



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA



# Avaliação do efeito da aplicação de aquecimento ôhmico na qualidade do leite de castanha de caju

*Autor: Cíntia Mara Selbach*

*Orientador: Daniele Misturini Rossi*

*Co-orientador: Sueli Van der Sand*

*Colaborador: Lígia Damasceno Ferreira Marczak*

Porto Alegre, julho de 16

## **Sumário**

Sumário	ii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Leites Vegetais	3
2.2 Castanha de caju	4
2.2.1 Leite de castanha de caju	6
2.3 Métodos de conservação dos alimentos	6
2.3.1 Tratamentos térmicos convencionais	7
2.3.2 Aquecimento ôhmico	8
2.4 Estudo de Populações Microbianas	11
2.4.1 Populações microbianas da castanha de caju	11
2.4.2 Contagem de Heterotróficos	11
2.4.3 Coliformes totais	12
2.4.4 Escherichia coli	12
2.5 Análises de composição centesimal	13
2.5.1 Umidade	13
2.5.2 Cinzas	13
2.5.3 Lipídios	14
2.5.4 Proteínas	14
2.5.5 Carboidratos e fibras	14
3 Metodologia	15
3.1 Procedimento de obtenção do leite vegetal de castanha de caju	15
3.2 Tratamento com aquecimento ôhmico	16
3.2.1 Descrição do sistema de aquecimento ôhmico	16
3.2.2 Aplicação do aquecimento ôhmico	18
3.3 Análises microbiológicas	20
3.3.1 Diluições	20
3.3.2 Contagem de Heterotróficos	21
3.3.3 Coliformes totais	22
3.3.4 Escherichia coli (E. coli)	24
3.4 Análise de composição centesimal	25
3.4.1 Umidade	25
3.4.2 Cinzas – Método por incineração	25
3.4.3 Lipídios	25
3.4.4 Proteínas	26
3.4.5 Carboidratos e fibras	26

---

4	Resultados e Discussão	27
4.1	Efeito sobre a população microbiana	27
4.1.1	Contagem de Heterotróficos	28
4.1.2	Coliformes totais	29
4.1.3	Escherichia coli	30
4.2	Efeito sobre a composição centesimal	31
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	33
6	Referências	34
	Anexo A	37
	Anexo B	38

## **Agradecimentos**

Agradeço às pessoas que participaram diretamente deste trabalho: as professoras Daniele, Lígia e Sueli não só pelos ensinamentos, preocupações e revisões, mas também por terem comprado essa idéia de pesquisa, pela atenção e por resolverem prontamente nossos problemas e dificuldades. Também agradeço à Sayonara pela imensurável paciência ao ensinar e realizar as análises microbiológicas, toda dedicação, apoio e adequação das metodologias foram fundamentais para este trabalho. E ao Raul do laboratório do ICTA por nos receber e permitir que ajudássemos a realizar as análises de composição centesimal.

Agradeço ao meu namorado, Lucas, pela parceria, cumplicidade, motivação, paciência, carinho e apoio que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho.

Agradeço também à minha família, que teve paciência para compreender a minha ausência ao longo dos nada breves oito anos de faculdade. Agradeço aos meus pais, que contribuíram com a minha formação desde o princípio da melhor maneira que puderam, sempre incentivando o estudo e buscando as melhores escolas, ainda que essa escolha compromettesse o orçamento doméstico. Agradeço aos meus irmãos, pelo apoio, amizade e que mesmo distantes, sempre estão presentes.

Agradeço aos meus ex-empregadores, pela motivação, incentivo, inspiração e por permitirem as trocas de horários de trabalho que, sem as quais eu não poderia ter estudado e garantido meu sustento concomitantemente.

Agradeço aos amigos que fiz na UFRGS, especialmente à Bruna por ter compartilhado comigo incontáveis madrugadas de estudo. Também agradeço aos amigos que conheci graças ao veganismo, pela inspiração, ensinamentos, pelo apoio incondicional e por me fazerem acreditar que o mundo pode ser melhor.

Agradeço aos meus gatos amados, que foram meus maiores companheiros ao longo da graduação: Penélope, Tigrinho, Preto, Pernoca, Gravata, Chuchu, Kitkat, Lili e Frajola, além dos outros que passaram por mim e foram adotados ou não resistiram.

Por fim, dedico este trabalho de conclusão de curso às pessoas que não têm opção, senão a de ultrapassar os limites físicos e psicológicos, que precisam aguentar firme perante as dificuldades que vão muito além das provas e trabalhos para se obter o diploma de graduação.

---

## Resumo

---

O mercado de leites vegetais em substituição ao leite de origem animal vem sendo notado pelo crescente número de pessoas com restrições alimentares ou que buscam uma alimentação mais saudável e ética, por exemplo. Dentre as opções de leite vegetal, existe o leite de castanha de caju, que é preparado com a amêndoa do cajueiro, árvore largamente cultivada na região nordeste brasileira. A produção de leite de castanha de caju é uma alternativa para agregar valor às castanhas quebradas, menos valorizadas pelo mercado consumidor. Métodos de conservação, como tratamento térmico, devem ser aplicados ao leite vegetal de castanha de caju com o objetivo de minimizar a deterioração causada por microrganismos, no entanto, também com o cuidado de evitar as alterações químicas causadas pelo calor na sua composição. O aquecimento ôhmico é uma tecnologia emergente que supostamente poderia ser usada como método de conservação do leite de castanha de caju, apresentando vantagens em relação aos métodos convencionais. Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo aplicar o tratamento ôhmico no leite de castanha de caju, mantendo a temperatura de  $63,5 \pm 1$  °C por 30 minutos, realizar análises microbiológicas de contagem de heterotróficos, coliformes totais e *Escherichia coli*, além das análises de composição centesimal para verificar e comparar os resultados entre as amostras de leite que passaram por aquecimento ôhmico e amostras de leite sem tratamento (leite cru). Os resultados apontaram redução da carga microbiológica em todas as amostras sem causar significativa alteração na composição centesimal. Os resultados são promissores, mas o método ainda precisa ser aperfeiçoado e reproduzido para garantir que o produto tratado não esteja contaminado com microrganismos patogênicos.

---

**Palavras chave:** Leites vegetais; restrições alimentares; tratamento térmico; aquecimento ôhmico; tecnologia emergente; carga microbiológica; composição centesimal.

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 2.1:</b> Exemplo de leites vegetais obtidos a partir de coco, amêndoas, castanha de caju e castanha do Pará. ....	3
<b>Figura 2.2:</b> A castanha de caju e seu pedúnculo, também chamado de pseudo-fruto do cajueiro e uma castanha de caju cortada longitudinalmente, apresentando as camadas da casca e a amêndoa .....	4
<b>Figura 2.3:</b> Classes da castanha de caju: (a)inteira, (b) batoques, (c) bandas, (d) pedaços e (e) grânulos. ....	5
<b>Figura 3.1:</b> Castanhas de caju utilizadas para a preparação do leite vegetal. ....	15
<b>Figura 3.2:</b> Preparação do leite de castanha de caju em liquidificador. ....	16
<b>Figura 3.3:</b> Esquema do sistema de aquecimento ôhmico utilizado .....	17
<b>Figura 3.4:</b> Interface do programa utilizado para monitorar e armazenar os dados do aquecimento ôhmico.....	18
<b>Figura 3.5:</b> Arranjo geral da aplicação do aquecimento ôhmico no leite de castanha de caju, sendo da esquerda pra direita: Célula ôhmica conectada aos eletrodos e termopares, variador manual de tensão, sistema de aquisição de dados e computador. ....	19
<b>Figura 3.6:</b> Eletrodos utilizados para o aquecimento ôhmico. ....	19
<b>Figura 3.7:</b> Representação da diluição da amostra de leite cru em água peptonada. ....	21
<b>Figura 3.8:</b> Método de espalhamento em superfície para contagem de heterotróficos. ....	21
<b>Figura 3.9:</b> Preparação dos tubos para prova presuntiva de coliformes totais.....	22
<b>Figura 3.10:</b> Sequência de tubos do teste presuntivo após a inoculação de leite de castanha. ....	23
<b>Figura 3.11:</b> Representação da inoculação de uma alíquota do tubo positivo para a prova confirmativa de coliformes totais.....	23
<b>Figura 3.12:</b> Sequência de tubos do teste confirmativo de coliformes após o período de incubação de uma amostra de leite tratado. ....	24
<b>Figura 3.13:</b> Representação da inoculação de uma alíquota do tubo positivo pelo método das estrias múltiplas em caldo EMB. ....	24
<b>Figura 3.14:</b> Teste para determinação de <i>E. coli</i> . À esquerda, coleta de alíquota do teste presuntivo positivo para fazer as estrias na placa e à direita, placa com crescimento verde metálico específico de <i>E. coli</i> após o período de incubação. ....	25
<b>Figura 4.1:</b> Contagem de Heterotróficos em uma amostra de Leite Cru com diluição $10^{-2}$ . ...	28
<b>Figura 4.2:</b> Exemplos de sequência de tubos múltiplos do teste de colimetria. À esquerda, teste presuntivo em caldo lactosado e à direita, teste confirmativo em caldo verde brilhante. ....	29
<b>Figura 4.3:</b> Crescimento de <i>Escherichia coli</i> presente na amostra Leite Tratado-F.....	30

**Lista de Tabelas**

Tabela 1: Avaliação Microbiológica do leite de castanha de caju – Ensaio 1 .....	27
Tabela 2: Avaliação Microbiológica do leite de castanha de caju – Ensaio 2 .....	27
Tabela 3: Resultados das análises de composição centesimal das amostras de leite de castanha de caju cru e leite tratado com aquecimento ôhmico.....	31

### **Lista de Abreviaturas e Siglas**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APLV – Alergia à proteína do leite de vaca

*E. coli* – *Escherichia coli*

EMB – Eosina Azul de Metileno

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HDL – *High Density Lipoprotein*

ICMSF – *International Commission of Microbiological Specifications for Foods*

IN – Instrução Normativa

LDL – *Low Density Lipoprotein*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NMP – Número Mais Provável

PCA – *Plate Count Agar*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

USDA – *United States Department of Agriculture*



## **1 Introdução**

O consumo dos chamados leites vegetais vem ganhando espaço na rotina dos brasileiros em substituição ao leite de vaca e tem diferentes perfis de consumidores. Pessoas que buscam uma alimentação mais saudável, adeptas à dietas que excluem alimentos de origem animal ou, ainda, pessoas com restrições alimentares fazem parte deste público. Este mercado historicamente negligenciado por parte da indústria de alimentos vem ganhando importância nos últimos anos, uma vez que a proteína do leite de vaca é uma das principais causas de alergia em crianças, chegando a afetar de 2 a 3 % delas ainda no primeiro ano de vida, logo após a introdução de fórmulas a base de leite de vaca (Apps & Beattie, 2009); além disso, estima-se que 70 % da população mundial apresenta intolerância à lactose em algum nível (Lule et al, 2016).

Dentre as várias opções de formulações de leites vegetais, existe o leite de castanha de caju, bebida rica em proteínas, ácidos graxos essenciais (inclusive ômega-9), além de outros nutrientes, como cobre, ferro e zinco. O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de castanha de caju com uma safra em torno de 320 mil toneladas, segundo Carneiro (2016). Esta produção é vendida basicamente na forma de amêndoas para exportação e consumo direto. Tal mercado visa castanhas inteiras, grandes, sem defeitos e de cor marfim uniforme, atributos de qualidade que são decisivos na cotação de preços internacionais. Uma amêndoa inteira chega a ter o dobro do preço de uma quebrada (Rosa et al, 2002).

A produção de leite vegetal constitui uma alternativa para agregar valor às castanhas quebradas, explorando seu potencial nutricional para atender o mercado emergente desse tipo de bebida. No entanto, a conservação desse produto para um adequado tempo de prateleira, sem fazer uso de aditivos químicos, ainda é um problema quase inexplorado por pesquisadores.

Um dos fatores que alteram a qualidade do leite de castanha de caju é o crescimento microbiano, por isso métodos de conservação como os tratamentos térmicos convencionais podem ser aplicados. Todavia, tais tratamentos muitas vezes são limitados pela distribuição de calor que gera gradientes de temperatura, o que acarreta a necessidade de sobreprocessamento. Com isso, o processamento convencional pode aumentar a ocorrência de mudanças químicas na composição do leite, alterando de forma indesejada suas qualidades sensoriais e o valor nutritivo (Ordóñez et al, 2005).

## 2 Avaliação do efeito da aplicação de aquecimento ôhmico na qualidade do leite de castanha de caju

---

Nesse contexto, tecnologias emergentes estão sendo estudadas. Um exemplo é o aquecimento ôhmico, tecnologia que usa o calor de forma mais eficiente e ainda pode causar a inativação microbiológica por outros mecanismos simultâneos ao térmico, como a eletroporação.

Não foram encontrados registros de tratamento ôhmico para leites vegetais na literatura, então, neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral aplicar o aquecimento ôhmico para o processamento térmico de leite de castanha de caju e avaliar seus efeitos sobre a qualidade do mesmo. Espera-se que este tratamento comprove as seguintes hipóteses:

- que o aquecimento ôhmico seja efetivo para promover redução da população microbiológica presente no leite de castanha de caju, uma vez que esta pode causar deterioração do mesmo e ainda ser causadora de doenças alimentares quando há contaminação por microrganismos patogênicos;
- que essa tecnologia não cause alterações químicas na composição centesimal do leite de castanha de caju.

Os objetivos específicos para comprovar as hipóteses são:

- preparar o leite de castanha de caju;
- aplicar o aquecimento ôhmico, mantendo a temperatura de  $63,5 \pm 1$  °C por 30 minutos;
- realizar as análises microbiológicas:
  - contagem de heterotróficos;
  - coliformes totais;
  - *Escherichia coli*.
- realizar as análises de composição centesimal:
  - umidade;
  - cinzas;
  - proteínas;
  - lipídios;
  - carboidratos e fibras.
- verificar e comparar os resultados entre as amostras de leite que passaram por aquecimento ôhmico e amostras de leite sem tratamento (leite cru).

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Leites Vegetais

Leites vegetais são bebidas não lácteas preparadas a partir de grãos, de sementes, de cereais ou até mesmo de fruta, como no caso do coco. A Figura 2.1 ilustra alguns tipos de leites de origem vegetal. De modo geral, tais bebidas são dispersões obtidas pela emulsão em fase aquosa dos óleos e gorduras, bem como de outros componentes presentes na matéria-prima. O leite de castanha de caju, o qual é o objeto em estudo neste trabalho, é um tipo de leite vegetal que, como o nome já diz, é preparado a partir da castanha de caju crua. O termo “leite” é usado porque a bebida tem uma composição centesimal parecida com a do leite de vaca, podendo ser usada para substituí-lo em uso direto ou em algumas preparações a base de leite animal. No entanto, as proteínas, lipídios e carboidratos, bem como outros componentes, são diferentes dos presentes no leite de origem animal, assim como as características sensoriais (Velasco et al, 2014).

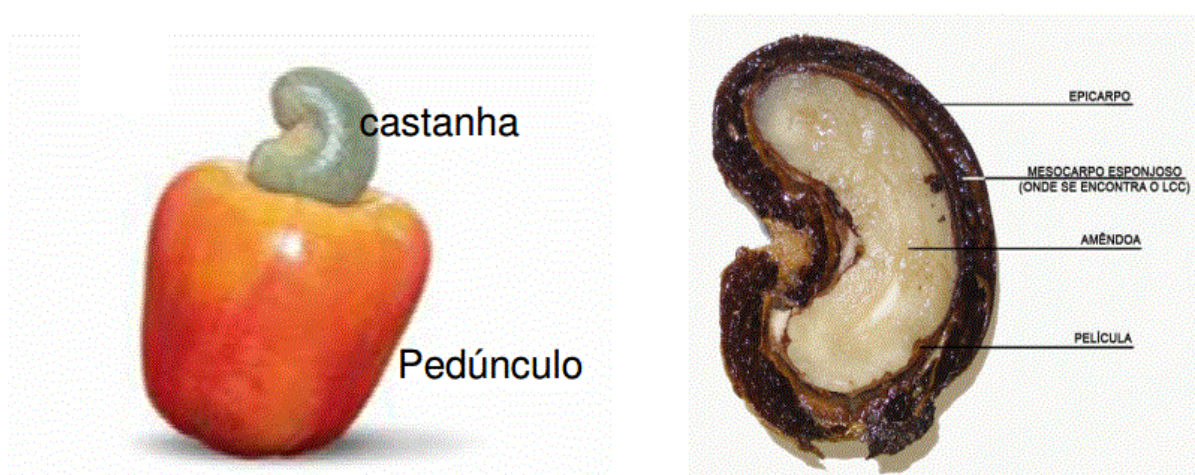


**Figura 2.1:** Exemplo de leites vegetais obtidos a partir de coco, amêndoas, castanha de caju e castanha do Pará. FONTE: André, 2015.

O mercado de leites vegetais é novo e crescente. Enquanto as pessoas veganas evitam o consumo de laticínios por seguirem uma dieta estritamente vegetariana (frente a questões de ordem ética e subjetiva), há um mercado em expansão relativo a pessoas procurando alternativas ao leite de vaca pelas mais diversas razões, tais como alergias alimentares (alergia à proteína do leite de vaca – APLV), intolerância à lactose, busca por uma alimentação mais natural e saudável ou receio dos inúmeros casos de adulteração do leite de vaca comercial. Além disso, um relevante número de pessoas considera os leites vegetais muito saborosos, sendo que cada combinação de ingredientes gera uma experiência única sob o ponto de vista sensorial e das aplicações possíveis (Gentry, 2015).

### 2.2 Castanha de caju

A castanha de caju é o verdadeiro fruto do caju, sendo constituído por casca, película e amêndoa, sendo esta última a parte comestível e que corresponde em média a 30% do peso da castanha. A amêndoa de castanha de caju é a semente do fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), que é uma árvore tropical de origem brasileira. A Figura 2.2 apresenta a castanha de caju com o seu pseudo-fruto ou pedúnculo, o caju, bem como as camadas de uma castanha cortada longitudinalmente. O fruto duro e oleaginoso passa, de modo simplificado, pelos processos de colheita, seleção, secagem, classificação, cozimento, decorticação, estufagem, umidificação, reestufagem, resfriamento e depelículagem para a obtenção da amêndoa, que é rica em fibras, proteínas, minerais (magnésio, ferro, potássio, selênio, cobre e zinco), além das vitaminas A, D, K, PP e E (Embrapa, 2006).



**Figura 2.2:** A castanha de caju e seu pedúnculo, também chamado de pseudo-fruto do cajueiro e uma castanha de caju cortada longitudinalmente, apresentando as camadas da casca e a amêndoa. FONTE: Câmara, 2010.

Os requisitos de qualidade da amêndoa da castanha de caju são definidos em função do tamanho, da granulometria, da coloração da amêndoa e da quantidade de defeitos, como impurezas, castanhas mofadas, rançosas e ardidadas, danos por insetos, danos superficiais ou presença da película da castanha. A amêndoa da castanha de caju é classificada em classes, subclasses e tipos e esta classificação influencia drasticamente no seu valor de venda. A Figura 2.3 apresenta as classes da castanha de caju (MAPA, Instrução Normativa 62/2009).



**Figura 2.3:** Classes da castanha de caju: (a)inteira, (b) batoques, (c) bandas, (d) pedaços e (e) grânulos. FONTE: Câmara, 2010.

A região nordeste responde por mais de 95% da produção nacional de castanha de caju. Com uma área plantada superior a 650 mil hectares, em grande parte por pequenos produtores, a produção de castanha de caju tem elevada importância econômica e social para o nordeste brasileiro, especialmente no período de seca. Apesar do grande potencial de diversificação e agregação de valor, este agronegócio ainda é basicamente produção e exportação da castanha (Leite, 2004).

Segundo Câmara (2010), *“Um dos grandes problemas enfrentados pela indústria de beneficiamento de castanha de caju é a disponibilidade no mercado de equipamentos. Em geral, os equipamentos utilizados nas grandes indústrias são adaptações, principalmente da indústria do café. Este fato além de influenciar o rendimento industrial, também dificulta uma higienização eficaz, possibilitando a contaminação microbiológica”*.

A Embrapa firmou parcerias com Universidades, Ministérios, Secretarias estaduais, Sebrae, dentre outros, a fim de desenvolver pesquisas tanto no segmento agrícola, como para as etapas de pós-colheita e de processamento industrial. Entretanto, pouco tem sido desenvolvido a respeito de produtos processados de castanha de caju com maior valor agregado, senão as castanhas propriamente ditas para consumo. Logo, a industrialização da castanha de caju ainda é incipiente por questões históricas e socio-culturais, ainda que haja um esforço para aumentar a competitividade do mercado da castanha de caju (Leite, 2004).

Tendo em vista que as castanhas perdem o valor e têm seu preço sensivelmente diminuído à medida que se afastam do padrão mais alto de qualidade, deixa-se de aproveitar um grande potencial deste alimento, uma vez que pouco se desenvolve a respeito da indústria de transformação da castanha de caju.

### 2.2.1 Leite de castanha de caju

O leite de castanha de caju é um tipo de leite vegetal considerado saboroso, feito a partir da amêndoa da castanha de caju e água. Das qualidades nutricionais, o leite de castanha de caju pode ser considerado uma fonte de proteínas, fibras, carboidratos e lipídios, assim como a maioria dos leites vegetais preparados a partir de oleaginosas. Das gorduras presentes neste leite, 70 % são monoinsaturadas e poli-insaturadas, consideradas gorduras boas, pois ajudam a diminuir o colesterol LDL (ruim) e aumentar o HDL (colesterol bom). O leite de castanha de caju também contém nutrientes, como manganês, potássio, cobre, ferro, magnésio, fósforo e zinco e selênio, além de outros componentes benéficos para o corpo humano (USDA, 2016).

Levando em consideração que a produção de leite de castanha de caju não requer amêndoas inteiras e sem imperfeições como matéria prima, esta seria uma alternativa para agregar valor às castanhas quebradas, que atualmente têm seu preço sensivelmente reduzido.

Porém, assim como o leite de vaca, o leite vegetal também é suscetível à deterioração por microrganismos, coalhando em meio ácido ou, ainda, sofrendo proteólise em repouso. Esses processos de deterioração podem ser controlados por tratamentos térmicos (Lewis e Heppel, 2000).

### 2.3 Métodos de conservação dos alimentos

Os métodos de conservação têm como objetivo evitar a deterioração dos alimentos, aumentando, conseqüentemente, sua vida útil ou tempo de prateleira. As técnicas utilizadas evitam alterações microbianas, enzimáticas, químicas e físicas, buscando manter os nutrientes e características organolépticas. As alterações por crescimento microbiano são as mais importantes, tanto pela comum ocorrência, quanto pelo potencial patogênico (Vasconcelos, 2010).

Existem métodos de conservação baseados na destruição total ou parcial dos microrganismos presentes nos alimentos e métodos de alteração do meio para que este não seja propício para ao desenvolvimento da flora microbiana. Estes métodos podem ou não ser aplicados simultaneamente (Vasconcelos, 2010).

O efeito preservativo do processamento de alimentos com calor ocorre devido à desnaturação das proteínas, o que destrói a atividade enzimática e, conseqüentemente, o metabolismo controlado por enzimas nos microrganismos. A taxa de destruição é uma reação

de primeira ordem. Da mesma forma, o efeito do calor sobre muitas vitaminas e outros componentes também é de primeira ordem. Enquanto que a destruição microbiana ocorre logaritmicamente, em tese, seria possível destruir todas as células somente após um tempo infinito de aquecimento, as características sensoriais e nutricionais são melhor retidas pelo uso de temperaturas altas e tempos mais curtos de processamento térmico. (Fellows, 2006)

Nos últimos anos, a busca por alimentos processados, mas com características mais naturais (sem abrir mão de um tempo de prateleira suficiente para distribuição e armazenagem), tem feito aumentar o interesse pelo uso de tecnologias emergentes, ou seja, métodos de conservação não convencionais que não usam calor ou, que o utilizam apenas de forma reduzida ou otimizada. Dentre estes métodos, pode-se citar o aquecimento elétrico (radiofrequência, microondas ou aquecimento ôhmico), o processamento com alta pressão, com luz pulsante, com ultrassom ou por irradiação, sendo, este último, já regulamentado e empregado na indústria (Portal da educação, 2013).

Métodos alternativos, nos quais o calor é fornecido por outras técnicas e gerado *in situ* devido à aplicação de campos externos, vêm sendo estudados. São tecnologias que independem dos fenômenos de transferência de calor a partir de uma fonte externa. Estes campos podem ser aplicados por cisalhamento ou campos elétricos que geram aquecimento ôhmico ou por microondas, por exemplo (Lewis e Heppel, 2000).

### 2.3.1 *Tratamentos térmicos convencionais*

A maioria das operações unitárias no processamento de alimentos para a sua conservação envolve a transferência de calor do alimento ou para ele, no entanto, os processos térmicos podem causar diminuição da qualidade nutricional ou sensorial dos alimentos. Para os tratamentos térmicos convencionais a transferência de calor se dá pelos mecanismos básicos: radiação, condução e convecção (Fellows, 2006).

O propósito de um tratamento térmico deve ser aquecer o produto até a temperatura requerida, manter pelo tempo estipulado e, então, resfriar de forma que não haja recontaminação. Existem vários fatores que afetam a qualidade do produto e, por isso, são levados em conta na escolha do processamento, assim como os custos de implementação e operação, bem como também sua viabilidade prática (Lewis e Heppel, 2000).

Em primeiro lugar, o que se espera de um tratamento térmico é a redução da concentração de microrganismos de forma que o produto torne-se estável para

## 8 Avaliação do efeito da aplicação de aquecimento ôhmico na qualidade do leite de castanha de caju

---

armazenamento ou, simplesmente, que o tratamento seja executado de acordo com os termos legais de aquecimento à temperatura requerida e mantida pelo tempo mínimo para inativar células patogênicas. De forma secundária, espera-se do tratamento térmico que o produto final tenha alta qualidade nutricional e/ou organoléptica, seja mais econômico possível em termos de consumo energético, custo de investimento e que possa operar o maior tempo possível com o mínimo de incrustação (Lewis e Heppel, 2000).

### 2.3.2 Aquecimento ôhmico

Embora o aquecimento ôhmico seja tratado como um novo processo, a primeira aplicação que se tem notícia é do ano de 1919, para a pasteurização do leite de origem animal (Anderson, 1919).

O aquecimento ôhmico é um aquecimento direto, no qual uma corrente elétrica alternada (geralmente na frequência da rede) passa através do alimento. A técnica usa a resistência elétrica dos alimentos para converter a energia diretamente em calor, pelo conhecido efeito Joule. O calor produzido é proporcional ao quadrado da corrente elétrica que percorre o alimento, a resistência elétrica do condutor e o tempo que a corrente é aplicada, conforme a equação [1].

$$Q = R \int_{t_1}^{t_2} i^2 dt \quad [1]$$

Onde:

Q: calor gerado pela corrente elétrica;

R: resistência elétrica do condutor;

i: corrente elétrica que percorre o condutor;

dt: variável de integração;

$t_1$  e  $t_2$ : tempo inicial e tempo final aplicação da corrente, respectivamente.

Assim, a energia elétrica é dissipada na forma de calor em cada partícula dentro do produto, por todo o alimento instantaneamente (Fellows, 2006).

O efeito de aquecimento depende da condutividade elétrica do alimento, que por sua vez depende da concentração de íons, e da temperatura. Para alimentos puramente líquidos, a condutividade aumenta linearmente com a temperatura e diminui com o aumento de



sólidos dispersos. Para muitos produtos de origem vegetal, a condutividade elétrica apresenta crescimento rápido em torno de 60 °C, devido à quebra das paredes das células, aumentando a mobilidade dos íons, gelatinização dos amidos ou desnaturação das proteínas (Palaniappan e Sastry, 1991).

O aquecimento ôhmico é mais comumente utilizado em alimentos líquidos que contém partículas, mas também pode ser aplicado em líquidos muito viscosos, termicamente sensíveis ou propensos à incrustação, já que não possui uma superfície aquecida no equipamento (Lewis e Heppel, 2000).

Assim como os outros métodos que usam eletricidade para aquecimento, há um custo de operação que fez com que o aquecimento ôhmico tenha sido pouco usado. No entanto, o atual interesse por eficiência energética vem dando espaço à essa tecnologia, já que o aquecimento ôhmico é o método que apresenta maior eficiência de conversão de energia elétrica em calor e, por tal motivo, por isso pode se tornar menos oneroso que o aquecimento por microondas ou fricção (Lewis e Heppel, 2000).

O equipamento de aquecimento ôhmico consiste basicamente em eletrodos conectados individualmente na rede elétrica, que, por sua vez, é alimentada com eletricidade de baixa frequência (50 ou 60 Hz). Os eletrodos são feitos de liga metálica de alta resistência à corrosão, compatível com alimentos, e ficam suportados em um bloco de PTFE (Politetrafluoretileno) ou vidro, que são isolantes elétricos (Lewis e Heppel, 2000).

### **Fenômenos elétricos do aquecimento ôhmico**

Durante as últimas décadas, tem-se levantado diversas questões a respeito da forma com que as variáveis elétricas, tais como frequência e intensidade do campo elétrico afetam as enzimas e microrganismos adicionalmente ao efeito térmico.

Estudos recentes sugerem a existência de uma leve eletroporação concomitantemente ao tratamento térmico, contribuindo para a morte celular. Eletroporação é um fenômeno de permeabilização da membrana, devido à desestabilização da bicamada lipídica e das proteínas de membrana, levando a formação de poros ou até ruptura celular quando a membrana excede um valor potencial crítico de campo elétrico (Knorr et al, 2001).

Tal suposição encontra embasamento científico, como, por exemplo, a constatação da morte de células de *Escherichia coli* (*E. coli*) pela aplicação de campo elétrico sem efeitos térmicos (temperatura abaixo de 25°C). O uso de campos elétricos acima de 220 V.cm<sup>-1</sup>

promoveu taxas de morte de 3 ciclos logaritmos de *E. coli* em menos de 6 minutos. Após o tratamento elétrico, as células foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura, tendo revelado mudanças nas membranas celulares, indicando a possível causa da morte das células (Machado et al, 2009).

#### **2.3.2.1.1 Vantagens e desvantagens do aquecimento ôhmico**

Dentre as principais vantagens deste método, segundo Lewis e Heppel (2000), pode-se citar:

- o alimento é aquecido rapidamente, na mesma taxa, sem gradientes de temperatura (aquecimento uniforme de sólidos e líquidos, se as suas resistências forem as mesmas). A fase sólida é aquecida muito mais rapidamente do que nos outros métodos que usam aquecimento convencional, já que o calor não precisa ser conduzido para o interior da partícula. Com este aquecimento rápido, diminui-se o tempo necessário para obter a temperatura requerida do tratamento térmico, minimizando a perda de propriedades organolépticas e nutricionais. Além disso, como não há gradiente de temperatura, compostos sensíveis ao calor não são alterados por sobreaquecimento localizado;
- a conversão direta de eletricidade em calor no produto é substancialmente mais eficiente do que o uso de aquecimento por microondas ou radiofrequência, que apresentam perda de eficiência para a geração de radiação eletromagnética;
- não existem superfícies quentes para a transferência de calor, o que reduz o sobreprocessamento do produto e sujamento da superfície dos equipamentos;
- ideal para o processamento de produtos viscosos, já que permite o aquecimento uniforme sem as limitações da transferência de calor;
- eficiência energética (conversão de energia elétrica em calor superior a 90%);
- baixo custo de manutenção;
- baixo stress mecânico induzido no alimento, o que é ideal para produtos sensíveis cuja integridade deve ser mantida.

Por outro lado, pode-se citar algumas desvantagens, tais como:

- o alimento deve ter líquido o suficiente para permitir uma boa condução, de forma a não isolar a corrente elétrica;
- necessita que os eletrodos estejam em contato com o alimento, o que pode causar contaminações.

## **2.4 Estudo de Populações Microbianas**

### *2.4.1 Populações microbianas da castanha de caju*

A baixa atividade de água na castanha de caju inibe a deterioração por ação de bactérias e a produção de toxinas, mas o alto percentual de lipídios acaba tornando-a suscetível à deterioração por bactérias lipolíticas e fungos, sendo que estes podem ser produtores de micotoxinas. A contaminação por microrganismos nas castanhas de caju pode ocorrer antes e após a colheita, ou ainda, durante o processamento (ICMSF, 2005).

A legislação brasileira estabelece padrões microbiológicos para as castanhas, sendo a tolerância de  $10^3$  UFC/g para coliformes a 45°C e ausência de *Salmonella sp.* em 25 g (ANVISA, Resolução 012/2001).

### *2.4.2 Contagem de Heterotróficos*

A contagem de microrganismos heterotróficos, também conhecida como contagem padrão em placa, é uma técnica utilizada para determinar o número da população bacteriana presente na amostra, de forma que apenas as células viáveis são quantificadas. Partindo do princípio que cada colônia formada é originada do crescimento e multiplicação de uma célula bacteriana. Como nem sempre isso é verdade, já que as bactérias frequentemente crescem em cadeia ou grumos, as contagens costumam ser chamadas de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (Morton, 2001).

A contagem de bactérias heterotróficas, apesar de não ter um valor máximo estipulado na legislação para os alimentos, serve como um indicador importante da qualidade higiênico-sanitária, indicando possíveis contaminações ou causas de deterioração da qualidade do alimento ou da água, além de ser um dado geral sobre o crescimento microbiológico passível de comparação. Para a água potável, o Ministério da Saúde (Portaria nº 2.914, 2011) diz que alterações bruscas ou acima do usual na contagem de bactérias heterotróficas devem ser

## 12 Avaliação do efeito da aplicação de aquecimento ôhmico na qualidade do leite de castanha de caju

---

investigadas para identificação de irregularidade e recomendando-se que não se ultrapasse o limite de 500 UFC/mL.

Para a contagem é fundamental que o número de colônias presentes esteja limitado em torno de 25 a 250 unidades e sem sobreposições para evitar saturação e, conseqüentemente, uma leitura errônea. Quando as populações bacterianas são muito grandes, torna-se necessário realizar a diluição seriada para que a contagem esteja na faixa adequada de leitura (Tortora et al, 2012).

### 2.4.3 *Coliformes totais*

Coliformes são bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, gram-negativas, não formadoras de endosporos, do tipo bastonete e que fermentam lactose, sendo esta última característica usada como base para o teste. Nem todo coliforme é de origem fecal e patogênico, razão pela qual existem testes específicos para diferenciá-los e padrões para alimentos e água que especificam a identificação de coliformes fecais (Tortora et al, 2012).

O teste de coliformes é aplicado em águas e alimentos para determinar a segurança alimentar, não só para quantificar o próprio grupo microbiológico, mas também porque os coliformes são organismos indicadores de que possíveis patógenos possam estar presentes, ainda que em menor quantidade. A ausência de coliformes somente é um indicativo de que bactérias do grupo das Enterobactereaceae e fermentadoras de lactose não estão presentes (ICMSF, 2005).

O método de fermentação de tubos múltiplos, juntamente com o método do número mais provável (NMP) é uma das metodologias utilizadas para se estimar o número de coliformes em uma amostra. O NMP é uma técnica estatística que fornece uma estimativa de 95 % de probabilidade da população bacteriana estar numa faixa tabelada conforme o número de tubos positivos das diluições seriadas que foram necessárias para reduzir a densidade microbiológica até que nenhuma bactéria esteja presente em alguns tubos (Tortora et al, 2012).

### 2.4.4 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) é o microrganismo predominante no subgrupo das bactérias coliformes termotolerantes, ou seja, que fermentam a lactose a  $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  em 24 horas,

além de ser considerado o mais específico indicador de contaminação fecal (Ministério da Saúde, 2004).

Existem várias cepas de *E. coli* e a maioria é inofensiva para o ser humano. Contudo, há algumas linhagens patogênicas, como a chamada *E. coli* 0157:H7, que causa diarreia sanguinolenta ao crescer no intestino, podendo, inclusive, levar a morte seu hospedeiro (Tortora et al, 2012).

## **2.5 Análises de composição centesimal**

A análise de composição centesimal de um alimento expressa a proporção em que aparecem, em 100 gramas, os seguintes grupos homogêneos de substâncias convencionadas: umidade, cinzas, lipídios, proteínas, fibras e carboidratos.

Além de tornar possível a verificação do valor nutritivo dos alimentos, os resultados destas análises viabilizam, por comparação, a percepção da possível ocorrência de alguma alteração na qualidade do leite vegetal de castanhas de caju após o tratamento de aquecimento ôhmico.

### *2.5.1 Umidade*

Todos os alimentos contém água, seja na forma de água livre, aquela que é facilmente evaporada, ou água ligada, aquela que é encontrada no interior do alimento, combinada quimicamente com o mesmo. A umidade corresponde à perda de peso sofrida durante 3 horas de secagem, seguida de resfriamento em dessecador até temperatura ambiente para que a amostra seja pesada. Este procedimento é repetido até obter resultado de peso constante (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

### *2.5.2 Cinzas*

Cinzas é o nome que se dá ao resíduo obtido por sequências de aquecimento de uma amostra em forno mufla em temperatura de 550 °C até a eliminação completa da matéria orgânica. Nem sempre este resíduo representa toda a massa inorgânica da amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização durante o aquecimento (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

### 2.5.3 *Lipídios*

Lipídios são compostos orgânicos altamente energéticos, contém ácidos graxos essenciais ao organismo e atuam como transportadores das vitaminas lipossolúveis. São solúveis em solventes orgânicos e não em água, portanto, são removidos da amostra por extração contínua com éter. Em seguida, o éter é evaporado com aquecimento e a amostra é resfriada em dessecador até temperatura ambiente para o produto resultante ser pesado. O procedimento é repetido até peso constante (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

### 2.5.4 *Proteínas*

A determinação de proteínas baseia-se na determinação de nitrogênio, geralmente feita pelo método Kjeldahl clássico, que baseia-se na determinação do nitrogênio orgânico total da amostra através das etapas de digestão, destilação e titulação para obter um resultado que é convertido em proteínas usando-se um fator de conversão adequado para chegar à concentração de proteína do alimento (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

### 2.5.5 *Carboidratos e fibras*

No grupo de compostos dos carboidratos, que são hidratos de carbono, têm-se os mais variados tipos de substâncias, desde monossacarídeos até polissacarídeos. Já as fibras, são componentes das paredes celulares vegetais que são incluídas na dieta humana, que não são digeríveis pelo organismo humano. Na determinação da composição centesimal, os carboidratos e fibras podem ser determinados juntos por diferença, ou seja, o percentual de água, proteínas, gordura e cinzas subtraído de 100 (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

### 3 Metodologia

A preparação do leite de castanha de caju, coleta de amostra do leite cru, aplicação do tratamento ôhmico e coleta de amostras do leite tratado foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia e Processamento em Alimentos (LATEPA) da UFRGS. Enquanto que as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) e, as análises de composição centesimal, no Laboratório de Alimentos do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA), ambos da UFRGS.

#### 3.1 Procedimento de obtenção do leite vegetal de castanha de caju

As castanhas utilizadas são do tipo B1 (batoque 1) natural, conforme Figura 3.1, e foram adquiridas diretamente da fábrica GMF Indústria de Alimentos LTDA, situada na cidade de Pacajus/CE - Brasil. Uma embalagem lacrada foi enviada pela fábrica, via transportadora, evitando, assim, contaminações da castanha devido a manuseio no caso de compra das mesmas à granel no comércio.



**Figura 3.1:** Castanhas de caju utilizadas para a preparação do leite vegetal.

As castanhas foram pesadas para a preparação do leite de forma que a relação fosse de 100 g de castanha de caju para se obter 1 litro da bebida. Estas foram deixadas de molho em água pelo período de 8 horas sob refrigeração para hidratação. A água utilizada foi água potável fornecida pela rede de Porto Alegre, a qual é filtrada por um filtro doméstico (*Fun Kitchen*, modelo PN FK).

Após este período, as castanhas hidratadas foram drenadas, lavadas com água corrente e embaladas em saco plástico para em seguida serem congeladas por 7 dias. Após esse processo, finalmente o leite foi preparado através da cominuição com água morna em

## 16 Avaliação do efeito da aplicação de aquecimento ôhmico na qualidade do leite de castanha de caju

---

um liquidificador Philips de 600 W do tipo doméstico, conforme a Figura 3.2. Ao leite obtido nessa etapa, dá-se o nome de leite cru.



**Figura 3.2:** Preparação do leite de castanha de caju em liquidificador.

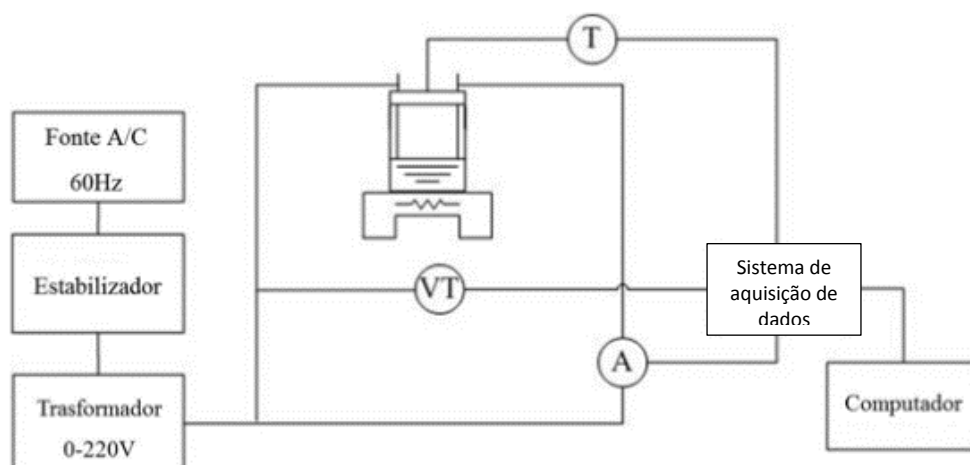
### 3.2 Tratamento com aquecimento ôhmico

O tratamento térmico da amostra foi realizado fazendo uso do sistema de aquecimento ôhmico - Equipamento do Laboratório de Tecnologia e Processamento em Alimentos (LATEPA) da UFRGS conforme as recomendações constantes no manual disponibilizado no laboratório.

#### 3.2.1 Descrição do sistema de aquecimento ôhmico

O sistema, descrito mais detalhadamente a seguir, consiste basicamente em: um esquema de fornecimento de energia (que conta com um estabilizador e transformador que funciona como variador da tensão que é aplicada nos eletrodos), uma célula de vidro, onde é colocado o leite a ser tratado, esta célula possui uma espécie de tampa feita de material isolante que funciona como encaixe para os eletrodos e termopares do equipamento, medidores de tensão e corrente elétrica e um sistema de aquisição de dados ligado a um computador. Tal sistema é apresentado esquematicamente na Figura 3.3, que apresenta o fornecimento de energia à esquerda, os transdutores de tensão que passam pela amostra e corrente elétrica são representados pelas siglas VT e A, respectivamente, a célula com os eletrodos e sensor de temperatura ligado ao sistema de aquisição de dados, assim como os outros medidores e, por fim, o sistema de aquisição de dados ligado ao computador.





**Figura 3.3:** Esquema do sistema de aquecimento ôhmico utilizado, representando o fornecimento de energia à esquerda, os transdutores de tensão que passam pela amostra e corrente elétrica são representados pelas siglas VT e A, respectivamente, a célula com os eletrodos e sensores de temperatura ligados ao sistema de aquisição de dados, assim como os outros medidores e o sistema de aquisição de dados ligado ao computador.

FONTE: Manual de operação do sistema de aquecimento ôhmico.

A fonte de energia é a rede local, com corrente elétrica alternada, de frequência igual a 60 Hz. A corrente passa pelo estabilizador, por um disjuntor e pelo variador de tensão manual de 0 a 220 V (*Sociedade Técnica Paulista LTDA*, modelo Varivolt, Brasil) que possui dois cabos com “jacarés” para conectar aos eletrodos da célula ôhmica. Os eletrodos são de titânio e ficam encaixados na tampa da célula, assim como os termopares do tipo Pt-100 (*Novus*, Brasil) com haste de aço inoxidável. O transdutor de tensão CA (*Yokogawa*, modelo 2374A-T13-VRX/AN, Taiwan) possui um range de 0 a 300 V e o transdutor de corrente CA (*Yokogawa*, modelo 2374A-T13-ALS/NA, Taiwan) de 0 a 5 A.

A célula tem o corpo de vidro, 8 cm de diâmetro, capacidade de 300 ml e pode ser usada com camisa para trocar calor, recurso que não foi utilizado nestes experimentos.

O sistema de aquisição de dados monitora e registra a corrente elétrica, tensão e temperatura em função do tempo, num intervalo de 0,9 s, utilizando um módulo de aquisição e registro de dados (*Novus*, modelo Field logger, Brasil). A interface gráfica do programa utilizado está representada a seguir na Figura 3.4. O programa permite visualizar, na aba Processo, em tempo real, as medidas de corrente, tensão e temperatura, bem como os gráficos dessas variáveis ao longo do tempo. Simultaneamente, na aba Planilha, pode-se encontrar os dados tabelados e disponíveis para exportar para uma planilha de Windows Excel.

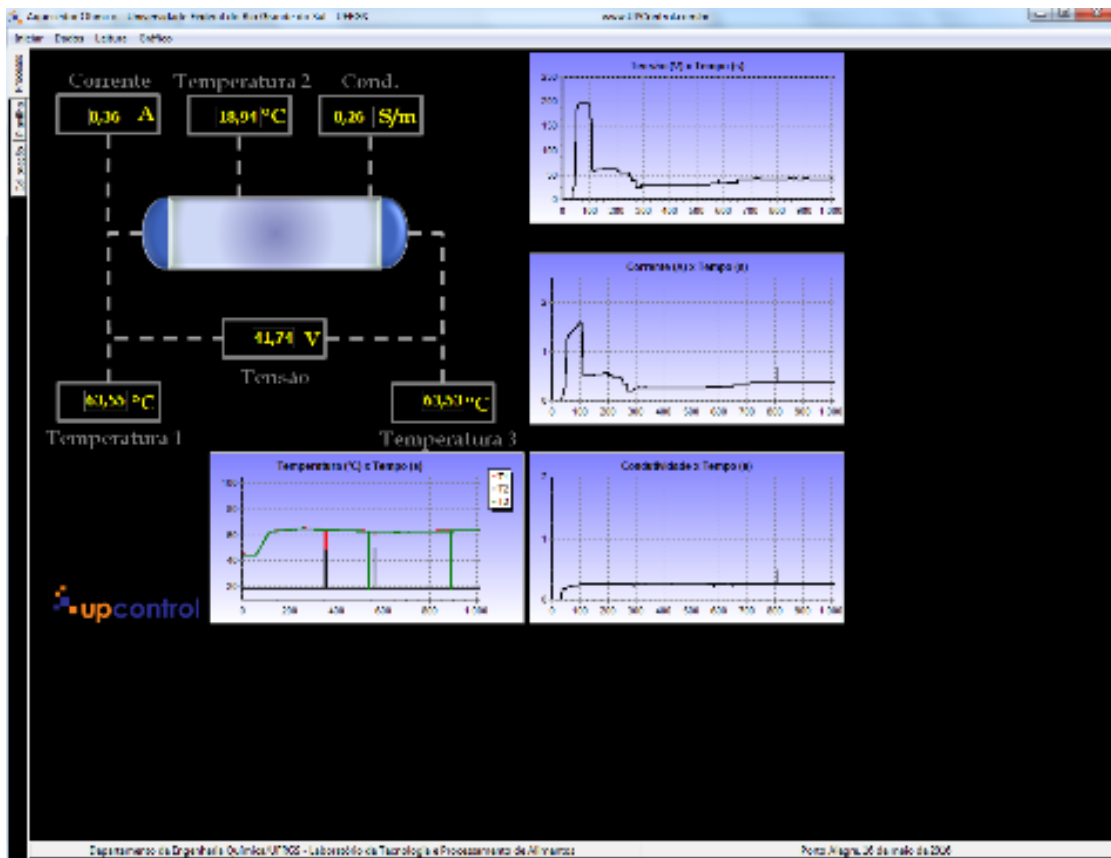
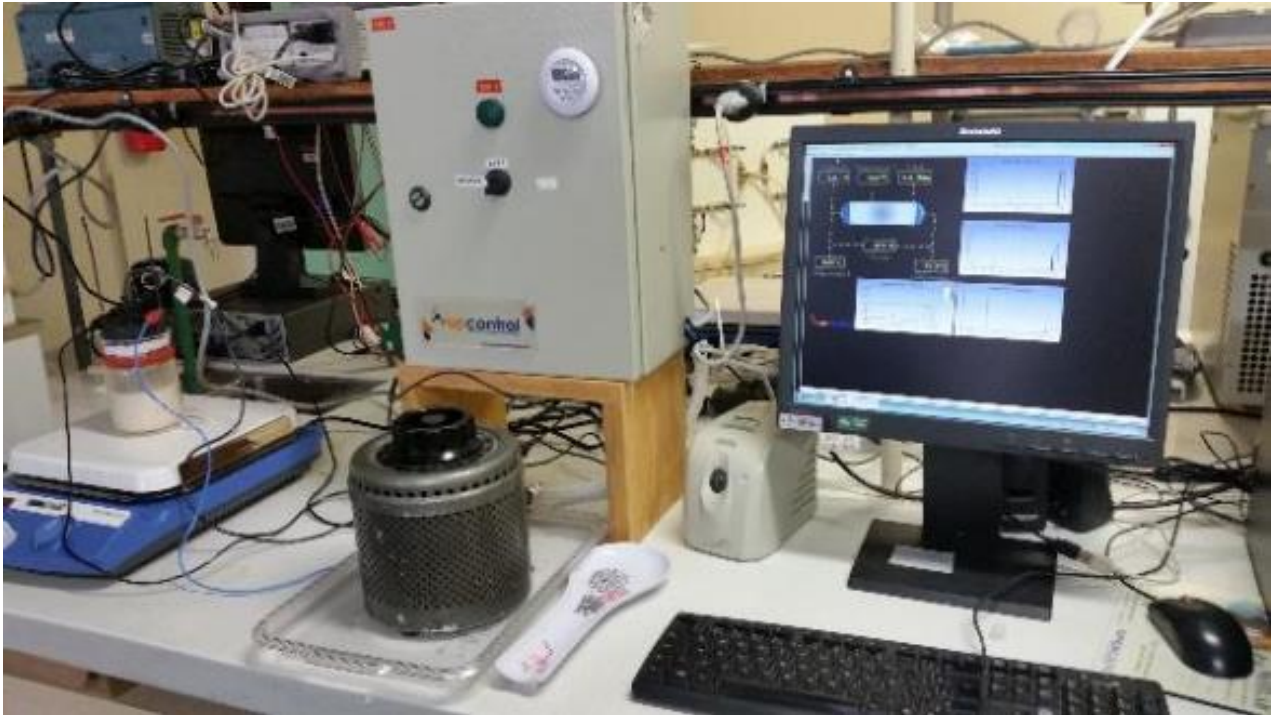


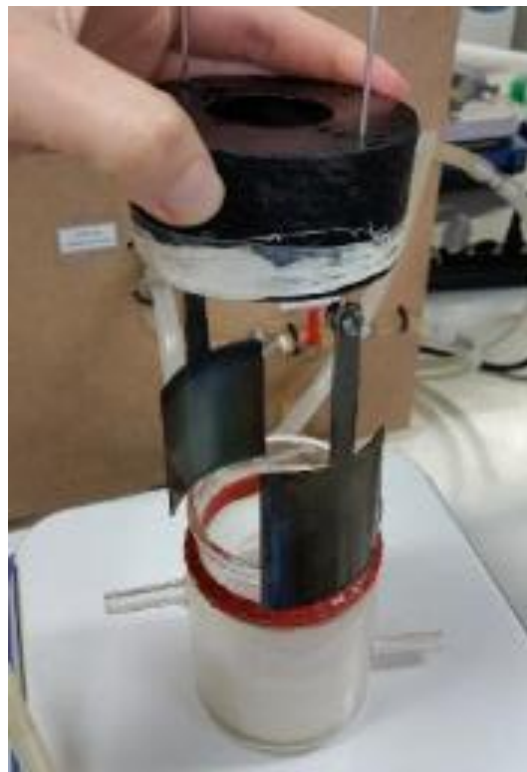
Figura 3.4: Interface do programa utilizado para monitorar e armazenar os dados do aquecimento ôhmico.

### 3.2.2 Aplicação do aquecimento ôhmico

Os experimentos foram executados em batelada no sistema descrito no item 3.2.1 e, para homogeneizar o leite de castanhas durante o teste, foi usado um agitador magnético sob a célula ôhmica. Cada tratamento foi realizado colocando-se 200 g de leite na célula, que então era conectada ao sistema de aquecimento ôhmico que foi estipulado via teste experimental prévio da seguinte forma: aplicação de 200 V na célula até a amostra atingir 60°C, redução de tensão para 60 V até atingir 63,5°C e então controle manual da tensão de forma que a temperatura de 63,5 ± 1°C fosse mantida pelo período de 30 minutos. Essas tensões foram escolhidas objetivando usar a tensão máxima para aquecimento rápido e então controle da temperatura com uma tensão mais baixa. O arranjo geral do tratamento pode ser visualizado na Figura 3.5 e os eletrodos utilizados na Figura 3.6.



**Figura 3.5:** Arranjo geral da aplicação do aquecimento ôhmico no leite de castanha de caju, sendo da esquerda pra direita: Célula ôhmica conectada aos eletrodos e termopares, variador manual de tensão, sistema de aquisição de dados e computador.



**Figura 3.6:** Eletrodos utilizados para o aquecimento ôhmico.

## 20 Avaliação do efeito da aplicação de aquecimento ôhmico na qualidade do leite de castanha de caju

---

O binômio tempo e temperatura foi escolhido de forma que os resultados possam ser futuramente comparados com outros métodos de aquecimento, como a pasteurização lenta convencional.

Por fim, após o tratamento, as amostras do leite tratado foram coletadas para os testes microbiológicos e de composição centesimal posteriores que estão descritos a seguir. Os tratamentos foram realizados em dois diferentes dias, cada um com três repetições que são apresentadas na seção de Resultados.

### 3.3 Análises microbiológicas

O objetivo do tratamento ôhmico é causar inativação de populações microbianas com potencial patogênico, e também populações responsáveis pela degradação do leite de castanha de caju, uma vez que seu crescimento altera a qualidade do produto. Para verificar tal efeito, as análises microbiológicas são de suma importância para este trabalho.

Para as análises, foram coletadas amostras de 100 mL em tubos Falcon esterilizados de leite cru (controle) e de leite tratado por aquecimento ôhmico com 3 repetições em cada um dos dois ensaios realizados. As amostras foram acondicionadas em gelo do momento da coleta até o início das análises.

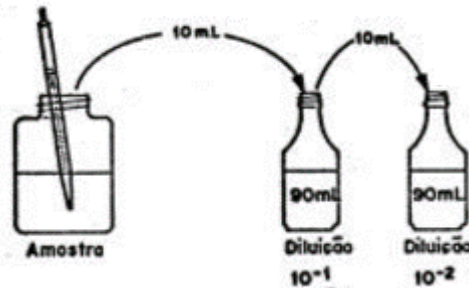
Como não há referências de estudos científicos de análise microbiológica em leite de castanha de caju para comparação, apenas no próprio grão ou outros derivados, foram escolhidas as análises microbiológicas padrões realizadas para leites de origem animal, as quais foram: contagem de heterotróficos, determinação de coliformes totais e *Escherichia coli*.

As análises microbiológicas foram realizadas em condições estéreis, onde todo o material necessário foi devidamente autoclavado a 121°C por 15 min e todas as amostras foram tratadas em capela de fluxo laminar, previamente esterilizada pela passagem de álcool 70 % e luz UV por 15 minutos.

#### 3.3.1 Diluições

A diluição do leite cru foi realizada transferindo-se 10 mL de leite para um frasco contendo 90 mL de água peptonada estéril, seguido de homogeneização para obtenção da diluição  $10^{-1}$  e, em seguida, nova transferência de 10 mL da solução para outro frasco também contendo 90 mL de água peptonada estéril para obtenção da diluição  $10^{-2}$ , conforme a Figura

3.7. O leite tratado não precisou passar por diluição antes das análises, de acordo com estudos prévios realizados. Portanto, as análises microbiológicas que seguem foram realizadas com as amostras de leite cru na diluição  $10^{-2}$  e do leite tratado na diluição  $10^0$ .



**Figura 3.7:** Representação da diluição da amostra de leite cru em água peptonada.  
FONTE: CETESB, 2007.

### 3.3.2 Contagem de Heterotróficos

Em placas de Petri estéreis e descartáveis, previamente identificadas, foram preparados os meios de cultura Ágar Padrão de Contagem (PCA). Após a solidificação do meio, foram inoculadas as amostras pelo método de espalhamento em superfície. Neste método, 0,1 mL da amostra foram dispostos na superfície do meio e espalhados uniformemente com uma alça de Drigalsky, conforme a Figura 3.8. As placas foram então incubadas em estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 h para, imediatamente, fazer-se a leitura, conforme as recomendações do MAPA, através da Instrução Normativa IN 62. A expressão dos resultados da contagem é dada por UFC/mL e é calculada levando em consideração a diluição empregada.



**Figura 3.8:** Método de espalhamento em superfície para contagem de heterotróficos.

FONTE: Madigan et al, 2010.

## 22 Avaliação do efeito da aplicação de aquecimento ôhmico na qualidade do leite de castanha de caju

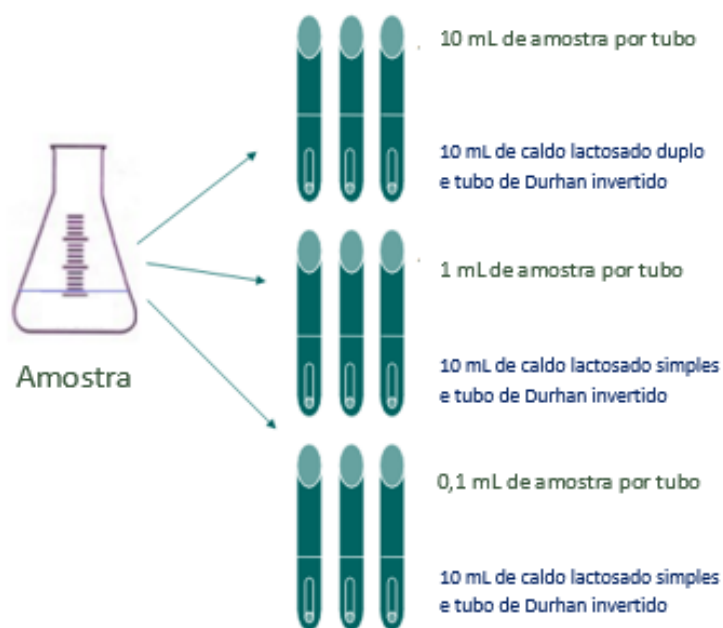
### 3.3.3 Coliformes totais

A contagem de coliformes totais foi realizada para as amostras de leite cru e leite tratado nas diluições  $10^{-2}$  e  $10^0$ , respectivamente, e conforme a metodologia do MAPA (IN 62) de determinação do número mais provável de coliformes totais em água e gelo, que é baseada nas etapas de prova presuntiva e posterior prova confirmativa.

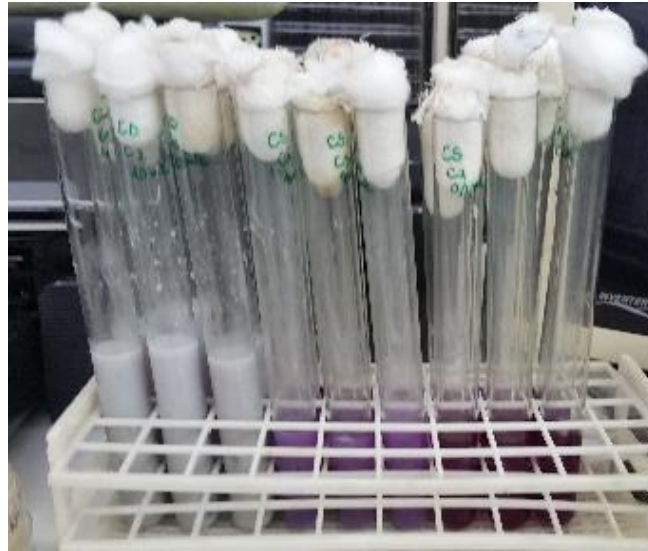
#### **Prova presuntiva**

É baseada na inoculação da amostra em caldo lactosado; a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan, que são previamente colocados invertidos nos tubos de ensaio, e turvação do meio de cultura em 48 h de incubação a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para cada amostra, séries de 9 tubos foram identificados e preparados com o caldo lactosado e tubos de Durhan invertidos, sendo que os três primeiros tubos continham caldo lactosado de dupla concentração (caldo lactosado duplo) e, os seguintes, caldo lactosado simples. Conforme ilustra a Figura 3.9, nos tubos com caldo lactosado duplo foram inoculados 10 mL de amostra, seguido de inoculação de 1 mL de amostra em três tubos contendo caldo lactosado simples e inoculação de 0,1 mL em cada um dos três tubos restantes. Em seguida, os tubos são incubados por 48 h a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . A Figura 3.10 apresenta uma sequência de nove tubos aonde foram inoculados 10 mL, 1 mL e 0,1 mL de leite de castanha de caju tratado.



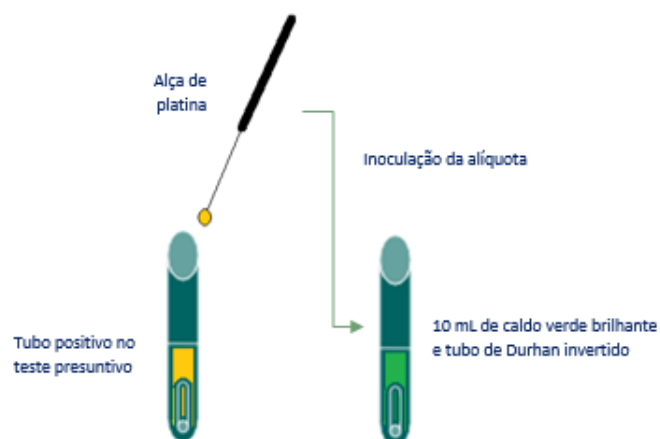
**Figura 3.9:** Preparação dos tubos para prova presuntiva de coliformes totais.



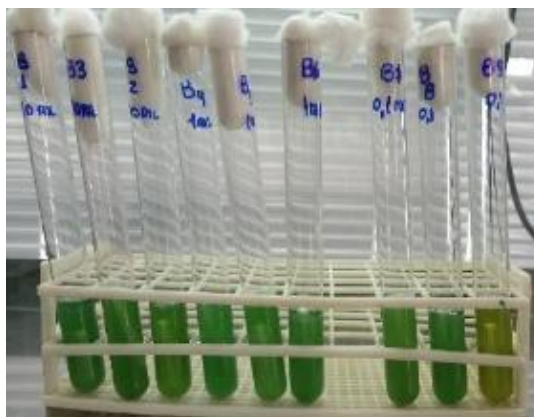
**Figura 3.10:** Sequência de tubos do teste presuntivo após a inoculação de leite de castanha.

### **Prova confirmativa**

A confirmação da presença de coliformes totais é dada pelo crescimento e formação de gás nos tubos de Durham devido à fermentação da lactose. A Figura 3.11 ilustra o processo de retirada de alíquota dos tubos positivos da etapa anterior, que é coletada com uma alça de platina previamente flambada e, em seguida, inoculada em caldo verde brilhante contendo um tubo de Durham invertido. Os tubos inoculados são, então, incubados por 48 horas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . A Figura 3.12 mostra uma sequência de tubos após o período de incubação de uma amostra de leite tratado. Os resultados são determinados pelas combinações de resultados positivos e expressos em NMP/g, de acordo com a tabela que segue no ANEXO A.



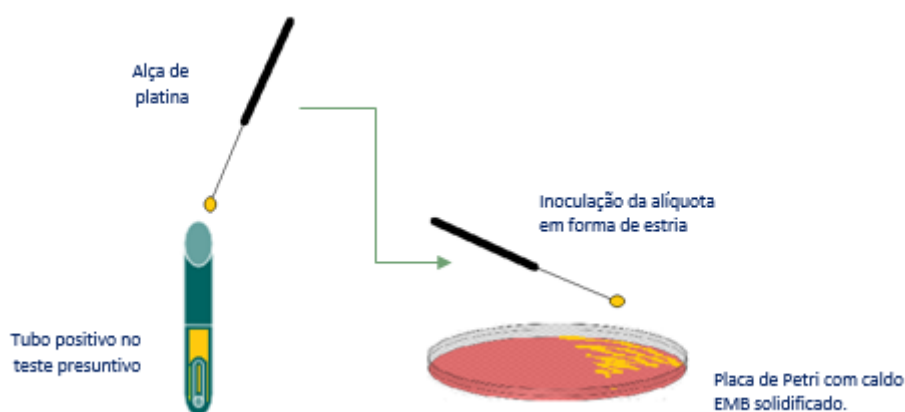
**Figura 3.11:** Representação da inoculação de uma alíquota do tubo positivo para a prova confirmativa de coliformes totais.



**Figura 3.12:** Sequência de tubos do teste confirmativo de coliformes após o período de incubação de uma amostra de leite tratado.

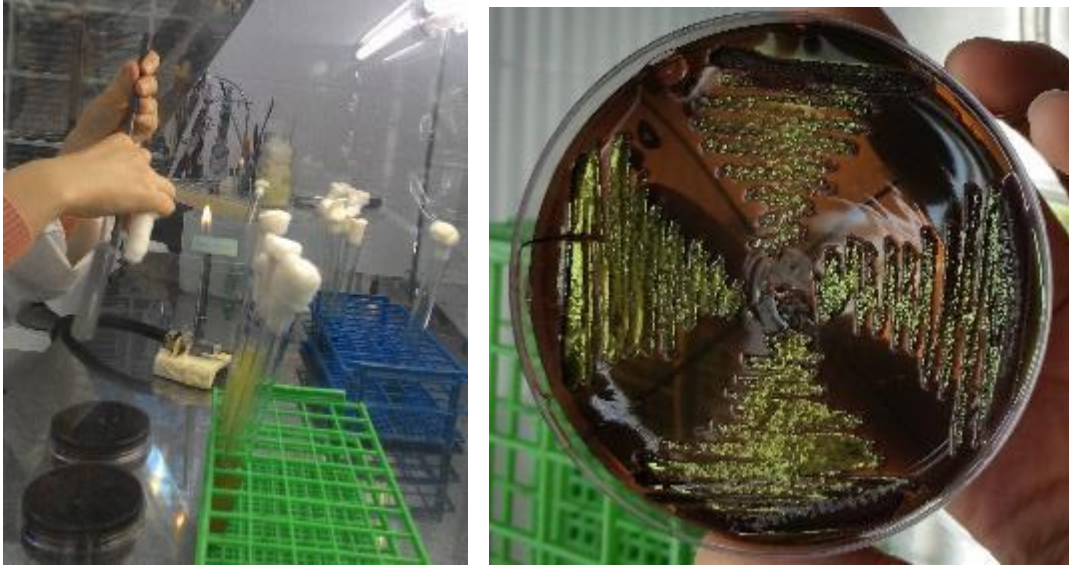
### 3.3.4 *Escherichia coli* (*E. coli*)

A análise foi realizada conforme representado pela Figura 3.13, ou seja, coletando-se uma alíquota de amostra dos testes positivos da prova presuntiva de coliformes, com alça de platina flambada e, pela técnica das estrias múltiplas, foram feitas estrias em ziguezague na superfície do meio de cultura Eosina Azul de Metileno (EMB) previamente preparado em placa de Petri e identificado. As placas foram incubadas a  $44,5 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas e então foi feita a leitura, havendo confirmação de *E. coli* em caso de um crescimento microbológico verde metálico. A Figura 3.14 mostra, à esquerda, coleta de alíquota para fazer as estrias na placa e, à direita, uma placa com crescimento verde metálico específico de *E. coli* após o período de incubação. Os resultados são então determinados pelas combinações de resultados positivos e expressos em NMP.



**Figura 3.13:** Representação da inoculação de uma alíquota do tubo positivo pelo método das estrias múltiplas em caldo EMB.





**Figura 3.14:** Teste para determinação de *E. coli*. À esquerda, coleta de alíquota do teste presuntivo positivo para fazer as estrias na placa e à direita, placa com crescimento verde metálico específico de *E. coli* após o período de incubação.

### 3.4 Análise de composição centesimal

As análises foram realizadas em triplicata das amostras de leite cru e leite tratado seguindo os protocolos de bromatologia dos laboratórios do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFRGS. A metodologia utilizada está apresentada a seguir e os métodos constam no ANEXO B.

#### 3.4.1 Umidade

A umidade foi determinada pelo método da secagem direta em estufa a 105°C.

#### 3.4.2 Cinzas – Método por incineração

Os minerais (cinzas) foram determinados pelo método por incineração em forno mufla em temperatura de 550 °C. Como a amostra era líquida, a umidade foi retirada previamente em estufa.

#### 3.4.3 Lipídios

Os lipídios foram determinados pelo método extração direta em Soxhlet.

#### *3.4.4 Proteínas*

As proteínas foram determinados pelo método Kjeldahl Clássico, utilizando fator de conversão 5,46, o mesmo de nozes.

#### *3.4.5 Carboidratos e fibras*

Na determinação da composição centesimal, os carboidratos e fibras foram determinados por diferença, ou seja, o percentual de água, proteínas, gordura e cinzas subtraído de 100.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Efeito sobre a população microbiana

Das análises microbiológicas realizadas, foram obtidos os resultados apresentados em ciclos logarítmicos nas Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente. A Tabela 1 é referente ao primeiro ensaio e contém os resultados da amostra de Leite Cru 1, que é a amostra de leite de castanha de caju que não sofreu tratamento (amostra controle), e os resultados de três amostras de leite de castanha de caju tratado com aquecimento ôhmico, chamadas de Leite Tratado A, B e C (provenientes da triplicata do tratamento ôhmico). Da mesma forma, a Tabela 2 apresenta os resultados do segundo ensaio, que é uma repetição do primeiro, realizado em condições similares para efeito de comparação. Nesta tabela, a amostra controle é a Leite Cru 2, enquanto que as amostras de leite tratado com aquecimento ôhmico foram chamadas de Leite Tratado D, E e F. Entre os dois ensaios houve um intervalo de duas semanas.

Tabela 1: Avaliação Microbiológica do leite de castanha de caju – Ensaio 1

AMOSTRA	Contagem de Heterotróficos Log 10 (UFC/mL)	Coliformes totais Log 10 NMP/g	<i>Escherichia coli</i> Log 10 NMP/g
Leite Cru 1	3,9	2,97	2,36
Leite tratado - A	1,4	0	0
Leite tratado - B	1	0	0
Leite tratado - C	0	0	0

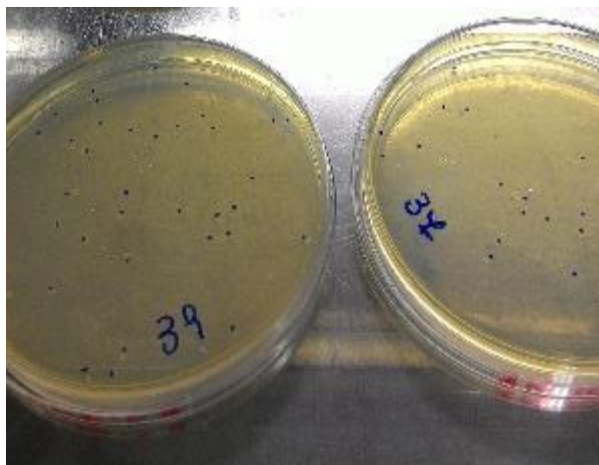
Tabela 2: Avaliação Microbiológica do leite de castanha de caju – Ensaio 2

AMOSTRA	Contagem de Heterotróficos Log 10 (UFC/mL)	Coliformes totais Log 10 NMP/g	<i>Escherichia coli</i> Log 10 NMP/g
Leite Cru 2	4,5	2,6	2,6
Leite tratado - D	2,5	2	2
Leite tratado - E	2,4	0	0
Leite tratado - F	2,2	2	2

Para melhor entendimento, estes resultados tabelados serão discutidos nos subitens que seguem.

#### 4.1.1 Contagem de Heterotróficos

Os resultados são dados em Unidades Formadoras de Colônia por mililitro de amostra (UFC/mL). A Figura 4.1 apresenta um exemplo de contagem de Heterotróficos realizada no Leite Cru com diluição  $10^{-2}$ .



**Figura 4.1:** Contagem de Heterotróficos em uma amostra de Leite Cru com diluição  $10^{-2}$ .

Para ambos os ensaios, a contagem de Heterotróficos do leite tratado apresentou valores reduzidos em relação ao leite que não recebeu tratamento. Para o primeiro ensaio, a redução de unidades formadoras de colônias foi da ordem de três ciclos logarítmicos, o que significa que a contagem das células heterotróficas viáveis foi reduzida em torno de mil vezes. Para o segundo ensaio, houve uma redução da ordem de dois ciclos logarítmicos, ou seja, em torno de cem vezes.

Pode-se inferir então, que o tratamento por aquecimento ôhmico reduz a população microbológica do leite de castanha de caju, possivelmente a carga microbiana que causa a deterioração do alimento. No entanto, apesar de ambos os resultados do tratamento irem ao encontro de uma redução significativa na contagem de heterotróficos, os valores encontrados ainda são muito distintos tanto para o leite tratado, quanto para o leite sem tratamento. Apenas dois ensaios microbiológicos não possuem caráter conclusivo, por isso seria de fundamental importância mais repetições para comparação.

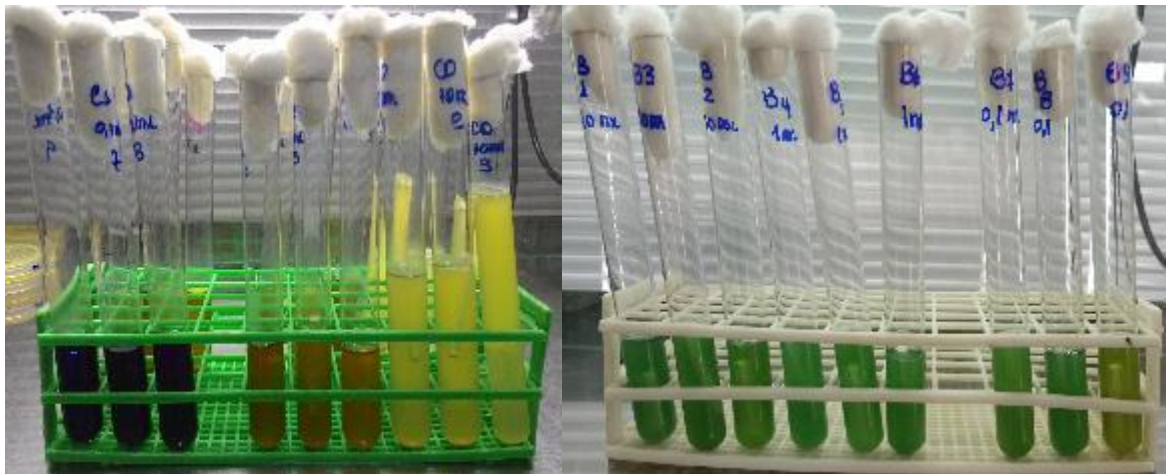
Para o leite de vaca pasteurizado, o Ministério da Agricultura (Instrução Normativa nº 51, 2002) estabelece o valor máximo aceitável de  $8 \cdot 10^4$  UFC/mL para a contagem padrão em placa, valor muito mais alto que os encontrados para o leite de castanha de caju tratado.

Portanto, segundo o padrão citado, o aquecimento ôhmico mostrou-se eficiente para tornar a bebida aceitável em termos de população de bactérias heterotróficas. Lembrando

que não existe legislação própria para o leite de castanha de caju pasteurizado, por isso essa comparação com o padrão microbiológico de outra bebida.

#### 4.1.2 Coliformes totais

Os resultados são expressos em Número Mais Provável por grama de amostra (NMP/g). A Figura 4.2 apresenta exemplos de sequência de tubos múltiplos do teste de colimetria: à esquerda, teste presuntivo em caldo lactosado e, à direita, teste confirmativo em caldo verde brilhante.



**Figura 4.2:** Exemplos de sequência de tubos múltiplos do teste de colimetria. À esquerda, teste presuntivo em caldo lactosado e, à direita, teste confirmativo em caldo verde brilhante.

Para ambos os ensaios, a análise de coliformes totais do leite tratado também apresentou valores reduzidos em relação ao leite que não recebeu tratamento. Para o primeiro ensaio, a redução de coliformes totais foi quase da ordem de três ciclos logarítmicos, ou seja, de quase mil coliformes por grama para ausência de coliformes no leite tratado.

Para o segundo ensaio, foram obtidos dois resultados diferentes. Enquanto a amostra E reportou ausência de coliformes totais, de forma similar aos resultados do primeiro ensaio, as amostras D e F apresentaram apenas redução de 0,6 ciclo logarítmico, ou seja, o valor de coliformes totais foi reduzido em torno de quatro vezes.

Não é possível inferir se o tratamento ôhmico causa a inativação total ou parcial de coliformes totais com estes poucos resultados. Conforme já mencionado, para o teste ser conclusivo, torna-se necessário mais repetições. Não foi encontrado na legislação vigente qualquer padrão microbiológico de coliformes totais em produtos similares para comparação.

#### 4.1.3 *Escherichia coli*

Os resultados também são expressos em Número Mais Provável por grama de amostra (NMP/g). A Figura 4.3 apresenta o crescimento de *E. coli* em caldo EMB durante a análise da amostra Leite Tratado-F.



**Figura 4.3:** Crescimento de *Escherichia coli* presente na amostra Leite Tratado-F.

Para o primeiro ensaio, a Tabela 1 apresenta 2,97 ciclos logarítmicos de coliformes totais e 2,36 de *E. coli* no leite cru. Isso significa que cerca de 25 % dos coliformes totais presentes na amostra são do tipo *E. coli* no ensaio 1. Já para o segundo ensaio, segundo a Tabela 2, essa relação foi de 100 %.

Para ambos os ensaios, a análise de *E. coli* do leite tratado também apresentou valores menores em relação ao leite que não recebeu tratamento. No primeiro ensaio, essa redução de *E. coli* foi de 2,36 ciclos logarítmicos para ausência de coliformes no leite tratado.

Assim como no teste de coliformes totais, para o segundo ensaio também foram obtidos dois resultados diferentes, como não poderia deixar de ser, já que 100 % dos coliformes são do tipo *E. coli*.

Para leite de vaca pasteurizado, a Resolução RDC n°12 (ANVISA, 2001) determina a tolerância de 4 NMP/mL de coliformes a 45 °C em amostras indicativas. Esta mesma Resolução também estabelece o limite de 10<sup>2</sup> NMP/mL para o leite de coco e o limite de 10 NMP/mL de coliformes a 45 °C para o leite de soja e sucos pasteurizados.

A fim de facilitar a comparação com as análises realizadas no leite de castanha de caju, segundo a Tabela 2, as amostras D e F ao final apresentaram *E. coli* de 2 ciclos logarítmicos, o que pode ser expresso também por 110 NMP/mL.

Lembrando que o grupo de bactérias do tipo *E. coli* são o principal representante do grupo de coliformes termotolerantes, logo, ele pertence ao grupo de coliformes a 45 °C indicado na resolução acima. Como os resultados indicaram que 100 % dos coliformes são *E. coli*, é possível comparar diretamente os dados obtidos com os da resolução. Caso não fossem, seria necessário dispor dos resultados de análise específica pelo método de determinação do número mais provável de coliformes a 45 °C.

Devido aos resultados divergentes, para concluir a respeito da eficiência do aquecimento ôhmico para inativação do grupo patogênico *E. coli* seriam necessários mais testes. De qualquer forma, comparando os resultados com os limites da resolução citada, os tratamentos que resultaram em ausência de *E. coli* seriam possivelmente considerados próprios para consumo. Já as amostras D e E seriam reprovadas para consumo, bem como o leite que não sofreu tratamento. O mesmo pode se dizer comparando aos padrões de potabilidade de água, que determinam ausência de *E. coli* para a água ser considerada adequada para consumo.

#### 4.2 Efeito sobre a composição centesimal

Tabela 3 A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para as análises de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos/fibras do leite de castanha de caju cru e leite tratado com aquecimento ôhmico.

Tabela 3: Resultados das análises de composição centesimal das amostras de leite de castanha de caju cru e leite tratado com aquecimento ôhmico.

Parâmetro	Leite Cru (%)	Leite tratado (%)
Umidade	89,1	91,0
Cinzas	0,25	0,18
Proteínas	2,38	2,0
Lipídios	5,68	4,7
Carboidratos e fibras	2,59	2,12

Pode-se perceber que há uma pequena diferença entre os percentuais de composição do leite cru e do leite tratado. Com exceção da umidade, todos os outros valores de composição do leite tratado são levemente menores do que os valores do leite cru, embora, essa diferença seja muito pequena frente ao percentual de umidade.

### **32 Avaliação do efeito da aplicação de aquecimento ôhmico na qualidade do leite de castanha de caju**

---

Levando em consideração que as amostras coletadas para análise de composição centesimal não eram provenientes da mesma preparação do leite vegetal, e que durante o preparação do leite era difícil acertar o volume de 1 litro devido a formação de espuma, a variabilidade destes valores pode ter decorrido simplesmente de uma leve diferença de concentração entre as amostras.

Portanto, não é possível afirmar que estes parâmetros analisados apresentaram alguma diferença causada pelo tratamento ôhmico no leite de castanha de caju.



## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Ao fim deste trabalho, conclui-se que o campo de tratamento de leites vegetais tem muitas contribuições a receber. Ainda que muitos resultados desta pesquisa tenham se mostrado inconclusivos, foram obtidos dados promissores a respeito de tratamento ôhmico do leite de castanha de caju que precisam ser confirmados.

Pode-se inferir que o tratamento ôhmico foi eficiente para a redução da contagem de heterotróficos, coliformes totais e *E. Coli*. No entanto, mais testes são necessários para concluir que este tratamento pode garantir inativação total das células patogênicas, tais como *E. coli*.

Além das necessárias repetições dos ensaios para aumentar a confiabilidade dos resultados, também faz-se necessário aprimorar a metodologia aplicada. Algumas causas de erro e contaminação poderiam ter sido minimizadas, tais como a preparação do leite de castanha de caju, bem como a aplicação do tratamento ôhmico que não foram realizadas em ambiente estéril. Cabe ressaltar que os eletrodos, célula e termopares do conjunto de aquecimento ôhmico têm contato direto com a amostra e, por não serem previamente esterilizados, podem ser fontes de contaminação.

A respeito das análises centesimais, aparentemente o tratamento ôhmico não causou alterações significativas na composição. A fim de aprimorar os resultados, seria interessante repetir as análises com a mesma preparação de leite vegetal, recolhendo amostras antes e depois da aplicação do tratamento.

Como sugestão para trabalhos futuros, é interessante que seja avaliada a alteração da qualidade do leite de castanha de caju em relação a nutrientes e microrganismos específicos da castanha de caju, tais como os produtores de micotoxinas. Também é importante que outros binômios de tempo e temperatura sejam testados para comparação.

Infelizmente, não houve tempo hábil para executar mais testes, tampouco para aplicar melhorias na metodologia. As análises microbiológicas, em especial, demandaram muito tempo, já que cada conjunto de ensaios leva 5 dias úteis para serem realizados. Lembrando que não apenas as análises apresentadas nos resultados foram efetuadas, uma vez que análises prévias a fim de adequar a metodologia também foram requeridas.

## 6 Referências

- ANDERSON, A.; FINKELSTEIN, R. Study of the electro pure process of treating milk. *Journal of Dairy Science* 2, 374–406, 1919.
- ANDRÉ, 2015. Leites vegetais, disponível em <[temperoalternativo.com.br/2015/01/16/leites-vegetais-2](http://temperoalternativo.com.br/2015/01/16/leites-vegetais-2)>, acessado em 10 de junho de 2016.
- APPS, J. R.; BEATTIE, R. M. Cow's milk allergy in children. *BMJ* 2009 339: b2275.
- CÂMARA, C. R. Indicadores de qualidade de amêndoas de castanha de caju em pedaços durante o processo industrial. Tese de Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, 2010.
- Carneiro, A. L. - SINDICAJU: Perfil do agronegócio do caju, disponível em: <[sindicaju.org.br/perfil-do-setor/perfil-do-setor](http://sindicaju.org.br/perfil-do-setor/perfil-do-setor)>, acessado em 18 de junho de 2016.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. Norma Técnica L5.406 – Coliformes Termotolerantes – Determinação em Amostras Ambientais pela Técnica de Tubos Múltiplos com Meio A-1 – Método de Ensaio A-1. 2007.
- EMBRAPA. Processamento de Castanha de Caju. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2006.
- FELLOWS, P.J. Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e prática. Tradução: Florencia Cladera Oliveira et al, 2 ed, Porto Alegre: Artemed, 2006.
- GENTRY, A. A nova culinária vegana. Ed. Alaúde, 2015.
- INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF, 2005) - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Disponível em: <<http://www.icmsf.org/>>, acessado em 15 de junho de 2016.
- INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in foods 3. Microbial Ecology of Foods. Food Commodities. v. 2. New York: Academic Press, 1980.
- KNORR, D. et al. Processing concepts based on high intensity electric field pulses. *Trends in Food Science & Technology*, v.12, p.129-135, 2001.
- LEITE, L. A. S.; PESSOA, P. F. A. P. Cultivo do cajueiro no Nordeste brasileiro: o agronegócio caju. 2004. Disponível em: <[www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo\\_587.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_587.pdf)>, acessado em 05 de junho de 2016.
- LEWIS, M.; HEPPEL, N. Continuous Thermal Processing of Foods: Pasteurization and UHT Sterilization. Aspen Publishers, Inc., 2000.

LULE, V. K.; GARG, S.; TOMAR, S. K.; KHEDKAR, C. D.; NALAGE, D. N. Food Intolerance: Lactose Intolerance. Elsevier, 2016.

MACHADO, L. F. et al. Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature. *Journal of Food Engineering*. Volume 96, Issue 4, February 2010, Pages 520–527.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; DUNLAP, P; CLARK, C. *Microbiologia de Brock*, 12ª Ed. Ed. Artmed. 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal; Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 - Aprova e oficializa o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado, *Diário Oficial da União*, n. 172, p.13-22, 2002. Seção I.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária; Instrução Normativa Nº 62 - Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução – RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001 –Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, GABINETE DO MINISTRO. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Portaria MS nº 518/2004. Brasília, 2005. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4<sup>th</sup> ed. Washington: APHA, 2001.

ORDÓNEZ, J. A. *Tecnologia de alimentos*. Volume 2. Alimentos de origem animal – 1ª Ed., Ed. Artmed – SP, 2005.

PALANIAPPAN, S.; SASTRY, S.K. Electrical conductivity of selected juices: influences of temperature, solids content, applied voltage, and particle size. *Journal of Food Process Engineering*, 14 (4) (1991), pp. 247–260

PORTAL DA EDUCAÇÃO. Métodos não convencionais de conservação de alimentos. 2013. Disponível em:

<[www.portaleducacao.com.br/nutricao/artigos/31208/metodos-nao-convencionais-de-conservacao-de-alimentos](http://www.portaleducacao.com.br/nutricao/artigos/31208/metodos-nao-convencionais-de-conservacao-de-alimentos)>, acessado em 14 de junho de 2016.

RICHARDSON, P. Thermal Technologies in Food Processing. Washington DC: Woodhead Publishing Limited, 2001.

ROSA, M. F.; FIGUEIREDO, M. C.; PESSOA, P. F. A. P.; BRÍGIDA, A. I. Módulos múltiplos de processamento de castanha de caju - avaliação dos impactos ambientais. Embrapa Agroindústria Tropical, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10ª Ed. Ed. Artmed, 2012

USDA National Nutrient Database, disponível em [ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3677](http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3677), acessado em 19 de junho de 2016.

VASCONCELOS, M. A. S; FILHO, A. B. M. Conservação de alimentos. Programa Escola Técnica Aberta do Brasil (ETEC – Brasil). Recife, 2010.

VELASCO, C. E. O.; GONZÁLEZ, M. C.; BELTRÁN, J. A. G. Ultraviolet-C light inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in coconut (*Cocos nucifera* L.) milk. Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 26, December 2014, Pages 199–204

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

**Anexo A**

Tabela de NMP e limites a 95% de confiança para várias combinações de resultados positivos de tubos pelo método dos tubos múltiplos.

Número de Tubos Positivos			NMP/mL	Intervalo de Confiança (95%)	
10-0	10-1	10-2		Inferior	Superior
0	0	0	<0,3	-	0,95
0	0	1	0,3	0,015	0,96
0	1	0	0,3	0,0015	1,1
0	1	1	0,61	0,12	1,8
0	2	0	0,62	0,12	1,8
0	3	0	0,94	0,36	3,8
1	0	0	0,36	0,017	1,8
1	0	1	0,72	0,13	1,8
1	0	2	1,1	0,36	3,8
1	1	0	0,74	0,13	2
1	1	1	1,1	0,36	3,8
1	2	0	1,1	0,36	4,2
1	2	1	1,5	0,45	4,2
1	3	0	1,6	0,45	4,2
2	0	0	0,92	0,14	3,8
2	0	1	1,4	0,36	4,2
2	0	2	2	0,45	4,2
2	1	0	1,5	0,37	4,2
2	1	1	2	0,45	4,2
2	1	2	2,7	0,87	9,4
2	2	0	2,1	0,45	4,2
2	2	1	2,1	0,87	9,4
2	2	2	3,5	0,87	9,4
2	3	0	2,9	0,87	9,4
2	3	1	3,6	0,87	9,4
3	0	0	2,3	0,46	9,4
3	0	1	3,8	0,87	11
3	0	2	6,4	1,7	18
3	1	0	4,3	0,9	18
3	1	1	7,5	1,7	20
3	1	2	12	3,7	42
3	1	3	16	4	42
3	2	0	9,3	1,8	42
3	2	1	15	3,7	42
3	2	2	21	4	43
3	2	3	29	9	100
3	3	0	24	4,2	100
3	3	1	46	9	200
3	3	2	110	18	410
3	3	3	>110	42	-

(FONTE: MAPA, 2003)

## Anexo B