

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERNANDA CRISTINA PIMENTA

**Potencial da combinação de dióxido de carbono em estado supercrítico e  
temperaturas brandas na estabilização microbiológica e enzimática de caldo de cana**

---

Pirassununga

2023

FERNANDA CRISTINA PIMENTA

**Potencial da combinação de dióxido de carbono em estado supercrítico e temperaturas brandas na estabilização microbiológica e enzimática de caldo de cana**

(Versão corrigida)

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

Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus

---

Pirassununga

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P644p Pimenta, Fernanda Cristina  
Potencial da combinação de dióxido de carbono em estado supercrítico e temperaturas brandas na estabilização microbiológica e enzimática de caldo de c / Fernanda Cristina Pimentá ; orientador Rodrigo Rodrigues Petrus . -- Pirassununga, 2023.  
62 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Tecnologia de barreiras . 2. Bebida não alcoólica . 3. Tecnologias emergentes . 4. Delineamento fatorial . I. Petrus , Rodrigo Rodrigues , orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a nossa Senhora Aparecida, por terem me dado forças para vencer os desafios na vida pessoal e acadêmica durante os últimos anos;

Aos meus pais, Cida e Pedro, por acreditarem em mim e nos meus sonhos.

Ao meu irmão Giovani, pelo carinho e apoio.

Ao meu amor Carlos Augusto, pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis da minha trajetória.

Às minhas cunhadas Ana e Cristina, e à minha prima Silvia, pelo carinho e torcida rumo ao meu sucesso!

Às minhas amigas Natália e Priscila, companheiras de curso e moradia.

Aos meus tios e padrinhos Rosilene e João, pelo acolhimento, apoio e orações.

Ao povo brasileiro, que ajudou a financiar meu projeto.

Ao professor Doutor Rodrigo Petrus, por me orientar com dedicação durante todo o mestrado.

À professora Alessandra Lopes de Oliveira, pela disponibilização do Laboratório de Tecnologia à Alta pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP.

Aos técnicos Fábio, Nilson e Marcelo, por auxiliarem na parte laboratorial.

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), por permitir a minha integração a esta instituição almejada e prestigiada.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2020/08011-5) pelo financiamento concedido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

PIMENTA, F. C. **Potencial da combinação de dióxido de carbono em estado supercrítico e temperaturas brandas na estabilização microbiológica e enzimática de caldo de cana.** 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

O caldo de cana é uma bebida nutritiva, energética e muito popular no Brasil. No que tange às tecnologias de processamento, o emprego de dióxido de carbono em estado supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) tem o potencial para assegurar a obtenção de produtos de elevada qualidade. O presente trabalho visou, primariamente, à avaliação de desempenho da aplicação combinada de SC-CO<sub>2</sub> e temperaturas brandas na inativação de micro-organismos e enzimas atuantes na degradação de caldo de cana (pH~5,5). Pressões (P) na faixa de 74 a 351 bar, temperaturas (T) entre 33 e 67 °C, e tempos de exposição (t) entre 20 e 70 min foram testados, em um delineamento composto central rotacional. Dezesete ensaios foram realizados, incluindo três repetições no ponto central. Contagens de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, bactérias lácticas e coliformes a 45 °C, determinação das atividades de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), e análise de fatores de cor em amostras de caldo de cana *in natura* e processada foram realizadas. O pH do caldo *in natura* e processado variou entre 4,6 e 6,0, e entre 4,6 e 6,3, respectivamente. O número de reduções decimais na população de mesófilos, bolores e leveduras, bactérias lácticas e coliformes variou entre 0,1 e 3,9; 2,1 e 4,1; 0,0 e 2,1 e 0,3 a 2,5, respectivamente. As porcentagens de redução de atividade de PPO variaram entre 3,51% e 64,18%. Relativamente à POD, obtiveram-se reduções entre 0,27% e 41,42%. As variações na cor entre as amostras *in natura* e processada oscilaram entre 2,0 e 12,3. Quanto à redução de mesófilos, bolores e leveduras e variação de sólidos solúveis, nenhuma das variáveis ou suas interações foram significativas. Em termos de redução da PPO, apenas t foi significativo; entretanto, T, t e a interação entre eles afetaram significativamente a redução da POD. Em relação à variação do pH, P e a interação entre T e t foram significativas. P, T, t e a interação entre T e t tiveram um efeito significativo na diferença total de cor (entre o caldo *in natura* e tratado). Concluiu-se que a aplicação combinada e otimizada de SC-CO<sub>2</sub> com temperaturas brandas tem potencial para alcançar a estabilização microbiológica e enzimática do caldo de cana.

**Palavras-chave:** Tecnologia de barreiras. Bebida não alcoólica. Tecnologias emergentes. Delineamento fatorial.

## ABSTRACT

PIMENTA, F. C. **Potential of supercritical carbon dioxide and mild temperature combinations in the microbiological and enzymic stabilization of sugarcane juice.** 2023. 65 f. Thesis (Master's Degree) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

Sugarcane juice is a nutritious and energetic drink and very popular in Brazil. For its processing, the use of supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) technology as an intervention potentially capable of rendering a high quality product can be considered. This study evaluated the combined effect of SC-CO<sub>2</sub> and mild temperatures, primarily aiming for the reduction of endogenous microorganisms and enzymes in sugarcane juice (pH~5.5). Pressures (P) ranging from 74 to 351 bar, temperatures (T) between 33 and 67 °C, and holding times (t) between 20 and 70 min were tested in a central composite rotational design. Seventeen trials were performed, comprising three replicates at the central points. Counts of aerobic mesophiles, molds and yeasts, lactic acid bacteria and coliforms at 45 °C, determination of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) activities, and measurement of color parameters in freshly extracted and processed juice's samples were carried out. The pH of fresh and processed juice varied between 4.6 and 6.0, and between 4.6 and 6.3, respectively. The number of decimal reductions achieved in mesophiles, molds and yeasts, lactic acid bacteria and coliforms varied between 0.1 and 3.9, 2.1 and 4.1, 0.0 and 2.1, and 0.3 to 2.5, respectively. The percentages of PPO reduction ranged from 3.51% to 64.18%. Regarding the POD, reductions between 0.27% and 41.42% were obtained. Color variations between fresh and processed samples varied between 2.0 and 12.3. As for mesophiles, molds and yeasts reduction, and soluble solids variation, none of the variables or their interactions were significant. In terms of polyphenol oxidase (PPO) reduction, only t was significant; however, T, t, and the interaction between them significantly affected the peroxidase (POD) reduction. In regards to pH variation, P, and the interaction between T and t were significant. P, T, t, and the interaction between T and t played a significant effect on color. The combination of mild temperatures and SC-CO<sub>2</sub> can be potentially used for cane juice preservation.

**Keywords:** Hurdle technology. Non-alcoholic beverage. Emerging technologies. Factorial design.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de pressão e temperatura e os equilíbrios entre as fases sólida, líquida e gasosa .....	18
Figura 2 - Imagens do Equipamento de SC-CO <sub>2</sub> .....	23
Figura 3 - Diagrama de fluxo do CO <sub>2</sub> durante o tratamento do caldo de cana .....	24
Figura 4 - Diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) entre o caldo de cana in natura e processado com SC-CO <sub>2</sub> .....	42
Figura 5 - Diagramas de Pareto para caldo de cana tratado com SC-CO <sub>2</sub> .....	46
Figura 6 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para redução de POD (peroxidase reduction) e diferença total de cor (total color difference) em caldo de cana tratado com SC-CO <sub>2</sub> .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores reais e codificados para as variáveis testadas no tratamento do caldo de cana com SC-CO <sub>2</sub> .....	24
Tabela 2 - Matriz de delineamento fatorial .....	25
Tabela 3 - Valores de pH e sólidos solúveis do caldo de cana in natura e tratado com SC-CO <sub>2</sub> .....	30
Tabela 4 - Atividades (U) de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) em caldo de cana in natura e tratado com SC-CO <sub>2</sub> .....	32
Tabela 5 - Contagens (log UFC/mL) em caldo de cana in natura e tratado com dióxido de carbono em estado supercrítico .....	35
Tabela 6 - Parâmetros de cor determinados no caldo de cana in natura e tratado com SC-CO <sub>2</sub> .....	39
Tabela 7 - Matriz completa do experimento com caldo de cana tratado com SC-CO <sub>2</sub> .....	44
Tabela 8 - Análise de variância ( $p \leq 0,1$ ) para redução de peroxidase e diferença de cor total no caldo de cana .....	48
Tabela 9 - Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para validação do modelo para predição da redução de <b>peroxidase</b> .....	51
Tabela 10 - Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para validação dos modelos para predição da <b>diferença total de cor</b> .....	51
Tabela 11 - Resultados preditos e experimentais .....	52
Tabela 12 - Dados obtidos no tratamento de caldo de cana com CO <sub>2</sub> abaixo do ponto crítico .....	53



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	13
2.1	CENÁRIO PRODUTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL	13
2.2	CARACTERIZAÇÃO DO CALDO DE CANA	13
2.3	MECANISMOS DE DEGRADAÇÃO	14
2.4	TECNOLOGIAS PARA ESTABILIZAÇÃO DO CALDO DE CANA	16
2.5.1	Dióxido de carbono em estado supercrítico	17
2.5.1.1	Efeito na inativação de microrganismos	18
2.5.1.2	Influência na cor	19
2.5.1.3	Inativação de enzimas	19
2.5.1.4	Alterações sensoriais	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	21
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
4.1	PROCESSAMENTO	22
4.1.1	<b>Obtenção do caldo de cana</b>	22
4.1.2	<b>Tratamento com SC-CO<sub>2</sub></b>	22
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
4.3	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO	26
4.3.1	<b>Caracterização físico-química</b>	27
4.3.2	<b>Testes enzimáticos</b>	27
4.3.3	<b>Ensaio microbiológicos</b>	27
4.3.3.1	Contagem de aeróbios mesófilos	27
4.3.3.2	<i>Bolores e leveduras</i>	27
4.3.3.3	Bactérias lácticas	28
4.3.3.4	Coliformes a 45 °C	28
4.3.4	<b>Análise instrumental de cor</b>	28
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	29
5.1	DADOS DOS TESTES FÍSICO-QUÍMICOS	29
5.2	TESTES ENZIMÁTICOS	32
5.3	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	35
5.4	ANÁLISE INSTRUMENTAL DE COR	39
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	45
<b>6</b>	<b>VALIDAÇÃO DOS MODELOS PREDITIVOS</b>	51
<b>7</b>	<b>TRATAMENTO ABAIXO DO PONTO CRÍTICO</b>	52

<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS .....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O caldo de cana, largamente consumido e popular no Brasil, é caracterizado como um líquido de coloração parda a verde escura, de baixa acidez (pH 4,7-5,5), elevada atividade de água ( $A_w \sim 0,99$ ), possuindo composição variável em função da variedade, do cultivar, do estágio de maturação, do solo, das condições climáticas e agrícolas, com limitado tempo de vida útil devido à sua rápida deterioração enzimática e microbiológica (OLIVEIRA et al., 2007; PRADO; BERGAMINI, 2010; SANKHLA et al., 2012).

O caldo de cana destinado ao consumo final, processado em plantas industriais, é submetido ao tratamento térmico com intuito de inativar enzimas, microrganismos deteriorantes e potencialmente patogênicos, o que propicia o aumento do tempo de vida útil do produto. Entretanto, o tratamento térmico, dependendo de sua intensidade, pode causar danos à qualidade sensorial, funcional e nutricional da bebida (SILVA; MEIRELES; SALDAÑA, 2020). Durante a extração, o caldo de cana é exposto ao oxigênio, que é um reagente para o escurecimento enzimático, catalisado pelas enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD). Por conseguinte, a inativação enzimática garante uma maior qualidade ao produto (OLIVEIRA, 2007). Ademais, é necessário a destruição de microrganismos deteriorantes, como *Leuconostoc mesenteroides*, bolores e leveduras, sendo a primeira produtora de ácido lático e promotora de mudanças na viscosidade do caldo durante a estocagem (KOHLI et al., 2019).

A crescente industrialização do caldo de cana para consumo direto é notória no Brasil. Na última década, registrou-se, informalmente, o lançamento de mais de uma dezena de marcas da bebida processada no mercado nacional. As tecnologias de conservação aplicadas abrangem a acidificação, adição de conservadores químicos, tratamento térmico e refrigeração, variando entre as diferentes marcas. Entretanto, a qualidade sensorial do produto disponível no mercado é questionável.

Alternativamente ao tratamento térmico, a tecnologia que emprega o dióxido de carbono em estado supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) é uma intervenção promissora para inativar enzimas e microrganismos patogênicos e deteriorantes. Essa técnica não térmica consiste na exposição da matriz alimentícia a altas pressões, sendo que a vantagem principal é a proteção dos atributos de qualidade (SILVA, 2011), diferente dos tratamentos térmicos convencionais que potencialmente promovem danos colaterais ao produto.

Fluidos supercríticos são definidos como qualquer substância mantida acima da sua temperatura e pressão críticas. A temperatura crítica é a temperatura mais alta na qual um gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica

é a pressão mais elevada na qual um líquido por ser convertido a gás pelo aumento da temperatura do líquido. Acima da pressão e temperatura críticas, o fluido (altamente denso) é denominado supercrítico (ARAÚJO, 2004). No tratamento com SC-CO<sub>2</sub>, o alimento é exposto ao CO<sub>2</sub> pressurizado por um determinado período de tempo. O fluido em estado supercrítico difunde através do alimento, produzindo um efeito microbicida, cuja intensidade depende da pressão e do tempo de exposição (KARAMAN; ERKMEN, 2001; ZHANG et al., 2006; FERRENTINO et al., 2010;). De acordo com Santos et al. (2012), a temperatura e pressão que caracterizam o ponto crítico do dióxido de carbono são 31,1 °C e 73,8 bar. Silva (2011) reportou a utilização de SC-CO<sub>2</sub> na inativação de enzimas e microrganismos deteriorantes em suco de laranja. Naquele trabalho, constatou-se que a inativação microbiana foi mais efetiva quanto mais elevada a pressão a qual o suco foi exposto. A faixa de pressão estudada variou de 80 a 160 Bar, mais estreita comparada a investigada no presente estudo (74-351 bar). Oulé, Dickman e Arul (2013) processaram suco de laranja com SC-CO<sub>2</sub>; todos os microrganismos foram inativados, e nos testes sensoriais os provadores não perceberam diferenças entre o produto recém-extraído e o que havia sido exposto ao tratamento. Ademais, 88% da vitamina C existente no produto original foi preservada. O SC-CO<sub>2</sub> vem sendo investigado como uma alternativa ao tratamento térmico, mostrando-se eficiente na inativação de microrganismos e enzimas. Destacam-se a sua baixa toxicidade e baixo custo, já que o CO<sub>2</sub> é naturalmente encontrado na atmosfera (SILVA; MEIRELES; SALDAÑA, 2020). A utilização do SC-CO<sub>2</sub> sob condições brandas é uma técnica que quando utilizada em sucos permite a maior preservação de constituintes termicamente instáveis, como compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas (JIMÉNEZ-SÁNCHEZ et al., 2017a). Diversos estudos abordam a aplicação de SC-CO<sub>2</sub> na inativação de enzimas e microrganismos em sucos de fruta, incluindo suco de laranja (TSUJI; SATO; KOMIYAMA, 2005; GUI et al., 2006; BAE et al., 2009; GUO et al., 2011; OULE; DICKMAN; ARUL, 2013; IFTIKHAR; WAGNER; RIZVI, 2014; ORTUNO; BALABAN; BENEDITO, 2014; MARSZALEK, 2015; MARSZALEK, 2017; SILVA; MEIRELES; SALDANÃ, 2020). Entretanto, nenhum trabalho tendo o caldo de cana como alvo de investigação foi localizado.

Posto isto, a utilização do SC-CO<sub>2</sub> representa uma alternativa para a conservação do caldo de cana, visto que essa tecnologia tem se demonstrado promissora na inativação de enzimas e microrganismos, conforme reportado por Zdeněk e Zarevúcka (2010) e demais autores supracitados. O presente trabalho foi conduzido para investigar, primariamente, o efeito combinado do SC-CO<sub>2</sub> e temperaturas moderadas/brandas na estabilização enzimática e microbiológica de caldo de cana.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CENÁRIO PRODUTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

A cana-de-açúcar brasileira, líder mundial em produção, possui crescimento acentuado nas áreas centrais do País, enquanto no passado, o Nordeste detinha maior produção, embora ainda permaneça com a maioria dos seus estados na atividade canavieira. Esta cultura ganhou mais espaço no Sudeste e no Centro-Oeste, que lideram a produção há muitos anos. São Paulo responde isoladamente por cerca de 50% do total (ANUÁRIO BRASILEIRO DA CANA DE AÇÚCAR, 2022).

A atividade produtiva da cana é de grande importância para o agronegócio brasileiro, e se estende desde os tempos coloniais, quando o açúcar era o produto de base de negócio com Portugal. Posteriormente, houve expansão do cenário produtivo, ganhando maior importância e evidência na economia, exibindo versatilidade, rentabilidade e sustentabilidade. O plantio e a colheita prosseguem simultaneamente ao processamento e demandas do mercado interno e externo. Os segmentos econômicos são diversos, podendo ser destinado a área de biocombustíveis como o etanol (no qual a maior parte da produção se destina), produção de biomassa com o bagaço e demais produtos residuais de processamentos, além da indústria de alimentos e bebidas como o açúcar, a cachaça e o próprio caldo de cana integral (ANUÁRIO BRASILEIRO DA CANA DE AÇÚCAR, 2016). A área colhida na safra 2021/22, alcançou 8.317 mil hectares, com uma redução de 299 mil hectares em relação à safra 2020/21. A produtividade média da cana-de-açúcar no Brasil foi de 70.357 kg/ha, 5.608 quilos inferiores à da safra 2020/21 (CONAB, 2022).

### 2.2 CARACTERIZAÇÃO DO CALDO DE CANA

A cana-de-açúcar pertence à família das Gramíneas, e ao gênero *Saccharum* L., sendo seis espécies reconhecidas: *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. berberie*, *S. edule*, *S. spontaneum* e *S. robustum*. Descobriu-se a fertilidade das sementes do gênero *Saccharum* em 1920, em Java e Barbados, possibilitando cruzamentos e hibridações visando à obtenção de novas variedades dotadas de maior resistência à doenças e pragas, e mais ricas em sacarose (TFOUNI, 2005). A cana é composta, em média, de 74,5% de água, 25% de matéria orgânica e 0,5% em matéria mineral (MARTINS; HORII; ALCARDE, 2002).

O caldo de cana, conhecido como garapa, é uma bebida energética, que possui sabor agradável e gosto doce intenso, sendo muito popular em grande parte do Brasil.

Naturalmente, o caldo de cana exibe cores que variam entre o amarelo ao verde escuro.

Essa cor característica deve-se, em grande parte, à presença de pigmentos vegetais, como clorofilas e xantofilas (SMITH; PATON, 1985). Os compostos polifenólicos, caramelos e produtos de degradação do açúcar pela reação de Maillard também influenciam na cor da bebida (SINGH; JADHAV; SINGHAL, 2015). A cor verde representa o efeito da reação entre o sal férrico e os taninos. A cor opaca resulta de substâncias coloidais e à base de sílica, e compostos como o amido, proteínas, gomas e ceras geram turbidez e opacidade (PERRY, 1988). O caldo de cana é consumido por todas as faixas etárias e classes sociais, principalmente no verão, sendo extraído em moendas elétricas ou manuais, peneirado e servido com gelo ou misturado com suco de frutas (limão, abacaxi, maracujá etc) e gengibre (KUNITAKE, 2012; RAMACHANDRAN et al., 2017), comumente comercializado por vendedores ambulantes (garapeiros) em vias públicas, parques, praças e feiras livres (LUBATTI, 1999; PRATI; MORETTI; CARDELLO, 2005).

A composição do caldo sofre variações notáveis em função da variedade, cultivar, grau de maturação, práticas agrícolas e condições edafoclimáticas. O líquido preserva os nutrientes presentes na cana, sendo composto por minerais (3% a 5%) como ferro, cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio, além de vitaminas do complexo B e vitamina C. Os principais componentes são água, cuja composição varia entre 65% e 75%, e sacarose, correspondendo a 70-91% do total de sólidos solúveis. A cana contém glicose (2% a 4%), frutose (2% a 4%), proteínas (0,5% a 0,6%), amido (0,001% a 0,05%), ceras e ácidos graxos (0,05% a 0,015%) e pigmentos (3% a 5%) (Fava AR, 2004; IBGE, 1999). Por ser rico em nutrientes orgânicos e inorgânicos, possuir alta atividade de água ( $A_w \sim 0,99$ ) e baixa acidez ( $\text{pH} > 4,6$ ), é considerado um ótimo substrato para o desenvolvimento microbiano (GALLO; CANHOS, 1991). Os microrganismos de maior importância em estudos envolvendo o caldo de cana são principalmente aqueles oriundos do solo e de vegetais, como bolores, leveduras, bactérias lácticas e esporuladas (GALLO, 1989).

### 2.3 MECANISMOS DE DEGRADAÇÃO

O perfil físico-químico e a composição do caldo cana – descritos no item anterior – o tornam uma matriz alimentícia vulnerável a um complexo mecanismo de reações de degradação (microbiológica, enzimática, química e física), se as devidas intervenções tecnológicas não forem rapidamente implementadas após a extração da bebida.

A comercialização do caldo de cana *in natura* é bastante limitada em virtude de sua rápida deterioração (YUSOF; SHIAN; OSMAN, 2000). O caldo é um ótimo substrato

para desenvolvimento de um amplo espectro microbiano por conter nutrientes de natureza orgânica e inorgânica, além de apresentar alta atividade de água e baixa acidez (GALLO; CANHOS, 1991). Após 24 horas da extração, mesmo sob refrigeração, o caldo de cana *in natura* apresenta sedimentação e sinais de alteração em suas características sensoriais como a mudança de cor, sabor e aparência, principalmente devido à fermentação e ao escurecimento enzimático.

Os microrganismos naturalmente presentes no caldo consomem sacarose produzindo ácidos orgânicos e etanol (CHOI; KIM; LEE, 2002). Essa microbiota é oriunda do solo e vegetais, destacando-se fungos filamentosos e leveduriformes, além das bactérias lácticas e esporuladas (SILVA, 1988; GALLO, 1989; SILVA; CANHOS, 1990).

No caldo de cana extraído, os microrganismos podem advir não somente da própria planta, mas também de focos de contaminação nas moendas, dentre outros utensílios utilizados na manipulação e preparação da bebida (SILVA; CANHOS, 1990). Outro fator importante a ser considerado sobre a integridade microbiológica do caldo de cana é a implementação das boas práticas de fabricação a serem exercidas pelos manipuladores, que representam potenciais veículos para disseminação de microrganismos patogênicos (VANZO; AZEVEDO, 2003).

Outros compostos importantes que deixam o caldo de cana mais vulnerável a degradação são as enzimas endógenas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), ativadas logo após a extração. Estas enzimas promovem alterações indesejáveis na cor, na textura, no sabor, no aroma e na composição nutricional. A POD é uma enzima naturalmente presente em vegetais, com elevada resistência térmica, sendo, portanto, usada em testes de validação de parâmetros de pasteurização (JAKÓB et al., 2010). A PPO é uma oxidoreductase que, na presença de oxigênio, catalisa a oxidação de compostos o-fenólicos em o-quinonas, que são posteriormente polimerizados em pigmentos escuros (VAN LOEY; VERACHTERT; HENDRICKX, 2001). A reação inicia-se com a oxidação de fenólicos e culmina com a produção de melanina, que confere uma coloração escura ao caldo (QUDSIEH et al., 2002). As enzimas PPO e POD catalisam reações oxidativas e biodegradativas, acarretando perdas econômicas, nutricionais e sensoriais (ARAÚJO, 2011), limitando a aceitabilidade do produto.

Em relação às reações de degradação não-enzimáticas, a reação de Maillard destaca-se como um mecanismo importante de escurecimento potencializado pela ação do calor e tempo prolongado de estocagem. A reação ocorre a partir da interação de um carboidrato redutor (glicose, por exemplo) com um grupo amina produzindo a melanoidina, um pigmento de cor escura. Esse complexo mecanismo de reações é favorecido em faixa alcalina de pH, valores de Aa intermediários e temperaturas

elevadas. Outro fenômeno importante é a foto-oxidação do caldo de cana por meio da degradação da clorofila que, em presença de luz é oxidada, formando peróxidos e consequentemente sofrendo branqueamento ou perda da cor verde (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

#### 2.4 TECNOLOGIAS PARA ESTABILIZAÇÃO DO CALDO DE CANA

Comercialmente, as tecnologias empregadas na estabilização de caldo de cana no Brasil abrangem o tratamento térmico (pasteurização/esterilização comercial), o emprego de aditivos químicos (conservadores/antioxidantes) e a refrigeração, geralmente aplicados de forma combinada. O sistema de envase asséptico também é utilizado.

Os desafios para processar, acondicionar, proteger e assegurar a qualidade e integridade dos produtos alimentícios são constantes para a indústria, visto que são necessárias operações unitárias e/ou vários métodos combinados para proporcionar ou manter a qualidade do alimento. Para o caldo de cana, esse desafio é amplificado pois, no Brasil, esta bebida é tradicionalmente consumida *in natura* sendo vendida por ambulantes em ruas e feiras. O caldo *in natura* sofre deterioração de sabor e aparência em poucas horas após sua extração, ainda que mantido sob refrigeração. Essa perda está relacionada a fermentação provocada por microrganismos que acidificam o caldo.

Dentre os métodos clássicos de processamento figura a pasteurização térmica, visando a inativação enzimática, destruição de microrganismos patogênicos e deteriorantes de baixa resistência ao calor. Este método é utilizado quando tratamentos mais rigorosos podem afetar de forma indesejada as propriedades sensoriais e nutritivas do alimento. Além disso, a pasteurização pode ser aplicada concomitantemente a produtos alimentícios que serão estocados sob refrigeração, visando a redução da taxa de desenvolvimento microbiano (FONSECA, 1984). Quando deseja-se estocar o caldo a temperatura ambiente, o sistema de processamento e envase asséptico apresenta-se como uma alternativa atraente, a despeito de seu elevado custo de implantação e manutenção. Silva (2004) submeteu amostras de caldo de cana acidificado a 141 °C/10 s, seguido de envase em garrafa de vidro; o tempo de vida útil alcançado foi de 30 dias estocado sob temperatura ambiente. Em outro ensaio, o caldo de cana foi submetido a um tratamento térmico de 110 °C/10 s, sendo envasado a quente (85–95 °C), obtendo uma bebida mais estável, com 60 dias de vida de prateleira sob estocagem a temperatura ambiente.



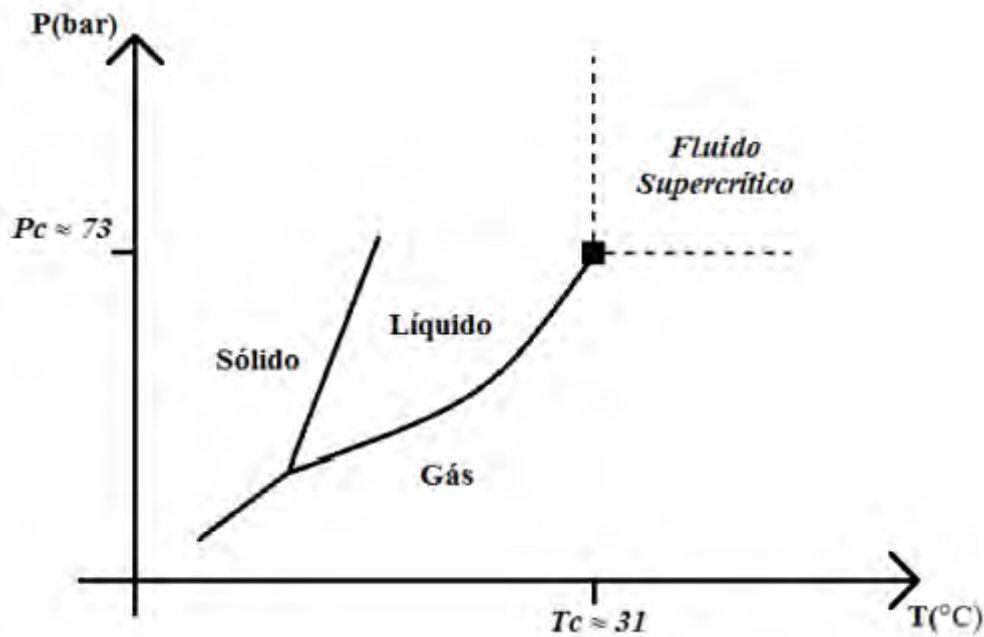
### 2.5.1 Dióxido de carbono em estado supercrítico

As tecnologias não térmicas podem minimizar as alterações indesejáveis no alimento, por empregar temperaturas que não ultrapassam 40 °C, bastante inferior às usadas nos tratamentos térmicos convencionais. Segundo Panighahi et al. (2021), a implementação de tais tecnologias para processamento em escala industrial do caldo de cana além de ser vantajosa em relação às convencionais, também pode ser útil na produção da bebida sem aditivos (*clean label*), de alta qualidade, com apelo sensorial natural e fresco. Esta abordagem promoveria o empreendedorismo no processamento e comercialização do caldo de cana em vasta extensão territorial, inclusive no mercado externo.

O dióxido de carbono em estado supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) insere-se entre as tecnologias não térmicas emergentes, juntamente com alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado, irradiação, campo magnético de alta densidade, luz pulsante, ozonização, plasma frio, ultrassom etc (MATOS, 2013). Diversos estudos científicos com caldo de cana abordam métodos de conservação para estender a vida de prateleira, e investigam o impacto de diferentes tecnologias de processamento – térmico e/ou não térmico – na qualidade sensorial do produto (SILVA; FARIA, 2006; FERREIRA et al., 2007; ROCHA, 2012; SILVA et al., 2014). Entretanto, a descrição da aplicação de SC-CO<sub>2</sub> na estabilização de caldo de cana, como feita neste trabalho, não foi localizada na literatura científica mundial.

Há cerca de duas décadas, o uso de SC-CO<sub>2</sub> tem sido proposto como uma técnica alternativa à pasteurização. Em 1951, Fraser foi o primeiro a demonstrar o potencial bactericida do CO<sub>2</sub> pressurizado. Esta técnica utiliza o CO<sub>2</sub> sob condição de pressão, sendo que a maioria dos tratamentos descritos na literatura utilizam pressões inferiores a 350 bar (MATOS, 2013). O estado supercrítico é referenciado como aquele em que a matéria apresenta propriedades intermediárias às fases gasosa e líquida simultaneamente, a uma temperatura e pressão acima de seus valores críticos. Portanto, no ponto crítico as fases líquida e gasosa coexistem e tornam-se uma só (WU, et al., 1989). A Figura 1 mostra o diagrama de definição da região supercrítica para o CO<sub>2</sub>.

Figura 1 - Diagrama de pressão e temperatura e os equilíbrios entre as fases sólida, líquida e gasosa



$P_c/T_c$ : pressão e temperatura críticas para o  $\text{CO}_2$ .

Fonte: Matos (2013).

A vantagem deste método não térmico é que o alimento é preservado dos efeitos adversos do calor, mantendo sua integridade física, nutricional, funcional e sensorial. Durante o tratamento, a matriz alimentícia permanece em contato com o  $\text{CO}_2$  pressurizado, em condição sub ou supercrítica, por um período de tempo determinado. O tratamento pode ser contínuo, descontínuo ou semi-contínuo (MATOS, 2013).

#### 2.5.1.1 Efeito na inativação de microrganismos

A maioria das pesquisas publicadas até o presente reporta a aplicação do  $\text{SC-CO}_2$  para inativação de culturas microbianas puras. Muitas espécies de bactérias já foram estudadas, incluindo Gram-positivas e Gram-negativas. Alguns trabalhos envolvendo a inativação de esporos também foram realizados. Perrut (2012) apud Matos (2013) compilaram as principais publicações sobre o efeito na ativação

microbiana, destacando os seguintes gêneros: *Alicyclobacillus*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Legionella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Penicillium*, *Pichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Salmonella* e *Streptococcus*. Entretanto, o emprego de modelos matemáticos preditivos ainda tem sido pouco explorado.

#### 2.5.1.2 *Influência na cor*

Pigmentos escuros são formados durante o processamento da cana desde a extração do caldo até a cristalização do açúcar bruto. A indústria preocupa-se com a formação desses pigmentos pois sua presença impede a cristalização e implica em rendimentos de açúcar mais baixos e de pior qualidade, consequentemente aumentando os custos de refino (JIMENES; SAMANIEGO,1981). Durante a produção de açúcar bruto pelo menos quatro mecanismos contribuem para a formação de cor (KORT, 1979): (1) melanoidinas formadas a partir de reações entre carboidrato redutor-aminoácidos via reação de Maillard, (2) caramelização, (3) degradação alcalina e condensação de produtos de reações de açúcares redutores e (4) reações oxidativas de compostos fenólicos. As três primeiras são não enzimáticas, e a quarta reação é enzimática, e ocorre no início da extração. As enzimas contribuem significativamente para o escurecimento.

Gui et al. (2006) estudaram os efeitos do tratamento com SC-CO<sub>2</sub> em suco de maçã a 80, 150, 220 e 300 Bar por 60 min a 55 °C. O suco tratado foi estocado a 4 °C durante 4 semanas. O tratamento com SC-CO<sub>2</sub> produziu efeitos significativos, sendo observada uma redução na luminosidade e um aumento na intensidade da coloração do suco.

#### 2.5.1.3 *Inativação de enzimas*

Gui et al. (2006) também avaliaram os efeitos do SC-CO<sub>2</sub> a 80, 150, 220 e 300 Bar por 60 min a 55 °C na atividade da PPO durante 4 semanas a 4 °C em suco de maçã. A menor atividade residual foi de 38,50% a 300 Bar. A regeneração da atividade residual após o tratamento com SC-CO<sub>2</sub> foi observada após 4 semanas de estocagem e variou com o nível de pressão.

Marszalek et al. (2015) estudaram o efeito do SC-CO<sub>2</sub> na preservação de suco de morango. O tratamento foi eficaz na inativação de microrganismos e enzimas. As amostras foram tratadas a 300 e 600 Bar, a 45 °C por 30 min. A porcentagem de inativação da PPO e POD alcançou 85%. No entanto, o tratamento com SC-CO<sub>2</sub>

resultou na hidrólise da sacarose e perdas de 30% de vitamina C, aproximadamente. Os autores concluíram que a aplicação dessa tecnologia é uma alternativa à pasteurização.

#### 2.5.1.4 Alterações sensoriais

Damar e Balaban (2006) afirmaram que o SC-CO<sub>2</sub> retém as propriedades sensoriais, nutricionais e físicas de muitos alimentos líquidos, evitando os efeitos térmicos da pasteurização tradicional. Estudos com suco de laranja mostraram que o tratamento com CO<sub>2</sub> a alta pressão pode aprimorar alguns atributos físicos e nutricionais, como formação e estabilidade de “nuvens”, cor e retenção de ácido ascórbico.

MOSCA et al. (2020) estudaram os efeitos sensoriais dos tratamentos com SC-CO<sub>2</sub> em suco de romã. Em relação ao sabor, não houve diferença significativa entre o suco tratado e o suco *in natura*. No entanto, os resultados sugerem que os parâmetros do processo precisam ser otimizadas para minimizar os impactos na qualidade sensorial e no perfil volátil do suco.

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da aplicação combinada do dióxido de carbono em estado supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) e temperaturas brandas na inativação de enzimas endógenas e microrganismos deteriorantes em caldo de cana.

Especificamente, objetivou-se:

1. Analisar os efeitos das variáveis pressão do CO<sub>2</sub> (P), temperatura (T) e tempo de exposição ao tratamento (t), na redução da atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), e na redução da população de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, bactérias lácticas, e coliformes termotolerantes presentes no caldo de cana *in natura*, empregando-se para este fim um delineamento experimental composto central rotacional;
2. Gerar e validar os modelos matemáticos preditivos obtidos;
3. Mensurar o impacto dos tratamentos na alteração da cor da bebida.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 PROCESSAMENTO**

#### **4.1.1 Obtenção do caldo de cana**

O caldo de cana, extraído do cultivar RB867515, foi adquirido de um fornecedor local, na cidade de Pirassununga/SP, na data do processamento. Em cada ensaio experimental foram utilizados aproximadamente 500 mL de caldo, fracionados em duas partes e coletados em frascos de vidro com tampas de rosca previamente esterilizados. Uma fração foi utilizada como controle e outra destinada ao tratamento com SC-CO<sub>2</sub>.

#### **4.1.2 Tratamento com SC-CO<sub>2</sub>**

O tratamento do caldo de cana com injeção direta de SC-CO<sub>2</sub> foi conduzido no reator de um extrator de fluido supercrítico modelo 500 MR (Thar SFE, Pittsburgh/EUA) disponível no Laboratório de Tecnologia à Alta pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP. As amostras foram tratadas no reator com volume de 100 mL nas condições pré-estabelecidas (descritas no item subsequente), e transferidas (após o tempo de contato definido) por meio da depressurização rápida do equipamento para uma câmara de depressurização com volume aproximado de 1 L. Os ensaios experimentais foram conduzidos no período compreendido entre outubro/2021 a março/2022. A Figura 2 reúne as imagens do equipamento utilizado.

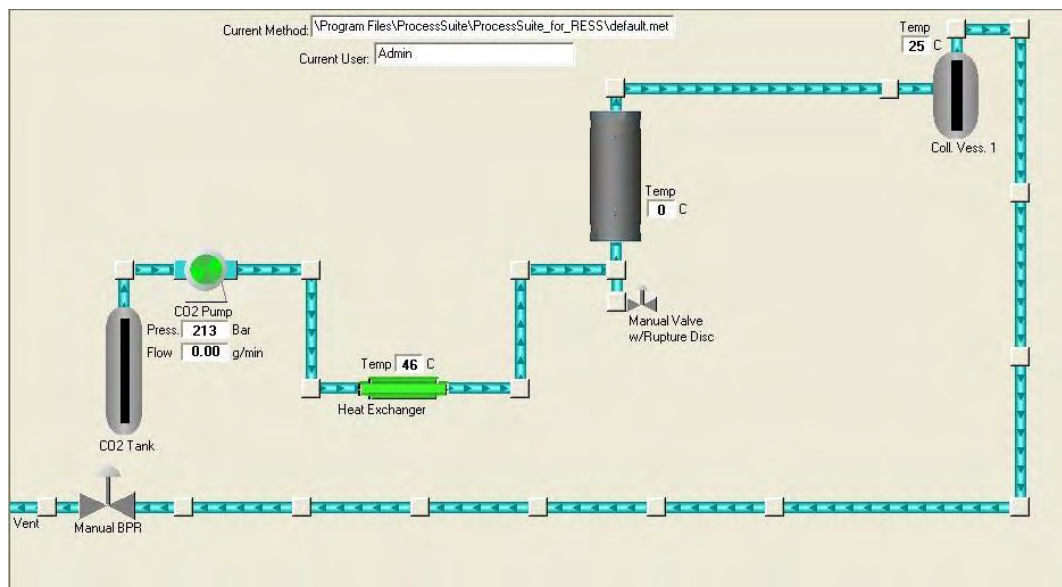
Figura 2 - Imagens do Equipamento de SC-CO<sub>2</sub>

Legenda: 1) Extrator de fluido supercrítico; 2) Receptor da amostra; 3) Hélice homogeneizadora; 4) Transferência da amostra para o reator; 5) Coleta do caldo tratado; 6) Amostras de caldo de cana processado.

Fonte: Acervo pessoal.

O controle/monitoração dos fatores (Pressão/Temperatura/Vazão) do tratamento foi realizado por meio de um *software* instalado em um computador acoplado ao equipamento. A Figura 3 mostra a tela exibida no computador pelo *software* durante o tratamento da amostra.

Figura 3 - Diagrama de fluxo do CO<sub>2</sub> durante o tratamento do caldo de cana



Fonte: própria autoria

## 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A Tabela 1 exibe as variáveis e os níveis (reais e codificados) testados, na execução do delineamento composto central rotacional.

Tabela 1 - Valores reais e codificados para as variáveis testadas no tratamento do caldo de cana com SC-CO<sub>2</sub>

Variáveis	Código	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Pressão (bar)	x <sub>1</sub>	74	130	213	295	351
Temperatura (°C)	x <sub>2</sub>	33	40	50	60	67
Tempo (min)	x <sub>3</sub>	20	30	45	60	70

(-1,68) ponto axial inferior, (-1) nível inferior, (0) ponto central, (+1) nível superior, (+1,68) ponto axial superior.  $\alpha = (2^n)^{1/4} = 1.68$ . n = número de variáveis independentes (3).

Fonte: própria autoria



Para obter uma inferência estatística aproximada, foram realizadas três repetições no ponto central do espaço experimental. Tais repetições podem fornecer informações valiosas sobre o comportamento das respostas entre os níveis atribuídos aos fatores, e demonstrar a repetibilidade do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2015). As análises de atividade enzimática, pH, sólidos solúveis e de cor foram realizadas em triplicata. Para as análises microbiológicas, os experimentos foram realizados em duplicata.

A Tabela 2 mostra a matriz de delineamento fatorial com as respectivas datas de realização dos experimentos.

Tabela 2 - Matriz de delineamento fatorial

Ensaio	P (bar)	T (°C)	t (min)	Sequência de execução	Data do processo
1	130 (-1)	40 (-1)	30 (-1)	2º	30/11/20
2	295 (+1)	40 (-1)	30 (-1)	3º	7/12/20
3	130 (-1)	60 (+1)	30 (-1)	4º	25/10/21
4	295 (+1)	60 (+1)	30 (-1)	5º	08/11/21
5	130 (-1)	40 (-1)	60 (+1)	7º	04/11/21
6	295 (+1)	40 (-1)	60 (+1)	8º	23/11/21
7	130 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	9º	08/02/22
8	295 (+1)	60 (+1)	60 (+1)	10º	21/02/22
9	74 (-1,68)	50 (0)	45 (0)	12º	15/03/22
10	351 (1,68)	50 (0)	45 (0)	13º	16/03/22
11	213 (0)	33 (-1,68)	45 (0)	14º	17/03/22
12	213 (0)	67 (1,68)	45 (0)	15º	23/03/22
13	213 (0)	50 (0)	20 (-1,68)	16º	28/03/22
14	213 (0)	50 (0)	70 (1,68)	17º	29/03/22
15	<b>213 (0)</b>	<b>50 (0)</b>	<b>45 (0)</b>	<b>1º</b>	09/11/20
16	<b>213 (0)</b>	<b>50 (0)</b>	<b>45 (0)</b>	<b>6º</b>	17/11/21
17	<b>213 (0)</b>	<b>50 (0)</b>	<b>45 (0)</b>	<b>11º</b>	08/03/22

Fonte: própria autoria

#### 4.3 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO

As análises físico-químicas, enzimáticas, microbiológicas e a determinação instrumental de parâmetros de cor, realizadas nas amostras *in natura* e processada de caldo de cana, para avaliar o desempenho das múltiplas combinações dos fatores de processo (Tabela 2), são descritas a seguir.

#### **4.3.1 Caracterização físico-química**

Os testes físico-químicos foram executados conforme metodologia da AOAC (2010). Para a determinação do pH utilizou-se um medidor Analyser modelo 300 M. O teor de sólidos solúveis (expresso em °Brix) foi determinado em um refratômetro portátil digital Reichert modelo AR 200.

#### **4.3.2 Testes enzimáticos**

Determinaram-se as atividades da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) conforme metodologia descrita por Campos et al. (1996).

Para análise da atividade da PPO adicionou-se tampão fosfato (pH 6,0) e catecol a uma alíquota da amostra incubada a 25 °C por 30 min. Após a paralisação da reação em banho de água a 5 °C realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 425 nm.

Para a análise da atividade da POD utilizou-se tampão fosfato (pH 5,5), peróxido de hidrogênio e solução alcóolica de guaiacol incubados a 35 °C por 15 min. Após a paralisação da reação em banho de água sob temperatura de 5 °C, fez-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 470 nm. Como branco, utilizaram-se todos os reagentes sem adição da amostra.

Expressou-se a leitura das atividades da PPO e POD em U, sendo uma unidade (U) equivalente a variação de 0,001 na absorbância por minuto.

#### **4.3.3 Ensaio microbiológicos**

Realizaram-se as análises microbiológicas em conformidade com os protocolos descritos por Silva et al. (2010).

##### *4.3.3.1 Contagem de aeróbios mesófilos*

A contagem de mesófilos aeróbios foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade, utilizando como meio de cultura o ágar para contagem em placas *plate count agar* (PCA) da marca Biokar diagnostics. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h, e as colônias enumeradas.

##### *4.3.3.2 Bolores e leveduras*

Executou-se a análise de bolores e leveduras pela técnica de plaqueamento em superfície, após a transferência de uma alíquota de 0,1 mL da amostra para placas

contendo o meio dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) da marca GranuCult, seguido de incubação a 25 °C por 5 dias.

#### 4.3.3.3 Bactérias lácticas

A enumeração de bactérias lácticas foi feita pela técnica de plaqueamento em profundidade em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) da marca KASVI. Após a solidificação do meio, adicionou-se uma sobrecamada de MRS. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

#### 4.3.3.4 Coliformes a 45 °C

A análise de coliformes termotolerantes (45 °C) foi conduzida pela técnica de plaqueamento de uma alíquota de 1 mL de caldo de cana em profundidade em ágar violet red bile (VRB) da marca GranuCult, seguido de incubação das placas a 45 °C por 48 h.

#### 4.3.4 Análise instrumental de cor

Determinaram-se os fatores de cor em sistema CIELab utilizando o colorímetro Hunterlab Ultra-Scan, Modelo SN7877, com iluminante D65 e ângulo de observação de 10°. Os parâmetros L\*, a\* e b\* foram utilizados nos cálculos da diferença total de cor entre a bebida *in natura* e processada/DTC (Eq. 1), chroma/C\* (Eq. 2) e ângulo hue/°hue (Eq. 3). O °hue classifica a cor (amarelo, azul, verde, vermelho etc). O parâmetro chroma denota a saturação (cor vívida ou esmaecida) (KONICA MINOLTA SENSING INC, 2007).

$$DTC = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \quad \text{Eq. 1}$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Eq. 2}$$

$$^{\circ}hue = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{Eq. 3}$$

Sendo:

L\* - luminosidade (0 a 100).

a\* - coordenada vermelho (+60) verde (-60).

b\* - coordenada amarelo (+60) azul (-60).

$\Delta L^*$  - variação de luminosidade.

$\Delta a^*$  - variação de vermelho a verde.

$\Delta b^*$  - variação de amarelo a azul.

Os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram inseridos na calculadora de cores EasyRGB (<https://www.easyrgb.com/en/convert.php>) para geração da cor das amostras.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados do delineamento fatorial foram primeiramente submetidos à análise de efeitos para identificar as variáveis (P/T/t) que tiveram efeito significativo ( $p \leq 0,1$ ) nas respostas investigadas. A análise de regressão foi conduzida tanto para a 1ª ordem (respostas obtidas apenas com os pontos centrais) quanto para a 2ª ordem (respostas incluindo os pontos axiais). Os modelos matemáticos foram re-parametrizados considerando apenas os coeficientes estatisticamente significativos. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a significância estatística do modelo. A superfície de resposta foi gerada quando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi superior a 0,85 e o valor de F calculado superior ao F tabelado. O software Protimiza Experimental Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br>) foi utilizado na análise estatística dos dados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DADOS DOS TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

Os dados obtidos na determinação dos valores de pH e do teor de sólidos solúveis estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de pH e sólidos solúveis do caldo de cana *in natura* e tratado com SC-CO<sub>2</sub>

Ensaio	Tratamento	pH	Sólidos Solúveis
	<i>in natura</i>	5,4 ± 0,1	25,3 ± 0,0
1	213 bar/50 °C/45 min	5,3 ± 0,0	24,9 ± 0,1
	Δ	<b>-0,1</b>	<b>-0,4</b>
	<i>in natura</i>	5,2 ± 0,1	24,2 ± 0,1
2	130 bar/40 °C/30 min	5,0 ± 0,1	24,0 ± 0,1
	Δ	<b>-0,2</b>	<b>-0,2</b>
	<i>in natura</i>	4,6 ± 0,0	22,1 ± 0,1
3	295 bar/40 °C/30 min	4,6 ± 0,1	21,8 ± 0,1
	Δ	<b>0,0</b>	<b>-0,3</b>
	<i>in natura</i>	5,4 ± 0,1	25,2 ± 0,1
4	130 bar/60 °C/30 min	5,1 ± 0,1	25,0 ± 0,1
	Δ	<b>-0,3</b>	<b>-0,2</b>
	<i>in natura</i>	5,4 ± 0,1	24,3 ± 0,0
5	295 bar/60 °C/30 min	5,2 ± 0,1	24,0 ± 0,1
	Δ	<b>-0,2</b>	<b>-0,3</b>
	<i>in natura</i>	5,4 ± 0,0	23,5 ± 0,1
6	213 bar/50 °C/45 min	5,4 ± 0,0	23,2 ± 0,1
	Δ	<b>0,0</b>	<b>-0,3</b>
	<i>in natura</i>	5,4 ± 0,1	23,6 ± 0,1
7	130 bar/40 °C/60 min	5,0 ± 0,1	23,2 ± 0,1
	Δ	<b>-0,4</b>	<b>-0,3</b>
	<i>in natura</i>	5,3 ± 0,1	23,7 ± 0,1
8	295 bar/40 °C/60 min	5,1 ± 0,0	23,6 ± 0,1
	Δ	<b>-0,2</b>	<b>-0,1</b>
	<i>in natura</i>	4,6 ± 0,1	21,4 ± 0,1
9	130 bar/60 °C/60 min	4,4 ± 0,0	21,2 ± 0,1
	Δ	<b>-0,2</b>	<b>-0,2</b>
	<i>in natura</i>	5,3 ± 0,1	18,7 ± 0,1
10	295 bar/60 °C/60 min	5,5 ± 0,0	18,7 ± 0,1
	Δ	<b>+0,2</b>	<b>0,0</b>

	<i>in natura</i>	5,5 ± 0,1	20,6 ± 0,1
<b>11</b>	213 bar/50 °C/45 min	5,6 ± 0,1	20,4 ± 0,0
	Δ	<b>+0,1</b>	<b>-0,2</b>
	<i>in natura</i>	6,0 ± 0,1	19,0 ± 0,1
<b>12</b>	74 bar/ 50 °C/ 45 min	6,3 ± 0,0	18,7 ± 0,1
	Δ	<b>+0,3</b>	<b>-0,3</b>
	<i>in natura</i>	5,6 ± 0,1	20,9 ± 0,1
<b>13</b>	351 bar/50 °C/45 min	5,4 ± 0,0	20,8 ± 0,1
	Δ	<b>-0,2</b>	<b>-0,1</b>
	<i>in natura</i>	5,4 ± 0,1	20,4 ± 0,1
<b>14</b>	213 bar/33°C/45 min	5,2 ± 0,0	20,1 ± 0,1
	Δ	<b>-0,2</b>	<b>-0,3</b>
	<i>in natura</i>	5,6 ± 0,1	19,9 ± 0,1
<b>15</b>	213 bar/67 °C/45 min	5,5 ± 0,1	19,9 ± 0,0
	Δ	<b>-0,1</b>	<b>0,0</b>
	<i>in natura</i>	5,6 ± 0,1	18,6 ± 0,1
<b>16</b>	213 bar/50 °C/20 min	5,6 ± 0,0	18,6 ± 0,1
	Δ	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
	<i>in natura</i>	5,3 ± 0,1	18,5 ± 0,1
<b>17</b>	213 bar/50 °C/70 min	5,4 ± 0,0	18,2 ± 0,1
	Δ	<b>+0,1</b>	<b>-0,3</b>

Fonte: própria autoria

Os valores de pH determinados no caldo *in natura* variaram de 4,6 a 6,0, e entre 4,4 e 6,3 para a bebida processada. Observou-se que os tratamentos provocaram uma redução de até 0,4 unidades no valor de pH. Entretanto, as amostras dos ensaios 3 (295 bar/40 °C/30 min), 6 (213 bar/50 °C/45 min) e 16 (213 bar/50 °C/20 min) permaneceram inalteradas. Segundo Souza (1988), a variedade da cana, tipo de solo, adubação, condições climáticas, grau de maturação, métodos de colheita e extração são fatores importantes a serem considerados na variação do pH no caldo. Bomdespacho (2018) avaliou diferentes cultivares de caldo de cana *in natura* obtendo uma média de pH equivalente a 5,05. Este dado aproxima-se dos valores encontrados na maioria dos tratamentos realizados no presente estudo, com exceção dos ensaios 3, 9 e 12.

Em relação ao teor de sólidos solúveis, observaram-se variações entre 18,5 e 25,3 °Brix para o caldo *in natura*, e entre 18,2 e 25,0 para a bebida processada. As

variações neste parâmetro provocadas pelo tratamento com SC-CO<sub>2</sub> oscilaram entre 0,0 e 0,4. Com exceção dos ensaios 15 e 16, registrou-se uma redução nesse parâmetro. Esses fenômenos podem estar relacionados a variação dos tratamentos submetidos, bem como ao lote utilizado no dia dos respectivos ensaios. Bomdespacho (2018) reportou uma média de 21,2 °Brix determinada em amostras de caldo *in natura* extraído de diferentes cultivares. Este resultado encontra-se na faixa obtida neste estudo. Em todos os 17 ensaios não foram observadas grandes variações ( $\Delta \leq 0,4$ ) entre o caldo processado e *in natura*. Estes resultados são considerados positivos pois conduzem à hipótese de que não houve variação significativa nos valores de pH e sólidos solúveis provocada pelos tratamentos.

## 5.2 TESTES ENZIMÁTICOS

As atividades das enzimas endógenas – polifenoloxidase e peroxidase – assim como as porcentagens de redução alcançadas pelos diferentes trinômios estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4 - Atividades (U) de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) em caldo de cana *in natura* e tratado com SC-CO<sub>2</sub>

Ensaio	Tratamento	PPO	POD
	<i>in natura</i>	11,445 ± 0,0315	226,667 ± 0,1080
1	213 bar/50 °C/45 min	7,678 ± 0,244	198,000 ± 0,545
	<b>red (%)</b>	<b>32,91</b>	<b>12,65</b>
	<i>in natura</i>	11,000 ± 0,118	245,110 ± 0,314
2	130 bar/40 °C/30 min	5,411 ± 0,841	202,222 ± 2,0608
	<b>red (%)</b>	<b>50,81</b>	<b>17,50</b>
	<i>in natura</i>	10,997 ± 0,117	238,444 ± 1,258
3	295 bar/40 °C/30 min	6,555 ± 0,305	202,222 ± 2,0608
	<b>red (%)</b>	<b>40,40</b>	<b>15,19</b>
	<i>in natura</i>	11,000 ± 0,118	231,555 ± 7,230
4	130 bar/60 °C/30 min	6,088 ± 0,260	202,222 ± 2,060
	<b>red (%)</b>	<b>44,66</b>	<b>12,70</b>
	<i>in natura</i>	11,000 ± 0,119	202,222 ± 2,060



5	295 bar/60 °C/30 min	3,940 ± 0,0141	192,889 ± 0,314
	<b>red (%)</b>	<b>64,18</b>	<b>4,61</b>
	<i>in natura</i>	11,444 ± 0,0311	235,555 ± 1,57
6	213 bar/50 °C/45 min	7,777 ± 0,253	190,666 ± 0,000
	<b>red (%)</b>	<b>32,04</b>	<b>19,06</b>
	<i>in natura</i>	11,444 ± 0,0311	232,221 ± 6,285
7	130 bar/40 °C/60 min	9,440 ± 0,327	183,777 ± 4,085
	<b>red (%)</b>	<b>17,51</b>	<b>20,90</b>
	<i>in natura</i>	11,444 ± 0,0311	231,110 ± 7,856
8	295 bar/40 °C/60 min	8,011 ± 0,244	215,110 ± 3,143
	<b>red (%)</b>	<b>30,00</b>	<b>6,92</b>
	<i>in natura</i>	10,044 ± 0,200	56,067 ± 4,0923
9	130 bar/60 °C/60 min	9,267 ± 2,000	33,956 ± 6,939
	<b>red (%)</b>	<b>7,74</b>	<b>39,43</b>
	<i>in natura</i>	3,367 ± 0,590	56,067 ± 4,0923
10	295 bar/60 °C/60 min	2,543 ± 0,372	33,956 ± 6,939
	<b>red (%)</b>	<b>24,47</b>	<b>39,43</b>
	<i>in natura</i>	2,300 ± 0,552	8,444 ± 1,683
11	213 bar/50 °C/45 min	0,844 ± 0,408	7,155 ± 1,635
	<b>red (%)</b>	<b>63,30</b>	<b>15,26</b>
	<i>in natura</i>	1,755 ± 0,575	8,089 ± 1,723
12	74 bar/ 50 °C/ 45 min	0,744 ± 0,440	6,667 ± 1,607
	<b>red (%)</b>	<b>58,74</b>	<b>17,57</b>
	<i>in natura</i>	2,366 ± 0,544	8,100 ± 0,216
13	351 bar/50 °C/45 min	0,933 ± 0,499	5,599 ± 1,744
	<b>red (%)</b>	<b>60,56</b>	<b>30,87</b>
	<i>in natura</i>	18,033 ± 0,659	7,263 ± 2,0286
14	213 bar/33 °C/45 min	17,400 ± 0,509	7,243 ± 1,6672
	<b>red (%)</b>	<b>3,51</b>	<b>0,27</b>

	<i>in natura</i>	21,944 ± 0,676	8,800 ± 1,750
<b>15</b>	213 bar/67 °C/45 min	20,511 ± 0,253	5,155 ± 0,126
	<b>red (%)</b>	<b>6,53</b>	<b>41,42</b>
	<i>in natura</i>	2,667 ± 0,1699	7,133 ± 1,7666
<b>16</b>	213 bar/50 °C/20 min	1,200 ± 0,000	7,100 ± 1,674
	<b>red (%)</b>	<b>55,00</b>	<b>0,46</b>
	<i>in natura</i>	3,367 ± 0,590	5,133 ± 0,047
<b>17</b>	213 bar/50 °C/70 min	2,100 ± 0,367	5,033 ± 0,410
	<b>red (%)</b>	<b>37,62</b>	<b>1,94</b>

Red – redução.  
Fonte: própria autoria

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram o potencial do SC-CO<sub>2</sub>, combinado com temperaturas moderadas, na inativação das enzimas endógenas PPO e POD, responsáveis pela degradação da cor, sabor e valor nutricional do caldo de cana. As porcentagens de redução de atividade da PPO (3,51 – 64,18%) e POD (0,27 – 41,42%) variaram amplamente. O trinômio aplicado no ensaio 5 (295 bar/60 °C/30 min) alcançou o maior nível de inativação (64,18%), sugerindo que a temperatura exerceu um efeito mais significativo na porcentagem de redução. No entanto, esta hipótese será confirmada à luz da análise estatística dos efeitos das variáveis estudadas. A POD exibiu maior resistência a maioria dos trinômios testados. O trinômio aplicado no ensaio 15 (213 bar/ 67 °C/ 45 min) atingiu maior porcentagem de inativação (41,4%).

Marszałek et al. (2019) estudaram o efeito do SC-CO<sub>2</sub> sobre a atividade da PPO e POD em cogumelo e rabanete. A PPO foi mais resistente à temperatura e à pressão do que a POD; esse fenômeno pode ser explicado pelas diferenças estruturais entre as duas enzimas. Neste estudo observou-se o mesmo comportamento nos ensaios 7, 9, 10 e 15; ou seja, a PPO foi mais resistente ao tratamento com SC-CO<sub>2</sub>. Entretanto, nos demais ensaios, a porcentagem de redução de atividade da POD foi menor do que a de PPO, indicando que o tipo de matriz alimentícia também exerce influência no impacto da tecnologia aplicada. Marszałek et al. (2019) alegam que a matriz alimentícia pode interferir nas ligações intermoleculares das duas enzimas dependendo do teor de água presente no meio, uma vez que o impacto da pressão sobre as interações intra e intermoleculares também pode estar relacionado à capacidade dos grupos funcionais das enzimas de interagir com a água.

Segundo Lqbal et al. (2019), a redução da atividade das enzimas expostas a temperaturas elevadas e tempos prolongados é explicada pelas alterações nas estruturas terciárias e secundárias da proteína. Saxena et al. (2017) mostraram que a inativação cinética da PPO seguiu ( $n=1,6$ ) enésima ordem com o aquecimento convencional do caldo de cana, e a constante de inativação K mostrou uma dependência recíproca quadrática da temperatura. A PPO possui dois íons de cobre em seu sítio ativo, sendo circundados por seis resíduos de histidina e um de cisteína. Dessa forma, as mudanças no sítio ativo da enzima afetam a atividade enzimática (MARSZAŁEK et al., 2017).

Múltiplas pesquisas sobre a inativação térmica da PPO foram realizadas. Segundo Lqbal et al. (2019), a estabilidade térmica da PPO depende de fatores com a fonte, espécie, natureza e comportamento do alimento. A PPO comporta-se de forma diferente a depender da espécie de origem. Trabalhos ligados à aplicação de alta temperatura foram importantes para observar que a PPO foi plenamente inativada a temperaturas variando entre 70–90 °C (GOYENECHE; DI SCALA; ROURA, 2013; MURTAZA et al., 2018). Parte majoritária da literatura localizada sobre PPO discute o processamento com utilização de extratos enzimáticos, ao invés de matrizes alimentícias onde essa enzima está presente (SIDDIQ E DOLAN, 2017). Dessa forma, o padrão de inativação enzimática poderá ser diferente, dependendo do alimento em questão (LQBAL et al., 2019).

### 5.3 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A Tabela 5 exhibe os resultados das contagens de microrganismos no caldo de cana *in natura* e tratado com SC-CO<sub>2</sub>.

Tabela 5 - Contagens (log UFC/mL) em caldo de cana *in natura* e tratado com dióxido de carbono em estado supercrítico

Ensaio	Tratamento	Coliformes (45 °C)	Mesófilos	Bactérias lácticas	Bolores e leveduras
1	<i>in natura</i>	1,5	3,6	1,0	3,5
	213 bar/50 °C/45 min	< 1 <sub>est</sub>	1,8	< 1 <sub>est</sub>	1,1
	RD	> 0,5 <sub>est</sub>	<b>1,8</b>	-	<b>2,4</b>
2	<i>in natura</i>	< 1 <sub>est</sub>	3,1	2,6	3,5
	130 bar/40 °C/30 min	< 1 <sub>est</sub>	2,7	1,2	1,4
	RD	-	<b>0,4</b>	<b>1,4</b>	<b>2,1</b>

	<i>in natura</i>	< 1 <sub>est</sub>	4,6	1,3	2,4
3	295 bar/40 °C/30 min	< 1 <sub>est</sub>	2,6	< 1 <sub>est</sub>	0,3
	RD	-	<b>2,0</b>	<b>&gt; 0,3<sub>est</sub></b>	<b>2,1</b>
	<i>in natura</i>	2,5	4,6	3,0	4,2
4	130 bar/60 °C/30 min	0,7	1,6	1,0	1,0
	RD	<b>1,8</b>	<b>3,0</b>	<b>2,0</b>	<b>3,2</b>
	<i>in natura</i>	1,3	3,7	3,1	3,8
5	295 bar/60 °C/30 min	< 1 <sub>est</sub>	1,5	1,5	1,6
	RD	<b>&gt; 0,3</b>	<b>2,2</b>	<b>1,6</b>	<b>2,2</b>
	<i>in natura</i>	< 1 <sub>est</sub>	4,9	3,0	4,1
6	213 bar/50 °C/45 min	< 1 <sub>est</sub>	1,7	1,6	0,9
	RD	-	<b>3,2</b>	<b>1,4</b>	<b>3,2</b>
	<i>in natura</i>	2,3	2,7	2,2	4,9
7	130 bar/40 °C/60 min	< 1 <sub>est</sub>	< 1 <sub>est</sub>	2,1	1,7
	RD	<b>&gt; 1,3<sub>est</sub></b>	<b>&gt; 1,7<sub>est</sub></b>	<b>0,1</b>	<b>3,2</b>
	<i>in natura</i>	< 1 <sub>est</sub>	6,0	3,5	4,1
8	295 bar/40 °C/60 min	< 1 <sub>est</sub>	2,1	1,4	1,8
	RD	-	<b>3,9</b>	<b>2,1</b>	<b>2,3</b>
	<i>in natura</i>	3,5	4,7	< 1 <sub>est</sub>	5,4
9	130 bar/60 °C/60 min	2,2	1,7	< 1 <sub>est</sub>	2,6
	RD	<b>1,3</b>	<b>3,0</b>	-	<b>2,8</b>
	<i>in natura</i>	5,2	3,0	4,0	4,9
10	295 bar/60 °C/60 min	2,9	2,0	2,2	1,5
	RD	<b>2,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,8</b>	<b>3,4</b>
	<i>in natura</i>	3,9	2,0	2,1	4,9
11	213 bar/50 °C/45 min	1,4	1,9	0,7	2,7
	RD	<b>2,5</b>	<b>0,1</b>	<b>1,4</b>	<b>2,2</b>
	<i>in natura</i>	3,3	5,5	0,7	4,8
12	74 bar/ 50 °C/ 45 min	2,3	3,2	0,4	1,9
	RD	<b>1,0</b>	<b>2,3</b>	<b>0,3</b>	<b>2,9</b>
	<i>in natura</i>	3,4	5,6	3,9	4,2

13	351 bar/50 °C/45 min	2,5	3,6	2,8	1,8	
	RD	<b>0,9</b>	<b>2,0</b>	<b>1,1</b>	<b>2,4</b>	
		<i>in natura</i>	3,3	5,6	1,2	5,1
14	213 bar/33°C/45 min	2,8	2,8	< 1 <sub>est</sub>	2,6	
	RD	<b>0,5</b>	<b>2,8</b>	<b>&gt; 0,2<sub>est</sub></b>	<b>2,5</b>	
		<i>in natura</i>	1,8	5,9	2,5	4,7
15	213 bar/67 °C/45 min	< 1 <sub>est</sub>	4,1	< 1 <sub>est</sub>	0,6	
	RD	<b>&gt; 0,8<sub>est</sub></b>	<b>1,8</b>	<b>0,0</b>	<b>4,1</b>	
		<i>in natura</i>	2,8	5,3	3,7	5,3
16	213 bar/50 °C/20 min	0,8	3,2	3,5	1,8	
	RD	<b>2,0</b>	<b>2,1</b>	<b>0,2</b>	<b>3,5</b>	
		<i>in natura</i>	2,9	4,8	3,6	4,3
17	213 bar/50 °C/70 min	0,8	2,8	2,8	1,6	
	RD	<b>2,1</b>	<b>2,0</b>	<b>0,8</b>	<b>2,7</b>	

est – contagem estimada. - ausência. - - indisponível. RD – redução decimal.  
 Fonte: própria autoria

Os resultados apresentados na Tabela 4 evidenciam o potencial do SC-CO<sub>2</sub> na destruição de contaminantes presentes no caldo de cana *in natura*. As RD decimais alcançadas pelos diferentes trinômios testados atingiram 2,5 log para coliformes termotolerantes, 3,9 log para mesófilos aeróbios, 2,1 log para bactérias lácticas e 4,1 log para bolores e leveduras.

Resultados mais contundentes e consistentes, no tocante ao número de RD decimais, poderiam ser obtidos com a inoculação de uma população elevada (> 7 log UFC/mL) de células no caldo antes do tratamento (denominado teste desafio). Entretanto, como o produto é tratado fora da embalagem, e o equipamento utilizado nesta pesquisa é emprestado e compartilhado em outros projetos conduzidos concomitantemente a este, não foi possível adotar esse protocolo experimental.

Segundo Prati, Moretti e Cardello (2005), contagens de mesófilos acima de 6,0 log UFC/mL indicam deterioração e podem estar relacionadas a deficiências higiênico-sanitárias na extração e/ou estocagem do caldo de cana. Constatou-se neste estudo que tanto o caldo *in natura* quanto o processado apresentaram contagens dentro da faixa aceitável (1,6 – 6,0 log UFC/mL). Para bolores e leveduras, o caldo *in natura* atingiu contagens entre 2,4 e 5,4 log UFC/mL. Segundo Jay (1992), valores acima de 3,0 log UFC/ mL podem provocar alterações indesejáveis. No entanto, no caldo processado as contagens variaram entre 0,3 e 2,7. A eficiência do tratamento com SC-CO<sub>2</sub> na

inativação microbiana está associada à modificação do pH intracelular e extracelular; a inativação está também relacionada com o tempo de difusão do CO<sub>2</sub> nas células microbianas. Assim sendo, o tempo de interação do produto com o CO<sub>2</sub> durante o tratamento é um fator de grande influência na taxa de inativação microbiana (SILVA; MEIRELES; SALDAÑA, 2020).

Para coliformes a 45 °C, as contagens na bebida *in natura* variaram entre < 1,0<sub>est</sub> e 5,2 log UFC/mL. As amostras submetidas aos tratamentos atingiram contagens entre < 1,0<sub>est</sub> e 2,9 log UFC/mL. Os tratamentos atingiram até 2,5 reduções decimais. Os valores quantificados para bactérias láticas no caldo *in natura* variaram entre 1,0 e 4,0 log UFC/mL. Para o caldo processado, as contagens variaram entre < 1,0<sub>est</sub> e 3,5 log UFC/mL. Comparações com dados da literatura não foram realizadas, pois os trabalhos localizados quantificaram aquele grupo após a fermentação da cana, como Martins et al. (2015), que realizaram contagens após 3, 11 e 24 h de fermentação. A contaminação do caldo com bactérias láticas, como *Leuconostoc mesenteroides* e algumas espécies do gênero *Lactobacillus* pode resultar na síntese de dextranas (polissacarídeo formado por unidades de glicose) (KOBLOITZ, 2008), com formação de gomas na bebida, e levando a sua rejeição. A discrepância entre as contagens dentro do mesmo grupo de microrganismos para o caldo *in natura* pode ser atribuída a falhas e falta de padronização nos procedimentos de higienização da matéria-prima, utensílios e/ou dos equipamentos utilizados na extração. Esse fato pode ser considerado comum, tratando-se de alimentos vendidos por ambulantes em vias públicas.








Eggleston (2002) comparou a deterioração microbiológica, enzimática e química (degradação ácida) da sacarose em caldo de cana. Os resultados indicaram que a presença de microrganismos é relevante para a degradação de sacarose. Após 14 horas, a maior contribuição foi de ordem microbiológica, sendo responsável por 93% das perdas, enquanto a degradação enzimática contribuiu com 5,7% das perdas, e a química com 1,3%. Dhansu et al. (2023) pasteurizaram caldo de cana a 65 °C/25 min, e estocaram a bebida sob refrigeração, alcançando 60 dias de conservação. Oliveira et al. (2007) pasteurizaram caldo de cana a 70 °C/25 min; a contagem de bactérias láticas do caldo de cana *in natura* e processado foram (5,9 e 1,3) log UFC/mL respectivamente, alcançando 4,6 RD decimais. As contagens de bolores e leveduras na bebida *in natura* e processada foram (6,1 e 1,7) log UFC/mL respectivamente, alcançando 4,4 RD decimais. Gomes et al. (2020) otimizaram o binômio tempo x temperatura empregado na pasteurização de caldo de cana integral; testaram-se temperaturas e tempos de retenção variando entre 78 e 92 °C, e de 16 a 44 s. Em relação à redução de microrganismos, o tratamento a 90 °C/40 s foi o mais eficiente, alcançando 4,6 RD decimais para mesófilos. Para bolores e leveduras, alcançaram-se 3,2 RD.










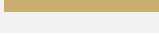

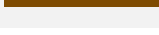

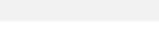













Outros trabalhos investigando o efeito da pasteurização na inativação microbiana foram encontrados, porém com adição de ácidos. Andrade et al. (2019) pasteurizaram caldo de cana acidificado a 95 °C/30 s. A média das contagens de mesófilos no caldo *in natura* foi 3,9 log UFC/mL. Coliformes a 45 °C e *Salmonella* spp. não foram detectados no produto final, obtendo resultados relevantes que se adequaram ao regulamento sanitário brasileiro (RDC 12, 2001), que estabelece normas para o caldo de cana pasteurizado e refrigerado. Silva et al. (2016) acidificaram o caldo de cana até o pH de 4,3. Posteriormente, pasteurizaram a bebida a 95 °C/30 s. As médias das contagens de mesófilos, e bolores e leveduras foram (6,26 e 5,20) log UFC/mL respectivamente, no caldo de cana *in natura*. As médias das contagens no caldo de cana acidificado e pasteurizado para bolores e leveduras foram (2,3 e inferiores a 1) log UFC/mL respectivamente. Hart et al. (2021) reportaram a aplicação de SC-CO<sub>2</sub> na inativação de esporos em alimentos, destacando o quanto esta técnica pode ser mais eficiente na preservação das características nutricionais e sensoriais quando comparada às técnicas de alta pressão hidrostática e métodos térmicos a altas temperaturas. A atuação do SC-CO<sub>2</sub> se dá através de ruptura da parede celular, revestimento, córtex e membranas, e degradação de proteínas. Verifica-se, contudo, a necessidade de estudos mais detalhados e em maiores escalas para atender a indústria e ao consumidor, podendo assim disseminar essa tecnologia no processamento de frutas e sucos.

#### 5.4. ANÁLISE INSTRUMENTAL DE COR

Os fatores de cor determinados no caldo de cana estão exibidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros de cor determinados no caldo de cana *in natura* e tratado com SC-CO<sub>2</sub>

Tratamento	L*	a*	b*	Chroma	°hue	Cor
<i>in natura</i>	33,67 ± 0,02	8,71 ± 0,01	29,95 ± 0,02	31,2	73,8	
213 bar/50 °C/45 min	37,91 ± 0,01	6,25 ± 0,02	27,92 ± 0,02	28,6	77,4	
<i>in natura</i>	34,17 ± 0,02	10,5 ± 0,01	32,55 ± 0,01	34,2	72,1	
130 bar/40 °C/30 min	35,75 ± 0,03	9,37 ± 0,02	30,02 ± 0,01	31,4	72,7	
<i>in natura</i>	32,26 ± 0,02	10,5 ± 0,02	26,03 ± 0,01	28,1	68,1	
295 bar/40 °C/30 min	34,92 ± 0,01	9,02 ± 0,01	26,40 ± 0,01	27,9	71,1	
<i>in natura</i>	36,75 ± 0,01	6,19 ± 0,02	36,71 ± 0,03	37,2	80,4	

130 bar/60 °C/30 min	37,77 ± 0,02	6,27 ± 0,02	34,55 ± 0,02	35,1	79,7	
<i>in natura</i>	38,93 ± 0,03	4,61 ± 0,01	35,44 ± 0,05	35,7	82,6	
295 bar/60 °C/30 min	44,14 ± 0,02	3,96 ± 0,05	37,62 ± 0,03	37,6	84,0	
<i>in natura</i>	69,03 ± 0,10	0,96 ± 0,0	36,60 ± 0,02	36,6	88,5	
213 bar/50 °C/45 min	63,14 ± 0,02	4,62 ± 0,01	43,95 ± 0,01	44,2	84,0	
<i>in natura</i>	40,67 ± 0,01	4,89 ± 0,01	38,58 ± 0,02	38,9	82,8	
130 bar/40 °C/ 60 min	42,55 ± 0,02	4,89 ± 0,01	37,84 ± 0,01	38,2	82,6	
<i>in natura</i>	72,92 ± 0,01	1,22 ± 0,02	36,71 ± 0,02	36,7	88,1	
295 bar/40 °C/60 min	73,06 ± 0,01	4,04 ± 0,01	42,28 ± 0,02	42,5	84,5	
<i>in natura</i>	71,09 ± 0,02	2,64 ± 0,04	35,90 ± 0,03	36,0	85,8	
130 bar/60 °C/60 min	60,91 ± 0,02	3,97 ± 0,02	39,33 ± 0,02	39,5	84,2	
<i>in natura</i>	37,02 ± 0,01	16,09 ± 0,0	45,84 ± 0,01	40,6	70,7	
295 bar/60 °C/60 min	50,14 ± 0,02	14,74 ± 0,0	50,67 ± 0,02	52,8	73,8	
<i>in natura</i>	31,48 ± 0,02	4,60 ± 0,03	30,29 ± 0,03	30,6	81,4	
213 bar/50 °C/45 min	32,53 ± 0,01	5,80 ± 0,03	24,75 ± 0,02	25,4	76,8	
<i>in natura</i>	55,16 ± 0,02	5,14 ± 0,02	41,59 ± 0,02	41,9	83,0	
74 bar/ 50 °C/ 45 min	49,73 ± 0,02	6,78 ± 0,02	34,34 ± 0,01	35,0	78,8	
<i>in natura</i>	49,15 ± 0,01	5,65 ± 0,01	44,44 ± 0,01	44,8	82,8	
351 bar/50 °C/45 min	51,37 ± 0,01	4,33 ± 0,02	37,39 ± 0,05	37,6	83,4	
<i>in natura</i>	60,81 ± 0,02	4,94 ± 0,01	44,73 ± 0,01	44,9	83,7	
213 bar/33 °C/45 min	66,36 ± 0,02	4,05 ± 0,04	38,75 ± 0,02	39,0	84,0	
<i>in natura</i>	58,49 ± 0,01	3,05 ± 0,05	40,05 ± 0,02	40,2	85,6	
213 bar/67 °C/45 min	52,32 ± 0,02	4,25 ± 0,03	36,51 ± 0,01	36,8	83,4	
<i>in natura</i>	52,49 ± 0,03	6,53 ± 0,05	45,88 ± 0,02	46,3	81,9	
213 bar/50 °C/20 min	52,82 ± 0,02	6,63 ± 0,04	41,09 ± 0,02	41,6	80,8	
<i>in natura</i>	63,63 ± 0,01	4,84 ± 0,03	46,17 ± 0,05	46,4	84,0	
213 bar/50 °C/70 min	65,70 ± 0,04	4,58 ± 0,02	42,14 ± 0,02	42,4	83,8	



L\* (luminosidade) = 0 (preto), 100 (branco), +a\* = vermelho, -a\* = verde, +b\* = amarelo, -b\* = azul.  
Fonte: própria autoria

O parâmetro L\*, que representa a luminosidade, variou amplamente para o caldo *in natura* (32,26 – 72,92) e processado (32,53 – 73,06). A maioria dos tratamentos influenciou positivamente na luminosidade do caldo de cana, o que provavelmente está relacionado a inativação enzimática (Tabela 3). Este resultado poderia favorecer a aceitação sensorial da bebida, assumindo-se a premissa de que o consumidor tem preferência por uma bebida mais clara.

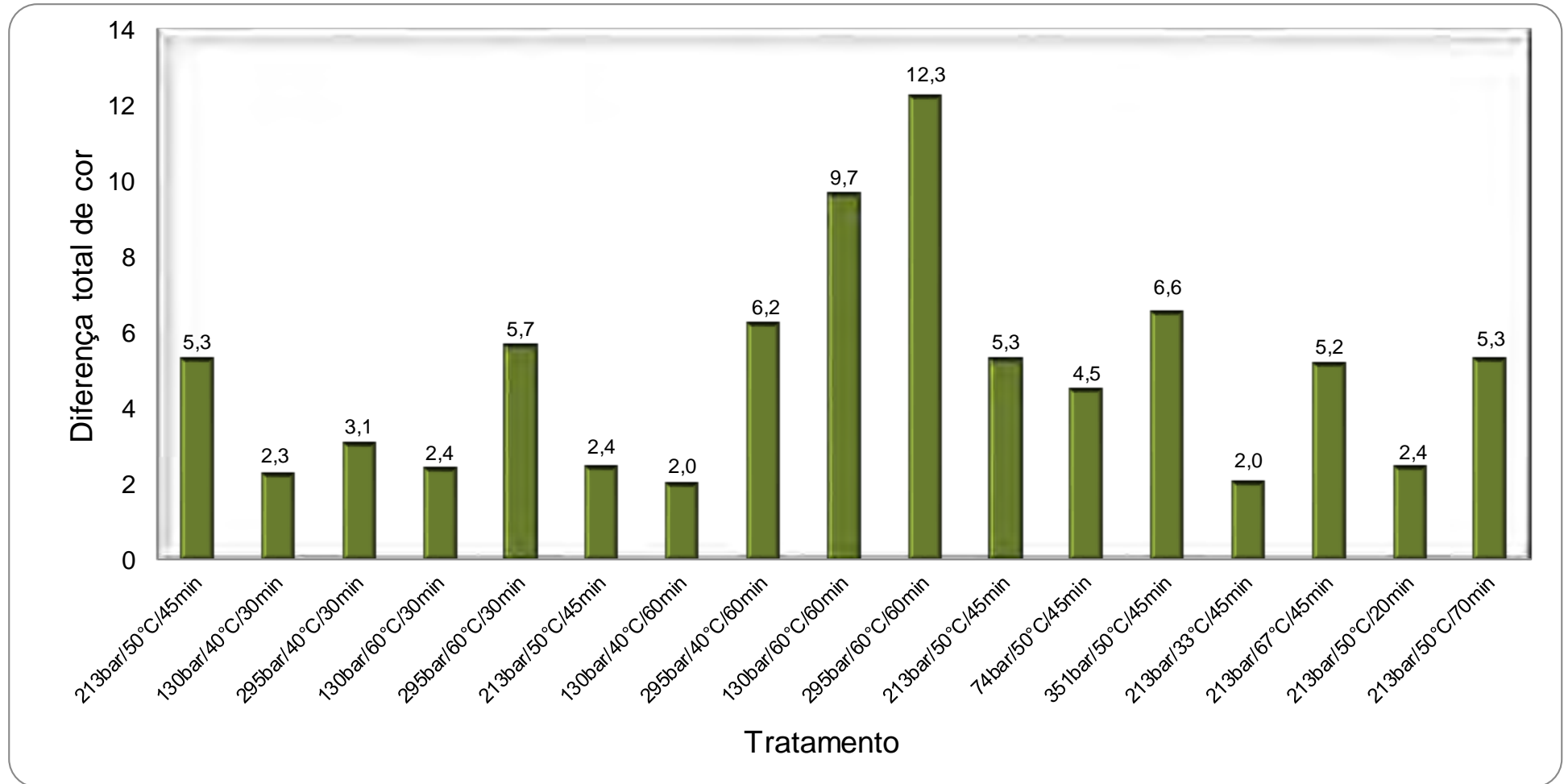
Analogamente, observou-se uma grande variação no parâmetro a\* para o caldo *in natura* (0,96 – 16,09) e processado (3,96 – 14,74). O parâmetro b\* também variou consideravelmente para a bebida *in natura* (26,03 – 46,17) e processada (24,75 – 50,67).

Em relação ao parâmetro chroma, variações expressivas também foram observadas para a bebida *in natura* (28,1 – 46,4) e processada (25,4 – 52,8). O parâmetro chroma (C\*) correlaciona-se com a saturação, caracterizando a cor da amostra como “viva” (*vivid*) ou opaca (*dull*). Este atributo é independente da luminosidade e do ângulo hue. A saturação varia de vermelho-púrpura a verde, e aumenta do centro (0) para a extremidade do círculo de cor. Segundo Oliveira et al. (2007), valores de C\* inferiores representam cores cinzas, e próximos a 60 representam cores vivas. Oliveira et al. (2007) obtiveram valores de C\* próximos a 9 (coloração mais neutra), para caldo de cana *in natura*, contrastando com o presente estudo. Meerod (2019) estudou diferentes cultivares de matéria-prima, que apresentaram colorações divergentes em vários níveis.

Seguindo o mesmo comportamento dos parâmetros anteriores, o ângulo hue também exibiu grande variação para o caldo *in natura* (68,1 – 88,5) e processado (71,1 – 84,5°). Hue, medido em graus, classifica a cor (verde, amarelo, azul etc). As faixas determinadas neste estudo estão posicionadas no primeiro quadrante do círculo de cor, podendo ser classificada entre vermelho-amarelado e amarelo.

As amplas faixas de variação observadas nos parâmetros de cor podem ser explicadas pela variabilidade inerente à matéria-prima; utilizaram-se amostras de caldo extraídas em diferentes dias, de diferentes canas, no transcorrer da pesquisa, que estendeu-se por mais de 1 ano.

A Figura 4 ilustra a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) entre o caldo de cana *in natura* e processado.

Figura 4 - Diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) entre o caldo de cana *in natura* e processado com SC-CO<sub>2</sub>

Fonte: própria autoria

O maior (12,3) e menor (2,0) valores de DTC foram determinados para a bebida tratada a 295 bar/ 60 °C/ 60 min e (130 bar/ 40 °C/ 60 min e 213 bar/ 33 °C/ 45 min), respectivamente. De acordo com Bernart et al. (2014), valores de  $\Delta E^*$  inferiores a 3 não podem ser detectados com facilidade pelo olho humano, e valores superiores a 12 representam diferentes “espaços” de cor. Portanto, dos 17 ensaios realizados, apenas seis preservaram a coloração original da bebida, no que tange a sua provável percepção sensorial.

A Tabela 7 mostra a matriz experimental completa, com os fatores (variáveis independentes) e as respostas (variáveis dependentes) obtidas a partir dos testes microbiológicos, enzimáticos e da análise de cor.

Tabela 7 - Matriz completa do experimento com caldo de cana tratado com SC-CO<sub>2</sub>

Ensaio	P (bar)	T (°C)	t (min)	PPO (%red)	POD (%red)	Colif. (45 °C) log red	Meso RD	Bol e lev RD	Bact lácticas RD	Diferença total de cor	ΔpH	ΔSS
1	130 (-1)	40 (-1)	30 (-1)	50,81	17,50	-	0,4	2,1	1,4	2,3	-0,2	-0,2
2	295 (+1)	40 (-1)	30 (-1)	40,40	15,19	-	2,0	2,1	> 0,3	3,1	0,0	-0,3
3	130 (-1)	60 (+1)	30 (-1)	44,66	12,70	1,8	3,0	3,2	2,0	2,4	-0,3	-0,2
4	295 (+1)	60 (+1)	30 (-1)	64,18	4,61	> 0,3	2,2	2,2	1,6	5,7	-0,2	-0,3
5	130 (-1)	40 (-1)	60 (+1)	17,51	20,90	> 1,3	> 1,7	3,2	0,1	2,0	-0,4	-0,2
6	295 (+1)	40 (-1)	60 (+1)	30,00	6,92	-	3,9	2,3	2,1	6,2	-0,2	-0,1
7	130 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	7,74	39,43	1,3	3,0	2,8	-	9,7	-0,2	-0,2
8	295 (+1)	60 (+1)	60 (+1)	24,47	39,43	2,3	1,0	3,4	1,8	12,3	0,2	0,0
9	74 (1.68)	50 (0)	45 (0)	58,74	17,57	1,0	2,3	2,9	0,3	4,5	0,3	-0,3
10	351(1.68)	50 (0)	45 (0)	60,56	30,87	0,9	2,0	2,4	1,1	6,6	-0,2	-0,1
11	213 (0)	33 (1.68)	45 (0)	3,51	0,27	0,5	2,8	2,5	> 0,2	2,0	-0,2	-0,3
12	213 (0)	67 (1.68)	45 (0)	6,53	41,42	> 0,8	1,8	4,1	0,0	5,2	-0,1	0,0
13	213 (0)	50 (0)	20 (-1.68)	55,00	0,46	2,0	2,1	3,5	0,2	2,4	0,0	0,0
14	213 (0)	50 (0)	70 (1.68)	37,62	1,94	2,1	2,0	2,7	0,8	5,3	0,1	-0,3
15	213 (0)	50 (0)	45 (0)	32,91	12,65	> 0,5	1,8	2,4	-	5,3	-0,1	-0,4
16	213 (0)	50 (0)	45 (0)	32,04	19,6	-	3,2	3,2	1,4	2,4	0,0	-0,3
17	213 (0)	50 (0)	45 (0)	63,30	15,26	2,5	0,1	2,2	1,4	5,3	-0,1	-0,2

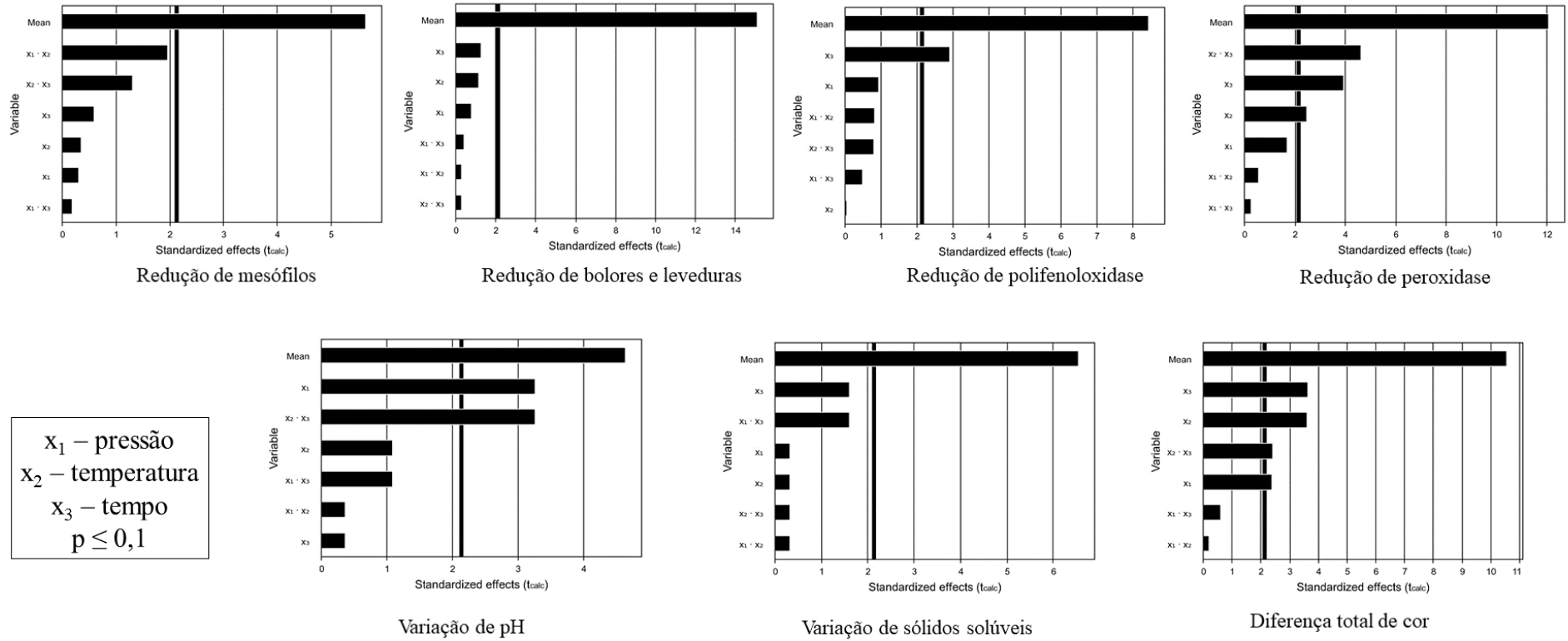
(-1,68) ponto axial inferior. (-1) nível inferior. (0) ponto central. (+1) nível superior. (+1,68) ponto axial superior.  $\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,68$ . SS – sólidos solúveis. RD – redução decimal.

Fonte: própria autoria

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Como o número de reduções de coliformes e bactérias lácticas não pôde ser calculado em alguns ensaios (Tabela 6), essas respostas não foram submetidas à análise estatística. A Figura 5 exibe os diagramas de Pareto, construídos para investigar quais fatores/variáveis (pressão/  $P/x_1$ , temperatura/  $T/x_2$ , tempo de espera/  $t/x_3$ ) foram significativos ( $p \leq 0,1$ ) nas respostas estudadas. Os termos que não apresentaram significância estatística foram incorporados à falta de ajuste para cálculo do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Figura 5 - Diagramas de Pareto para caldo de cana tratado com SC-CO<sub>2</sub>



Fonte: própria autoria

Quanto à redução de mesófilos, bolores e leveduras e variação de sólidos solúveis, nenhuma das variáveis ou suas interações foram significativas. Em termos de redução da polifenoloxidase (PPO), apenas  $t$  ( $x_3$ ) foi significativo; entretanto, os fatores  $T$  ( $x_2$ ),  $t$  ( $x_3$ ) e a interação entre eles ( $x_2, x_3$ ) tiveram um efeito significativo na redução da peroxidase (POD). Em relação à variação do pH,  $P$  ( $x_1$ ) e a interação entre  $T$  e  $t$  ( $x_2, x_3$ ) foram significativos. Finalmente,  $P$ ,  $T$ ,  $t$  e a interação entre  $T$  e  $t$  foram significativos na diferença de cor total. Apenas as variáveis significativas foram incorporadas ao modelo matemático, cuja significância estatística foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA). A Tabela 8 apresenta a ANOVA realizada para os modelos (1ª e 2ª ordens) gerados para as respostas *redução de POD* e *diferença total de cor* (DTC); os modelos para outras respostas não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,1$ ). Os modelos preditivos codificados obtidos para as respostas acima mencionadas são representados pelas Equações 4 e 5.

$$Y_1 = 18.56 + 4.46 x_2 + 7.09 x_3 + 8.30 x_2 x_3$$

(Eq.4)

**$Y_1$  – POD redução (%)**

$x_2$  – Temperatura (T)

$x_3$  – Tempo (t)

$$Y_2 = 5.15 + 1.36 x_1 + 2.06 x_2 + 2.09 x_3 + 1.39 x_2 x_3$$

(Eq.5)

**$Y_2$  – Diferença total de cor**

$x_1$  – Pressão (P)

$x_2$  – Temperatura (T)

Para fins práticos, é desejável que o modelo ajustado seja o mais simples possível e contenha o menor número possível de parâmetros sem prescindir da qualidade do desenho experimental. Os modelos apresentados (Eq. 4 e 5) foram reparametrizados/reduzidos, em virtude da exclusão dos fatores com pouca ou nenhuma influência no resultado do ajuste final. A Tabela 8 mostra a ANOVA para redução de peroxidase e diferença de cor total no caldo de cana.

Tabela 8 - Análise de variância ( $p \leq 0,1$ ) para redução de peroxidase e diferença de cor total no caldo de cana

Resposta	Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	valor F	
					F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Redução de POD 1 <sup>a</sup> ordem	Regressão	1112,0	3	370,7	13,8	3,1
	Residuo	188,4	7	26,9		
	Total	1300,4				
	R <sup>2</sup>	<b>0,86</b>				
Redução de POD 2 <sup>a</sup> ordem	Regressão	1356,7	2	678,3	6,2	2,73
	Residuo	1536,4	14	109,7		
	Total	2893,1				
	R <sup>2</sup>	<b>0,47</b>				
Diferença total de cor 1 <sup>a</sup> ordem	Regressão	99,1	4	24,8	13,1	3,2
	Residuo	11,5	6	1,9		
	Total	110,6				
	R <sup>2</sup>	<b>0,90</b>				
Diferença total de cor 2 <sup>a</sup> ordem	Regressão	99,8	4	25,0	10,0	2,5
	Residuo	29,5	12	2,5		
	Total	129,3				
	R <sup>2</sup>	<b>0,77</b>				

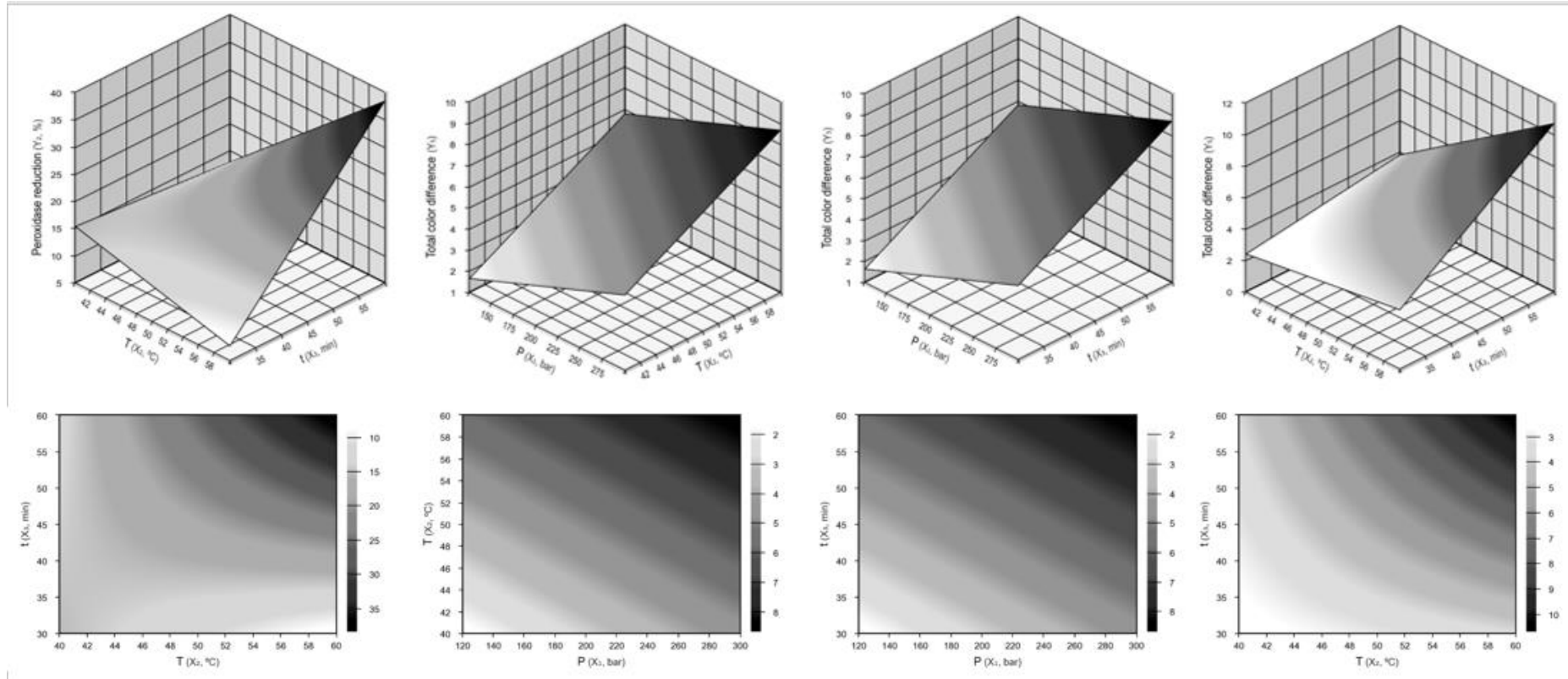
Fonte: própria autoria

Em relação à *redução de POD*, a Tabela 7 mostra que o modelo de 1<sup>a</sup> ordem ( $R^2 = 0,86$ ) ajustou-se melhor aos dados experimentais comparado ao modelo de 2<sup>a</sup> ordem ( $R^2 = 0,47$ ). Para ambas as ordens,  $F_{\text{calc}}$  foi maior que  $F_{\text{tab}}$ . Da mesma forma, quanto à *diferença total de cor* (TCD), o modelo matemático de 1<sup>a</sup> ordem ( $R^2 = 0,90$ ) melhor se ajustou aos dados experimentais. As Equações 4 e 5 (codificadas) podem ser usadas para prever a porcentagem de redução de POD e o TCD que pode ser alcançado em caldo de cana processado nas mesmas condições deste estudo. O modelo codificado é aquele cujos coeficientes de regressão são obtidos a partir da matriz de variáveis codificadas ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ ). Para prever uma resposta ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ) deve-se substituir os valores na respectiva equação codificada. Em contrapartida, se os valores reais das variáveis foram substituídas no modelo, o valor predito pode ser incorreto e até absurdo. De particular relevância é a afirmação de que os modelos matemáticos de primeira apresentados (Equações 4 e 5) são válidos apenas em uma faixa de pressão compreendida entre 130 e 295 bar, temperatura entre 40 e 60 min e tempo de exposição entre 30 e 60 min (Tabela 1).



A Figura 5 ilustra as superfícies de resposta e curvas de contorno que representam as Equações 4 e 5. Ao analisar a superfície para redução de POD, pode-se identificar a existência de uma faixa ótima para a temperatura (57-60 °C) e tempo de exposição (56-60 min), independentemente da pressão (na faixa de 130-295 bar). Quanto a TDC, as faixas de 130-150 bar, 40-43°C e 30-35 min, dentro das quais a diferença de cor entre o caldo *in natura* e processado é mínima, representam as condições ideais neste experimento. Esse resultado é mais interessante do que um simples valor pontual, pois fornece informações sobre a “robustez” do processo, pois demonstra as variações de pressão, temperatura e tempo que podem ser permitidas em torno de valores ótimos que ainda mantêm o processo em condições otimizadas. Essa constatação é fundamental para os controladores do processo definirem e manterem os sensores de pressão, temperatura e tempo em condições acuradas (RODRIGUES; IEMMA, 2015).

Figura 6 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para redução de POD (peroxidase reduction) e diferença total de cor (total color difference) em caldo de cana tratado com SC-CO<sub>2</sub>



Fonte: própria autoria

## 6 VALIDAÇÃO DOS MODELOS PREDITIVOS

A validação dos modelos preditivos (Equações 4 e 5) foi realizada para confirmar experimentalmente os resultados obtidos a partir da análise da superfície de resposta. A Tabela 9 apresenta as condições operacionais utilizadas nos ensaios experimentais para validação dos modelos para predição da redução de peroxidase (Eq. 4).

Tabela 9 - Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para validação do modelo para predição da redução de **peroxidase**

Variável independente	Condição Experimental				Valor Codificado			
Pressão	130 bar	130 bar	74 bar	130 bar	-1	-1	-1,68	-1
Temperatura	45 °C	45 °C	59 °C	59°C	-0,5	-0,5	0,90	0,90
Tempo	40 min	40 min	59 min	58 min	-0,33	-0,33	0,93	0,93

E – ensaio

Fonte: própria autoria

A tabela 10 apresenta as condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para validação do modelo para predição da diferença total de cor (Eq. 5).

Tabela 10 - Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para validação dos modelos para predição da **diferença total de cor**

Variável	Condição Experimental				Valor Codificado			
Pressão	280 bar	280 bar	130 bar	140 bar	0,82	0,82	-1	-0,88
Temperatura	55 °C	55 °C	50 °C	42 °C	0,50	0,50	0	-0,8
Tempo	50 min	50 min	30 min	33 min	0,33	0,33	-1	-0,8

E – ensaio.

Fonte: própria autoria

A tabela 11 reúne os resultados preditos e experimentais dos trinômios otimizados para os tratamentos do caldo de cana.

Tabela 11 - Resultados preditos e experimentais

Resposta	Valor predito				Valor experimental			
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4
Peroxidase (% redução)	15,4	15,4	36,1	36,1	20,9	21,8	32,9	19,9
Diferença total de cor	8,2	8,2	1,7	1,5	7,4	5,2	8,2	7,3

E – ensaio.

Fonte: própria autoria

Para a POD, as variáveis tempo (t) e temperatura (T) foram significativas enquanto para cor, as variáveis significativas foram pressão (P) e temperatura (T). (Tabela 7/ Figura 5)



Dos 4 ensaios de realizados para peroxidase, houve maior discrepância apresentada em E4, no qual o resultado predito foi de 36,1% de redução, enquanto o resultado experimental foi de 19,9%. Em E1 e E2, as porcentagens preditas foram mais próximas às determinadas experimentalmente. Em E3 o valor predito foi de 36,1%, enquanto o experimental foi de 32,9%.

Quanto à diferença total de cor, os ensaios E1 e E2 apresentaram porcentagens de RD próximas às preditas. Porém nos ensaios E3 e E4 observa-se maior discrepância nos resultados experimentais quando comparados aos preditos. Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos, pode-se considerar que os resultados experimentais obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios para alguns ensaios. Tais resultados mostram que a utilização do planejamento fatorial promove a realização de condições experimentais onde é possível otimizar mais que uma resposta ao mesmo tempo, estabelecendo condições que garantam àquelas desejadas ao produto final (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

## 7 TRATAMENTO ABAIXO DO PONTO CRÍTICO

Com o propósito de avaliar o impacto do CO<sub>2</sub> abaixo do ponto crítico (73,8 bar e 31,1 °C) na inativação de microrganismos e enzimas, nos fatores físico-químicos e na cor do caldo de cana, realizou-se um ensaio adicional a 70 bar/25° C/45 min. A Tabela 12 compila os dados obtidos.

Tabela 12 - Dados obtidos no tratamento de caldo de cana com CO<sub>2</sub> abaixo do ponto crítico

Contagem microbiana (log UFC/mL)			
	<i>in natura</i>	70 bar/25° C/45 min	RD
Coliforme a 45° C	3,2	0,9	2,3
Mesófilos	5,2	3,3	1,9
Bactérias lácticas	3,6	2,5	1,1
Bolores e leveduras	4,8	3,6	1,2
Atividade enzimática (U)			
	<i>in natura</i>	70 bar/ 25° C/ 45 min	Redução (%)
Polifenoloxidase	17,6 ± 1,5	15,1 ± 0,4	14,2
Peroxidase	198,7 ± 0,0	197,6 ± 2,1	0,6
Parâmetros físico-químicos			
	<i>in natura</i>	70 bar/ 25° C/ 45 min	Δ
pH	5,3 ± 0,0	5,1 ± 0,0	-0,2
Sólidos solúveis (°Brix)	21,3 ± 0,1	21,1 ± 0,1	-0,2
Cor			
Parâmetro	<i>in natura</i>	70 bar/25° C/45 min	
L *	67,30	66,67	
a*	0,54	2,82	
b*	45,81	46,75	
Chroma	45,80	46,8	
°hue	89,30	86,5	
Coloração			
Diferença total de cor (DTC)		2,6	

Fonte: Própria autoria.

Os resultados apresentados na tabela 11 evidenciam o potencial do CO<sub>2</sub> na destruição de contaminantes presentes no caldo de cana *in natura*, tratado abaixo do ponto crítico. Relativamente à redução de coliformes, mesófilos e bactérias lácticas, as respostas (número de RD decimais) situaram-se nas faixas verificadas nas condições supercríticas (Tabela 6). Para bolores e leveduras, o tratamento com CO<sub>2</sub> abaixo do ponto crítico não foi tão efetivo comparado ao tratamento no estado supercrítico.

Quanto à percentagem de redução de PPO (14,2%), esta foi inferior a alcançada pela grande maioria dos tratamentos no estado supercrítico (Tabela 6). Para a POD, a percentagem de redução de atividade foi equivalente a 0,6%, muito inferior a grande maioria dos resultados obtidos no estado supercrítico.

Em relação ao pH e ao teor de sólidos solúveis, não houve variações relevantes ( $\Delta = -0,2$ ), similarmente ao que foi verificado nos tratamentos no estado supercrítico (Tabela 6).

Em relação à diferença total de cor (DTC), o ensaio realizado abaixo do ponto crítico resultou em um valor de 2,6, indicando que o tratamento a 70 bar/25° C/45 min não produziu efeito perceptível na cor do caldo de cana. De acordo com Bernat et al. (2014) valores de DTC inferiores a 3 não podem ser detectados com facilidade pelo olho humano. Este resultado (DTC = 2,6) está próximo aos valores determinados em alguns ensaios na condição supercrítica.

## 8 CONCLUSÕES

A combinação de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) e temperaturas brandas exibiu um efeito significativo na redução de microrganismos no caldo de cana, nas condições deste estudo. As enzimas endógenas que deterioram a qualidade do caldo foram parcialmente inativadas. Nenhuma das variáveis (pressão/P, temperatura/T, tempo/t) ou suas interações foram significativas na redução de mesófilos, bolores e leveduras, ou variação de sólidos solúveis. Em termos de redução da polifenoloxidase, apenas t foi significativo; no entanto, T, t e a interação entre eles teve um efeito significativo na redução da peroxidase. Em relação à variação do pH, P e a interação entre T e t foram significativas. P, T, t e a interação entre T e t foram significativas na diferença de cor total. Finalmente, os dados obtidos nesta pesquisa indicaram que a combinação de SC-CO<sub>2</sub> e temperaturas brandas representa uma potencial intervenção tecnológica a ser explorada para a conservação de caldo de cana.

## 9 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Algumas sugestões para condução de eventuais estudos futuros estão apontadas, a mencionar:

- 1 - Análise sensorial do caldo de cana submetido às combinações de pressão, temperatura e tempo que resultaram em maiores RD de microrganismos e enzimas endógenas;
- 2 - Estudo de vida de prateleira da bebida com os melhores tratamentos aplicados diante dos modelos matemáticos preditivos encontrados;
- 3 - Avaliação comparativa do efeito combinado de temperaturas brandas + CO<sub>2</sub> supercrítico e da aplicação do tratamento térmico, isoladamente, aplicado em escala comercial;
- 4- Estudo do potencial do dióxido de carbono em estado supercrítico na estabilização de outras bebidas.

## 10 REFERÊNCIAS

- ABIDIN, Z. *et al.* **Bebidas não alcoólicas**: a ciência das bebidas. [S.l.:s.n.] 2019. 227 p. v. 6.
- ANDRADE, I. M. G. *et al.* The shelf life of standardized sugarcane juice stored under refrigeration. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 40, n. 1, p. 95-101, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.33918>.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA CANA DE AÇÚCAR. Safra de 2016. Editora Gazeta, 2016. Disponível em: <https://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-da-cana-de-acucar-2016/>.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA CANA DE AÇÚCAR. Safra de 2022. Editora Gazeta, 2022. Disponível em: <https://www.editoragazeta.com.br/anuario-brasileiro-da-cana-de-acucar-2022/>.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 22 de março 2021.
- AOAC. (2010) – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis** (18th ed., 1094 p.). Washington: AOAC.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. 5. ed. atual. ampl. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. 601 p.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. 478 p.
- ARIF, Sania *et al.* Physical-chemical characteristics, nutritional properties and health benefits of sugarcane juice. In **Non-alcoholic beverages**. Woodhead Publishing, 2019. p.227-257
- BAE, Y. Y. *et al.* Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1, p. 95-100, Nov. 2009.
- BERNAT, N. *et al.* Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 49, n. 12, p. 2553-2562, 2014.
- BOMDESPACHO, L. Q. **Avaliação sensorial descritiva de caldo de cana extraído de diferentes cultivares**. 2018. 160 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.
- CAMPOS, C. F. *et al.* Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 20, p. 487-500, 1996.
- CHOI, M. H.; KIM, G. H.; LEE, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. **Food Research International**, Ottawa, v. 35, n. 8, p. 753-759, 2002.



COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra cana de açúcar 2022**. CONAB, 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em 20 de janeiro de 2023

DAMAR, S.; BALABAN, O. Review of dense phase CO<sub>2</sub> technology: microbial and enzyme inactivation and effects on food quality. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 1, p. 1-11, 2006.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010.

DHANSU, P. *et al.* Different treatments for conservation of sugarcane juice para conservação do caldo de cana. **Foods**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 311, 2023.

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

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

FERREIRA, K. S. M. *et al.* Influência de cor e do sabor na preferência de caldo de cana. **Nutrire**, São Paulo, v. 32, res. PS25041, p. 118, 2007. Supl. Trabalho apresentado no 9º Congresso Nacional da SBAN, 2007, São Paulo.

FERRENTINO, G. *et al.* Food treatment with high pressure carbon dioxide: Saccharomyces cerevisiae inactivation kinetics expressed as a function of CO<sub>2</sub> solubility. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 52, p. 151-160, 2010.

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

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, p. 35-40, 1991.

GOMES, J. L. *et al.* Sugarcane juice pasteurization: a search for the most effective parameters. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 44, n. 11, art. e14842, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14842>.

GOYENECHÉ, Rosário; DI SCALA, Karina; ROURA, Sara. Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish (*Raphanus sativus* var. *sativus*). **LWT-Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 54, n. 1, pág. 57-62, 2013.

GUI, F. *et al.* Change of polyphenol oxidase activity, color, and browning degree during storage of cloudy apple juice treated by supercritical carbon dioxide. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 223, n. 3, p. 427-432, 2006.

GUO, M. M. *et al.* Effects on microbial inactivation and quality attributes in frozen lychee juice treated by supercritical carbon dioxide. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 232, n. 5, p. 803-811, May. 2011.

HART, A. *et al.* Application of supercritical fluid carbon dioxide to improve shelf life and food safety through spore inactivation: a review. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], p. 1-12, 2021.

IFTIKHAR, T.; WAGNER, M. E.; RIZVI, S. S. H. Enhanced inactivation of pectin methyl esterase in orange juice using modified supercritical carbon dioxide treatment. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 804-810, Mar. 2014.

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

IQBAL, A. *et al.* Mecanismos de ativação e inativação da polifenol oxidase durante métodos térmicos e não térmicos de processamento de alimentos. **Food and Bioproducts Processing**, Amsterdam, v. 117, p. 170-182, 2019.

JAKÓB, A. *et al.* Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 123, n. 2, p. 369–376, 2010.

JAY, James M. Do background microorganisms play a role in fresh food safety? **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 12, pág. 421-424, 1997.

JIMENEZ, P.O.; SAMANIEGO, R.L. Enzymic browning in cane juice. **Crystallizer**, v.4, p. 10-11, 1981.

JIMENEZ-SANCHEZ, C. *et al.* Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing, Part 1: techniques and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 57, n. 3, p. 501-523, 2017a.

JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, C. *et al.* Alternatives to conventional thermal treatments in fruit juice processing, Part 2: effect on composition, phytochemical content, and physicochemical, rheological, and organoleptic properties of fruit juices. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 57, n. 3, p. 637-652, 2017b.

KARAMAN, H.; ERKMEN, O. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 11-16, 2001.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos**: teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOHLI, G. *et al.* Effect of non-thermal hurdles in shelf life enhancement of sugarcane juice. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 112, art. 108233, 2019.

KORT, M. J. Colour in the sugar industry. In: BIRCH, G. G.; PARKER, K. J. (Eds.). **Sugar: Science and Technology**. London: Applied Science Publishers, 1979.

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

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

MARZALEK, K. *et al.* The application of supercritical carbon dioxide for the stabilization of native and commercial polyphenol oxidases and peroxidases in cloudy apple juice (cv. Golden Delicious). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 39, p. 42-48, 2017.

MARZALEK, K. *et al.* Application of supercritical carbon dioxide for the preservation of strawberry juice: microbial and physicochemical quality, enzymatic activity and the degradation kinetics of anthocyanins during storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 32, p. 101-109, 2015.

MARZALEK, Krystian *et al.* Comparative effect of supercritical carbon dioxide and high pressure processing on structural changes and loss of redox enzyme activity. **Journal of CO2 Utilization**, v. 29, p. 46-56, 2019.

MARTINS, N. G. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Fitalatos em cana-de-açúcar. *In*: ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PÓS-GRADUANDOS DO CENA/USP, 8., 2002, Piracicaba. **Resumos** [...]. Piracicaba: CENA/USP, 2002. p. 64.

MARTINS, S. C. S. *et al.* Evolução do crescimento das populações de leveduras e bactérias lácticas na fermentação do caldo de cana para produção de aguardente. **Higiene alimentar**, São Paulo, p. 141-143, 2015. Disponível em: <https://higienealimentar.com.br/wp-content/uploads/2019/07/242-243.pdf#page=140>. Acesso em: 29 jan. 2022.

MATOS, K. H. O. **Inativação microbiana em ostras (*Crassostrea gigas*) empregando dióxido de carbono supercrítico**. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MEEROD, K., WEERAWATANAKORN, M., & PANSAK, W. (2019). Impact of sugarcane juice clarification on physicochemical properties, some nutraceuticals and antioxidant activities of non-centrifugal sugar. **SugarTech**, 21(3), 471-480. <http://dx.doi.org/10.1007/s12355-018-0646-7>

MOSCA, A. C. *et al.* Effect of CO2 preservation treatments on the sensory quality of pomegranate juice. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 23, art. 5598, 2020.

MURTAZA, Ayesha *et al.* Aggregation and conformational changes in native and heat-treated polyphenol oxidase from apple juice (*Malus domestica*). **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 203, 2018.

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

OLIVEIRA, A. C. G. *et al.* Percepção dos consumidores sobre o comércio de alimentos de rua e avaliação do teste de mercado do caldo de cana processado e embalado em seis municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 4, p. 397-403, 2007.

ORTUNO, C.; BALABAN, M.; BENEDITO, J. Modelling of the inactivation kinetics of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and pectin methylesterase in orange juice treated with ultrasonic-assisted supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 90, p. 18-26, June. 2014.

OULE, K. M.; DICKMAN, M.; ARUL, J. Properties of orange juice with supercritical carbon dioxide treatment. **International Journal of Food Properties**, New York, v. 16, n. 8, p. 1693-1710, Nov. 2013.

PERRY, R. H. **Chemical engineering handbook**. New York: Mc Graw-Hill Chemical Engineering Services, 1988.

PRADO, S. P. T.; BERGAMINI, A. M. M. Avaliação do perfil microbiológico e microscópico do caldo de cana in natura comercializado por ambulantes, **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, p. 55-61, 2010.

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

QUDSIEH, H. Y. M. *et al.* Effect of maturity on chlorophyll, tannin, color and polyphenol oxidase (PPO) activity of sugarcane juice (*Saccharum officinarum* Var, Yellow Cane). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 1615-1618, 2002.

RAMACHANDRAN, C. *et al.* Optimization of shelf stability of sugarcane juice with natural preservatives. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 41, p. 1-11, 2017.

RE, L. *et al.* Effects of some natural extracts on the acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. **Pharmacological Research**, London, v. 39, n. 3, p. 239-45, 1999.

ROCHA, G. F. **Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e sensorial do caldo de cana cultivada sob manejo orgânico e convencional**. 2012. 43 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Amic, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Amic, 2015.

SANKHLA, S. *et al.* Preservation of sugarcane juice using hurdle technology. **Sugar Tech**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 26-39, Mar. 2012.

SANTOS, D. N. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos estratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L)**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

SAXENA, Juhi; AHMAD MAKROO, Hilal; SRIVASTAVA, Brijesh. Effect of ohmic heating on Polyphenol Oxidase (PPO) inactivation and color change in sugarcane juice. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 3, pág. e12485, 2017.

SIDDIQ, M.; DOLAN, KD Characterization of blueberry de polyphenol oxidase (Vaccinium corymbosum L.). **Chemistry of food**, v. 218, p. 216-220, 2017.

SILVA, C. O. *et al.* Sugarcane juice processing: microbiological monitoring. **Journal of Food Processing and Technology**, Los Angeles, v. 7, n. 7, art. 1000607, 2016. DOI: 10.4172/2157.7110.1000607.

SILVA, E. K.; MEIRELES, M. A. A.; SALDAÑA, M. D. A. Supercritical carbon dioxide technology: a promising technique for the non-thermal processing of freshly fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 97, p. 381-390, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.025>.

SILVA, J. M. **Inativação de *Escherichia coli* utilizando dióxido de carbono supercrítico**. 2011. 64 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2011.

SILVA, K. S. **Avaliação de processo de industrialização de caldo de cana de açúcar (*sacharum ssp*) por enchimento a quente e sistema asséptico**. 2004. 111 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2004.

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

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, N. **Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo de cana no processo de produção de álcool**. 1988. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

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

SILVA, V. P. *et al.* Desenvolvimento de sorvetes à base de caldo de cana e avaliação sensorial com crianças. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 813-824, mar./abr. 2014.

TFOUNI, S. A. V. **Estudo do efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2005. 113 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

TSUJI, M.; SATO, Y.; KOMIYAMA, Y. Inactivation of microorganisms and enzymes in juices by supercritical carbon dioxide method with continuous flow system. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, [s.l.], v. 52, n. 11, p. 528-531, 2005.

VAN LOEY, A.; VERACHTERT, B.; HENDRICKX, M. Effects of high electric field pulses on enzymes. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 12, n. 3-4, p. 94–102, 2001.

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

WU, Benjamin C.; KLEIN, Michael T.; SANDLER, Stanley I. Reactions in supercritical fluids: effect of phase behavior on dibenzyl ether pyrolysis kinetics. **Research in industrial chemistry and engineering**, v. 28, n. 3, pág. 255-259, 1989.

YASMEEN, G. Workers in the urban “informal” food sector: innovative organizing strategies. **Food nutrition and Agriculture**, Rome, v. 29, p. 32-4, 2001.

YUSOF, S.; SHIAN, L. S.; OSMAN, A. Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 68, p. 395-40, 2000.

ZDENĚK, W.; ZAREVÚCKA, M. Review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v.11, p. 233-253, jan. 2010.

ZHANG, J. *et al.* Sterilization using high-pressure carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 38, p. 354-372, 2006.