado. A Tabela 17 revela que não houve variação considerável na contagem de bactérias e fungos psicrotróficos. Ou seja, no que tange à sua qualidade microbiológica todos os lotes apresentaram-se adequados ao consumo durante o período do estudo.

Oliveira et al. (2007) obtiveram contagens de psicrotróficos na ordem de 10^1 UFC/mL após 42 dias de estocagem a 5 °C para caldo de cana adicionado de 4% de suco de limão, pasteurizado a 70 °C/25 min; similares ao presente estudo.

Conforme Prati (2004), as leveduras são o principal grupo de micro-organismos responsável pela deterioração do caldo de cana acidificado com suco de fruta. O mesmo autor constatou a predominância de colônias gomosas e de cor rosada que foram isoladas e identificadas como *Rhodotorula mucilaginosa*. Segundo Pitt e Hocking (1999), esta levedura desenvolve-se na faixa de 0,5 a 35 °C e exige altos níveis de açúcar, condições oferecidas pela bebida processada nesta pesquisa, onde observou-se o referido tipo de colônia, conforme ilustrado na Figura 14. Contudo, o isolamento e a identificação desta não foram realizados.

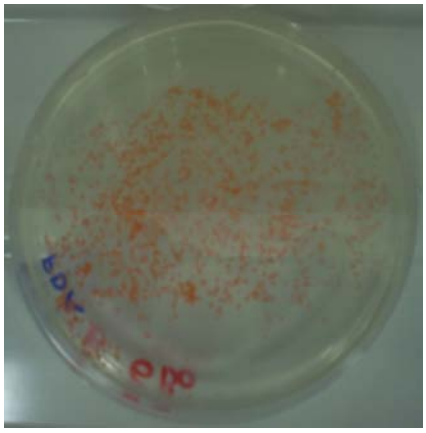


Figura 14. Imagem de colônias desenvolvidas em amostras de caldo de cana com polpa de maracujá.

Os resultados apresentados na Tabela 17 foram utilizados no cálculo estimado das médias das três replicatas, para cada binômio utilizado na pasteurização, visando à construção dos gráficos apresentados nas Figuras 15 e 16. As curvas mostram o desenvolvimento de bactérias e fungos psicrotróficos na bebida, ao longo do tempo de estocagem a 6,5 ± 0,5 °C. Salienta-se que os resultados das contagens microbianas foram estimados, por estarem situados

abaixo do limite de sensibilidade dos métodos de contagem em placas, utilizados nesta pesquisa.

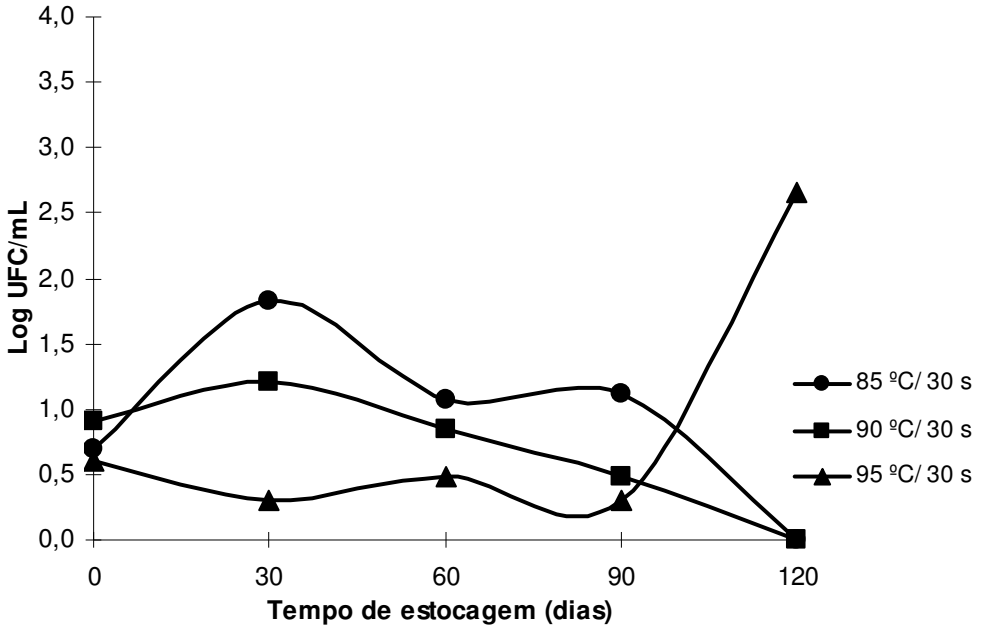


Figura 15. Desenvolvimento de bactérias psicrotróficas em caldo de cana adicionado de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 ºC.

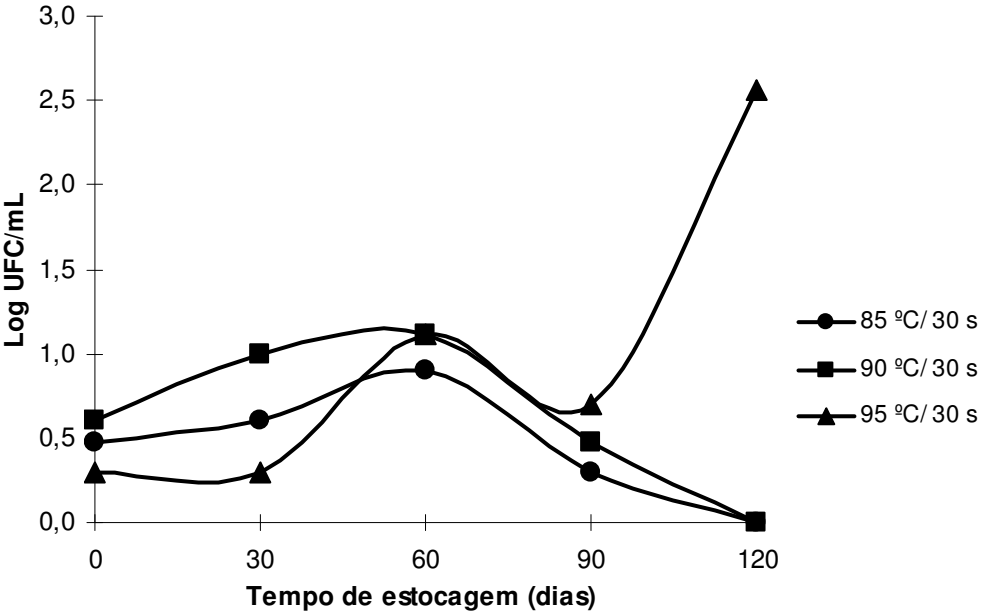


Figura 16. Desenvolvimento de fungos psicrotróficos em caldo de cana adicionado de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 ºC.

As Figuras 15 e 16 demonstram que as contagens de bactérias e fungos psicrotróficos foram inferiores a 2,0 e 1,5 log UFC/mL, respectivamente, até 90 dias de estocagem, indicando boa estabilidade microbiológica da bebida.

Após 90 dias de estocagem, notou-se um incremento na taxa de desenvolvimento microbiano nas amostras processadas a 95 °C, destacando-se em relação às amostras pasteurizadas às temperaturas mais brandas. Para explicar este resultado, supõe-se que a temperatura mais severa (95 °C) tenha destruído a microbiota termossensível, tendo os micro-organismos termorresistentes encontrado um meio pouco competitivo, favorecendo desta forma o seu desenvolvimento. Em contraste aos binômios mais brandos, a temperatura de pasteurização não teria sido efetiva na destruição da população competitiva, resultando na inibição do desenvolvimento microbiano.

No que tange à avaliação microbiológica do produto, maior destaque é dado à sua segurança e à constatação de que todas as contagens obtidas foram inferiores aos limites pré-estabelecidos para bactérias (4 log UFC/mL) e fungos psicrotróficos (3 log UFC/mL), assegurando a qualidade microbiológica da bebida ao longo do período investigado.

5.5 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial revelou-se estratégica para estimar a vida útil da bebida elaborada e processada nesta pesquisa; uma que vez que a aceitação do produto foi o fator limitante na determinação de sua estabilidade.

Os alimentos submetidos a um processamento térmico brando, como a pasteurização seguida da estocagem refrigerada, apresentam características sensoriais mais próximas à matéria prima que lhe deu origem (ALVES; GARCIA, 1993), o que agrada ao mercado brasileiro, que possui um paladar exigente e sensível às alterações no sabor ocasionadas por tratamentos térmicos intensos (OLIVEIRA, A., 2007).

As Tabelas 18 a 23 reúnem os resultados obtidos nos testes de escala hedônica e diferença de controle, das três replicatas, visando à estimativa da estabilidade sensorial da bebida, em conformidade com os critérios descritos no item Material e Métodos.

Os valores em negrito nas tabelas de aceitação sensorial destacam as médias de notas de corte (≤ 4), obtidas no teste de escala hedônica de 7 pontos, e porcentagens de aceitação ≤ 60% para os quatro atributos avaliados.

O índice de aceitabilidade geral para o caldo de cana adicionado de polpa de maracujá foi positivo em relação aos três tratamentos, considerando-se o tempo inicial (t_0) do estudo de estabilidade sensorial, variando de 72 a 100% para qualquer atributo analisado. Conforme Teixeira, Meinert e Barbetta (1987) e Dutcoski (1996), índices acima de 70% de aprovação revelam uma boa aceitação.

Tabela 18. Aceitação sensorial de caldo de cana acidificado e pasteurizado a **85 °C**/30 s.

ESTOCAGEM a 7 °C (dias)	ATRIBUTO AVALIADO (média / % aceitação*)							
	Aparência		Aroma		Sabor		Impressão global	
	Amostra	Controle	Amostra	Controle	Amostra	Controle	Amostra	Controle
	Replicata 1 (L1)							
0	$5,84^{A}$/88		$6,58^{A}$/98		$6,44^{A}$/94		$6,34^{A}$/98	
30	$5,82^{Aa}$/89,8	$5,78^{a}$/85,7	$5,88^{Ba}$/89,8	$5,94^{a}$/91,8	$6,04^{Aa}$/91,8	$5,86^{a}$/85,7	$5,96^{Ba}$/95,9	$5,73^{a}$/93,9
	Replicata 2 (L4)							
0	$6,10^{A}$/92		$5,95^{A}$/96		$4,93^{A}$/98		$5,28^{A}$/98	
30	$5,50^{Ba}$/85	$5,88^{a}$/88	$5,43^{Ba}$/93	$5,80^{a}$/93	$4,75^{Ab}$/93	$5,55^{a}$/95	$4,88^{Ab}$/93	$5,68^{a}$/95
	Replicata 3 (L7)							
0	$6,12^{A}$/96		$6,34^{A}$/96		$6,14^{A}$/94		$6,16^{A}$/100	
30	$5,78^{Aa}$/86	$5,72^{a}$/82	$5,84^{Aa}$/92	$5,72^{a}$/88	$5,52^{Aa}$/90	$5,36^{a}$/78	$5,60^{Ba}$/92	$5,42^{a}$/78
63	$4,72^{Bb}$/**54**	$6,12^{a}$/96	$4,64^{Bb}$/**54**	$6,06^{a}$/92	$4,08^{Bb}$/**44**	$5,76^{a}$/90	$4,36^{Cb}$/**48**	$5,88^{a}$/96

Médias seguidas pelo mesmo expoente maiúsculo, na mesma coluna (comparação entre tempos de estocagem para o mesmo lote) e médias com o mesmo expoente minúsculo na mesma linha (comparação entre amostra e controle) não são diferentes ($P > 0,05$).
*Porcentagem de provadores que atribuiu nota superior a 4. Controle: estocado a -18 °C. Número de provadores: 50. Temperatura de degustação: 12-13 °C. Escala hedônica de 7 pontos (1 = desgostei muito; 4 = nem gostei/nem desgostei; 7 = gostei muito).

Os resultados da Tabela 18 demonstram a elevada aceitação sensorial dos lotes processados a 85 °C/30 s, com médias para impressão global situadas entre 5,3 e 6,4 e porcentagens de aceitação próximas a 100%, no início do estudo de estabilidade (t_0). Após 30 dias de estocagem refrigerada determinaram-se médias entre 4,75 e 6,0; para impressão global, e porcentagens de aceitação entre 92 e 96%. Para os lotes L1 e L4 a próxima sessão seria realizada após 60 dias de estocagem, aproximadamente; contudo, as amostras apresentaram indícios de deterioração. Por esta razão, estas não foram servidas aos provadores. Assim, estimou-se uma estabilidade sensorial de 30 dias para os três lotes processados a 85 °C, envasados em garrafas de PET e estocados a 7 °C na ausência de luz.

Prati (2004) estudou a vida útil de caldo de cana adicionado de 5% de suco de maracujá clarificado e estabilizado. O autor utilizou uma escala hedônica não estruturada de 9 pontos e verificou que a média da notas para a cor, sabor e impressão global da bebida processada diminuiu significativamente durante o período de 30 dias de estocagem refrigerada (4-6 °C), atingindo valores em torno de 7. Contudo, o desenvolvimento microbiano limitou a vida útil do produto a 15 dias.

Em relação ao lote L7, verificou-se que o sabor foi o atributo que sofreu a maior depreciação após 63 dias de estocagem, por ter recebido as menores notas e porcentagens de aceitação. De acordo com a Tabela 18, a diferença entre as amostras estocadas a 7 °C e a amostra controle não foi estatisticamente significativa, na maior parte dos testes de Tukey realizados, após 30 dias de estocagem.

Oliveira, A. (2007) notou redução significativa da aceitação dos provadores em relação ao sabor nas bebidas, de caldo de cana adicionado de suco de limão, irradiadas e submetidas à pasteurização associada à radiação gama. Após 28 dias de estocagem a 5 °C, a bebida pasteurizada (70 °C/25 min) apresentou maior aceitação do sabor comparado àquela irradiada. Entretanto, após 42 dias, bebida submetida à pasteurização combinada com radiação gama de 2,5 kGy, juntamente com a bebida pasteurizada, atingiu a melhor aceitação para a cor e aparência.

Complementarmente ao teste de escala hedônica, aplicou-se o teste discriminatório de diferença do controle para identificar eventual diferença entre a amostra refrigerada e o controle (congelado), além de estimar o tamanho de tal diferença. Os resultados do referido teste estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Teste de diferença do controle (Dunnett) para caldo de cana acidificado pasteurizado a **85 ºC**/30 s.

Lote	Estocagem a 7 ºC (dias)	Média do controle[1]	Média da amostra	Diferença entre as médias	Mínima diferença significativa
L1	30	1,12[b]	1,72[a]	0,60 (>0,36)	0,36
L4	30	1,03[b]	2,63[a]	1,60 (>0,37)	0,37
L7	30	1,24[a]	1,24[a]	0,00 (<0,35)	0,35
	63	1,58[b]	2,22[a]	0,64 (>0,57)	0,57

Médias com o mesmo expoente, na mesma linha, não são diferentes (P > 0,05).
[1]estocado a -18 ºC. Número de provadores: 50. Temperatura de degustação: 12-13 ºC.
(0) nenhuma diferença da amostra controle (1) ligeiramente diferente (2) moderadamente diferente (3) muito diferente (4) extremamente diferente.

Os resultados da Tabela 19 apontaram diferença significativa entre a amostra e o controle dos lotes L1 e L4, após 30 dias de estocagem. Para L7, verificou-se diferença estatística apenas com 63 dias de estocagem. Os resultados também mostram que a maior diferença (1,60) foi observada para L4, após 30 dias de estocagem.

Os estudos de Oliveira, A. (2007) revelaram uma rápida deterioração da bebida acidificada; sendo que o controle do caldo de cana adicionado de 4% de suco de limão *in natura* foi rejeitado pelos provadores a partir do sétimo dia de estocagem a 5 °C.

Os resultados obtidos a partir dos testes de aceitação e diferença de controle dos três lotes processados a 90 °C/30 s são mostrados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20. Aceitação sensorial de caldo de cana acidificado pasteurizado a **90 ºC**/30 s.

ESTOCAGEM a 7 ºC (dias)	ATRIBUTO AVALIADO (média / % aceitação*)							
	Aparência		Aroma		Sabor		Impressão global	
	Amostra	Controle	Amostra	Controle	Amostra	Controle	Amostra	Controle
	Replicata 1 (L2)							
0	$6,14^{A}$/94		$6,46^{A}$/98		$5,50^{A}$/78		$5,80^{A}$/86	
29	$5,40^{Ba}$/80	$5,66^{a}$/86	$5,36^{Ba}$/70	$5,58^{a}$/84	$4,86^{ABa}$/66	$4,98^{a}$/72	$4,88^{Bb}$/72	$5,34^{a}$/84
59	$5,40^{Bb}$/76	$5,92^{a}$/92	$5,06^{Bb}$/66	$5,78^{a}$/90	$4,48^{Bb}$/**54**	$5,02^{a}$/70	$4,86^{Bb}$/64	$5,40^{a}$/82
	Replicata 2 (L5)							
0	$5,98^{A}$/90		$6,52^{A}$/98		$5,90^{A}$/94		$6,14^{A}$/98	
32	$6,10^{Aa}$/88	$6,13^{a}$/95	$6,05^{ABa}$/90	$5,70^{b}$/83	$5,30^{ABa}$/78	$5,75^{a}$/83	$5,78^{ABa}$/88	$5,88^{a}$/93
59	$5,73^{Ab}$/82	$6,13^{a}$/93	$5,60^{BCb}$/80	$6,13^{a}$/96	$5,04^{ABb}$/67	$5,71^{a}$/89	$5,44^{ABb}$/82	$5,91^{a}$/89
90	$5,47^{Ab}$/77	$6,57^{a}$/100	$5,23^{Cb}$/73	$6,27^{a}$/100	$4,50^{Bb}$/**53**	$5,93^{a}$/90	$4,83^{Bb}$/**60**	$6,27^{a}$/100
	Replicata 3 (L8)							
0	$6,04^{A}$/92		$6,14^{A}$/94		$5,88^{A}$/98		$5,88^{A}$/94	
34	$5,96^{Ab}$/90	$6,32^{a}$/94	$5,86^{Aa}$/84	$6,04^{a}$/96	$5,38^{Ba}$/78	$5,82^{a}$/90	$5,52^{Ab}$/80	$5,92^{a}$/88

Médias seguidas pelo mesmo expoente maiúsculo, na mesma coluna (comparação entre tempos de estocagem para o mesmo lote) e médias com o mesmo expoente minúsculo na mesma linha (comparação entre amostra e controle) não são diferentes ($P > 0,05$).

*Porcentagem de provadores que atribuiu nota superior a 4. Controle: estocado a -18 ºC. Número de provadores: 50. Temperatura de degustação: 12-13 ºC. Escala hedônica de 7 pontos (1 = desgostei muito; 4 = nem gostei/nem desgostei; 7 = gostei muito).

Os resultados da Tabela 20 mostram médias entre 4,9 e 5,8 aos lotes processados a 90 °C/ 30 s e porcentagens de aceitação variando entre 72 e 88%, para impressão global, ao longo de 30 dias de estocagem refrigerada, aproximadamente. Após 59 dias observou-se uma redução considerável na porcentagem de aceitação do sabor da amostra estocada a 7 °C, atingindo 54% e 53% para R1 e R2, respectivamente; inferior ao limite pré-estabelecido (60%). Posto isto, os testes sensoriais foram interrompidos. Portanto, a estabilidade sensorial do produto foi estimada em cerca de 30 dias, como no lote processado a 85 °C, para L2 e L8. De maneira análoga aos resultados obtidos a partir da análise dos lotes processados a 85 °C, a depreciação do sabor limitou a vida útil da bebida. Em contrapartida, o lote L5 apresentou maior estabilidade, estimada em 60 dias, supostamente influenciada pela maior acidez (3,85), comparada aos lotes L2 (4,17) e L8 (4,23).

Rezzadori (2010) estudou os tratamentos de microfiltração e pasteurização P1 (90 °C/30 s) e P2 (95 °C/30 s) de caldo de cana adicionado de 5% de polpa de maracujá. Os atributos analisados apresentaram diferença significativa a um nível de confiança de 95%, indicando que a bebida pasteurizada P2 recebeu as maiores notas para os atributos aparência, sabor e impressão global, entre “gostei muito” e “gostei muitíssimo”, correspondendo a um índice de aceitabilidade superior a 90%. O uso da microfiltração, utilizando temperaturas mais amenas, contribuiu para reduzir as perdas sensoriais do produto processado levando-o à uma maior aceitação.

A Tabela 21 mostra que a partir de 30 dias de estocagem, aproximadamente, as amostras da bebida refrigerada e controle diferiram entre si; exceto o lote L2, em que a diferença foi observada com 59 dias de estocagem.

Tabela 21. Teste de diferença do controle (Dunnett) para caldo de cana acidificado e pasteurizado a **90 °C**/30 s.

Lote	Estocagem a 7 °C (dias)	Média do controle[1]	Média da amostra	Diferença entre as médias	Mínima diferença significativa
L2	29	1,64[a]	1,72[a]	0,08 (<0,38)	0,38
	59	1,30[b]	1,96[a]	0,66 (>0,46)	0,46
L5	32	1,53[b]	2,05[a]	0,52 (>0,46)	0,46
	59	1,42[b]	1,98[a]	0,57 (>0,44)	0,44
	90	0,77[b]	2,87[a]	2,10 (>0,49)	0,49
L8	34	1,20[b]	2,70[a]	1,50 (>0,46)	0,46

Médias com o mesmo expoente, na mesma linha, não são diferentes (P>0,05).
[1]estocado a -18 °C. Número de provadores: 50. Temperatura de degustação: 12-13 °C.
(0) nenhuma diferença da amostra controle (1) ligeiramente diferente (2) moderadamente diferente (3) muito diferente (4) extremamente diferente.

A diferença identificada entre as amostras refrigeradas e controle pode representar indícios de perda de qualidade da bebida; ocasionada, supostamente, por ação enzimática remanescente, degradação de pigmentos do caldo, como a clorofila, ou eventual atuação de leveduras termorresistentes, que fermentam o caldo, resultando no fim da vida útil da bebida.

Eggleston (2002) pressupõe que o odor de vinho e a cor escura estejam relacionados à presença de micro-organismos no caldo de cana; sendo as leveduras as principais responsáveis pela produção de etanol durante a degradação da bebida.

A Tabela 22 apresenta as médias das notas do teste de escala hedônica e as porcentagens de aceitação para as três replicatas do processamento a 95 ℃. Salienta-se que a análise seguinte de L3 seria realizada após 150 dias; contudo, as amostras apresentaram-se deterioradas na data do teste sensorial.

Tabela 22. Aceitação sensorial de caldo de cana acidificado pasteurizado a **95 ºC**/30 s.

ESTOCAGEM a 7 ºC (dias)	ATRIBUTO AVALIADO (média / % aceitação*)							
	Aparência		Aroma		Sabor		Impressão global	
	Amostra	Controle	Amostra	Controle	Amostra	Controle	Amostra	Controle
Replicata 1 (L3)								
0	$5,63^{A}$/86		$5,61^{A}$/84		$4,97^{A}$/72		$5,34^{A}$/84	
30	$5,96^{Ab}$/90	$6,32^{a}$/94	$5,86^{Aa}$/84	$6,04^{a}$/96	$5,38^{Aa}$/82	$5,82^{a}$/92	$5,52^{Ab}$/84	$5,92^{a}$/90
65	$6,04^{Aa}$/92	$5,70^{a}$/86	$5,90^{Aa}$/90	$5,44^{a}$/80	$5,82^{Aa}$/92	$5,14^{b}$/70	$5,86^{Aa}$/96	$5,34^{b}$/86
93	$5,44^{Ab}$/92	$6,14^{a}$/86	$5,26^{Ab}$/90	$6,14^{a}$/80	$4,80^{Aa}$/92	$5,24^{a}$/70	$4,92^{Aa}$/96	$5,48^{a}$/86
130	$5,42^{Ab}$/78	$6,20^{a}$/95	$5,25^{Ab}$/75	$6,18^{a}$/95	$5,13^{Ab}$/78	$6,25^{a}$/98	$5,25^{Ab}$/80	$6,13^{a}$/100
Replicata 2 (L6)								
0	$6,29^{A}$/94		$6,32^{A}$/98		$5,73^{A}$/84		$5,86^{A}$/86	
33	$6,20^{Ab}$/100	$6,58^{a}$/100	$5,86^{Ab}$/88	$6,14^{a}$/100	$4,98^{Bb}$/64	$6,02^{a}$/100	$5,46^{Ab}$/80	$6,34^{a}$/100
62	$4,90^{Bb}$/70	$6,37^{a}$/100	$4,90^{Bb}$/73	$6,33^{a}$/93	$4,27^{Bb}$/**57**	$6,20^{a}$/97	$4,20^{Bb}$/**43**	$6,13^{a}$/97
Replicata 3 (L9)								
0	$5,94^{A}$/94		$5,94^{A}$/92		$5,86^{A}$/90		$6,06^{A}$/94	
30	$4,57^{Bb}$/**60**	$5,88^{a}$/93	$5,07^{Bb}$/73	$5,89^{a}$/89	$4,51^{Bb}$/**56**	$5,53^{a}$/87	$4,67^{Bb}$/**53**	$5,76^{a}$/93

Médias seguidas pelo mesmo expoente maiúsculo, na mesma coluna (comparação entre tempos de estocagem para o mesmo lote) e médias com o mesmo expoente minúsculo na mesma linha (comparação entre amostra e controle) não são diferentes ($P > 0,05$).

*Porcentagem de provadores que atribuiu nota superior a 4. Controle: estocado a -18 ºC. Número de provadores: 50. Temperatura de degustação: 12-13 ºC. Escala hedônica de 7 pontos (1 = desgostei muito; 4 = nem gostei/nem desgostei; 7 = gostei muito).

Os resultados mostram que a estabilidade sensorial da replicata R1, baseada em sua aceitabilidade, alcançou 130 dias; consideravelmente superior àquela atingida pelas replicatas R2 e R3.

A variação observada nos tempos de vida útil atingidos pelos lotes L3, L6 e L9 deve-se, provavelmente, à variação na composição físico-química da matéria prima, influenciada pelo período de chuva e seca, que afeta o teor de sólidos solúveis (substrato para micro-organismos deteriorantes) e a acidez da bebida.

A Tabela 23 reúne os resultados obtidos a partir do teste de diferença do controle, indicando diferença estatisticamente significativa entre as amostras refrigerada e controle, do início ao final dos testes sensoriais, para as três replicatas do tratamento a 95 °C.

Tabela 23. Teste de diferença do controle (Dunnett) para caldo de cana acidificado e pasteurizado a **95 °C**/30 s.

Lote	Estocagem a 7 °C (dias)	Média do controle[1]	Média da amostra	Diferença entre as médias	Mínima diferença significativa
L3	30	0,96[b]	1,80[a]	0,84 (>0,34)	0,34
	65	0,98[b]	2,02[a]	1,04 (>0,37)	0,37
	93	1,34[b]	2,78[a]	1,44 (>0,43)	0,43
	130	0,93[b]	2,35[a]	1,42 (>0,30)	0,30
L6	33	1,34[b]	2,00[a]	0,66 (>0,53)	0,53
	62	0,63[b]	2,47[a]	1,84 (>0,69)	0,69
L9	30	1,09[b]	2,55[a]	1,46 (>0,39)	0,39

Médias com o mesmo expoente, na mesma linha, não são diferentes (P>0,05).
[1]estocado a -18 °C. Número de provadores: 50. Temperatura de degustação: 12-13 °C.
(0) nenhuma diferença da amostra controle (1) ligeiramente diferente (2) moderadamente diferente (3) muito diferente (4) extremamente diferente.

A Tabela 23 mostra que a diferença entre as médias do controle e da amostra aumentou ao longo do tempo de estocagem, sugerindo a perda de qualidade sensorial da bebida refrigerada. Após 93 dias, L3 atingiu uma média (2,78) sensivelmente acima do padrão esperado, representado pelo aumento gradativo da diferença entre as médias. Esta observação pode ter resultado da formação de uma equipe de provadores não treinados.

5.5.1 Estimativa da vida de prateleira

A Figura 17 ilustra a vida de prateleira média estimada para os lotes de caldo de cana com maracujá, processados a 85, 90 e 95 ℃/30 s, envasado assepticamente em garrafas de PET e estocados a 6,5 ± 0,5 ℃ na ausência de luz; em conformidade com os critérios microbiológicos e sensoriais estabelecidos no desenvolvimento da pesquisa.

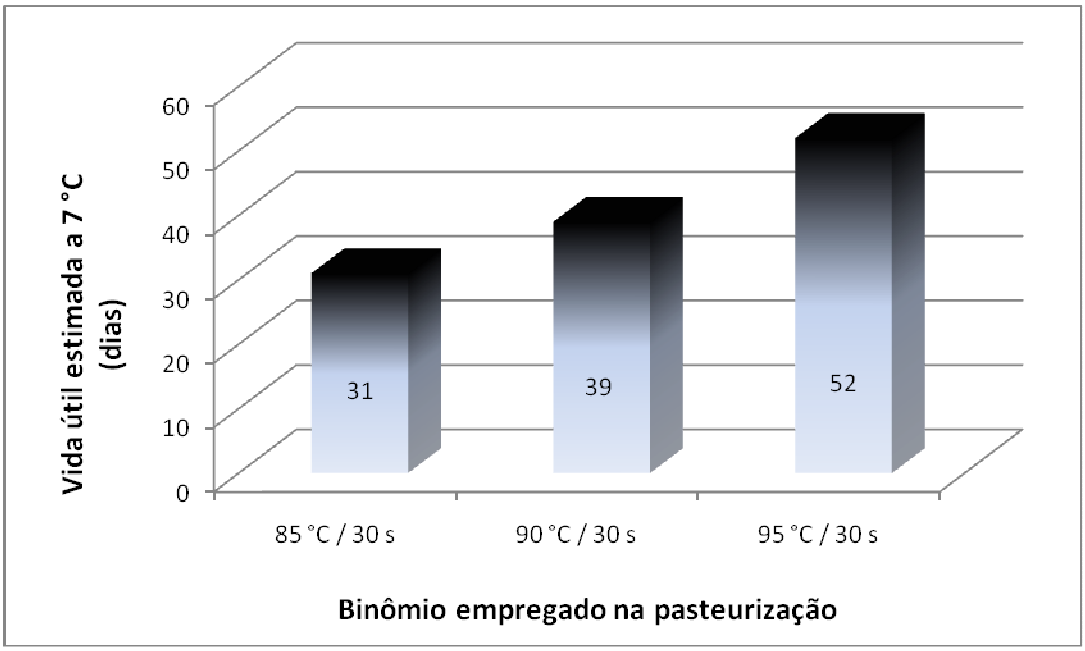


Figura 17. Vida de prateleira estimada para caldo de cana adicionado de polpa de maracujá, pasteurizado e estocado sob refrigeração na ausência de luz.

Inicialmente, destaca-se que a aceitação sensorial, notadamente o sabor, limitou a vida útil dos nove lotes processados ao longo da pesquisa.

Contrastando com lotes pasteurizados a 85 e 90 °C, com um tempo médio de vida útil estimado em 31 e 39 dias, respectivamente; a bebida processada a 95 °C atingiu maior estabilidade (52 dias). A Figura 17 demonstra que o incremento da temperatura de pasteurização exerceu um impacto positivo na vida útil da bebida, ocasionado, provavelmente, pela inativação de enzimas que deterioram a qualidade do produto, a exemplo da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD); ressaltando que a POD foi inativada somente pela temperatura de pasteurização mais severa.

Nos estudos de Oliveira, A. (2007), as bebidas elaboradas pela mistura de caldo de cana e 4% de suco de limão submetidas à radiação gama, à pasteurização combinada com a radiação gama e a pasteurização isoladamente, acondicionadas em garrafas de polietileno de alta densidade e estocadas sob refrigeração mantiveram qualidade satisfatória durante os períodos de 28, 35 e 42 dias, respectivamente. Tais resultados indicaram que o processamento térmico isolado foi o mais adequado à preservação da qualidade do produto, além de ter menor impacto no custo operacional.

5.5.2 Intenção de compra

O teste de intenção de compra foi aplicado com o intuito de avaliar a atitude dos potenciais consumidores da bebida. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 18, 19 e 20.

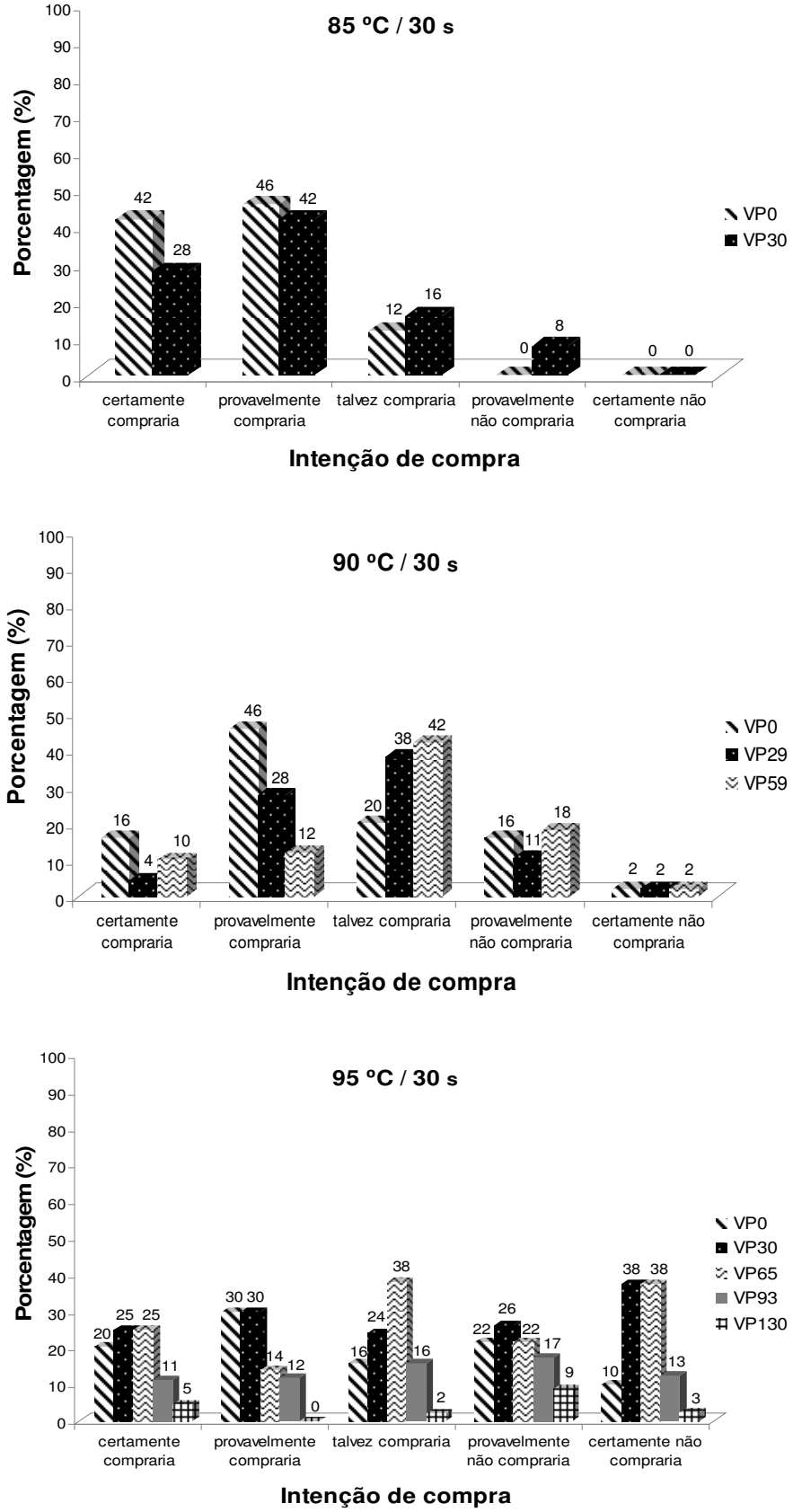


Figura 18. Intenção de compra de caldo de cana com polpa de maracujá pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 ℃ para a Replicata **R1** (VP: vida de prateleira em dias).

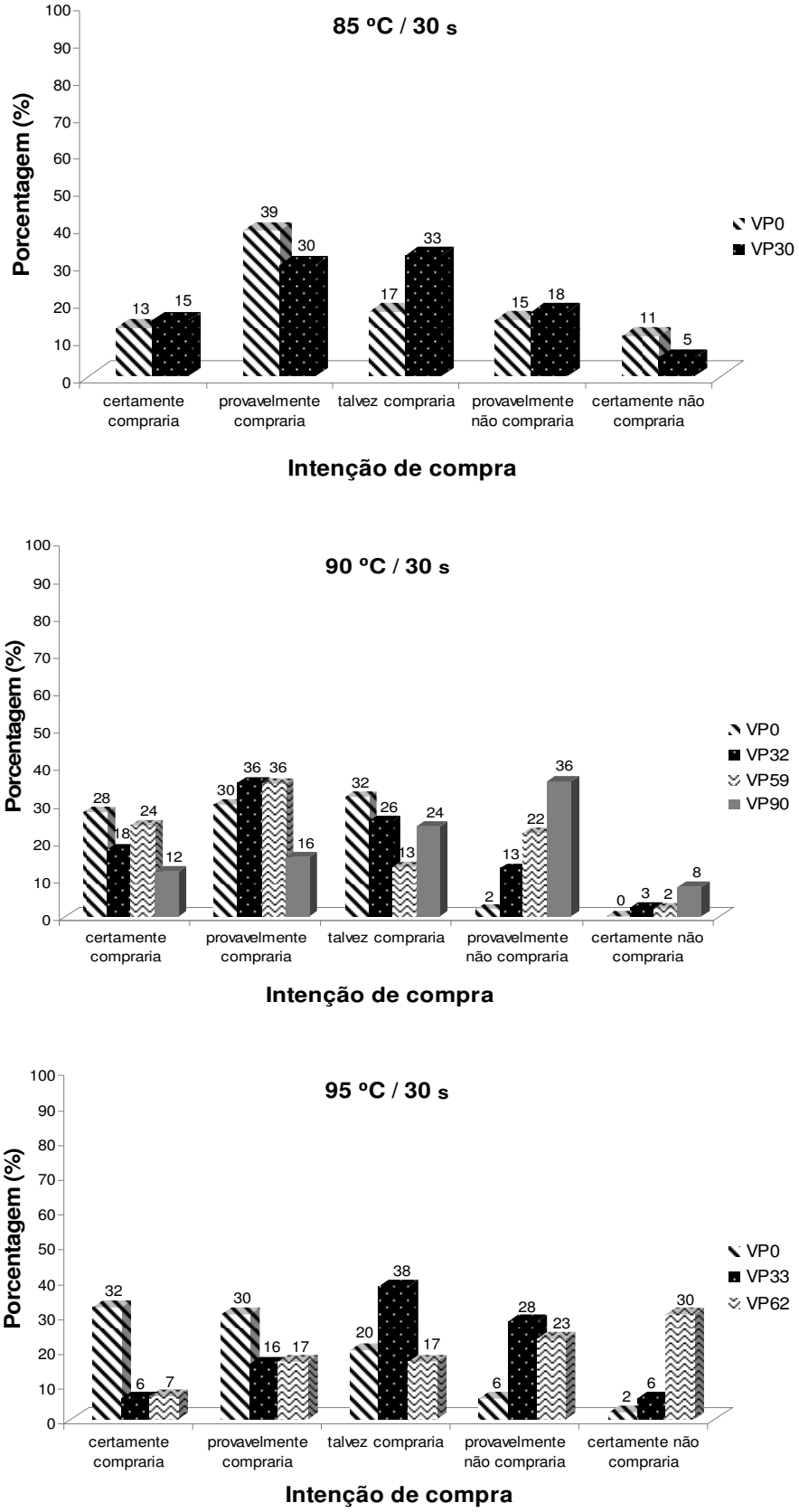


Figura 19. Intenção de compra de caldo de cana com polpa de maracujá pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 ºC para a Replicata **R2** (VP: vida de prateleira em dias).

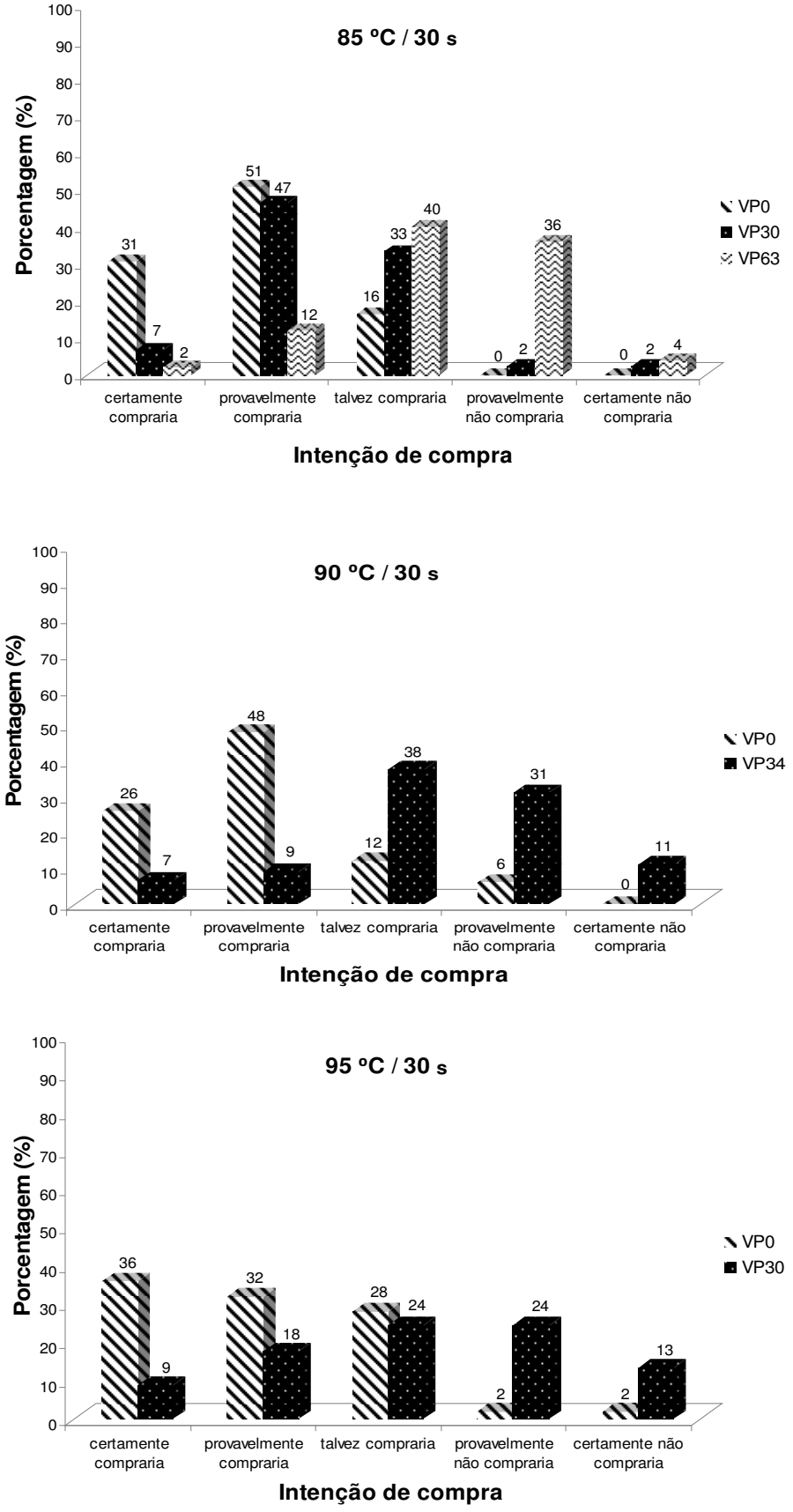


Figura 20. Intenção de compra de caldo de cana com polpa de maracujá pasteurizado e estocado a 6,5 ± 0,5 ºC para a Replicata **R3** (VP: vida de prateleira em dias).

As Figuras 18, 19 e 20 revelam o comportamento dos lotes ao longo do tempo. De modo geral, notou-se que a intenção de compra diminuiu com a evolução do tempo de estocagem. Independentemente da temperatura de pasteurização, a porcentagem de intenção de compra concentrou-se em “certamente compraria” e “provavelmente compraria”, no início do estudo de estabilidade (t_0). Neste sentido, tais resultados foram coerentes com os valores determinados nos testes de escala hedônica e diferença do controle. Estes resultados corroboram a hipótese acerca do bom potencial mercadológico do produto.

Prati, Moretti e Cardello (2005) avaliaram bebidas elaboradas com caldo de cana parcialmente clarificado-estabilizado com adição de 5% de suco de maracujá, 10% de suco de abacaxi e 7,5% de suco de limão, separadamente; constatando uma intenção positiva de compra, no início do estudo de vida de prateleira. Rezzadori (2010) também constatou uma intenção positiva de compra para caldo de cana adicionado de polpa de maracujá pasteurizado. Resultados similares foram obtidos no presente estudo.

Na primeira replicata (R1) verificou-se a influência positiva do aumento da temperatura no que tange ao aumento da vida útil da bebida e negativa em relação à intenção de compra no inicio do estudo de estabilidade (t_0). Essa tendência também foi percebida na replicata R3, em que os resultados das análises de sólidos solúveis e do *ratio* foram inferiores, comparados a R1 e R2.

Em contrapartida, R2 apresentou um padrão de comportamento oposto; ou seja, verificou-se um aumento na intenção de compra com o aumento da temperatura de pasteurização. Esta observação pode ser atribuída à variabilidade da matéria prima. Ressalta-se que alguns provadores comentaram que o intenso gosto doce depreciou a qualidade sensorial do produto, consequência dos maiores teores de sólidos solúveis determinados nos lotes processados em R2.

A falta de padronização da composição da bebida dificultou a comparação entre os lotes processados.

5.6 Análise das embalagens

5.6.1 Testes microbiológicos

A etapa de descontaminação das embalagens antes do envase é crucial para a segurança do consumidor, para a qualidade e estabilidade do produto.

A análise microbiológica das garrafas pela técnica da solução de enxágue e filtração à vácuo em membrana indicou ausência de micro-organismos em todas as amostras analisadas, demonstrando a elevada eficiência do procedimento de descontaminação empregado.

5.6.2 Avaliação sensorial para verificação de ácido peracético residual

A Tabela 24 mostra os resultados da análise sensorial do produto acondicionado nas garrafas de PET antes e após a sua descontaminação, para identificar eventual efeito de resíduos de APA nas embalagens.

Tabela 24. Teste de diferença do controle (Dunnett) para verificação da ação residual de ácido peracético (APA) nas embalagens.

Média do controle[1]	Média da amostra[2]	Diferença entre as médias	Mínima diferença significativa
1,14[a]	1,28[a]	0,14 (<0,39)	0,39

Médias com o mesmo expoente não são diferentes (P>0,05).
[1]Amostra de caldo de cana com polpa de maracujá acondicionado em garrafa sem tratamento com APA (apenas enxaguada com água destilada).
[2]Amostra de caldo de cana com polpa de maracujá acondicionado em garrafa previamente imersa em solução de APA 0,05% (v/v) / 50 °C / 30 min.
Número de provadores: 50.
(0) nenhuma diferença da amostra controle, (1) ligeiramente diferente, (2) moderadamente diferente, (3) muito diferente (4) extremamente diferente do controle.

Os resultados da Tabela 24 mostram que a utilização de APA, nas condições descritas, não interferiu na qualidade sensorial do conteúdo acondicionado, uma vez que o resíduo do agente químico nas embalagens não foi percebido pelo provador. A importância deste resultado reside na possibilidade de aplicação de APA, prescindindo de enxágue final das embalagens, ação que incorpora um relativo potencial de recontaminação do produto final.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões do presente trabalho de pesquisa são destacadas a seguir:

- Os lotes de matéria-prima processados apresentaram considerável variação em suas características físico-químicas.
- A composição físico-química da bebida processada variou significativamente ao longo do tempo de estocagem e entre os diferentes lotes produzidos, nas três replicatas realizadas.
- Os três binômios aplicados na pasteurização da bebida (85, 90 e 95 °C/30 s) foram efetivos na inativação da polifenoloxidase.
- A peroxidase foi inativada apenas pelo tratamento térmico mais severo, possibilitando a obtenção de uma bebida com menor taxa de escurecimento enzimático.
- As contagens de bactérias e fungos psicrotróficos mantiveram-se reduzidas e relativamente estáveis ao longo do período de estocagem a 6,5 ± 0,5 °C, na ausência de luz.
- A bebida acidificada apresentou elevada aceitação e intenção de compra no período de 30 dias de estocagem refrigerada.
- O decréscimo da aceitação sensorial ao longo do período de estocagem, notadamente na avaliação do sabor, limitou a vida útil da bebida.
- A falta de padronização da matéria prima gerou resultados relativamente inconsistentes. Contudo, foi possível estimar uma vida de prateleira mínima de 30 dias para a bebida.
- O tempo médio de vida útil estimado para o caldo de cana com polpa de maracujá aumentou com a temperatura de pasteurização.
- A combinação de tecnologias de processamento e envase, assim como o produto gerado por esta pesquisa mostraram-se promissores no que concerne a uma eventual industrialização e comercialização de caldo de cana acidificado com polpa de fruta.

7 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

As sugestões apresentadas para eventuais estudos futuros incluem:

- Padronização do *ratio* do caldo de cana recém-extraído.
- Combinação da pasteurização térmica com tecnologias não convencionais como ultrassom e campo magnético, visando à obtenção de um produto mais estável, com maior retenção das propriedades sensoriais e nutricionais.
- Aplicação de um selo de alumínio às embalagens visando à redução de sua taxa de permeabilidade ao oxigênio.
- Utilização de um contentor de produto processado, hermeticamente fechado, e embalagens de alta barreira visando à esterilidade comercial da bebida.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKUNTE, A.O. et al. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, Dublin, Ireland, v.122, n.3, p.500-507, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Consulta Pública nº 79, de 9 de outubro de 2003. **D.O.U de 13/10/2003**. Disponível em: http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[5666-1-0].PDF. Acessado em: 29 nov. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Ministério da Saúde. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 2 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Ministério da Saúde, 2005.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997.

AGUILÓ-AGUAYO, I. et al. Inactivation of tomato juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as affected by process conditions. **Food Chemistry**, Lleida, v.7, n.2, p.949-955, 2008.

ALEXANDER, A.G. Oxidizing enzymes of sugarcane: Peroxidase. **Journal of Agriculture University of Puerto Rico**, v.50 (l), n.3, p.6-52, 1966.

ALMEIDA, A.A.P. **Atividade antimicrobiana de extratos de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modo alimentar.** 2007, 135 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C. Embalagem para sucos de frutas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.105-122, jul./dez. 1993.

AMARO, A.P.; BONILHA, P.R.M.; MONTEIRO, M. Efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas e microbiológicas da polpa de maracujá. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v.13, n.1, p.151-162, 2002.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **ASTM E 18.06.07.:** Guide for the shelf life determination of consumer products by sensory evaluation. Philadelphia, ASTM, 1981.

ANDRADE, S.R.R.; PORTO, E.; SPOTO, M.H.F. Avaliação de qualidade do caldo extraído de toletes de cana-de-açúcar minimamente processada, armazenados sob diferentes temperaturas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.28, p.51-55, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Methods of analysis**. 16th ed. Arlington: 1997.

AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 195 p., 2004.

BACCHI, M.R.P. O bom preço da cana: A indústria canavieira do Brasil em clima otimista. **Futuros Agronegócios**, Piracicaba: Cepea, p.22-25, 2006.

BANWART, G.J. **Basic Food Microbiology**. New York: An Avi Book, p.651-710, 1989.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. Conservação de alimentos por tratamento térmico. In: **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, v.3, Cap.5, 1998.

BAYINDIRLI, A. et al. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. **Food Control**, Ankara, v.17, p.52-58, 2006.

BENASSI JÚNIOR, M. **Avaliação da influência do grau de maturação do fruto cítrico na composição química e sensorial de refrigerantes, refrescos, e energéticos à base de suco de laranja**. 2005. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade De Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2005.

BENASSI JÚNIOR, M. **Determinação das curvas de maturação das variedades cítricas (*Citrus sinensis L. Osbeck*) Pêra-rio, Natal, Valência e Hamlin**. 2001, 137f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2001.

BHUPINDER, K.; SHARMA, K.P.; HARINDER, K. Studies on the development and storage stability of ready to serve bottled sugarcane juice. **International Journal of Tropical Agriculture**, v.9, n.2, p.128-134, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento – MAA. Instrução Normativa n.º 01, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de fruta. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 11 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Org.). **Resolução – RDC n.º 12, de 2 de janeiro de 2001:** Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm#>. Acesso em: 07 maio 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Resolução de diretoria colegiada – RDC n.º 218, de 29 de julho de 2005:** D.O.U de 01/08/2005. Disponível em: <http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap_suvisa/arquivos/geradados/resol_218_julho_2005.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2011.

BRASIL. Presidente da República. Casa Civil (Org.). **Decreto n.º 6.871, de 4 de junho de 2009.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>. Acesso em: 19 dez. 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Doença de chagas aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina.** Nota Técnica. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/240305_nota.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2011.

BRUHN, C.M. Enhancing consumer acceptance of new processing technologies. **Innovative Food Science And Emerging Technologies**, USA, v.8, n.4, p.555-558, 2007.

BRYAN, F.L.; MICHANIE, S.C.; ALVAREZ, P.; PANIAGUA, A. Critical control points of street-vended foods in the Dominican Republic. **Journal of Food Protection**, v.51, n.5, p.373-383, 1988.

BRYAN, F.L.; TEUFEL, P.; RIAZ, S.; ROOHI, S.; QADAR, F.; MALIK, Z.R. Hazards and critical control points of street-vending operations in a Mountain Resort town in Pakistan. **Journal of Food Protection**, v.55, n.9, p.701-707, 1992.

BUCHELI, C.S.; ROBINSON, S.P. Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, p.257-261, 1994.

BUCHNER, N. Aseptic processing and packaging of food particulates. In: WILLHOFT, E.M.A. **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1993. Cap.1, p.1-22.

BULL, M.K. et al. The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Australia, v.5, n.2, p.135-149, 2004.

BUZRUL, S. et al. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. **International Journal Of Food Microbiology**, France, v.124, n.3, p.275-278, 2008.

CALIARI, M. et al. Efeito de ondas ultra-sônicas sobre a população de *Leuconostoc mesenteroides* em caldo de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, n.3, p.139-146, 2004.

CAMILO, A.N. **Tendências:** as novas embalagens de bebidas americanas confirmam tendências. 2010. Disponível em: <http://www.institutodeembalagens.com.br/clippings/tendencias_awp.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2011.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.637-643, jul. 2004.

CAMPOS, A.D; SILVEIRA, E.M.L. Metodologia para determinação de peroxidase e polifenoloxidase em plantas. **Comunicado técnico 87 – EMBRAPA**. Pelotas, 2003.

CANDÓN, S.; RASO, J.; PAGÁN, R. Microbial inactivation by ultrasound. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; TAPIA, M.S.; CANO, M.P. **Novel food processing technologies.** New York: Crc Press, 2005. Cap.19, p.423-442.

CHAUHAN, O.P.; SINGH, D.; TYAGI, S.M.; BALYAN, D.K. Studies on Preservation of Sugarcane Juice. **International Journal of Food Properties**, v.5, n.1, p.217-229, 2002.

CHAVES, J.B.P.; SPROESSER, R.L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas.** Universidade Federal de Viçosa. Imprensa Universitária. Viçosa, MG, 1996.

CHIRIFE, J.; FAVETTO, G.J. Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. **Food Research International**, v.25, p.89-396, 1992.

COELHO, G.L.V. Efeitos da alta pressão hidrostática em alimentos: aspectos físico-químicos. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra, v.21, n.1, p.105-110, 2002.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, janeiro/2011.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2011.

COOMBS, J.; BALDRY, C.W. Formation of color in cane juice by enzyme-catalyzed reactions. Part 1. Mechanism and chemical inhibition. **International Sugar Journal**,v.80, p.291-294, 1978.

COOMBS, J.; GOODACRE, B.C.; VANE, G.W. Process advantages and disadvantages associated with the inhibition of enzymecatalyzed color formation in sugarcane juice. **International Socciety of Sugar Cane Technologists**, v.17, p.2098-2117, 1980.

CORRÊA NETO, R.S. **Processamento de suco de laranja pasteurizado em garrafas de polietileno tereftalato (PET).** 1998, 93f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, Campinas, 1998.

DELIZA, R. et al. Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. **Journal of Food Engineering**, Rio de Janeiro, v.67,n.1-2, p.241-246, 2005.

DEMATTÊ, J.L.I. Modernizada, canicultura é líder em produção. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.60-67, 2004.

DUNCAN, C.L.; COLMER, A.R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Applied Microbiology**, v.12, n.2, p.173-177, 1964.

DUTCOSKI, S.D. **Análise Sensorial de Alimentos**. Editora Universitária: Champagnat, Curitiba, PR. 123 p., 1996.

ELEZ-MARTÍNEZ, P.; SUÁREZ-RECIO, M.; MARTÍN-BELLOSO, O. Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. **Journal of Food Engineering**, Lleida, v.78, n.1, p.184-193, 2007.

EGGLESTON, G. Deterioration of cane juice – sources and indicators. **Food Chemistry**, v.78, n.1, p.95-103, 2002.

ESTADOS UNIDOS. Food And Drug Administration. U.S Department of Health & Human Services (Org.). **Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies - Ohmic and Inductive Heating.** Food. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm101246.htm>. Acesso em: 23 jan. 2012.

FATIBELLO-FLHO, O; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecido e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, n.3, p.455-464, 2002.

FAVA A.R. Atletas ingerem garapa para repor energia. **Jornal da Unicamp**, v.18, n.250, p.8, 2004.

FERNÁNDEZ, J.L.; CRUZ O.R.; GONZALEZ L.C. Acción de las radiaciones ultrasónicas sobre el *Leuconostoc mesenteroides* presente en el jugo de caña. **Cuba Azúcar**, v.4, p.29-34, 1982.

FERREIRA, V.L.P. et al. **Análise Sensorial Testes Discriminativos e Afetivos**. 1.ed. Campinas: SBCTA, 2000. 127p. (Manual – Série Qualidade).

FONSECA, H. Princípios e métodos gerais de conservação de alimentos: conservação pelo calor e pelo frio. In: CAMARGO, R. (Coord.) **Tecnologia dos produtos agropecuários: alimentos.** São Paulo: Nobel, 1984. Cap. 5, p.73-95.

FRANCIS, F.J. Colorimetria e aplicações em alimentos. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 33p., 1988.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GALLO C.R.; CANHOS V.P. **Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – Revisão. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.9, n.4/5, p.35-40, 1991.

GARRUTI, D.S. **Contribuição ao estudo de estabilização física do suco de maracujá integral (*Passiflora edulis f. flavicarpa*).** 1989. 198f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, Campinas, 1989.

GAVA, A.J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel, 1984.

GERALDINI, A.M.; DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; OLIVEIRA, C.M.M.; UBOLDI-EIROA, M.N. Caracterização de bactérias lácticas em alimentos. I. Avaliação de meios sólidos para contagens de culturas puras. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.16, n.1, p.53-64, 1979.

GOMES, M.R.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; CARNEIRO,G.E.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Propriedades físico-quómicas de polifenoloxidade de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p.69-72, jan.-abr. 2001.

GRAUMLICH, T.R.; MARCY, J.E.; ADAMS, J.P. Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, n.3, p.402-405, 1986.

HOLDSWORTH, S.D. Aseptic processing and packaging of food products**. Elsevier Science Publisher Ltda**. Cap.9, p.335-375, 1992.

IADEROZA, M.; DRAETTA, I.S. Ênzimas e Pigmentos – influências e alterações durante o processamento. In: SOLER, M.P. et al. **Industrialização de frutas**. 2.ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1991. Cap. 2, p.17-31. (Manual Técnico, 8).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estudo nacional da despesa familiar: Tabela de composição de alimentos.** 5.ed. Rio de Janeiro: Varela, 1999. 137p.

JIN, Z.T. et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high voltage pulsed electric fields. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. et al. **Pulsed electric fields in food:** fundamental aspects and applications. Lancaster, Pennsylvania, USA: Technomic Publishing Company, 2001. Cap.11, p.167-182.

KITOKO, P.M.; OLIVEIRA, A.C.; SILVA, M.L.; LOURENÇÃO, M.; AGUIAR, E.F. Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado em Vitória. **Higiene Alimentar**, Espírito Santo, Brasil, v.18, n.119, p.73-77, 2004.

KLAUS, J.S. Soluções para o projeto de salas limpas na indústria de alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC)**, São José dos Campos, n.8 p.14-16, 2002.

KOBLISH, M.G.B.; MORETTI, R.H. Polysaccharide removal from refined sugar syrup. **Internacional Sugar Journal**, v.101, n.1206, p.323-325, 1999.

LEHMKUHL, A.L. **Biorredução da 4-aminoacetofenona catalisada por células de *Saccharomyces cerevisiae* sp. em sistemas bifásicos**. 2006. 79f. Dissertação (Mestre Acadêmico em Química) – Universidade Regional de Blumenau, SC, 2006.

LEITÃO, M.F.F. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Microbiologia de sucos, polpas e produtos ácidos. In: SOLER, M.P. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**. Industrialização de frutas: Manual técnico n° 8. Campinas: Cial/ital, 1991. Cap.3, p.32-52.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de sucos e produtos ácidos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.33, p.9-42, 1973.

LOURENÇO, A.E.P.; UCHOA, C.M.A.; BASTOS, O.M.P. Enteroparasitoses em manipuladores de alimentos de hospitais da cidade de Niterói. **Higiene Alimentar**, Rio de Janeiro, Brasil, v.16, n.97, p.16-21, 2002.

LUBATTI, M.R.S. Vendedor ambulante, profissão folclórica: pesquisa nas ruas, parques e jardins de São Paulo. **Jangada Brasil**, v.7, p.1-2, 1999.

MAO, L.C.; XU, Y.Q.; QUE, F. Maintaining the quality of sugarcane juice with blanching and ascorbic acid. **Food Chemistry**, China, v.104, n.2, p.740-745, 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana-de-açúcar: culturas**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/culturas/cana-de-acucar/saiba-mais>. Acesso em: 28 jan. 2011.

MATSUURA, F.C.A.U.; FOLEGATTI, M.I.S.; CARDOSO, R.L.; FERREIRA, D.C. Sensory acceptance of mixed nectar papaya, passion fruit and acerola. **Scientia Agricola**, v.61, n.6, p.604-608, 2004.

MEDINA, J.C.; GARCIA, J.L.M.; LARA, J.C.; TOCCHINI, R.P.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V.A.; CANTO, W.L. **Maracujá – da cultura ao processamento e**

comercialização. Campinas: ITAL/Governo do Estado de São Paulo, 1980. 207p. (Manual Técnico – Série Frutas Tropicais, n.9)

MELO, M.A.F.; SANTOS, G.R.; MARQUES, K; SANTOS, H.R; RANTHUM. M. Avaliação microbiológica de caldos de cana comercializados na cidade de Ponta Grossa, PR. In: **V Semana de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná** - UTFPR, v.02, n.1, 2007.

MONTEIRO, M.; AMARO, A.P.; BONILHA, P.R.M. Physicochemical and microbiological evaluation of a processed- passion fruit pulp stored under refrigeration. **Alim. Nutr**., Araraquara, v.16, n.1, p.71-76, jan./mar. 2005.

MOSUPYE, F.M.; VON HOLY, A. Microbiological hazard identification and exposure assessment of street food vending in Johannesburg, South Africa. **International Journal of Food Microbiology**, South Africa, v.61, n.2-3, p.137-145, 2000.

MUÑOZ, A.M.; CIVILLE, G.L.; CARR, B.T. **Sensory evaluation in quality control**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.

OLIVEIRA, A.C.G. **Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas, armazenado sob refrigeração**. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – ESALQ/USP, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, A.C.G.; SEIXAS, A.S.S.; SOUSA, C.P.; SOUZA, C.W.O. Microbiological evaluation of sugarcane juice sold at street stands and juice handling conditions in São Carlos. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, Brazil, v.22, n.5, p.1111-1114, 2006.

OLIVEIRA, A.C.G.; SPOTO, M.H.F.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; SOUSA, C.P., GALLO, C.R. Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.863-873, 2007.

OLIVEIRA, I.R.W.Z. **Desenvolimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos**. 2007. 148f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2007.

ORZARI, S. V. **Usina São João: 60 Doces anos**. Araras: Jc Editora, 2010. 143p.

PALOMEQUE, L.A. et al. Nonthermal inactivation of endoproteases by pulsed electric field technology. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. et al. **Pulsed electric fields in food:** fundamental aspects and applications. Lancaster, Pennsylvania, USA: Technomic Publishing Company, 2001. Cap. 9, p.135-148.

PIO, R.; RAMOS, J.D.; MENDONÇA, V.; GONTIJO, T.C.A.; RUFINI, J.C.M.; JUNQUEIRA, K.P. Caracterização físico-química dos frutos de sete seleções de maracujazeiro-amarelo para a região de Lavras, MG. **Revista Ceres**, Viçosa, v.50, n.291, p.573-582, 2003.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage.** Gaithersburg: Aspen Publication, 1999. Cap.10, p. 439-468: yeasts.

POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. **Food Science**. New York: Chapman e Hall. 5th ed. p.139-199, 1995.

PRATI, P. **Desenvolvimento de processo para estabilização de caldo de cana adicionado de sucos de frutas ácidos**. 2004. 169f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

PRATI, P.; MORETTI, R.H.; CARDELLO, H.M.A.B. Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.147-152, 2005.

QUDSIEH, H.Y.M.; YUSOF, S.; OSMAN, A.; RAHMAN, R.A. Effect of maturity on chorophyll, tannin, color and polyphenol oxidase (PPO) activity of sugarcane juice (*Saccharum officinarum* Var. Yellow Cane). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p.1615-1618, 2002.

RASO, J.; PAGÁN, R.; CANDÓN, A.. Nonthermal technologies in combination with other preservation factors. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; TAPIA, M.S.; CANO, M.P. **Novel food processing technologies**. New York: Crc Press, 2005. Cap. 21, p.453-475.

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Industrial e do Comércio Exterior. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Paulo Xaviel Pereira; Nercio José Uptmoor. **Processo de extração e conservação de caldo de cana sem adiçào de conservantes e aditivos químicos**. BR n. PI0700791-4, 6 mar. 2007, 21 out. 2008. Disponível em: <http://www.patentesonline.com.br/processo-de-extracao-e-conservacao-de-caldo-de-cana-sem-adicao-de-conservantes-e-184475.html>. Acesso em: 10 nov. 2011.

REZZADORI, K. **Pasteurização térmica e com membranas de caldo de cana adicionado de suco de maracujá**. 2010. 161f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – UFSC, Florianópolis, 2010.

RIENER, J. et al. Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. **Food Chemistry**, Dublin, v.109, n. 2, p.402-407, 2008.

RIFFER, R. The nature of colorants in sugarcane and cane sugar manufacture: Chemistry and processing of sugar beet and sugarcane. In: CLARKE, M.A.; GODSHALL, M.A., **Elsevier Science Publishers**, New York, 1988. Cap.13, p.186-207,

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros & Marques Ed. Eletrônica, 2004.

RIVAS, A. et al. Effect of PEF and heat pasteurization on the physical–chemical characteristics of blended orange and carrot juice. **LWT**, Valencia, v.39, n. 10, p.1163-1170, 2006.

ROCHA, M.C.; SILVA, A.L.B.; ALMEIDA, A.; COLLAD, F.H. Efeito do uso de biofertilizante agrobio sobre as características físico-químicas na pós-colheita do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no município de Taubaté. **Revista Biociências**, Taubaté, v.7, n.2, p.7-13, 2001.

RODRIGUEZ, O.; LODOS, J.; MENESES, X. Desinfeccion de jugos azucarados con ultrasonido. **Atac**, v.3, p.29-34, 1984.

RODRIGUES, K.L.; GOMES, J.P.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas, RS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p.447-452, 2003.

ROMANO, C.M. **Características físico-químicas e de cocção do feijão (*Phaseolus vulgaris, L.*), CV. Guapo brilhante decorrentes de secagem estacionária e de tempo de armazenamento convencional**. 2006, 95 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, RS, 2006.

ROSSETTO, R. Embrapa. **Melhoramento genético.** Agência de Informação Embrapa: cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_70_711200516719.html>. Acesso em: 05 dez. 2011.

ROSSI, A.D. Situação atual da produção de maracujá no Estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO SOBRE MANEJO NO CONTROLE DO VÍRUS DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS (PWV) DO MARACUJAZEIRO, 2005, Bauru. **Palestras...** Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2005. p.9-20.

SASTRY, S.K.. Advances in ohmic heating and moderate electric field (MEF) processing. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; TAPIA, M.S.; CANO, M.P. **Novel food processing technologies**. New York: Crc Press, 2005. Cap. 23, p.491-499.

SENAI/SEBRAE. **Elementos de apoio para o sistema APPCC**. Brasília, 1999. 371p.

SHAW, P.E.; MOSHONAS, M.G. Ascorbic acid retention in orange juice stored under simulated consumer home conditions. **Journal of Food Science**, v.56, n.3, p.867-868, 1991.

SHIMIZU, M.M. **Polifenoloxidase como fator de resistência da soja a nematóides e na oxidação do palmito**. 2004. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SILVA JÚNIOR, E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1995.

SILVA, N.; CANHOS, V.P. Caracterização da microbiota bacteriana contaminante do caldo de cana durante a etapa de resfriamento em torre no processo de produção de álcool. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p.60-72, 1990.

SILVA, F.C.; CESAR, M.A.A.; SILVA, C.A.B. **Pequenas indústrias rurais de cana-de-açúcar**: melado, rapadura e açúcar mascavo. Brasília: Embrapa, 2003. 155p.

SILVA, K.S.; FARIA, J.A.F. Avaliação da qualidade de caldo de cana envasado a quente e por sistema asséptico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.754-758, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 3.ed. 2007, 536p.

SILVA, R.A.; PETTER, C.O.; SCHNEIDER, I.A.H. Avaliação da perda da coloração artificial de ágatas. **Rem: Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v.60, n.3, p.477-482, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/img/revistas/rem/v60n3/>. Acessado em: 5 jan. 2010.

SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. 2.ed. São Paulo: Nobel, 1985.

SIVASUBRAMANIAN, C.G.; PAI, J.S. Effect of heat treatments on the quality of sugarcane juice. **Indian Food Packer**, v.48, n.2, p.51-54, 1994.

SOCCOL, C.R.; SCHWAB, A.; KATSOKA, C.E. Avaliação microbiológica do caldo de cana (garapa) na cidade de Curitiba. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.8, n.2, p.116-125, 1990.

SOUZA, A.C.G. de; SANDI, D. Industrialização. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 472p., 2001.

STONE, H.; SIDELL, J.L. **Sensory evaluation practices**. London: Academic Press, 1985. p. 202-226.

SUZART, C.A.G. **Desenvolvimento de tecnologia para estabilização física, sensorial e microbiológica de caldo de cana.** 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. (UNICAMP), Campinas, 2009.

TAPIA, M.S.; ARISPE, I.; MARTÍNEZ, A.. Safety and quality in the food industry. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; TAPIA, M.S.; CANO, M.P. **Novel food processing technologies.** New York: Crc Press, 2005. Cap. 33, p.669-679.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M.; BARBETTA, P.A. **Análise sensorial de alimentos.** Florianópolis: UFSC, 1987.

TEREFE, N.S. et al. The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. **Food Chemistry**, Australia, v.117, n.1, p.20-27, 2009.

THÉ, P.M.P.; CARVALHO, V.D.; ABREU, C.M.P.; NUNES, R.P.; PINTO, N.A V.D. Efeito da temperatura de armazenamento e do estádio de maturação sobre a composição química do abacaxi cv. Smooth *cayenne* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.2, p.356-363, 2001.

TIWARI, B.K. et al. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Dublin, Ireland, v.10, n.2, p.166-171, 2009.

UBOLDI-EIROA, M.N. Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3/4, p.141-160, 1989.

UKUKU, D.O. et al. A combined treatment of UV-light and radio frequency electric field for the inactivation of *Escherichia coli* K-12 in apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, Pennsylvania, v.138, n.1-2, p.50-55, 2010.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.15, p.49-127, 1981.

VAN DER HORST, H.C.; HANEMAAIJER, J.H. Cross-flow microfiltration in the food industry. State of the art. **Desalination**, v.77, p. 235-258, 1990.

VANZO, S.P.; AZEVEDO, R.V.P. Detecção de *S. aureus* em manipuladores de alimentos: perfil de resistência a antibióticos e quimioterápicos. **Higiene Alimentar**, v.17, n.101/105, p.114-123, 2003.

VERA, E.; RUALES, J.; DORNIER, M.; SANDEAUX, J.; PERSIN, F., PORCELLY, G.; VAILLANTE, F.; REYNES, M. Comparison of different methods for deacidification of clarified passion fruit juice. **Journal of Food Engineering**, v.59, n.4, p.361-367, 2003.

VIAN, C.E.F.; MARIN, F.R. **Logística e transporte**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_133_22122006154842.html>. Acesso em: 28 jan. 2011.

WALKLING-RIBEIRO, M. et al. Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. **Journal of Food Engineering**, Dublin, v.89, n.3, p.267-273, 2008.

WANG, W.; SASTRY, S.K. Effects of moderate electrothermal treatments on juice yield from cellular tissue. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, USA, v.3, n.4, p.371-377, 2002.

WELTI-CHANES, J. et al. Fundamentals and applications of high pressure processing to foods. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; TAPIA, M.S.; CANO, M.P. **Novel food processing technologies.** New York: Crc Press, 2005. p.157-181.

WHITAKER, J.R. Polyphenol oxidase. In: FENNEMA, O.R. (Ed.) **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker Inc, 1994. p.543-556.

WILLARD, T. Tecnologia de processamento para proteção alimentar. In: **Perspectivas Econômicas** - Revista Eletrônica do Departamento de Estado dos EUA, v.7, n.2, 2002.

WIRNANO, F.G.; ALLAIN, A. Street foods in developing countries: lessons from Asia. **Food Nutrition and Agriculture**, v.1, n.1, p.11-18, 1991.

YASMEEN, G. Workers in the urban “informal” food sector: innovative organizing strategies. **Food Nutrition and Agriculture**, v.29, p.32-41, 2001.

YON, R.M.; JAAFAR, M.Y. Effect of low temperatures on storage life and quality of carambola (*Averrhoa carambola L.*) cv. B 17. **Aciar Proceedings**, v.50, n.1, p.396-401, 1994.

YUSOF, S. et al. Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. **Food Chemistry**, v.68, n.4, p.395-401, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Imagens do processamento.

Cana de açúcar raspada e higienizada

Moagem

Envase asséptico da bebida

Dosagem gravimétrica semi-automática

APÊNDICE B – Imagens panorâmicas da planta piloto.

ANEXO

ANEXO A – Protocolo de análise de *Salmonella*.

1-2 Test®

AOAC® Official Method 989.13

BIOCONTROL

Results. Right now.

DESCRIÇÃO GERAL

O 1-2 Test® é um método rápido qualitativo para detecção de espécies móveis de *Salmonella* em alimentos, ingredientes e amostras ambientais. Se baseia na imobilização da *Salmonela* no meio de motilidade através de anticorpos polivalentes H (flagelar). A imobilização das espécies móveis de *Salmonella* resulta na formação de uma banda visível bem definida (ImmunoBand™).

PROCEDIMENTO DE USO

A. Preparação da amostra e enriquecimento

Pré-enriquecimento
Prepare as amostras de acordo com os procedimentos descritos nos Manuais de Análises Microbiológicas (BAM) ou nos Métodos Oficiais de Análise AOAC. Incubar a 35 - 37 °C por 24 ± 2 horas.

Para todas as amostras, com exceção de carne crua e Amostras com Contagem Total de Bactérias igual ou maior que 10^4, prossiga na etapa B. Procedimento de teste.

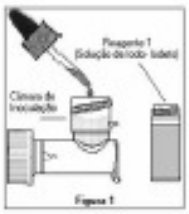
Para carne crua e Amostras com Contagem Total de Bactérias igual ou maior que 10^4.

Enriquecimento Seletivo
Transfira 1 ml da amostra pré-enriquecida da etapa anterior para 9 ml de caldo tetrationato – verde brilhante ativado com Iodo (TGB). Agite delicadamente para misturar. Incube a 42 ± 0,5 °C durante 6-8 horas em banho Maria.

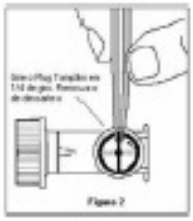
B. Procedimento de teste

Cada etapa da preparação pode ser executada para um único teste ou simultaneamente para várias unidades de teste. A identificação da amostra pode ser feita: 1) na metade inferior da câmara de motilidade, para não interferir na leitura dos resultados, ou 2) sobre a tampa branca.

(a) Adição da Solução de Iodo-Iodeto
Para todas as amostras com exceção de carne crua e Amostras com Contagem Total de Bactérias igual ou maior que 10^4
Posicione o 1-2 Test com a tampa preta para cima e remova a tampa. Adicione 1 gota do Reagente 1 (solução de Iodo-Iodeto) na câmara de inoculação. Recoloque a tampa e agite gentilmente para misturar.
NOTA: Esta etapa não é executada para carnes cruas e Amostras com Contagem Total de Bactérias igual ou maior que 10^4 porque a incubação do caldo tetrationato é conduzida à parte em tubo de ensaio.



(b) Remoção do plug tampão da câmara de inoculação
Recoloque a unidade do 1-2 Test com a tampa preta para cima e remova a tampa. Remova o plug tampão da câmara de inoculação com uma pinça estéril e descarte-o. Se o plug tampão da câmara não for removido, as bactérias não serão capazes de se mover da câmara de inoculação para a câmara de motilidade.



(c) Inoculação
Antes da inoculação, assegure-se de que o caldo de pré-enriquecimento contendo a amostra esteja bem homogeneizado.
Para todas as amostras com exceção de carne crua e Amostras com Contagem Total de Bactérias menor que 10^4
Transferir 0,1 ml da amostra enriquecida para a câmara de inoculação.
Para carne crua e Amostras com Contagem Total de Bactérias igual ou maior que 10^4 Transferir 1,5 ml do caldo tetrationato incubado a 42 °C para a câmara de inoculação previamente esvaziada.

Figura 3

(d) Cortar a ponta da tampa branca do gel
Posicione a unidade do 1-2 Test com a tampa branca para cima e remova a tampa. Corte a ponta da tampa com uma tesoura ou alicate esterilizado e descarte-a. O corte deve ser feito na base da forma da tampa.

Figura 4

(e) Adição da solução de Anticorpos
Adicione 1 gota do Reagente 2 (anticorpo) na câmara de motilidade no orifício do gel formado pela tampa cortada. Recoloque a tampa branca. Uma gota do Reagente 2 deve preencher dois terços da cavidade vazia no gel. Isto pode ser observado através da cor azul da solução de anticorpos. Não adicione mais de uma gota do reagente 2.

Figura 5

(f) Incubação
Incube as unidades do 1-2 Test na estufa com a tampa branca para cima a 35 °C por 14-30 horas. As unidades podem ser incubadas individualmente ou mantidas na bandeja plástica que acompanha o kit, usando-a como suporte.

BioControl América Latina – Campinas, fone 19 3213-5919 ou 19 3213-4462, fax 19 3213-4501, e-mail: biocontrolaws@uol.com.br
Distribuidor autorizado
Sovereign Brasil – São Paulo, fone 11 3838-2499, fax 11 3838-2498, e-mail: vendas@sovnet.com.br

Rev. Abril/08

1-2 Test®

BIOCONTROL

C. Leitura e Interpretação dos resultados

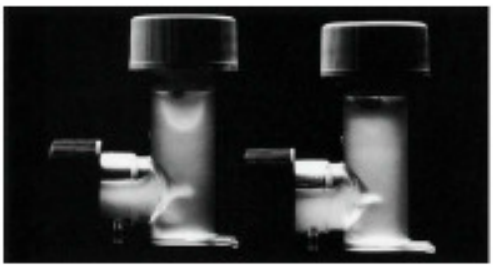
Com a tampa branca voltada para cima, mantenha a unidade de teste próxima a uma fonte de luz. Cuidadosamente observe o gel da câmara de motilidade em todos os lados girando a unidade do 1-2 Test de trás para frente, numa rotação de 360°, em frente da luz.

(a) Resultados Positivos

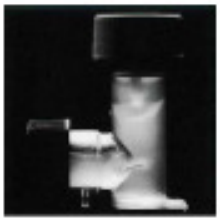
O resultado positivo presuntivo do teste é indicado pela presença de uma imunobanda na metade superior do gel na câmara de motilidade. Trata-se de uma banda esbranquiçada que se apresenta em forma de U ou menisco. A banda pode ser totalmente formada ou mais visível em um dos lados da câmara de motilidade do gel. Confirme os resultados positivos ou armazene as unidades sob refrigeração (2 – 8 °C).

(b) Resultados Negativos

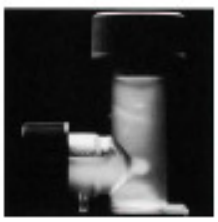
Se nenhuma banda é observada após a incubação do 1-2 test por pelo menos 14 horas, o resultado do teste é negativo. As unidades negativas podem apresentar turbidez uniforme por toda a câmara de motilidade como resultado do movimento de outras bactérias no gel.



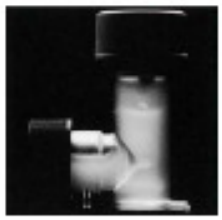
Positivo **Negativo**



Exemplo de Imunobanda Assimétrica à direita



Exemplo de Imunobanda Assimétrica à esquerda



Exemplo de Imunobanda Em forma de menisco

Exemplo de Imunobanda Assimétrica

D. Confirmação

Confirme todos os resultados presuntivos positivos das amostras como descrito nos procedimentos de referencia da AOAC Internacional. Isole a *Salmonella* a partir do caldo tetrationato contido na câmara de inoculação.

E. Controles Positivos e Negativos

Podem ser efetuados controles junto com as amostras de teste. Utilize uma unidade de 1-2 Test para cada controle positivo e negativo.

Controle Positivo: Inocule uma cepa de espécie conhecida de *Salmonella* móvel isolada, em 10 ml de caldo nutriente e incube overnight a 35 °C. Após completar a incubação, inocule 0,1 ml do caldo de cultura na câmara de inoculação da unidade do 1-2 Test. Siga o PROCEDIMENTO DE TESTE como descrito anteriormente.

Controle Negativo: Inocule uma espécie conhecida de bactéria entérica móvel isolada (por ex. *Klebsiella* spp.) em 10 ml de caldo nutriente e incube overnight a 35 °C. Após completar a incubação, inocule 0,1 ml do caldo de cultura na câmara de inoculação da unidade do 1-2 Test. Siga o PROCEDIMENTO DE TESTE como descrito anteriormente.

F. Condições de armazenamento

Mantenha o kit refrigerado a 2 - 8 °C. NÃO CONGELE AS UNIDADES DE TESTE.

G. Descarte

As unidades do 1-2 Test não são reutilizáveis. Unidades inoculadas podem conter microrganismos patogênicos e devem ser manipuladas com as técnicas de assepsia adequadas. Todas as tampas devem ser firmemente fechadas, de forma segura. Após a utilização, todas as unidades de teste devem ser esterilizadas a 121 °C por no mínimo 30 minutos.

H. Embalagem

Bandeja com 12 unidades	cód. 10107-12
Caixa com 72 unidades	cód. 10107-72

BioControl América Latina – Campinas, fone 19 3213-5919 ou 19 3213-4462, fax 19 3213-4501, e-mail: biocontrolaveu@uol.com.br
Distribuidor autorizado
Sovereign Brasil – São Paulo, fone 11 3838-2499, fax 11 3838-2498, e-mail: vendas@sovnet.com.br

Rev. Abril/06