UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da eficiência do processamento de água de coco por micro-ondas

Raquel Oliveira Medrado Pinto

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Mariza Landgraf

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da eficiência do processamento de água de coco por micro-ondas

Raquel Oliveira Medrado Pinto

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Mariza Landgraf

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Pinto, Raquel Oliveira Medrado
P659a Avaliação da eficiência do processamento de água de coco
por micro-ondas / Raquel Oliveira Medrado Pinto. -- São
Paulo, 2017.
57p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Landgraf, Mariza

1. Microbiologia de alimentos 2. Tecnologia de micro-ondas
I. T. II. Landgraf, Mariza, orientador.

664.07 CDD

Raquel Oliveira Medrado Pinto

Avaliação da eficiência do processamento de água de coco por micro-ondas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof^ª. Dr^ª. Mariza Landgraf
orientadora/presidente

Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

Prof. Dr. Jorge Andrey Wilhelms Gut

Prof. Dr. Luiz Alberto Jermolovicius

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

AGRADECIMENTOS

À professora Mariza Landgraf, por acreditar e confiar no meu trabalho, pela orientação e a oportunidade de vivenciar ótimas experiências, que ampliaram meus horizontes.

Ao professor Luiz Alberto Jermolovicius, pela fundamental colaboração no desenvolvimento desse trabalho de pesquisa. Agradeço especialmente todo tempo dedicado a me ensinar sobre o trabalho com micro-ondas, algo que até então me era desconhecido.

Ao professor Jorge Gut, pelas sugestões e direcionamento no decorrer de todo o trabalho.

À professora Cynthia, pela colaboração na análise estatística, pelas sugestões e apoio durante todo o trabalho.

Ao professor Leo, pela cooperação para viabilizar a realização do trabalho no Instituto Mauá de Tecnologia (IMT).

Aos professores Uelinton Pinto, Luiz Alberto Jermolovicius e Jorge Gut, agradeço as sugestões que sustentaram o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa.

À Faculdade de Ciências farmacêuticas da USP e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela oportunidade de realizar esse mestrado.

À secretaria de departamento de alimentos e da Pós-graduação, pelo apoio e serviços prestados.

Ao IMT, por permitir a realização dessa pesquisa em seus laboratórios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio à pesquisa com concessão de bolsa de estudo.

À Renata, técnica do laboratório de micro-ondas do IMT, pelo apoio, sugestões e ajuda com os ensaios.

À Dimitri, Andreza, Gustavo, Dimas, Lilian, Renato e Carlos, pela ajuda no trabalho com o micro-ondas.

À Ana Paula, técnica do laboratório de Microbiologia do IMT, pela ajuda nas análises.

À todos os colaboradores do IMT que direta ou indiretamente colaboraram nesse trabalho.

À Katia e Lúcia, pelo todo apoio e amizade nesse período.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia de alimentos da FCF/USP, pela amizade e cooperação.

À Crystina, pela amizade, incentivo e conselhos nos momentos de incerteza e dúvida.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e que possibilitaram minha permanência em

São Paulo para realizar esse trabalho. Agradeço todos os dias por acreditarem em mim.

Às minhas irmãs, irmãos e demais familiares, agradeço o carinho e apoio em todos os momentos.

Ao Kleber, grande companheiro, agradeço por ouvir meus medos e anseios, e, por acreditar, incentivar e apoiar minhas escolhas.

Enfim, agradeço todos que de alguma maneira acompanharam minha trajetória até esse momento. Muito obrigada!

RESUMO

PINTO, R. O. M. **Avaliação da eficiência do processamento de água de coco por micro-ondas.** 2017. 57f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A água de coco, como comercializada atualmente, é esterilizada e adicionada de conservante químico ou antioxidante, o que ocasiona a redução de suas qualidades sensorial e nutricional. Para evitar esses efeitos indesejados tem se estudado o aquecimento da água de coco através da radiação por micro-ondas, o que possibilitaria uma bebida de melhor qualidade sensorial e sem adição de conservante ou com menor quantidade dessa substância. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a viabilidade da pasteurização da água de coco por micro-ondas, utilizando esporos de *B. coagulans* como indicador biológico do processo. Esporos de *B. coagulans* CCGB (LFB-FIOCRUZ) 1433 foram inoculados em amostras de água de coco, obtida diretamente de frutos verdes (*Cocos nucifera* L.) e previamente acidificada (ácido ascórbico e cítrico), seguida de pasteurização em micro-ondas com frequência de 2450 MHz. Os ensaios, provenientes de um Delineamento Central Composto Rotacional, com 4 variáveis (temperatura, quantidade e composição dos ácidos e potência do aparelho de micro-ondas) foram realizados aleatoriamente, com tempo de processo de até 20 minutos. Os testes foram conduzidos com 3 repetições do ponto central. Também foi realizado o processo em manta de aquecimento a fim de comparar os dois métodos. Os resultados da inativação foram expressos em log número de esporos/mL de água de coco. A temperatura é o fator preponderante para o processo de pasteurização da água de coco através da análise dos resultados obtidos pela DCCR. Também foi possível observar que, nas seguintes condições: a) potência de 120 W; b) 76 mg de ácidos adicionados à bebida e c) composição dos ácidos de 22% ascórbico e 78% cítrico, houve uma separação dos resultados em dois grupos. Um grupo à temperatura de 86 °C, em que, a redução da população de esporos foi menor (entre 0,5 log e 3,7 log número de esporos/mL de água de coco), e outro à temperatura de 92 °C, que apresentou maiores reduções logarítmicas do micro-organismo (entre 3,4 log e 7,0 log número de esporos/mL de água de coco). Realizado o teste ANOVA, ficou comprovado que o aumento predito foi significativo. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre o aquecimento por micro-ondas e o convencional. Porém, essa diferença não foi considerada uma vez que microbiologicamente pode ser desprezada. Quanto ao tempo de processo, são necessários, em média, 10 a 15 minutos de retenção na temperatura desejada para atingir o maior nível de inativação de esporos nas condições do ponto central (89 °C, 125 W, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco e a composição desses ácidos de 75% cítrico e 25% ascórbico). A pasteurização da água de coco por micro-ondas mostrou-se viável, mas outros estudos são necessários para otimizar o processamento.

Palavras-chaves: *micro-ondas, inativação de esporos de B. coagulans, água de coco.*

ABSTRACT

PINTO, R. O. M. **Evaluation of the efficiency of microwave processing of coconut water.** 2017. 57f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Coconut water, as currently marketed, is sterilized and added with chemical preservative or antioxidant, which reduces its sensory and nutritional qualities. In order to avoid these undesired effects, the heating of coconut water through microwaves radiation has been studied, which would allow a drink of better sensorial quality and without addition of preservatives or with reduced amount of these substances. The objective of this study was to evaluate the viability of the pasteurization of coconut water by microwave, using spores of *B. coagulans* as biological indicator of the process. Spores of *B. coagulans* CCGB (LFB-FIOCRUZ) 1433 were inoculated in samples of coconut water, obtained directly from green fruits (*Cocos nucifera* L.) and previously acidified (ascorbic and citric acid), followed by pasteurisation using microwaves with frequency of 2450 MHz. The tests, from a Rotational Composite Central Design, with 4 variables (temperature, quantity and composition of the acids and power of the microwave apparatus) were carried out randomly, with a process time of up to 20 minutes. The tests were conducted with 3 replicates of the central point. The conventional heating process was also carried out in order to compare the two methods. Inactivation results were expressed as log of spores /mL of coconut water. Temperature is the preponderant factor for the process of pasteurization of coconut water through the analysis of the DCCR. It was also possible to observe that, under the following conditions: a) power of 120W; b) 76 mg of acids added to the beverage and c) composition of acids of 22% ascorbic and 78% citric acid, the results were separated into two groups: one group at a temperature of 86 °C, where the reduction of the spore population was lower (between 0,5 log and 3,7 log of spores/mL of coconut water), and another one at a temperature of 92 °C, which presented higher logarithmic reductions of the microorganism (between 3,4 log and 7,0 log of spores/mL of coconut water). Once the ANOVA test was performed, it was verified that the predicted increase was significant. There was a difference statistically significant between conventional and microwave heating. However, this difference was not taken into account because microbiologically it could be neglected. As for processing time, an average of 10 to 15 minutes of retention at the desired temperature is required to achieve the highest level of inactivation of spores at the center point conditions (89 °C, 125 W, 75 mg of acids added to the coconut water and the composition of acids of 75% citric and 25% ascorbic). The pasteurisation of coconut water by microwave has proved to be feasible, but other studies are needed to optimize processing.

Keywords: *microwaves, inactivation of B. coagulans spores, coconut water.*

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

CCGB – Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus*

DCCR – Delineamento central composto rotacional

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations

GHz - Gigahertz

IMT – Instituto Mauá de tecnologia

MHz – megahertz

MPa – megapascal

UFC – unidade formadora de colônia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Método simplex com cinco variáveis, para pasteurização da água de coco por micro-ondas, visando a redução de 5 ciclos log na população de esporos de <i>B. coagulans</i> , inoculados previamente na bebida.....	26
Tabela 2. Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), para definição dos efeitos principais, no processo de pasteurização da água de coco por micro-ondas, visando a redução de 5 ciclos log na população de esporos de <i>B. coagulans</i> , inoculados previamente na bebida.	27
Tabela 3. Análise de variância entre grupos que apresentaram diferença em relação à inativação dos esporos de <i>B. coagulans</i> , inoculados em água de coco, processada por micro-ondas com potência efetiva de 120 W e condições de temperatura, quantidade e composição de ácidos variando, segundo o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), com 95% de confiança.....	36
Tabela 4. Análise de variância entre grupos que apresentaram diferença em relação à inativação dos esporos de <i>B. coagulans</i> , inoculados em água de coco, processada por micro-ondas com adição de 76 mg de ácidos e condições de temperatura, composição de ácidos e potência efetiva variando, segundo o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), com 95% de confiança.....	36
Tabela 5. Análise de variância entre grupos que apresentaram diferença em relação à inativação dos esporos de <i>B. coagulans</i> , inoculados em água de coco, processada por micro-ondas com composição de ácidos de 22% ascórbico e 78% cítrico e condições de temperatura, quantidade de ácidos e potência efetiva variando, segundo o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), com 95% de confiança.....	36
Tabela 6. Validação dos dados observados no DCCR e em ensaio com condições aleatórias (87°C, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco, composição dos ácidos de 33% ascórbico e 67% cítrico e potência efetiva de 133 W), utilizando os valores preditos pelas equações da reta obtidas dos gráficos de inativação dos esporos de <i>B. coagulans</i> , em função da temperatura, nas 4 medições realizadas ao longo do processamento (5, 10, 15 e 20 minutos).....	38
Tabela 7. Análise de variância de dois fatores (equipamento e tempo) para inativação dos esporos de <i>B. coagulans</i> , inoculados em água de coco, processada por micro-ondas e manta térmica, nas condições de 89°C, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco, composição dos ácidos de 25% ascórbico e 75% cítrico e potência efetiva de 125 W, com 95% de confiança..	40
Tabela 8. Análise de Tukey com 95% de confiança entre os tempos analisados para inativação dos esporos de <i>B. coagulans</i> , inoculados em água de coco, processada por micro-ondas e manta térmica (n=8).....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Utensílio de aço inoxidável utilizado para abrir os cocos verdes.	22
Figura 2. Adaptação no equipamento de micro-ondas para possibilitar a irradiação de baixa potência (menor que 10% da capacidade do magnetron). Composta por: (1) magnetron; (2) circuladores em série; (3) carga de dissipação; (4) casador de impedância; (5) acopladores direcionais.....	23
Figura 3. Cavidade de reação, adaptações e controles do equipamento para realizar o processamento da água de coco por micro-ondas. (a) cavidade de reação, (b) serpentina para resfriamento, (c) condensador de refluxo total, (d) haste de agitação, (e) controlador de velocidade de agitação, (f) sensor de fibra ótica, (g) medidor de temperatura e (h) retirada de amostra.....	24
Figura 4. Manta aquecedora para balão de fundo redondo de 250 mL conectado ao sistema de resfriamento da reação, condensador de refluxo total, agitação, aferição de temperatura (termômetro a álcool) e tubo para retirada de amostra.	25
Figura 5. Garrafa de Roux utilizada para observação da esporulação de <i>B. coagulans</i> CCGB (LFB_FIOCRUZ) 1433.	28
Figura 6. Média e desvio padrão de inativação de esporos de <i>B. coagulans</i> , após o processamento por micro-ondas, nos 6 ensaios do planejamento simplex, para otimização do processo de pasteurização da água de coco. $\log N_0$ - $\log$ número de esporos/mL de água de coco antes da exposição às micro-ondas. $\log N_t$ - $\log$ número de esporos/mL de água de coco após o processamento.	32
Figura 7. Perfis de aquecimento (linha azul) e de potência efetiva (linha vermelha), ao longo do tempo, no processo de pasteurização da água de coco por micro-ondas, seguindo o planejamento simplex (6 ensaios - P1, P2, P3, P4, P5 e P6).	32
Figura 8. Número de reduções logarítmicas dos esporos de <i>B. coagulans</i> ao longo do tempo nas condições testadas no planejamento fatorial (2^4) do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), sem os pontos axiais e os centrais, para pasteurização da água de coco por micro-ondas (APÊNDICE B). a. Potência efetiva em 120 W; quantidade de ácidos adicionados à água de coco de 76 mg e composição dos ácidos de 22% ascórbico e 78% cítrico. b. Potência efetiva em 130 W; quantidade de ácidos adicionados à água de coco de 74 mg e composição dos ácidos de 28,5% ascórbico e 71,5% cítrico.....	35
Figura 9. Número de reduções logarítmicas dos esporos de <i>B. coagulans</i> , em função da temperatura, para os quatro tempos avaliados, 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. Em cada gráfico estão representadas as equações lineares e o R^2	38
Figura 10. Média e Desvio Padrão de inativação de esporos de <i>B. coagulans</i> após o processamento por micro-ondas, no ponto central (89 °C, 125 W, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco e composição desses ácidos de 75% cítrico e 25% ascórbico do DCCR, para pasteurização da água de coco ($\log N_0$ - $\log$ número de esporos/ mL de água de coco antes da exposição às micro-ondas. $\log N_t$ - $\log$ número de esporos/ mL de água de coco	

após o processamento. Linha tracejada: projeção de inativação de esporos do início do processo até a primeira coleta de amostra, para enumeração desse micro-organismo).....39

Figura 11. Média e Desvio Padrão de inativação de esporos de *B. coagulans* após o processo de pasteurização da água de coco por micro-ondas e manta aquecedora, em 4 momentos distintos de coleta de amostras (5, 10, 15 e 20 minutos) ($\log N_0$ – log número de esporos/ mL de água de coco antes da exposição às micro-ondas. $\log N_t$ – log número de esporos/ mL de água de coco após o processamento. MO – média da inativação de esporos por micro-ondas. M – média de inativação de esporos por manta aquecedora).40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Cultivo do coco	15
1.2. Água de coco.....	17
1.3. Micro-ondas	18
1.4. Processamento térmico de alimentos utilizando micro-ondas	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Materiais	22
3.1.1. Micro-organismo utilizado	22
3.1.2. Água de coco	22
3.1.3. Equipamento de micro-ondas	23
3.1.4. Aquecimento convencional.....	25
3.2. Métodos	25
3.2.1. Delineamento experimental	25
3.2.2. Preparo da suspensão dos esporos e determinação da população inicial de esporos de <i>B. coagulans</i>	27
3.2.3. Preparo das amostras de água de coco: inoculação de esporos de <i>B. coagulans</i> ...	28
3.2.4. Exposição das amostras de água de coco inoculadas com esporos de <i>B. coagulans</i> às micro-ondas.....	29
3.2.5. Tratamento térmico convencional das amostras de água de coco inoculadas com esporos de <i>B. coagulans</i>	30
3.2.6. Determinação da população de esporos sobreviventes ao tratamento por micro-ondas e ao processo térmico convencional.....	30
3.2.7. Análises estatísticas	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Estudo Exploratório	31
4.1.2. Reavaliação do planejamento	31
4.2. Definição das condições satisfatórias para pasteurização de água de coco por micro-ondas	31
4.3. Inativação da população de esporos de <i>B. coagulans</i> inoculados em água de coco exposta à micro-ondas	33
4.4. Comparação entre o aquecimento por micro-ondas e o por condução	40
5. DISCUSSÃO	41
5.1. Processamento da água de coco por micro-ondas – análise de DCCR.....	41
5.2. Desafios do trabalho com micro-ondas.....	43
6. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

APÊNDICE A.....	51
Resultados do processamento da água de coco (ao natural e com adição de ácidos) por micro-ondas e banho termostático utilizando <i>Geobacillus stearothermophilus</i> como indicador biológico do processo.....	51
APÊNDICE B.....	52
Observações dos delineamentos experimentais – Simplex e DCCR	52
APÊNDICE C	57
Análises de Homogeneidade das variâncias	57

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco com produção aproximada de três milhões de toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2012). Entre os diversos usos possíveis para o fruto, cita-se a obtenção da água de coco, bebida refrescante e popularmente conhecida, que vem ganhando mercado, impulsionada pela adoção de hábitos alimentares saudáveis pela população brasileira. O mercado da água de coco embalada vende 65 milhões de Litros por ano, movimentando R\$ 340 milhões no país, segundo dados da consultoria Concept (MARTINS e JÚNIOR, 2011; LOUREIRO, 2012).

Rica em açúcares, a água de coco ainda contém vitaminas, minerais, ácidos graxos e aminoácidos, tornando-a um meio propício para a multiplicação de micro-organismos. O crescimento microbiano pode causar deterioração com produção de gás devido à fermentação, rancidez e odor desagradável, em razão da quebra dos ácidos graxos e de aminoácidos sulfurados, pelos micro-organismos. Essa contaminação ocorre geralmente durante a manipulação dos frutos e, para evitar a deterioração da bebida, é necessária a aplicação de tratamentos térmicos e de armazenamento em condições adequadas que possam estender sua vida de prateleira. As faixas de temperatura utilizadas para o processamento são de 75° a 90°C por aproximadamente 300 segundos, seguido de resfriamento rápido e armazenamento em refrigeração a 4°C (ROSA e ABREU, 2000; MATSUI, 2006; ROLLER, 2007).

O processamento térmico de alimentos deve garantir a qualidade microbiológica dos produtos, além das características sensoriais e nutricionais. Micro-organismos que apresentam alta resistência térmica, especialmente aqueles com capacidade de esporular, são comumente utilizados como indicadores da eficiência do processo térmico. Um exemplo de micro-organismo que apresenta essas características é o *Bacillus coagulans*. Esse micro-organismo é capaz de se multiplicar em temperaturas entre 15 e 60°C, é acidúrico (multiplica em alimentos com acidez moderada, pH 4,5), seus esporos são resistentes ao aquecimento com valor $D_{121,1^{\circ}\text{C}}$ de 0,01 a 0,07 min e, quando presentes, deterioram os alimentos se armazenados inadequadamente pois os esporos germinam. Identificado em 1915 como causador de coagulação no leite condensado, esse micro-organismo Gram-positivo, aeróbio facultativo, possui características que o tornam um micro-organismo pertinente para avaliação de processos térmicos em bebidas como a água de coco (STUMBO, 1970; BERGEY, 1974; HAMMER, 1915).

A temperatura e o tempo necessários para a inativação desses esporos depende do pH

do meio, da composição do alimento, da atividade de água, da cepa do micro-organismo estudado, do tipo de recipiente utilizado no processamento e da associação de métodos de tratamento como temperatura e pressão ou uso de micro-ondas (POTTER e LINCH, 1988; PALOP, et al. 1997; PALOP, et al. 1999; WANG; HU; LIN, 2003). Neste contexto, Daryaei e Balasubramaniam (2013) submetem suco de tomate (pH 4,23) a tratamento térmico (100°C) sob pressão de 600 MPa e 0,1 MPa e obtiveram uma redução ≥ 7 log número de esporos de *B. coagulans* 185A após 3 e 13 minutos de processo, respectivamente. Já em leite, submetido ao tratamento combinado de aquecimento (80°C) e alta pressão (600 MPa), o tempo necessário para reduzir em 90% o número de esporos dessa bactéria foi de 4,168 minutos (WANG et al., 2009). Ainda referente à resistência de *B. coagulans*, Wang, Hu e Lin (2003) observaram que essa reduziu após a exposição às micro-ondas quando em meio com baixa atividade de água.

Além do estudo das condições necessárias para inativar micro-organismos deteriorantes e patogênicos, o método de conservação também deve considerar sua qualidade nutricional e sensorial. Assim, novos métodos de aquecimento dos alimentos têm sido estudados, como a exposição às micro-ondas, em que é possível reduzir o tempo de processamento e com isso fornecer um produto de melhor qualidade sensorial e nutricional (SALAZAR-GONZÁLEZ; MARTÍN-GONZÁLEZ e SOSA-MORALES 2012).

As micro-ondas são uma forma de radiação eletromagnética que produz calor e a sua utilização no processamento térmico de alimentos dependerá do tipo de sistema (frequência, fluxo contínuo ou descontínuo) usado, estado físico do material, concentração iônica e características dielétricas (BUFFLER, 1993; HEDDLESON e DOORES, 1994).

1.1. Cultivo do coco

Originado do gênero *Cocos*, da família das Arecaceae (palmáceas), o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta de espécie única e de clima tropical, que necessita de condições climáticas específicas para o seu adequado desenvolvimento como temperatura e umidade mais elevadas, boa luminosidade, adequada distribuição de chuvas e uma região sem ventos fortes (FOALE e HARRIES, 2011; PASSOS, 2002).

O coqueiro é, provavelmente, originado de regiões dos oceanos Índico e Pacífico. Chegou ao Brasil com início do período de colonização e devido às condições climáticas favoráveis ao crescimento desta planta, a região nordeste foi seu primeiro local de fixação (FOALE e HARRIES, 2011; MARTINS e JÚNIOR, 2011). Embora o Brasil esteja entre os cinco maiores produtores mundiais de coco (FAO, 2012), essa produção é considerada baixa e não atende à demanda interna, sendo necessária a importação do produto. Com o emprego de

novas tecnologias e dependendo da cultivar utilizada, pode-se aumentar em até sete vezes a produção de coco, demonstrando que este produto tem um bom potencial econômico (LOIOLA, 2005).

O fruto possui uma camada externa (epicarpo) de coloração verde a marrom, uma camada média fibrosa (mesocarpo) e o endocarpo, camada interna, tem por característica ser extremamente rígida. Mais internamente, há formação do albúmen sólido (massa branca e oleosa) e do líquido, que é a água de coco (BENASSI et al., 2007; MEDINA, 1980). Todas essas estruturas do coco podem ser utilizadas como matéria-prima para produzir peças de artesanato, carvão vegetal, sabão, leite e óleo de coco, além do consumo da água de coco que é reconhecida como de grande importância para a saúde (FOALE e HARRIES, 2011). O coqueiro ainda pode ser utilizado para obtenção de óleo voltado para produção de combustíveis biodegradáveis (LOIOLA, 2005).

As variedades da espécie *Cocos nucifera* L. *Typica* (gigante) e *Nana* (anão) são as mais cultivadas no país, correspondendo a 70% e 20% das plantações de coqueiros, respectivamente. A variedade gigante apresenta rápido crescimento, mas o fruto leva um longo período para ser colhido e seu produto, o coco seco, é utilizado para fabricação de farinha, coco ralado, leite de coco, entre outros. Já a variedade anã tem início rápido de produção de cocos, colhendo-se por planta cerca de 150 a 200 frutos a cada ano e geralmente são utilizados para obtenção e comercialização da água de coco. O período ideal para colheita desses frutos é de 5 a 7 meses após a abertura da inflorescência, quando a bebida apresenta melhor qualidade sensorial. Essa variedade também apresenta teor de gordura equivalente a menos da metade da espécie gigante, tornando-se uma boa opção na produção de alimentos com redução de calorias (ARAGÃO, 2002).

Durante a colheita, o fruto deve ser colhido com cuidado para evitar que o mesmo sofra quedas, provocando injúrias na casca que podem permitir o contato da água de coco com o ar atmosférico, o que desencadeará reações enzimáticas que causam alterações na coloração do fruto, bem como possibilitando a contaminação por micro-organismos presentes na casca e no ambiente. Durante a pós-colheita é recomendado armazenar os frutos em local seco e arejado, em forma de cacho e por no máximo dez dias, pois após esse período, iniciam-se processos químicos deteriorantes que resultam em aumento da acidez da bebida, implicando na rejeição pelos consumidores (ARAGÃO, 2002). A temperatura também não deve ser alta, pois permite a ocorrência de rachaduras na casca. Neste sentido, quando o transporte ocorrer ao longo do dia em caminhões abertos, ou caso os frutos sejam comercializados expostos ao sol, deve se reduzir esse período de armazenamento, uma vez

que essas condições possibilitam alterações à integridade da casca do fruto e assim causar a deterioração da água de coco. O coco da variedade anão apresenta maior facilidade para colheita devido a palmeira ser de pequeno porte. Os frutos devem permanecer sob a sombra até o armazenamento. As condições adequadas de colheita, transporte e armazenamento influenciam diretamente na qualidade da água de coco produzida (ARAGÃO, 2002).

1.2. Água de coco

A água de coco é definida no artigo 20 do decreto Nº 6871 de 4 de junho de 2009 (BRASIL, 2009a) como uma bebida extraída do fruto do coqueiro (*Cocus nucifera L.*), não diluída e não fermentada, e conservada utilizando tecnologias de processamento adequadas.

Na instrução normativa Nº 27 de 22 de julho de 2009 (BRASIL, 2009b), definem-se os parâmetros sensoriais, físico-químicos e microbiológicos para a água de coco: a bebida pasteurizada deve apresentar pH entre 4,30 e 4,50 e °Brix a 20°C com máximo de 6,70. Ela deve ser comercializada refrigerada à temperatura de, no máximo, 5°C e pode ser adicionada de aditivo alimentar aprovado para suco de fruta na RDC Nº 8 de 6 de março de 2013 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). A água de coco ainda deve possuir as seguintes características microbiológicas: ausência de *Salmonella* sp., população de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes de, no máximo, 1 UFC (Unidade formadora de colônia – UFC)/mL e de bolores e leveduras de até 20 UFC/mL (BRASIL, 2009b).

É uma bebida de baixo valor calórico (22 Kcal/100 mL) constituída basicamente de carboidratos, sendo a sacarose o principal constituinte presente em cocos maduros (5 a 7 meses) e, em cocos verdes, a glicose e a frutose são os açúcares principais. Contém vitaminas E, C e do complexo B (riboflavina e tiamina). Apresenta bom aporte de íons inorgânicos como o potássio (162 mg/100 mL), que pode auxiliar na redução da pressão sanguínea. Apresenta bom perfil de aminoácidos e ainda possui ácidos graxos que podem atuar minimizando processos inflamatórios e atuando como antioxidante (SANTOSO et al., 1996; NEPA, 2011; DEBMANDAL e MANDAL, 2011; FONSECA et al., 2009).

Outra característica inerente à água de coco, é que enquanto dentro do fruto ela é estéril. Quando as práticas de manipulação e armazenamento são realizadas em condições higiênicas insatisfatórias, micro-organismos podem contaminar a bebida e deteriorar o alimento tornando-o impróprio para o consumo. Para evitar esses problemas, a água de coco deverá ser processada termicamente, em temperatura que permita a inativação das enzimas e destruição de bactérias patogênicas e da maior parte dos micro-organismos deteriorantes e ser conservada em refrigeração (LIMA, 2013; ROSA e ABREU 2000).

1.3. Micro-ondas

A micro-onda é uma radiação eletromagnética constituída de um campo elétrico e um campo magnético, que se propagam perpendicularmente e sua característica é determinada pela frequência (invariável), pela velocidade da onda, que varia conforme o meio de propagação, e pelo seu comprimento que é obtido da relação entre esses dois fatores. Essas ondas eletromagnéticas constituem uma energia não ionizante, liberada em forma de calor em meio que absorve micro-ondas. Essas ondas curtas se não forem absorvidas, podem ser refletidas ou transmitidas dependendo do material. Por exemplo, o metal reflete a micro-onda, o vidro a transmite, sendo essa uma informação fundamental para ser analisada antes de iniciar um trabalho utilizando essa tecnologia (DECAREAU, 1992).

O equipamento de micro-ondas é constituído por: uma fonte de energia, um gerador de micro-ondas (magnetron), guias de onda, uma cavidade de reação e um sistema de controle. A fonte de energia alimenta o gerador de ondas curtas, que transforma a corrente elétrica em onda eletromagnética de alta frequência que é enviada à cavidade. O sistema de controle é necessário para ajustar a potência conforme o desenho do equipamento e o tipo de material contido na cavidade. Além disso, é importante que a montagem do equipamento de micro-ondas não permita que a potência refletida pelo material retorne ao magnetron (válvula que gera a micro-onda), pois poderá danificar o equipamento. Para tanto, essa potência deve ser desviada para um local que contenha material que absorva a micro-onda, como a água e fique, então, inativa (LOUPY, 2002).

O processamento de alimentos por ondas eletromagnéticas pode ser realizado em equipamento com sistema de batelada ou fluxo contínuo. O primeiro limita a capacidade de penetração da onda, pois todo o material é aquecido em um único espaço. Desse modo, a homogeneidade do aquecimento e a eficiência do processo ficam prejudicadas. Este desenho corresponde aos modelos domésticos comumente utilizados e que ocupam menos espaço. O segundo, sistema de fluxo contínuo, permite um aquecimento mais homogêneo e rápido, pois uma pequena quantidade do material passa por vez no tubo de retenção, onde este é exposto às micro-ondas, necessitando de uma potência menor, dentro da frequência, normalmente utilizada na indústria, de 915 ou 2450 MHz (LOUPY, 2002).

1.4. Processamento térmico de alimentos utilizando micro-ondas

A ampla comercialização de alimentos industrializados, com longa vida de prateleira como são encontrados atualmente, deve-se aos processos de conservação desenvolvidos ao longo do tempo e, entre esses, o mais utilizado tem sido o tratamento térmico dos alimentos.

Entretanto, o processo de aquecimento convencional por vezes provoca alterações indesejadas nos produtos alimentícios tais como, o escurecimento, as perdas sensoriais e nutricionais, que resultam em perdas econômicas para as indústrias. No intuito de minimizar esses problemas novas tecnologias têm sido desenvolvidas e, entre elas, cita-se o uso das micro-ondas (AHMED e RAMASWAMY, 2007).

A micro-onda como fonte de aquecimento foi descoberta em 1946, após a II Guerra Mundial pelo engenheiro Dr. Percy Spencer. Existe uma versão de que essa descoberta ocorreu quando o engenheiro percebeu, enquanto trabalhava com transmissor de ondas curtas, que o chocolate em seu bolso havia derretido. A partir daí ele passou a realizar experimentos com outros alimentos e assim começaram as pesquisas para desenvolvimento do forno de micro-ondas (LOUPY, 2002).

A produção de calor pelas micro-ondas é diferente daquele produzido pelo método convencional. No primeiro, o calor é produzido quando há interação do campo eletromagnético com as moléculas do alimento, provocando sua agitação (rotação dos dipolos) e fricção (condução iônica), resultando em liberação de energia em forma de calor. Neste caso, o alimento aquece do interior para as extremidades, elevando a temperatura quase que instantaneamente e permitindo que o calor se propague de forma mais homogênea. No método convencional, a produção de calor corre por contato com uma superfície quente e é transferido por condução, das extremidades para o interior (DECAREAU, 1992; MUDGETT, 1988).

O aquecimento de alimento por micro-ondas utiliza geralmente frequência de 915 ou de 2450 MHz, que corresponde a um comprimento de onda de 32,8 cm e 12,2 cm, respectivamente. Esta informação é fundamental para se definir o desenho do equipamento e o volume de amostra que será aquecido (AHMED e RAMASWAMY, 2007). Outros fatores afetam o desempenho do sistema de aquecimento por micro-ondas entre eles, a densidade, a superfície, a temperatura de aquecimento e as propriedades dielétricas do alimento. Este último representa a forma como os constituintes do alimento interagem com o campo eletromagnético. Essa interação é determinada por três fatores: o fator de perda dielétrica (ϵ''), que depende da frequência da micro-onda e determina quanto o material consegue converter de energia eletromagnética em calor; a constante dielétrica (ϵ') da substância, que representa quanto o material consegue absorver de energia de micro-onda em energia elétrica e o fator de dissipação ($\tan \delta$) do material que representa a capacidade do material de converter a energia absorvida em calor, e é dado pela relação $\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$. Quanto maior o fator de dissipação, menor o poder de penetração da onda no material, em uma dada frequência, pois a energia

absorvida é rapidamente liberada (BUFFLER, 1993; DECAREAU, 1992). Para a água de coco, Franco et al. (2015) demonstraram que o aquecimento na frequência de 2450 MHz é mais estável, mas tem menor profundidade de penetração; já em 915 MHz a profundidade de penetração é maior, mas esta cai com o aumento da temperatura. Além disso, a permissividade elétrica (capacidade de armazenar energia elétrica na forma de calor) reduz tanto com o aumento da temperatura como com o aumento da frequência. A associação desses fatores aos parâmetros de cinética de inativação de enzimas e de destruição do micro-organismo alvo é importante para definir em que condições essa bebida será processada (AHMED e RAMASWAMY, 2007).

Na exposição às micro-ondas, a inativação microbiana pode ocorrer devido ao efeito da temperatura e do campo eletromagnético. A combinação de dois efeitos em métodos de conservação de alimentos pode ser observado no trabalho de Wang et al. (2009) em que verificaram uma maior inativação dos esporos inoculados em leite quando aplicaram pressão maior e mantiveram a temperatura, sob maior pressão, a 80°C. Os nutrientes presentes nos alimentos podem conferir “proteção” aos micro-organismos durante o processamento. Assim, os efeitos da alta pressão associado ao efeito da temperatura, pode reduzir essa “proteção” aumentando, consequentemente a inativação dos esporos.

O trabalho de Palop et al. (1999) demonstrou que a combinação de métodos de conservação com fatores intrínsecos do alimento, como a redução do pH, pode reduzir a resistência térmica dos esporos bacterianos. Esses autores observaram menor valor D para os esporos de *B. coagulans* inoculados em tomate e aspargo com pH acidificado (pH 4), em ampla faixa de temperatura, quando comparado ao valor D dos esporos inoculados nesses alimentos com pH 7.

As micro-ondas tem sido estudadas como uma forma de preservação dos nutrientes nos alimentos em substituição ao aquecimento convencional, não só pelo modo de aquecimento que é diferente, mas também devido a possibilidade de o preparo ocorrer mais próximo ao momento de consumo e com isso também reduzir as perdas nutricionais. Vários alimentos já foram testados, como o suco de laranja (FRATIANNI; CINQUANTA; PANFILI, 2010), purê de batata doce (BRINLEY et al., 2007), leite (LIN e RAMASWAMY, 2011) e aspargos em conserva (LAU e TANG, 2002). Outros trabalhos na área também avaliam a eficiência do uso de micro-ondas sob a letalidade microbiana. A princípio, a inativação dos micro-organismos ocorre devido ao aquecimento, contudo a participação do campo eletromagnético nessa ação ainda não foi comprovada. O uso de micro-ondas para a destruição de micro-organismos deterioradores de suco de maçã demonstrou ser mais

eficiente em relação à inativação observada no processamento convencional, segundo Tajchakavit; Ramaswamy e Fustier (1998). A mesma conclusão foi observada na avaliação da inativação cinética de *Listeria monocytogenes* em purê de kiwi processado por micro-ondas e banho termo-estático com valores de $D_{60^{\circ}\text{C}}$ igual a 17,35 s e de $D_{60^{\circ}\text{C}}$ de 37,45 s, respectivamente (BENLLOCH-TINOCO et al., 2014). Pina-Pérez et al. (2014) observaram redução da população de *Cronobacter sakazakii* em leite em pó reconstituído, aquecido por micro-ondas doméstico. Contudo, esses autores ressaltam que não é possível afirmar com clareza a maior sensibilidade dessa bactéria às micro-ondas quando comparado ao tratamento térmico em sistema convencional.

A comprovação de que o aquecimento por micro-ondas pode ser mais eficiente para a letalidade microbiana, retenção de nutrientes e propriedades sensoriais do alimento do que o processamento tradicional, é dificultada pelos diversos fatores que interferem no processo como: o tipo de equipamento, o tipo e as características do produto, a agitação, o valor de potência aplicado, o tempo e a temperatura a serem empregados (DEACAREAU, 1992; MUDGETT, 1988).

Propusemos a presente pesquisa no sentido de eliminar ou reduzir a quantidade de conservantes químicos, adicionados à água de coco na forma como é comercializada atualmente e, de disponibilizar uma bebida industrializada segura quanto ao aspecto microbiológico e com características nutricionais e sensoriais mais próximas ao produto *in natura*, utilizando para este fim a exposição às micro-ondas.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- avaliar a viabilidade da pasteurização por micro-ondas de água de coco, utilizando esporos de *Bacillus coagulans* como indicador da efetividade microbiológica do processo.
- comparar o processamento térmico da água de coco por micro-ondas com o convencional.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Micro-organismo utilizado

Cepa de *Bacillus coagulans* CCGB (LFB-FIOCRUZ) 1433, gentilmente cedida pelo Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz. Essa cepa estava sob a forma de esporos em uma tira de papel embalado em papéis especiais.

3.1.2. Água de coco

A água de coco foi obtida diretamente de frutos verdes (*Cocos nucifera* L.), provenientes do município de Rodelas, situado no norte do estado da Bahia e adquiridos na cidade de São Paulo. No laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) ou no de Engenharia de Alimentos do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT), os frutos foram higienizados em água corrente e sanitizados em solução de Sumaveg[®] 0,33%, por 15 minutos. A abertura dos cocos para obtenção de sua água foi realizada assepticamente, utilizando utensílio pontiagudo de aço inoxidável (“fura coco”, Figura 1) e o líquido obtido foi filtrado em papel de filtro comum, coletado em Erlenmeyer e homogeneizado, manualmente, por 1 minuto. Todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados. A extração da água de coco ocorreu semanalmente e cada fruto apresentou volume de aproximadamente 300 mL. A bebida foi armazenada, em garrafas plásticas esterilizadas e mantidas sob refrigeração.

Figura 1. Utensílio de aço inoxidável utilizado para abrir os cocos verdes.

3.1.3. Equipamento de micro-ondas

Foi utilizado equipamento desenvolvido pelos docentes do IMT (Figura 2), composto por:

- um gerador de frequência de 2,45 GHz com potência regulável até 3 kW, modelo SM 1050 (Richardson Electronics Ltd., São Paulo, Brasil), que envia energia para o magnetron (1);
- cavidade multimodal de reação com abertura para inserção de balão de fundo redondo (Pyrex) de 250 mL, com três conexões.

Como a quantidade mínima de potência nominal do magnetron (1) é de 10% (300 W) da sua capacidade total e o nível de irradiação utilizada foi inferior a este limite, desenvolveu-se uma adaptação para dissipar parte da energia, reduzindo a potência irradiada para a cavidade de reação. Para isso, utilizaram-se dois circuladores em série (2), sendo que o primeiro transmitia a potência das micro-ondas advindas do magnetron para uma carga de dissipação (3) que era ligado a um casador de impedância (4) para refletir a potência que foi transmitida do primeiro circulador para o segundo e deste para a cavidade. Dois acopladores direcionais (5) foram utilizados para medir a potência irradiada e refletida que representa a quantidade de energia que não foi absorvida pelo material, no caso, o alimento (Figura 2). A esses acopladores direcionais foram conectados sensores de potência USB Average U2001A e o programa para leitura de sua medida foi o Power Panel 3.2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos da América).

Figura 2. Adaptação no equipamento de micro-ondas para possibilitar a irradiação de baixa potência (menor que 10% da capacidade do magnetron). Composta por: (1) magnetron; (2) circuladores em série; (3) carga de dissipação; (4) casador de impedância; (5) acopladores direcionais.

Fonte: Jermolovicius et al. (2014).

Para realizar o processamento da água de coco nesse aparelho de micro-ondas, foram necessárias outras adaptações:

a) um sistema de resfriamento do reator, composto por um banho criostático que resfriava querosene a -20°C e uma bomba de vácuo NH-10 PX 14x11 mm 1/2 G (PAN WORLD, Massachusetts, Estados Unidos da América) que fazia o fluido circular pela serpentina em polipropileno colocada dentro do balão de reação. A vazão do querosene foi regulada com válvula controladora (6 mm) e mangueira de circulação colocada dentro do banho. Como esta mangueira tinha calibre diferente daquela de dentro do balão, foram necessários redutores de mangueira de 6 para 4 mm.

b) condensador de refluxo total.

Esses dois sistemas (a e b) ligavam-se ao balão volumétrico por uma conexão em Y, onde uma de suas aberturas une-se ao condensador e a outra à serpentina.

Dentro do balão de reação ainda foram acondicionados uma haste para agitação com pá de teflon em formato “retangular”, dois tubos de vidro 5x0,8 mm sendo um utilizado para tomada de amostra com uma seringa BD descartável de 5 mL e outro usado para acondicionar uma fibra ótica modelo FOT-L-SD (FISO, Québec, Canadá), ligada a um medidor de temperatura. Todas as saídas foram vedadas com rolhas de teflon.

Na Figura 3 está representado a cavidade (a) com o balão de reação em seu interior, a serpentina para resfriamento do reator (b), o condensador de refluxo total (c) a agitação (haste “d” e controlador de velocidade “e”), o controle de temperatura (sensor de fibra ótica “f” e medidor de temperatura “g”) e o local de retirada de amostra (h) da água de coco processada.

Figura 3. Cavidade de reação, adaptações e controles do equipamento para realizar o processamento da água de coco por micro-ondas. (a) cavidade de reação, (b) serpentina para resfriamento, (c) condensador de refluxo total, (d) haste de agitação, (e) controlador de velocidade de agitação, (f) sensor de fibra ótica, (g) medidor de temperatura e (h) retirada de amostra

3.1.4. Aquecimento convencional

Para determinação da inativação térmica, por aquecimento convencional, de esporos de *B. coagulans* inoculados em água de coco, foi utilizada manta aquecedora para balão de 250 mL com regulador de temperatura (Fisatom, São Paulo, Brasil). Para realizar esse aquecimento foram utilizadas as mesmas adaptações da cavidade do equipamento de micro-ondas. O sistema montado para o aquecimento da água de coco em manta aquecedora está representado na Figura 4.

Figura 4. Manta aquecedora para balão de fundo redondo de 250 mL conectado ao sistema de resfriamento da reação, condensador de refluxo total, agitação, aferição de temperatura (termômetro a álcool) e tubo para retirada de amostra.

3.2. Métodos

3.2.1. Delineamento experimental

A primeira etapa do trabalho foi direcionada à definição das condições satisfatórias para o processo de pasteurização da água de coco por micro-ondas utilizando o método simplex (BARROS NETO; SCARMINIO e BRUNS, 1995), com cinco variáveis: temperatura, quantidade de ácidos adicionada à água de coco, composição (%) de ácidos cítrico e ascórbico, tempo e potência. Definiu-se que, a pasteurização seria aceita como satisfatória quando se atingisse, pelo menos, 5 reduções logarítmicas da população de esporos presentes na amostra processada. Os experimentos foram realizados em duplicata de

placas, com uma repetição.

Na etapa seguinte foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com 4 variáveis (as mesmas utilizadas no simplex, exceto o tempo), com 28 ensaios no total, sendo 16 pontos únicos, 8 axiais e o ponto central com 3 repetições. Em cada um desses pontos foram feitas 4 medições. Após atingir a temperatura pré determinada, foram coletadas amostras (aproximadamente 5 mL) da bebida nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos. Os resultados indicaram quais efeitos foram significativos. Um ensaio em condições aleatórias, com uma repetição, foi conduzido com o objetivo de validar os resultados do DCCR. Todos os experimentos foram realizados com duolicata de placas.

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os planejamentos simplex e DCCR.

Tabela 1. Método simplex com cinco variáveis, para pasteurização da água de coco por micro-ondas, visando a redução de 5 ciclos log na população de esporos de *B. coagulans*, inoculados previamente na bebida.

Testes	Temperatura (°C)	Quantidade total de ácido cítrico + ácido ascórbico (mg/100 mL)	Porcentagem de ácidos na amostra		Potência (W)	Tempo (min)
			% Ácido cítrico	% Ácido ascórbico		
1	95	76	76	24	144	19
2	89	76	76	24	144	19
3	92	72	76	24	144	19
4	92	75	71	29	144	19
5	92	75	75	25	124	19
6	92	75	75	25	140	15
7	92	75	75	25	140	22,5

Tabela 2. Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), para definição dos efeitos principais, no processo de pasteurização da água de coco por micro-ondas, visando a redução de 5 ciclos log na população de esporos de *B. coagulans*, inoculados previamente na bebida.

Testes	Temperatura (°C)	Quantidade total de ácido cítrico + ácido ascórbico (mg/100 mL)	Porcentagem de ácidos na amostra			Potência (W)
			% Ácido cítrico	% Ácido ascórbico	Razão entre os ácidos	
1	86	74	71,5	28,5	2,5	120
2	86	74	71,5	28,5	2,5	130
3	86	74	78	22	3,5	120
4	86	74	78	22	3,5	130
5	86	76	71,5	28,5	2,5	120
6	86	76	71,5	28,5	2,5	130
7	86	76	78	22	3,5	120
8	86	76	78	22	3,5	130
9	92	74	71,5	28,5	2,5	120
10	92	74	71,5	28,5	2,5	130
11	92	74	78	22	3,5	120
12	92	74	78	22	3,5	130
13	92	76	71,5	28,5	2,5	120
14	92	76	71,5	28,5	2,5	130
15	92	76	78	22	3,5	120
16	92	76	78	22	3,5	130
17	83	75	75	25	3	125
18	95	75	75	25	3	125
19	89	73	75	25	3	125
20	89	77	75	25	3	125
21	89	75	67	33	2	125
22	89	75	80	20	4	125
23	89	75	75	25	3	115
24	89	75	75	25	3	135
25	89	75	75	25	3	125
26	89	75	75	25	3	125
27	89	75	75	25	3	125
28	89	75	75	25	3	125

3.2.2. Preparo da suspensão dos esporos e determinação da população inicial de esporos de *B. coagulans*

Os esporos de *B. coagulans* CCGB (LFB-FIOCRUZ) 1433 foram reativados transferindo-se, assepticamente, a tira de papel para um tubo contendo 10 mL de caldo nutriente (3g 1⁻¹ extrato de carne BBL-BD, Sparks, Estados Unidos da América; 5g 1⁻¹ peptona - Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado com 0,3% de extrato de levedura (Oxoid) e incubado a 33°C por 48h. Em seguida, 30 alíquotas de 1 mL foram transferidas para 30 garrafas de Roux (Figura 5) contendo 200 mL de ágar nutriente (mesma composição do caldo acima descrito, acrescido de 15g 1⁻¹ de ágar bacteriológico BBL-BD). Essas garrafas

foram incubadas na posição horizontal a 33°C por 4 dias, quando então foi realizada a observação de formação dos esporos. Para isso, coletou-se com auxílio de alça de níquel-cromo, o crescimento presente na superfície do meio, que foi submetido à coloração de Schaeffer-Fulton (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 2001). Após a confirmação da presença dos esporos em 90% do campo microscópico, as garrafas foram lavadas com 20 mL de água destilada estéril e o conteúdo de cada uma foi vertido para tubos tipo Falcon. Esses tubos foram centrifugados (centrífuga Sigma 6-16K, Osterode am Harz, Alemanha) por 10 min a 16.743 x g a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento resuspendido em 20 mL de água destilada estéril. Essa etapa foi repetida três vezes e a suspensão mantida em temperatura de 4°C. A população de esporos foi determinada transferindo-se 1 mL para tubo contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%. A diluição 10^{-1} foi submetida a choque térmico, em banho termostático (Fisatom) de 80°C por 15 min, seguido de imersão em banho de gelo. A partir desta diluição submetida ao choque térmico, foram realizadas diluições decimais sucessivas até 10^{-6} . De cada tubo de diluição, 0,1 mL, em duplicata, foi semeado em superfície de ágar nutriente suplementado com 0,3% de extrato de levedura e as placas incubadas a 33°C por 24 h. A população da suspensão foi de 10^9 log número de esporos/mL e essa permaneceu sob refrigeração de 4°C até o término dos experimentos.

Figura 5. Garrafa de Roux utilizada para observação da esporulação de *B. coagulans* CCGB (LFB_FIOCRUZ) 1433.

3.2.3. Preparo das amostras de água de coco: inoculação de esporos de *B. coagulans*

Antes da pasteurização, 100 mL da bebida em estudo, obtida como descrito no item 3.1.2, foram acidificados utilizando ácido cítrico e ácido ascórbico nas quantidades e nas proporções definidas no planejamento experimental em 3.2.1. Após essa etapa, foi aferido o pH da água, utilizando pHmetro de bancada modelo FiveEasy (Mettler Toledo, Monza,

Greifensee, Suíça), a fim de verificar se o mesmo encontrava-se entre 4,3 e 4,5, conforme a determinação da Instrução Normativa nº 27 de 22 de julho de 2009 (BRASIL, 2009b) para água de coco pasteurizada.

Após a acidificação, procedeu-se à inoculação de 10 mL da suspensão de esporos (3.2.2) em 90 mL da bebida adicionada de ácidos, para obter amostra com população de 10^8 número de esporos/mL. Para cada dia do processamento, uma amostra com a mesma concentração de esporos também foi preparada para ser utilizada como controle do processo. Essa amostra deveria apresentar, ao final das análises, a mesma concentração de esporos de quando foi preparada. Demonstrando que o tempo, do momento do preparo até o final do processamento e a exposição das amostras a temperatura ambiente, não modificava a população final dos esporos.

A determinação da população inicial de esporos nas amostras foi realizada aplicando-se o choque térmico na primeira diluição decimal e semeando o líquido em placas de ágar nutriente, como descrito no item 3.2.2.

Finalizado o preparo das amostras, seguiu-se para a sua pasteurização nas condições pré-determinadas no delineamento experimental (3.2.1).

3.2.4. Exposição das amostras de água de coco inoculadas com esporos de *B. coagulans* às micro-ondas

As amostras foram processadas conforme definido em planejamento experimental (3.2.1). Para a realização dos ensaios, a amostra dentro do balão Pyrex de três conexões, foi colocada na cavidade do reator. Antes de iniciar o processo ligou-se o banho criostático para que o fluido aí contido atingisse temperaturas abaixo de 0°C para, então, iniciar o processamento da amostra. A partir desse momento, a cada 30 segundos, foram registrados dados de temperatura e potência (irradiada e refletida). O tempo de retenção definido para cada teste foi considerado no momento em que se atingiu a temperatura alvo e esta foi controlada, manualmente, através da abertura da válvula que libera o fluido para resfriamento. Ao final do tempo de retenção pré-definido pelo método simplex (Tabela 1) e no DCCR que foi de 5, 10, 15 e 20 minutos, essas amostras foram transferidas para tubos de vidro com tampa de rosca, previamente esterilizados, e colocados em banho de gelo até que a temperatura atingisse 20°C.

3.2.5. Tratamento térmico convencional das amostras de água de coco inoculadas com esporos de *B. coagulans*

Na manta de aquecimento, com suporte para balão de fundo redondo de 250 mL, foi realizado ensaio de inativação térmica dos esporos inoculados em água de coco, seguindo as condições do ponto central do DCCR (89°C, 125 W, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco e a composição desses ácidos sendo de 75% cítrico e 25% ascórbico). Foram realizadas 3 repetições verdadeiras. A amostra, preparada como descrito no item 3.2.3, foi colocada no balão com a serpentina e este na manta previamente aquecida. Imediatamente foram ligados a agitação, o resfriamento e o condensador de refluxo total. A temperatura foi registrada, utilizando o termômetro a álcool e, assim como foi realizado nos ensaios do DCCR em micro-ondas, as amostras foram coletadas nos quatro tempos, após atingir a temperatura planejada e colocadas imediatamente em banho de gelo para posterior análise dos esporos sobreviventes.

3.2.6. Determinação da população de esporos sobreviventes ao tratamento por micro-ondas e ao processo térmico convencional

Após o processamento, procedeu-se de maneira semelhante ao descrito no item 3.2.2, para a determinação da população de esporos sobreviventes (log número de esporos/ mL de água de coco). O número de reduções logarítmicas de esporos de *B. coagulans* foi representado como $\log N_t$ (log número de esporos sobreviventes)/ $\log N_0$ (log número de esporos antes do processo térmico).

3.2.7. Análises estatísticas

A partir dos parâmetros obtidos, foram realizados a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias (Tukey). Para análise dos dados do DCCR utilizou-se o método proposto por Myers e Montgomery (2002). Para a tabulação e análise de dados foi utilizado o programa Microsoft Excel[®] versão 2010. Nestas análises foi considerado nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo Exploratório

Em princípio foi utilizado como indicador microbiológico do processo o *Geobacillus stearothermophilus*, uma vez que se pensava em esterilizar comercialmente o produto. Esporos desse micro-organismo foram inoculados em água de coco previamente acidificada para a faixa de pH de 4,3 a 4,5, conforme a determinação da legislação para água de coco pasteurizada, (BRASIL, 2009b), utilizando ácido cítrico (35 a 50 mg/100 mL) e ácido ascórbico (25 mg/100 mL). A temperatura empregada foi de 98°C, ponto de fervura, e tempo retenção de 14 minutos. Essas condições, tanto em micro-ondas quanto em banho termostático, não foram suficientes para inativar esses esporos, não havendo diferença entre os dois tratamentos empregados (APÊNDICE A). Esses resultados eram, de certa forma, esperados para o tratamento térmico. Porém, para o tratamento por micro-ondas esperava-se uma possível interação entre o efeito das micro-ondas e o efeito térmico dessas ondas curtas, possibilitando a inativação desses esporos.

4.1.2. Reavaliação do planejamento

Tendo em vista os resultados obtidos com *G. stearothermophilus*, optou-se por utilizar esporos de *Bacillus coagulans* como indicador biológico de segurança do processamento térmico, devido à sua resistência térmica e crescimento em faixa ácida de pH próxima à da água de coco pasteurizada. Segundo a Food and Drug Administration (UNITED STATES, 2004), deve-se alcançar uma redução mínima de 5 log da população de esporos durante o tratamento por micro-ondas.

4.2. Definição das condições satisfatórias para pasteurização de água de coco por micro-ondas

Pelos resultados obtidos com a análise do simplex (APÊNDICE B), constata-se que a região com maior número de reduções na população de esporos, considerada satisfatória (redução de pelo menos 5 ciclos log) é, respectivamente, temperatura de 92°C, quantidade de ácido de 75 mg/100 mL, composição de ácidos sendo 75% de ácido cítrico e 25% de ascórbico, potência efetiva de 140 W e tempo de 19 minutos (Figura 6).

Figura 6. Média e desvio padrão de inativação de esporos de *B. coagulans*, após o processamento por micro-ondas, nos 6 ensaios do planejamento simplex, para otimização do processo de pasteurização da água de coco. $\log N_0$ - log número de esporos/mL de água de coco antes da exposição às micro-ondas. $\log N_t$ - log número de esporos/mL de água de coco após o processamento.

Devido à dificuldade inicial para controlar a temperatura do processamento por micro-ondas, os testes foram conduzidos empregando-se a estabilidade do aquecimento e da potência efetiva, como representado na Figura 7.

Figura 7. Perfis de aquecimento (linha azul) e de potência efetiva (linha vermelha), ao longo do tempo, no processo de pasteurização da água de coco por micro-ondas, seguindo o planejamento simplex (6 ensaios - P1, P2, P3, P4, P5 e P6).

4.3. Inativação da população de esporos de *B. coagulans* inoculados em água de coco exposta à micro-ondas

Os resultados (APÊNDICE B) permitem afirmar que a temperatura é o fator preponderante ($p < 0,05$) na pasteurização por micro-ondas da água de coco, apresentando comportamento linear nos tempos de 15 e 20 minutos de processo. Ao contrário, aos 5 minutos de tratamento, foram observados além do efeito da temperatura, os efeitos da quantidade de ácido, da potência e da associação da temperatura à potência. Os parâmetros que influenciaram o processo aos 10 minutos foram semelhantes ao que ocorreu com 5 minutos, exceto a quantidade de ácidos adicionada à água de coco (APÊNDICE B). Contudo, a avaliação dos dados indica que, independente do tempo de processo, o maior efeito da exposição às micro-ondas (redução da população) foi dado pela temperatura.

Observando o desenho fatorial (2^4) dado pelo DCCR, notou-se que houve um aumento perceptível na inativação dos esporos durante a elevação da temperatura de 86°C para 92°C, combinada às seguintes condições:

- A) Potência efetiva de 120W
- B) a quantidade de ácidos adicionados à água de coco maior (76 mg)
- C) composição dos ácidos de 22% ascórbico e 78% cítrico.

Nestes casos, observou-se na Figura 8, uma separação dos resultados obtidos em dois “grupos”: um grupo à temperatura de 86°C onde se verifica uma menor redução na população de esporos, e o outro grupo à temperatura de 92°C apresentando uma maior inativação da população de esporos.

Nos ensaios nas condições de potência de 130 W, quantidade de ácidos adicionados à água de coco de 74 mg e composição de ácidos (ascórbico 28,5% e cítrico 71,5%), a elevação da temperatura não causou diferença substancial na inativação dos esporos (Figura 8). A partir desta observação testou-se a homogeneidade das variâncias desses “dois grupos” (APÊNDICE C), comprovando, com 95% de certeza, a casualidade dessa diferença. Os resultados apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5 mostram que o aumento predito foi significativo.

a.

Continua

Continuação da Figura 8

b.

Figura 8. Número de reduções logarítmicas dos esporos de *B. coagulans* ao longo do tempo nas condições testadas no planejamento fatorial (2^4) do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), sem os pontos axiais e os centrais, para pasteurização da água de coco por micro-ondas (APÊNDICE B). a. Potência efetiva em 120 W; quantidade de ácidos adicionados à água de coco de 76 mg e composição dos ácidos de 22% ascórbico e 78% cítrico. b. Potência efetiva em 130 W; quantidade de ácidos adicionados à água de coco de 74 mg e composição dos ácidos de 28,5% ascórbico e 71,5% cítrico.

Tabela 3. Análise de variância entre grupos que apresentaram diferença em relação à inativação dos esporos de *B. coagulans*, inoculados em água de coco, processada por micro-ondas com potência efetiva de 120 W e condições de temperatura, quantidade e composição de ácidos variando, segundo o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), com 95% de confiança.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Grupos (potência inferior)	87,9	1	87,9	102,6	0,00	4,2
Resto	25,7	30	0,9			
Total	113,6	31				

*Grupos (potência inferior): Ensaios que apresentaram resultados semelhantes em um nível maior (n=4) e menor (n=4) na redução logarítmica, para a mesma condição de potência efetiva (120W).

Tabela 4. Análise de variância entre grupos que apresentaram diferença em relação à inativação dos esporos de *B. coagulans*, inoculados em água de coco, processada por micro-ondas com adição de 76 mg de ácidos e condições de temperatura, composição de ácidos e potência efetiva variando, segundo o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), com 95% de confiança.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Grupos (Quantidade ácidos superior)	92,7	1,0	92,7	133,1	0,00	4,3
Resto	15,3	22,0	0,7			
Total	108,0	23,0				

*Grupos (Quantidade de ácidos superior): Ensaios que apresentaram comportamento semelhante em um nível maior (n=3) e menor (n=3) na redução logarítmica, para a mesma condição de quantidade de ácidos adicionada na água de coco (76 mg).

Tabela 5. Análise de variância entre grupos que apresentaram diferença em relação à inativação dos esporos de *B. coagulans*, inoculados em água de coco, processada por micro-ondas com composição de ácidos de 22% ascórbico e 78% cítrico e condições de temperatura, quantidade de ácidos e potência efetiva variando, segundo o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), com 95% de confiança.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Grupos (composição ácidos superior)	85,3	1	85,3	119,2	0,00	4,3
Resto	15,7	22	0,7			
Total	101,0	23				

*Grupos (composição ácidos superior): Ensaios que apresentaram comportamento semelhante em um nível maior (n=3) e menor (n=3) na redução logarítmica, para a mesma condição de composição dos ácidos adicionados à água de coco (22% ascórbico e 78% cítrico).

A temperatura foi o fator significativo, em comum, para os quatro tempos avaliados (5 min, 10 min, 15 min e 20 min). Os R^2 das quatro equações apresentaram valores muito próximos a 1, mostrando que os resultados explicam de maneira satisfatória a diferença das reduções das populações de esporos, conforme a temperatura de processamento (Figura 9).

Continua

Continuação da figura 9

Figura 9. Número de reduções logarítmicas dos esporos de *B. coagulans*, em função da temperatura, para os quatro tempos avaliados, 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. Em cada gráfico estão representadas as equações lineares e o R^2 .

Os resultados foram validados empregando um ponto aleatório dentro da faixa analisada, com uma repetição, nas seguintes condições: 87°C, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco, composição dos ácidos (ascórbico 33% e cítrico 67%) e potência efetiva de 133 W. Os resultados observados no DCCR e no ponto aleatório ficaram próximos aos previstos pela equação, ratificando a proposição de que o processo apresenta uma tendência linear nos quatro tempos (Tabela 6).

Tabela 6. Validação dos dados observados no DCCR e em ensaio com condições aleatórias (87°C, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco, composição dos ácidos de 33% ascórbico e 67% cítrico e potência efetiva de 133 W), utilizando os valores preditos pelas equações da reta obtidas dos gráficos de intivação dos esporos de *B. coagulans*, em função da temperatura, nas 4 medições realizadas ao longo do processamento (5, 10, 15 e 20 minutos).

Validação da equação de regressão do modelo								
Tempo (min)	5		10		15		20	
Temperatura (°C)	Observados	Preditos	Observados	Preditos	Observados	Preditos	Observados	Preditos
83	0,2	-0,2	0,5	0,3	0,9	0,8	1,1	1,1
86	1,0	1,2	2,0	1,9	2,6	2,3	3,3	2,7
89	2,2	2,6	3,0	3,5	3,3	3,8	3,4	4,2
92	4,0	4,0	5,1	5,2	5,3	5,3	5,5	5,7
95	5,6	5,4	6,9	6,7	7,1	6,9	7,6	7,2
87	2,1	1,7	2,9	2,4	3,4	2,8	3,8	3,2

Para todos os ensaios realizados não foi evidenciado, nas amostras controle, nenhuma

possível contaminação durante todo o processo de análise ou de influências externas como, temperatura ambiente e intervalo de tempo entre o processamento e a análise, na inativação dos esporos.

Ainda na linha de observações dos ensaios de DCCR, chamou a atenção o aumento acentuado da inativação de esporos entre o início do aquecimento e o primeiro momento de coleta de amostra, sugerindo que durante o período necessário para atingir a temperatura desejada, já ocorra a inativação do micro-organismo ou alguma sensibilização desses esporos, que permita a diminuição da sua resistência já no início do processo. Um exemplo dessa condição está representada na Figura 10.

Figura 10. Média e Desvio Padrão de inativação de esporos de *B. coagulans* após o processamento por micro-ondas, no ponto central (89 °C, 125 W, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco e composição desses ácidos de 75% cítrico e 25% ascórbico do DCCR, para pasteurização da água de coco ($\log N_0 - \log$ número de esporos/mL de água de coco antes da exposição às micro-ondas. $\log N_t - \log$ número de esporos/mL de água de coco após o processamento. Linha tracejada: projeção de inativação de esporos do início do processo até a primeira coleta de amostra, para enumeração desse micro-organismo).

4.4. Comparação entre o aquecimento por micro-ondas e o por condução

A Figura 11 apresenta as médias de inativação e o desvio padrão para a comparação entre os dois tipos de aquecimento.

Figura 11. Média e Desvio Padrão de inativação de esporos de *B. coagulans* após o processo de pasteurização da água de coco por micro-ondas e manta aquecedora, em 4 momentos distintos de coleta de amostras (5, 10, 15 e 20 minutos) ($\log N_0$ – log número de esporos/ mL de água de coco antes da exposição às micro-ondas. $\log N_t$ – log número de esporos/ mL de água de coco após o processamento. MO – média da inativação de esporos por micro-ondas. M – média de inativação de esporos por manta aquecedora).

Foi realizado o teste de homogeneidade (APÊNDICE C) seguido pelo teste ANOVA (Tabela 7). Nas condições em que o experimento foi realizado, verificou-se na faixa analisada, que o aquecimento convencional (média de inativação 3,7 log número de esporos/mL) foi melhor do que o por micro-ondas (média de inativação 3,0 log número de esporos/mL) com $p < 0,05$. Contudo, essa diferença não é considerada no presente estudo, tendo em vista que se trabalha com seres vivos (esporos de bactérias). Não foi observada interação entre o tipo de equipamento (micro-ondas ou manta térmica) e o tempo de aquecimento ($p > 0,05$).

Tabela 7. Análise de variância de dois fatores (equipamento e tempo) para inativação dos esporos de *B. coagulans*, inoculados em água de coco, processada por micro-ondas e manta térmica, nas condições de 89°C, 75 mg de ácidos adicionados à água de coco, composição dos ácidos de 25% ascórbico e 75% cítrico e potência efetiva de 125 W, com 95% de confiança.

Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
F1 = equipamentos	4,80	1,00	4,80	43,39	0,00	4,26
F2 = tempo	12,81	3,00	4,27	38,61	0,00	3,01
F1xF2	0,75	3,00	0,25	2,27	0,11	3,01
Resto	2,65	24,00	0,11			
Total	21,02	31,00				

Quanto ao tempo de aquecimento necessário para atingir o maior nível de inativação térmica dos esporos testados, pode-se inferir que, 10 ou 15 minutos na temperatura estabelecida sejam suficientes, conforme observado no teste de comparação entre as médias de reduções logarítmicas do micro-organismo com o tempo de processo. Nota-se ainda que com 5 minutos foi verificado o menor nível de inativação e foi diferente de todos os demais tempos de processo (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de Tukey com 95% de confiança entre os tempos analisados para inativação dos esporos de *B. coagulans*, inoculados em água de coco, processada por micro-ondas e manta térmica (n=8).

Tempo (min)	Média (log esporos/ml de água de coco)	Agrupamento
20	4,0	a
15	3,8	ab
10	3,3	b
5	2,3	c

5. DISCUSSÃO

5.1. Processamento da água de coco por micro-ondas – análise de DCCR

A acidificação de alimentos de baixa acidez é utilizada para garantir que esses se mantenham microbiologicamente seguros após o processamento térmico. O tipo de ácido utilizado deve interferir o mínimo possível na palatabilidade e ser estável após o tratamento térmico. Na presente pesquisa, a quantidade de ácidos adicionada e a combinação desses apresentou diferença significativa apenas para o tempo de 5 minutos de processamento por micro-ondas da água de coco. Pode-se inferir que a influência das variáveis - quantidade de ácidos e a sua combinação - foi limitada devido à estreita faixa de pH estabelecida pela legislação brasileira (4,3 - 4,5) (BRASIL, 2009b). Palop et al. (1997) concluíram que em água peptonada, o ácido cítrico possibilitou maior inativação de esporos de *B. coagulans* do que o ácido láctico em processos à baixa temperatura e curto tempo (100°C/10s). Já em emulsão de salsicha, o ácido láctico foi mais eficiente na inativação desse micro-organismo do que o ácido cítrico, mas além do meio ser diferente, as condições térmicas aplicadas foram mais severas (110°C/2,5 a 6 min) (LYNCH; POTTER, 1988).

No uso do equipamento de micro-ondas pode-se variar a potência do equipamento e a temperatura. Contudo, a variação da potência pode ficar limitada, dependendo do meio em que as micro-ondas são aplicadas uma vez que o comportamento das ondas eletromagnéticas é bastante complexo. Sabe-se que o efeito do campo eletromagnético é influenciado por vários

fatores, entre eles a composição do meio, o volume de amostra, o tempo de aquecimento, a distribuição do campo eletromagnético na cavidade de reação e a perda de energia para controlar a temperatura. No presente estudo constatou-se a limitação do valor da potência pois o objetivo era atingir determinada temperatura. Verificou-se que a variação da potência (na faixa de 10 W) ficou abaixo do erro experimental de medição do equipamento (~50 W) o que, provavelmente influenciou no resultado, pois a potência não apresentou diferença significativa aos 15 e 20 minutos de processo. Já nas situações em que houve diferença, o efeito observado foi negativo.

É possível inferir que aplicando potência em níveis mais altos, sem controle de temperatura, poderia ser observado maior efetividade dessa variável no processo. Além disso, o tempo de pasteurização poderia ser menor e a bebida disponibilizada apresentaria menores perdas. Rougier et al. (2014) expuseram células de *E. coli* às micro-ondas e só observaram danos à membrana quando a potência foi superior a 200 W e o aumento desses danos só foi observado até 400 W. Fato semelhante não pode ser constatado nesta pesquisa uma vez que os valores de potência empregados foram de 115 e 135 W, apenas. Como a elevação da potência eleva a temperatura rapidamente, ultrapassando o limite determinado, não foi possível testar valores maiores de potência.

Quanto à observação da aparente inativação dos esporos durante o período de aumento da temperatura até o valor desejado, Daryaei e Balasubramaniam (2013) já constataram a significância dessa fase para os esporos de *B. coagulans* inoculados em suco de tomate assim como Wang et al. (2009) em leite submetido a tratamento com alta pressão. Esses dados são relevantes pois corroboram com o observado no presente estudo no qual a manutenção da temperatura em um patamar não foi o fator determinante para a inativação desse micro-organismo e sim a etapa de aquecimento.

Foi observado durante o processamento da água de coco à temperatura de 95°C, que o tempo de 5 minutos foi suficiente para atingir a inativação necessária (5 log número de esporos/ mL) (APÊNDICE B). Nos demais tempos (10 min, 15 min e 20 min), as medidas de redução de esporos viáveis permaneceram praticamente no mesmo nível, isto é, não houve maior redução. Ainda assim, esse tempo de 5 min pode ser considerado alto vindo a causar perdas nutricionais e sensoriais ao alimento. Wang et al. (2009) observaram que em leite submetido à alta pressão, houve uma rápida inativação de esporos de *B. coagulans* no tempo de 150 s, enquanto que tempos de retenção mais longos, até 30 min, apresentaram efeito limitado em todos os níveis de pressão e temperatura avaliados, corroborando com o observado na presente pesquisa.

A comparação entre o tratamento por micro-ondas e o tratamento térmico convencional não evidenciou diferenças, nas condições avaliadas. A letalidade, nos dois processos empregados, ocorreu devido ao aquecimento da amostra. Apesar dos estudos já realizados, o efeito não térmico das micro-ondas na inativação de micro-organismos ainda não foi comprovado. Alguns autores obtiveram resultados melhores no tratamento de alimentos por micro-ondas do que com o tratamento térmico convencional, sem contudo conseguirem segregar os efeitos térmicos dos não-térmicos ou afirmar que os resultados obtidos foram em razão da presença de um ou de outro (TAJCHAKAVIT, RAMASWAMY; FUSTIER, 1998; LAU e TANG, 2002; LIN e RAMASWAMY, 2011; BENLLOCH-TINOCO et al., 2014). Ademais, as pesquisas realizadas com micro-ondas utilizam condições variadas, entre elas o modelo do equipamento, as propriedades dielétricas do alimento, a quantidade de amostra processada, o micro-organismo, o desenho do recipiente onde ocorrerá o processo, de tal maneira que é difícil estabelecer uma comparação entre os ensaios.

5.2. Desafios do trabalho com micro-ondas

O equipamento de micro-ondas utilizado não tinha sido projetado para processar alimentos por isso foi necessário fazer adaptações que permitissem realizar os ensaios nas condições propostas. Por exemplo, foi preciso acoplar um aparelho que desviasse parte da potência gerada pelo equipamento, visto que sua utilização foi inferior a 10% da capacidade total do gerador, que é considerado o mínimo que pode ser enviado ao sistema.

Outro desafio foi o controle da temperatura, pois o equipamento só permitia o ajuste da potência. Para sanar esse problema, foi acrescentado ao sistema uma serpentina que possibilitasse a circulação de um fluido refrigerado. A serpentina e o fluido precisavam ser de material que não absorvesse as micro-ondas, razão pela qual optou-se por mangueira de polipropileno e querosene. Outro controle necessário foi em relação à vazão do fluido para manter a temperatura na faixa requerida durante todo o processo. Mesmo com essas adaptações, vários problemas ocorreram durante o desenvolvimento da pesquisa e são pontuados a seguir:

1. Falta de ajuste de temperatura: primeiro foi preciso definir qual faixa de potência permitia o controle das temperaturas a serem testadas. Além disso, a agitação precisava estar acima de 150 rpm e, em alguns momentos, foi necessário resfriar a cavidade entre um ensaio e outro. As mangueiras precisavam ser checadas antes de cada ensaio para averiguar se havia alguma obstrução pois, após o início do processo,

não era possível recomeçar e assim a amostra de água de coco inoculada com esporos de *B. coagulans* seria perdida.

2. Aspectos relacionados à água de coco: as amostras da bebida deviam apresentar o mesmo pH: para isso os frutos deviam ser provenientes da mesma região e serem jovens (aproximadamente 2 meses), pois ao longo do tempo esse parâmetro se eleva, além da modificação dos teores de açúcar, que altera a quantidade de energia absorvida pelo alimento e consequentemente muda o perfil de aquecimento, o que não é interessante para a validação do processo.

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos e na discussão realizada, pode-se concluir que:

- o tratamento da água de coco por micro-ondas possibilitou a pasteurização desse alimento, uma vez que a redução de 5 ciclos log na população de *B. coagulans* foi atingida. Além disso, essa condição associada à redução de pH garante a segurança microbiológica da bebida.

- a temperatura foi a variável que mais influenciou na inativação dos esporos de *B. coagulans* inoculados na água de coco.

- o tempo total despendido no processo – entre 20 e 30 minutos – foi considerado longo. Outros estudos serão necessários para definir outras condições em que seja possível reduzir esse tempo.

- o tratamento por micro-ondas e o térmico convencional não apresentaram diferenças significativas na inativação dos esporos bacterianos estudados.

Mesmo com todos os estudos já realizados não foi possível concluir se o emprego de micro-ondas é tão ou mais eficiente do que o emprego do tratamento térmico convencional por ser a gama de variáveis que influenciam no processo tão ampla que pode tornar inviável uma conclusão sobre o uso dessa tecnologia para alimentos. Cada trabalho de pesquisa tem seu próprio desenvolvimento e chega a conclusões diferentes dificultando a avaliação do processo do ponto de vista sensorial, microbiológico e econômico.

Tendo em vista os aspectos observados sugere-se para os próximos trabalhos de pesquisa:

- Realizar o processamento de água de coco em equipamento de micro-ondas com fluxo contínuo.

- Estudar o processo térmico da água de coco avaliando a influência da potência

aplicada ao sistema, sem controle de temperatura. Não será possível a comparação com o aquecimento convencional, mas poderá apresentar resultados diferentes dos observados neste trabalho e com menor tempo de processo.

- Avaliar a qualidade sensorial e aspectos nutricionais da água de coco após o processamento e sua vida de prateleira.

- Avaliar a estrutura da membrana do esporo antes e após o aquecimento por micro-ondas e aquecimento convencional, que permita observar se há alterações que, por exemplo, tornam os esporos menos resistentes ao aquecimento.

- Realizar a avaliação de custo do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.8, de 6 de março de 2013**. Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0008_06_03_2013.pdf. Acesso em: 20 set. 2016.

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

ARAGÃO, W.M. Cultivares de coqueiro. In: FONTES, H.R.; FERREIRA, J.M.S.; SIQUEIRA, L.A., orgs. **Sistema de produção para a cultura do coqueiro**. Aracajú: Embrapa, Tabuleiros Costeiros, 2002. Cap.5, p.16-19.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1995. 299p.

BENASSI, A.C.; RUGGIERO, C.; MARTINS, A.B.G.; SILVA, J.A.A. Caracterização biométrica de frutos de coqueiro, *Vocos nucifera* L. variedade anã-verde, em diferentes estádios de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.2, p.302–307, 2007.

BENLLOCH-TINOCO, M.; PINA-PÉREZ, M.C.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; RODRIGO, D. *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics under microwave and conventional thermal processing in a kiwifruit puree. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.22, p.131–136, 2014.

BERGEY, D.H.; BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N. E., eds. **Bergey`s manual of determinative bacteriology**. 8.ed. Baltimore: The Williams e Wilkins, 1974. 967p.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto n.6.871, de 4 de junho de 2009a**. Regulamenta a Lei n.8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm. Acesso em: 20 set. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.27, de 22 de Julho de 2009b**. Aprova o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade da água de coco. Disponível em: <http://www.ivegetal.com.br/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Referenciada/IN%20N%C2%BA%2027%20de%2022%20de%20julho%20de%202009.htm>. Acesso em: 20 set. 2016.

BRINLEY, T.A.; DOCK, C.N.; TRUONG, V.D.; CORONEL, P.; KUMAR, P.; SIMUNOVIC, J.; SANDEEP, K.P.; CARTWRIGHT, G.D.; SWARTZEL, K.R.; JAYKUS, L.A. Feasibility of utilizing bioindicators for testing microbial inactivation in sweetpotato purees processed with a continuous-flow microwave system. **Journal of Food Science**, v.72, n.5, p.E235-E242, 2007.

BUFFLER, C.R. Introduction to microwaves. In: BUFFLER, C.R. **Microwave cooking and processing: engineering fundamentals for food scientist**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. cap.1, p.1-13.

DARYAEI, H.; BALASUBRAMANIAM, V.M. Kinetics of *Bacillus coagulans* spore inactivation in tomato juice by combined pressure heat treatment. **Food Control**, v.30, p.168-175, 2013.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.3, p.241-247, 2011.

DECAREU, R.V. **Microwave foods: new product development**. Trumbull: Food & Nutrition Press, 1992. 213p. (Publications in food science and nutrition).

DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

FOALE, M.; HARRIES, H. Farm and forestry production and marketing profile for coconut (*Cocos nucifera*). In ELEVITCH, C.R., ed. **Specialty crops for pacific islands agroforestry**. Holwaloa: Permanent Agriculture Resources (PAR), 2011.

FONSECA, A.M.; BIZERRA, A.M.C.; SOUZA, J.S.N.; MONTE, F.J.Q.; OLIVEIRA, M.C.F.; MATTOS, M.C.; CORDELL, G.A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T.L.G. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1B, p.193-198, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION. **Food and agricultural commodities production**. FAO 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 10 jul. 2015.

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

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

HAMMER, B.W. **Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk**. Iowa: Agricultural Experiment Station: Iowa State College of Agriculture and Mechanic Arts, 1915. 16p. (Research bulletin, n.19).

HEDDLESON, R.A.; DOORES, S. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens – a review. **Journal of Food Protection**, v.57, n.11, p.1025-1037, 1994.

JERMOLOVICIUS, L. A.; POUZADA, E. V. S.; NASCIMENTO, R. B.; STEFANELLI, A. R.; CASTRO, E. R.; FEJFAR, J. L.; SENISE, J. T. Síntese da aspirina com micro-ondas: aceleração da reação por efeito não térmico de micro-ondas. In: SBMO – SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICRO-ONDAS E OPTOELETRÔNICA: MOMAG, 16.; CONGRESSO BRASILEIRO E ELETROMAGNETISMO, CBMag, 11., Curitiba, 2014. Curitiba, 2014.

LAU, M.H.; TANG, J. Pasteurization of pickled asparagus using 915 MHz microwaves. **Journal of Food Engineering**, v.51, p.283-290, 2002.

LIMA, S.A.J. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial da água de coco anão verde comercializadas pelas indústrias do sertão da Paraíba e do Ceará**. Pombal, 2013. 126p. Dissertação de Mestrado - Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar - Universidade Federal de Campina Grande.

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

LOIOLA, C.M. **Comportamento de cultivares de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) em diferentes condições agroecológicas dos tabuleiros costeiros do nordeste brasileiro**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2009. 74p.

LOUPY, A., ed. **Microwaves in organic synthesis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 517p. (Green chemistry).

LOUREIRO, M. **Mercado de água de coco já supera o de bebidas energéticas no país: Ducoco e Sococo ampliam produção para ganhar participação num segmento de 65 milhões de litros**. 2012. Disponível em: <http://economia.ig.com.br/empresas/2012-08-20/mercado-de-agua-de-coco-ja-supera-o-de-bebidas-energeticas-no-pais.html>. Acesso em: 10 jul. 2015.

LYNCH, D.J.; POTTER, N.N. Effects of organic acids on thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus coagulans* spores in frankfurter emulsion slurry. **Journal of Food Protection**, v.51, n.6, p.475-480, 1988.

MATINS, C.R.; JÚNIOR, L.A.J. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 28p. (Documentos, 164).

MATSUI, K.N. **Inativação das enzimas presentes na água de coco verde (*Cocos nucifera* L.) por processo térmico através de microondas.** São Paulo, 2006. 123p. Tese – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.

MEDINA, J.C. Coco I: cultura. In: MEDINA, J.C.; GARCIA, J.L.M.; MARTIN, Z.J.; KATO, K.; TERUO, P.; TURATTI, J.M.; SANTOS, L.C.; SILVA, M.T.C.; CANTO, W.L.; BICUDO NETO, L.C.; MORETTI, V.A., eds. **Coco: da cultura ao processamento e comercialização.** Campinas: ITAL, 1980. 285p. (Série Frutas Tropicais, 5).

MUDGETT, R. Electromagnetic energy and food processing. **Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy**, v.23, n.4, p.225-230, 1988.

MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C. **Response surface methodology: product and process optimization using designed experiments.** 2.ed. New York: John Wiley, 2002. 836p.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTOS. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO.** 4.ed. Campinas: Universidade de Campinas, 2011. 161p.

PALOP, A.; MARCO, A.; RASO, J.; SALA, F.J.; CONDÓN, S. Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, n.1, p.25–30, 1997.

PALOP, A.; RASO, J.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; SALA, F.J. Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, n.3, p.243–249, 1999.

PASSOS, E.E.M. Exigências climáticas do coqueiro. In: FONTES, H.R.; FERREIRA, J.M.S.; SIQUEIRA, L.A., orgs. **Sistema de produção para a cultura do coqueiro.** Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. cap.2, p.9-10.

PINA-PÉREZ, M.C.P.; BENLLOCH-TINOCO, M.; RODRIGO, D.; MARTINEZ, A. *Cronobacter sakazakii* inactivation by microwave processing. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, n.3, p.821–828, 2014.

ROLLE, R. **Good practice for the small-scale production of bottled coconut water.** Roma: Food and Agriculture Organization of United Nation, 2007. 35p. (Agricultural and food engineering training and resource materials, 1).

ROSA, M.F.; ABREU, F.A.P. **Água de coco: métodos de conservação.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 25p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, n.37).

ROUGIER, C.; PROROT, A.; CHAZAL, P.; LEVEQUE, P.; LEPRAT, P. Thermal and nonthermal effects of discontinuous microwave exposure (2.45 gigahertz) on the cell

membrane of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.16, p.4832-4841, 2014.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C.S.; MARTÍN-GONZÁLEZ, M.F.S.; SOSA-MORALES, A.L.M. Recent studies related to microwave processing of fluid foods. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, n.1, p.31–46, 2012.

SANTOSO, U.; KUBO, K.; OTA, T.; TADOKORO, T.; MAEKAWA, A. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chemistry**, v.57, n.2, p.299–304, 1996.

STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing**. New York: Academic Press, 1970. 329p.

TAJCHAKAVIT, S.; RAMASWAMY, H.S.; FUSTIER, P. Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. **Food Research International**, v.31, n.10, p.713-722, 1998.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Food. Guidance & Regulation. Guidance Documents & Regulatory Information by Topic. Juice. **Guidance for Industry Juice HACCP Hazards and Controls Guidance**. 2004. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm072557.htm>. Acesso em: 20 set. 2016.

WANG, B.S. Inactivation kinetics and reduction of *Bacillus coagulans* spore by the combination of high pressure and moderate heat. **Journal of Food Process Engineering**, v.32, p.692–708, 2009.

WANG, J.C.; HU, S.H.; LIN, C.Y. Lethal effect of microwaves on spores of *Bacillus* spp. **Journal of Food Protection**, v.66, n.4, p.604–609, 2003.

APÊNDICE A

Resultados do processamento da água de coco (ao natural e com adição de ácidos) por micro-ondas e banho termostático utilizando *Geobacillus stearothermophilus* como indicador biológico do processo

Figura 1: Inativação térmica de esporos de *G. stearothermophilus* (10^6 - 10^7 log número de esporos/mL) em amostras de água de coco (ao natural - pH 5,09; acidificada – pH 4,48) processadas por micro-ondas com potência de 600 W, e temperatura de 98°C.

Figura 2: Inativação térmica de esporos de *G. stearothermophilus* em amostras de água de coco (ao natural - pH 5,14; acidificada – pH 4,48) aquecidas em banho termo-estático, com concentração inicial de 10^7 e 10^6 número de esporos/ mL, respectivamente, a temperatura de 98°C.

APÊNDICE B

Observações dos delineamentos experimentais – Simplex e DCCR

Método Simplex com 5 variáveis

Quadro 1: Descrição das variáveis e suas unidades no Método Simplex

	variável	unidade
Z₁ =	Temperatura	°C
Z₂ =	Qtde ácidos	mg
Z₃ =	[] combinações de ácidos	Cítrico%/ascórbico%
Z₄ =	Potência	W
Z₅ =	Tempo	min
Y =	Nº esporos sobreviventes	log número de esporos/mL

Quadro 2: Definição dos ensaios iniciais do Método Simplex e da região de ótimo

Teste	Z₁	Z₂	Z₃	Z₄	Z₅	Y
1	95	76	3,2	144	19	5,6
2	89	76	3,2	144	19	4,7
3	92	72	3,2	144	19	5,4
4	92	75	2,4	144	19	5,2
5	92	75	3,0	124	19	6,0
6	92	75	3,0	140	15	4,5

Condição de processamento na região considerada ótima:

Z₁^c	Z₂^c	Z₃^c	Z₄^c	Z₅^c
92	75,00	3,00	140,00	18,65

Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

Fatores: 4

Fatorial completo em dois níveis

Pontos únicos: 16

Pontos axiais: 8

Pontos cetrais: 4

Total de ensaios: 28

Alpha: 2

Tabela 1: Parâmetros de cada ensaio do DCCR e os resultados nos quatro tempos avaliados R1 (5 min), R2 (10 min), R3 (15 min) e R4 (20 min)

Testes	Temperatura (°C)	Quantidade total de ácidos (mg/100 mL)	Composição de ácidos (cit./asc.)	Potência (W)	R1 (5)	R2 (10)	R3 (15)	R4 (20)
1	86	74	2,5	120	0,9	2,0	2,8	3,7
2	86	74	2,5	130	3,4	4,6	4,8	5,3
3	86	74	3,5	120	0,7	1,9	2,6	3,2
4	86	74	3,5	130	5,2	6,3	6,2	6,5
5	86	76	2,5	120	1,1	2,4	2,9	3,2
6	86	76	2,5	130	4,9	5,9	6,4	6,3
7	86	76	3,5	120	0,9	1,9	2,5	3,0
8	86	76	3,5	130	4,4	6,1	6,1	6,3
9	92	74	2,5	120	0,5	1,1	1,8	2,7
10	92	74	2,5	130	3,8	4,5	4,7	4,7
11	92	74	3,5	120	1,9	3,2	3,4	3,8
12	92	74	3,5	130	3,4	3,6	3,7	3,8
13	92	76	2,5	120	1,1	2,3	3,0	3,8
14	92	76	2,5	130	2,0	3,9	4,7	4,4
15	92	76	3,5	120	0,5	1,2	2,2	2,7
16	92	76	3,5	130	4,6	5,7	5,9	7,0
17	83	75	3	125	0,2	0,5	0,9	1,1
18	95	75	3	125	5,6	6,9	7,1	7,6
19	89	73	3	125	1,8	3,3	4,1	4,6
20	89	77	3	125	1,6	2,9	3,8	3,8
21	89	75	2	125	2,3	3,9	4,6	4,6
22	89	75	4	125	1,4	2,5	2,9	3,2
23	89	75	3	115	1,8	3,3	4,2	4,4
24	89	75	3	135	3,6	4,3	4,7	5,3
C1	89	75	3	125	2,1	2,9	3,0	3,3
C2	89	75	3	125	1,8	3,4	3,9	4,1
C3	89	75	3	125	2,2	2,8	3,0	3,1
C4	89	75	3	125	2,5	3,0	3,2	3,1

*C1, C2, C3 e C4 correspondem ao ensaio no ponto central e suas repetições.

Quadro 3: Análise de variância com os resultados observados com 5 minutos de processo (R1)

	Grau de liberdade	SQ	QM	Fcalc	P(%)	Fcrit
A - Temperatura	1	36,149	36,149	433,787	>95,0	10,128
B – Qtde de ácidos	1	0,997	0,997	11,966	>95,0	
C – Composição dos ácidos	1	0,011	0,011	0,135		
D - Potência	1	0,908	0,908	10,899	>95,0	
AB	1	0,097	0,097	1,168		
AC	1	0,014	0,014	0,173		
AD	1	1,205	1,205	14,461	>95,0	
BC	1	0,097	0,097	1,168		
BD	1	0,237	0,237	2,844		
CD	1	0,370	0,370	4,445		
erro			0,083			
Total	11	45,155	4,105			

Quadro 4: Análise de variância com os resultados observados com 10 minutos de processo (R2)

	Grau de liberdade	SQ	QM	Fcalc	P(%)	Fcrit
A - Temperatura	1	37,843	37,843	547,132	>95,0	10,128
B – Qtde de ácidos	1	0,688	0,688	9,942		
C – Composição dos ácidos	1	0,361	0,361	5,223		
D - Potência	1	1,994	1,994	28,833	>95,0	
AB	1	0,372	0,372	5,374		
AC	1	0,600	0,600	8,680		
AD	1	1,491	1,491	21,555	>95,0	
BC	1	0,372	0,372	5,374		
BD	1	0,020	0,020	0,284		
CD	1	0,054	0,054	0,776		
erro			0,069			
Total	11	48,969	4,452			

Quadro 5: Análise de variância com os resultados observados com 15 minutos de processo (R2)

	Grau de liberdade	SQ	QM	Fcalc	P(%)	Fcrit
A - Temperatura	1	28,183	28,183	154,428	>95,0	10,128
B – Qtde de ácidos	1	0,130	0,130	0,710		
C – Composição dos ácidos	1	0,907	0,907	4,969		
D - Potência	1	1,474	1,474	8,077		
AB	1	0,274	0,274	1,502		
AC	1	0,913	0,913	5,001		
AD	1	1,040	1,040	5,698		
BC	1	0,274	0,274	1,502		
BD	1	0,023	0,023	0,125		
CD	1	0,025	0,025	0,138		
erro			0,182			
Total	11	36,555	3,323			

Quadro 6: Análise de variância com os resultados observados com 20 minutos de processo (R4)

	Grau de liberdade	SQ	QM	Fcalc	P(%)	Fcrit
A - Temperatura	1	20,834	20,834	91,914	>95,0	10,128
B – Qtde de ácidos	1	0,262	0,262	1,157		
C – Composição dos ácidos	1	0,574	0,574	2,534		
D - Potência	1	1,297	1,297	5,723		
AB	1	0,013	0,013	0,058		
AC	1	1,279	1,279	5,644		
AD	1	1,237	1,237	5,458		
BC	1	0,013	0,013	0,058		
BD	1	0,113	0,113	0,497		
CD	1	0,476	0,476	2,100		
erro			0,227			
Total	11	31,713	2,883			

Tabela 2: Efeito médio observado na análise do DCCR para as 4 variáveis independentes e em associação com dois níveis, nos 4 tempos de resposta avaliado.

Variáveis	Efeito médio			
	R1	R2	R3	R4
A	3,006	3,076	2,654	2,282
B	0,499	0,415	0,180	0,256
C	-0,053	0,301	0,476	0,379
D	-0,477	-0,706	-0,607	-0,569
AB	0,394	0,312	0,152	0,466
AC	0,060	0,387	0,478	0,566
AD	-0,549	-0,611	-0,510	-0,556
BC	-0,156	-0,305	-0,262	0,057
BD	0,243	0,070	0,076	0,168
CD	-0,304	-0,116	0,079	0,345

Variáveis: A – Temperatura; B – Quantidade de ácidos adicionados à água de coco; C – Composição dos ácidos; D – Potência. **Respostas:** R1 – 5 minutos; R2 - 10 minutos; R3 – 15 minutos; R4 – 20 minutos.

APÊNDICE C

Análises de Homogeneidade das variâncias

Tabela 1: Teste de homogeneidade de variâncias (Hartley) com 95% de confiança.

Homogeneidade variâncias entre grupos de maior e menor temperatura e com potência fixa em 120W			
Grupos	Variâncias	S² máx./S² mín.	Hartley
Grupo 1 - alta temperatura	0,85	1,02	2,9
Grupo 2 - baixa temperatura	0,86		

Tabela 2: Teste de homogeneidade de variâncias (Hartley) com 95% de confiança.

Homogeneidade variâncias entre grupos de maior e menor temperatura e com quantidade de ácidos fixa 76 mg			
Grupos	Variâncias	S² máx./S² mín.	Hartley
Grupo 1 - alta temperatura	0,58	1,40	3,5
Grupo 2 - baixa temperatura	0,81		

Tabela 3: Teste de homogeneidade de variâncias (Hartley) com 95% de confiança.

Homogeneidade variâncias entre grupos de maior e menor temperatura e com a mesma composição de ácidos 28,5% ascórbico e 71,5% cítrico			
Grupos	Variâncias	S² máx./S² mín.	Hartley
Grupo 1 - alta temperatura	0,62	1,31	3,5
Grupo 2 - baixa temperatura	0,81		

Tabela 4: Teste de homogeneidade de variâncias (Hartley) com 95% de confiança.

Homogeneidade variâncias para comparação entre micro-ondas e manta térmica em 4 tempos diferentes			
Equipamento/ Tempo	Variâncias	S² máx./S² mín.	Hartley
Manta 5`	0,16	16,5	83,5
Manta 10`	0,06		
Manta 15`	0,01		
Manta 20`	0,05		
Micro-ondas 5`	0,08		
Micro-ondas 10`	0,09		
Micro-ondas 15`	0,20		
Micro-ondas 20`	0,23		

*Os valores de referência são baseados nos valores F máximo de Hartley com nível de significância de 5%.