

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Avaliação do suco de framboesa submetido a tratamento térmico e às tecnologias de ultrassom e campo elétrico moderado

Autor: Rodrigo Ramos Laurino

Orientadora: Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadoras: Cibele Freitas de Oliveira

Débora Pez Jaeschke

Sumário

| | |
|--|------|
| Sumário | ii |
| Agradecimentos | iv |
| Resumo | v |
| Lista de Figuras | vi |
| Lista de Tabelas | vii |
| Lista de Símbolos | viii |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | iv |
| 1 Introdução | 1 |
| 2 Revisão Bibliográfica | 2 |
| 2.1 Framboesa (<i>Rubus idaeus</i>) | 2 |
| 2.2 Compostos Bioativos | 3 |
| 2.2.1 Compostos fenólicos | 3 |
| 2.3 Aspectos microbiológicos | 8 |
| 2.4 Tratamento térmico | 9 |
| 2.5 Campo elétrico moderado (CEM) | 10 |
| 2.6 Ultrassom (US) | 12 |
| 3 Materiais e métodos | 14 |
| 3.1 Preparação do suco | 14 |
| 3.2 Pasteurização do suco de framboesa | 14 |
| 3.2.1 Tratamento térmico convencional | 14 |
| 3.2.2 Pasteurização assistida pela tecnologia de ultrassom | 15 |
| 3.2.3 Pasteurização assistida por campo elétrico moderado | 15 |
| 3.3 Análises do suco pasteurizado | 16 |
| 3.3.1 Compostos bioativos | 16 |
| 3.4 Determinação de antocianinas monoméricas totais | 16 |
| 3.5 Cor polimérica | 17 |
| 3.6 Análise de cor | 18 |
| 3.7 Análises físico-químicas | 19 |
| 3.7.1 pH | 19 |
| 3.7.2 Acidez total titulável | 19 |
| 3.8 Análises microbiológicas | 20 |
| 3.9 Análises estatísticas | 20 |
| 4 Resultados | 21 |
| 4.1 Compostos fenólicos | 21 |
| 4.2 Antocianinas totais monoméricas e Cor polimérica | 23 |
| 4.3 Análise de cor | 24 |
| 4.4 Análises físico-químicas | 26 |
| 4.5 Análises microbiológicas | 27 |

| | | |
|---|--------------------------------|----|
| 5 | Conclusões e Trabalhos Futuros | 28 |
| 6 | Referências | 29 |
| 7 | Anexos | 38 |

Agradecimentos

Agradeço a minha família e namorada, por sempre acreditarem em mim e estarem ao meu lado nos momentos que precisei.

Às minhas orientadoras Lígia, Cibele e Débora, por todo incentivo, correções e paciência na orientação o que tornou possível a conclusão desse trabalho. Ao professor Adriano Brandelli e ao bolsista Gustavo Gregory por toda ajuda durante a pesquisa.

Aos meus amigos e colegas, que compartilharam juntos comigo todos os momentos de alegrias, tristezas e dificuldade que encontramos ao longo do curso, mas que com certeza nos fizeram amadurecer para chegar nesse momento.

E à todos que, de alguma maneira, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Resumo

A framboesa é uma fruta apreciada pelo seu sabor e aroma agradáveis e essas características fazem com que ela seja consumida, principalmente, na forma de sucos, iogurtes, sorvetes, gelatinas e geleias. Essa fruta, também se destaca por ser um alimento rico em compostos bioativos, principalmente antocianinas, que possuem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além de ajudar a prevenir o câncer e doenças cardiológicas. A framboesa pode ser consumida de diversas maneiras. Entre elas, o principal meio de consumo é na forma de suco. No entanto, para possibilitar o consumo, é necessário que a framboesa passe pelo processo de pasteurização, para que sejam inativadas enzimas e micro-organismos que podem afetar a qualidade dos produtos. O processo de pasteurização mais comum é o térmico, em que o suco de a framboesa é submetido a altas temperaturas. Apesar de eficiente, esse processo pode degradar compostos bioativos, diminuindo os benefícios dos produtos. Com isso, existe a procura por alternativas a esse tipo de tratamento, sendo destacadas as tecnologias de ultrassom e campo elétrico moderado. Dentro deste contexto, o objetivo desse trabalho é comparar a pasteurização do suco de framboesa de maneira convencional com a pasteurização utilizando as tecnologias de ultrassom e campo elétrico moderado. Visando manter a qualidade do suco, após os tratamentos, foram analisados o conteúdo de compostos fenólicos e antocianinas além de outros aspectos físico-químicos como cor, pH e acidez titulométrica. Para verificar a eficiência dos processos foram realizados testes microbiológicos. No tratamento térmico foi utilizada a temperatura de 90°C, no ultrassom foram utilizadas as potências 423 W cm⁻² e 508 W cm⁻² (75 % e 90 % da capacidade de potência do equipamento, respectivamente) e no campo elétrico as tensões de 25 e 50 V. A intensidade do campo não está descrita em V cm⁻¹, pois os eletrodos utilizados eram curvos, não sendo possível medir a exata distancia entre eles. Os resultados mostraram que a única tecnologia que afetou a concentração dos compostos fenólicos e antocianinas foi a tecnologia do ultrassom, que degradou parte das antocianinas. As tecnologias do CEM e o tratamento térmico convencional não afetou significativamente esse aspecto do suco. Já os parâmetros da cor e os aspectos físico-químicos pH e acidez titulométrica não foram afetados por nenhuma das tecnologias. As análises microbiológicas mostraram que todos os tratamentos conseguiram diminuir a quantidade de micro-organismos em cerca de dois ciclos logarítmicos. No entanto, como os valores finais ficaram abaixo de 1000 UFC mL⁻¹, não foi possível verificar a diferença da eficácia de cada tratamento. As tecnologias conseguiram diminuir a quantidade de micro-organismos a valores aceitáveis pelos padrões de higiene e saúde exigidos por lei. No entanto, um estudo mais aprofundado em relação aos micro-organismos presentes no suco dever ser realizado para que possa ser observada a diferença entre os processos de pasteurização utilizados.

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2.1: Framboesa..... | 2 |
| Figura 2.2: Exemplos de estruturas de compostos fenólicos: a)taninos hidrolizáveis; b) Ácidos hidrobencícos..... | 3 |
| Figura 2.3: Estrutura química dos Flavonóides | 4 |
| Figura 2.4: Estruturas químicas das antocianinas | 5 |
| Figura 2.5: Formas estruturais das antocianinas em equilíbrio solução aquosa..... | 6 |
| Figura 2.6: Sistema de sonda para aplicação de ultrassom. | 13 |
| Figura 3.1: Espaço de cores, segundo escala CIELAB | 19 |

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Média dos resultados dos compostos Bioativos nos três tipos de pasteurizações realizadas 22

Tabela 4.2: Análise calorimétrica para todos experimentos.....25

Tabela 4.3: Análises físico-químicas para todos os tratamentos realizados..... 27

Lista de Símbolos

- A absorvância
- aw atividade de água
- a^*, b^* coordenadas cromáticas
- ϵ absorvidade molar (L.mol⁻¹.cm⁻¹)
- Eq equivalente-grama
- FD fator de diluição
- I intensidade corrente elétrica (A)
- L^* luminosidade
- MM massa molar (g/mol)
- n volume de solução de NaOH (mL)
- N normalidade da solução de NaOH (N)
- Q quantidade de energia gerada no ultrassom (j .s⁻¹)
- R resistência elétrica (Ω)

Lista de Abreviaturas e Siglas

CEM Campo elétrico moderado

ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods

RDC Resolução da diretoria colegiada

UFC Unidade formadora de colônia

US Ultrassom

UR Umidade Relativa

1 Introdução

A busca pela inclusão de compostos que tragam benefícios à saúde na alimentação está cada vez maior. As pessoas procuram, cada vez mais, ter em sua alimentação alimentos que, não só sejam saborosos e tragam prazer ao serem ingeridos, mas que também proporcionem algum tipo de benefício para a saúde. Nessa linha, destacam-se os alimentos funcionais, que pode ser qualquer alimento natural ou formulado, que contenha uma ou mais substâncias capazes de promover benefícios à saúde. Dentre esses principais benefícios estão as reduções do risco de doenças crônicas degenerativas, como câncer e diabetes. Pode-se destacar, entre os componentes alimentares não nutrientes com propriedades funcionais, os compostos organosulfurados, indólicos, substâncias fenólicas, terpenos e oligossacarídeos, entre outros.

A framboesa é uma fruta rica em compostos fenólicos, destacando-se as antocianinas, componente que possui grande potencial farmacológico, com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Entre os principais meios de consumo da framboesa estão os sucos industrializados, os quais passam pelo processo de pasteurização para poderem ser consumidos. Essa etapa da produção do suco visa à inativação de enzimas e micro-organismos que podem prejudicar aspectos importantes do suco, como cor e sabor e ainda a saúde o consumidor. Como principal método de pasteurização, o tratamento térmico consiste em submeter o suco a altas temperaturas por determinado período de tempo. Essa prática possui boa eficiência na eliminação das enzimas e micro-organismos, o que aumenta o tempo de prateleira do produto, mas pode acabar por degradar também nutrientes e compostos de interesse, como as antocianinas.

Devido a essas desvantagens que a busca por alternativas ao tratamento térmico convencional tem sido cada vez mais intensa e frequente entre os pesquisadores e a indústria. As tecnologias emergentes que utilizam temperaturas moderadas vêm se destacando, e, dentre elas, pode-se citar o ultrassom e o campo elétrico moderado.

O ultrassom baseia-se na propagação de ondas acústicas inaudíveis, que cobrem uma faixa de frequência desde 16 kHz até 1010 kHz. Essas frequências estão associadas a comprimentos de onda comparáveis às distâncias intermoleculares o que, em líquidos, pode provocar o fenômeno denominado de cavitação de bolhas. O campo elétrico moderado consiste na passagem de corrente elétrica alternada através de um alimento, com tensões variando entre 1 V.cm^{-1} e 1000 V.cm^{-1} , com a principal finalidade de causar a eletroporação das células aumentando a sua permeabilidade. Esse processo pode ou não gerar o aquecimento do alimento; se a intensidade do campo for suficiente para aquecer o alimento, o processo é chamado de aquecimento ôhmico. No entanto, este trabalho busca estudar os efeitos não térmicos do campo elétrico, que estão ligados ao fenômeno de permeabilização das células. Nesse caso, essa tecnologia é denominada campo elétrico moderado (MEF, do inglês *moderate electric field*).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade do suco de framboesa quanto aos aspectos microbiológicos, conteúdo de compostos fenólicos e características físico-químicas, após os tratamentos utilizando as tecnologias de ultrassom e campo elétrico moderado.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Framboesa (*Rubus idaeus*)

A framboesa (*Rubus Idaeus*) (Figura. 21) é um fruto originário do centro-norte europeu e de parte da Ásia. No âmbito mundial, a framboesa é cultivada em 37 países, sendo o principal produtor a Rússia, seguido pela Servia, Ucrânia, Estados Unidos e Polônia. Estima-se que a produção mundial de framboesa seja de aproximadamente 415 mil toneladas, (University of Georgia, 2006). Na América Latina, quem se destaca é o Chile com uma produção anual de 30 mil toneladas, cultivadas em cerca de 5.000 hectares, e também Argentina e Uruguai, onde o cultivo da framboesa tem aumentado gradativamente.



Figura 2.1: Framboesa.

No Brasil, o cultivo da framboesa começou em São Paulo, no município de Campos do Jordão. Posteriormente, se espalhou para o sul do país, sendo os atuais maiores produtores os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, com um cultivo em uma área de 150 hectares e com uma produção anual de 150 toneladas (Gonçalves *et al.*, 2011).

Em relação às formas de consumo, a produção de framboesa pode ser destinada tanto ao mercado de frutas frescas quanto à fabricação de polpa congelada, gelatinas, geleias, sucos e iogurtes (Vendrusculo *et al.*, 2009). Como também é muito apreciada *in natura*, o seu cultivo tornou-se comum em áreas que realizam o turismo rural (Pio, 2007).

Quanto aos valores nutricionais, a framboesa é constituída principalmente por água, podendo variar o seu teor entre 83 e 85 % (Gorini, 1989). Também estão presentes em boa quantidade açúcares, sendo a frutose, glucose e sacarose os principais. Essa fruta caracteriza-se por ser de baixa quantidade calórica e com bom teor de sais minerais como potássio, cálcio, magnésio e ferro, vitamina C, betacaroteno e compostos fenólicos (Souza *et al.*, 2007). Todas essas características fazem com que a framboesa faça parte dos chamados alimentos funcionais, os quais segundo a ANVISA, além de possuir efeitos nutricionais, auxiliam na redução dos riscos de doenças como câncer, diabetes, hipertensão entre outras.

2.2 Compostos Bioativos

Compostos bioativos são substâncias capazes de desempenhar um papel importante na diminuição de doenças crônicas degenerativas (Neumann *et al.*, 2002; Taipina, Fontes, Cohen, 2002). Essas substâncias são constituintes extras nutricionais presentes em pequenas quantidades em alimentos de origem vegetal como cereais, frutas, hortaliças, peixes e óleos (Scarbieri, Pacheco, 1999). Entre os principais exemplos dessas substâncias pode-se citar os flavonoides (como quercetina, carcetina, antocianinas e genisteína), carotenoides (licopeno, luteína, zeaxantina e β -caroteno), fotosteróis e ácidos graxos.

Dentre todos os compostos bioativos, neste trabalho será dado maior enfoque aos compostos fenólicos, principais compostos bioativos presentes na framboesa, que são compostos químicos cujo aspecto estrutural comum é a presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático (Croteau, Kutchan, Lewis, 2000; Shahidi, Naczyn, 1995).

2.2.1 Compostos fenólicos

Representando a maioria dos agentes fotoquímicos, esses compostos encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal. Existe uma grande variedade na estrutura e ocorrência das substâncias fenólicas, desde estruturas complexas, como, por exemplo, os taninos hidrolisáveis (Figura 2.2a) de elevadas massas molares, até estruturas extremamente simples como os ácidos hidrobenzóicos (Figura 2.2b) (Tomás Barberan, Espin, 2001).

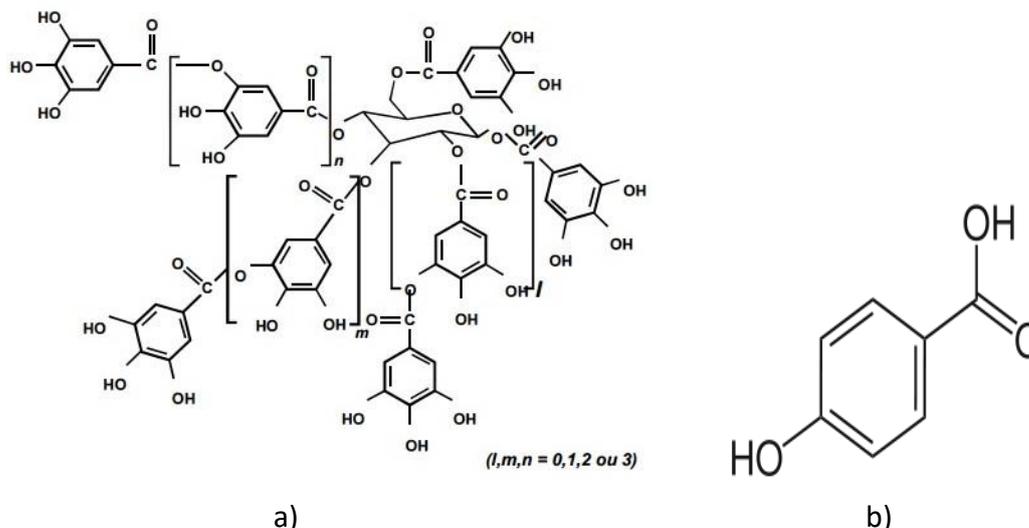


Figura 2.2 : Exemplos de estruturas de compostos fenólicos: a) taninos hidrolisáveis, b) ácidos hidrobenzóicos.

(fontes: Nakamura *et al.*, 2003, : Ângelo e Jorge, 2006)

Os compostos fenólicos naturais são considerados metabólitos secundários e estão entre as principais classes de antioxidantes naturais, sendo encontrados em todas as plantas e também em frutas e legumes (You, *et al.*, 2001). Entre as principais classes de compostos fenólicos destaca-se os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos.

Na framboesa, os principais compostos fenólicos encontrados são as antocianinas (25 %) e elagitaninos (50 %); o restante se divide em ácidos fenólicos e conjugados de ácidos elágicos e a quercetina (Burton-Freeman, *et al.*, 2016).

Além dos compostos com propriedades antioxidantes, a framboesa possui também compostos bioativos anti-inflamatórios, que atuam contra a atividade microbiana de organismos patogênicos intestinais e anti-proliferação de células cancerígenas no fígado, mama, cólon e próstata (Zhang, *et al.*, 2009).

Os flavonoides (Figura 2.3) são compostos de baixa massa molecular, possuindo estruturas químicas C₆-C₃-C₆ com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (Iwashina, 2000, Martinez-Flores *et al.*, 2002; Shahidi, Naczn, 1995a).

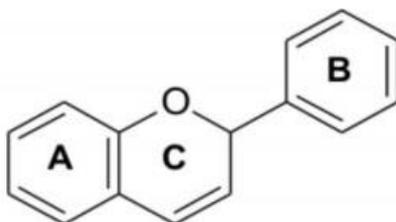


Figura 2.3: Estrutura química dos Flavonóides

(Fonte: Ângelo e Jorge, 2007)

Esses compostos estão presentes em diversas partes das plantas como caule, folhas, sementes e em outras partes. Esses compostos estão associados a funções de defesa e atração (Santos, 2007). Podem-se dividir os flavonoides em diversas subclasses, entre elas as antocianinas, flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavonóis (King, Young, 1999), sendo a diferença entre elas as substituições no anel heterocíclico.

Os ácidos fenólicos são compostos que possuem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metila na sua estrutura, o que confere a molécula propriedades antioxidantes. Eles consistem em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzoico, que incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, os quais possuem estrutura comum C₆-C₁, e os derivados do ácido hidroxicinâmico, como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, todos compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral.

Em relação aos taninos, esses compostos possuem a massa molar relativamente mais alto do que os flavonoides, constituindo uma classe de polifenóis. Os taninos destacam-se pela capacidade de formar ligações estáveis com as proteínas (Flanzy, 2003), isso por que são moléculas relativamente volumosas e esse volume juntamente com a sua configuração espacial, fornece estabilidade a essas ligações (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

2.2.1.1 Antocianinas

De fórmula molecular C₆-C₃-C₆, as antocianinas são uma parte muito importante do grupo dos flavonóides (Hernández, 2002). Pigmentos naturais, elas são compostos hidrossolúveis que estão distribuídas amplamente na natureza, fornecendo cores como rosa, laranja, vermelho, azul e violeta a diversas plantas e vegetais (Bridle; Timberlake, 1997; Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

O interesse nas antocianinas cresceu após ser descoberto que, além de corantes naturais, essas moléculas proporcionam benefícios à saúde, em virtude de seus efeitos

antioxidantes, atuando na prevenção de doenças crônicas degenerativas como câncer, diabetes e problemas cardiovasculares (Espin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008).

Em relação à sua estrutura química, as antocianinas são compostos formados por duas ou três partes: uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (Francis, 1989). Na Figura 2.4 é possível visualizar as diversas combinações possíveis para formação de antocianinas.

Existem cerca de 22 diferentes agliconas, mas entre elas destacam-se a cianidina, a delphinidina, a malvidina, a pelargonidina, a peonidina e a petunidina (Vizzoto, 2012), por serem as mais presentes em todas as frutas. Já entre os açúcares que se ligam a elas, destacam-se a glicose, a xilose, a arabinose, a ramnose e a galactose.

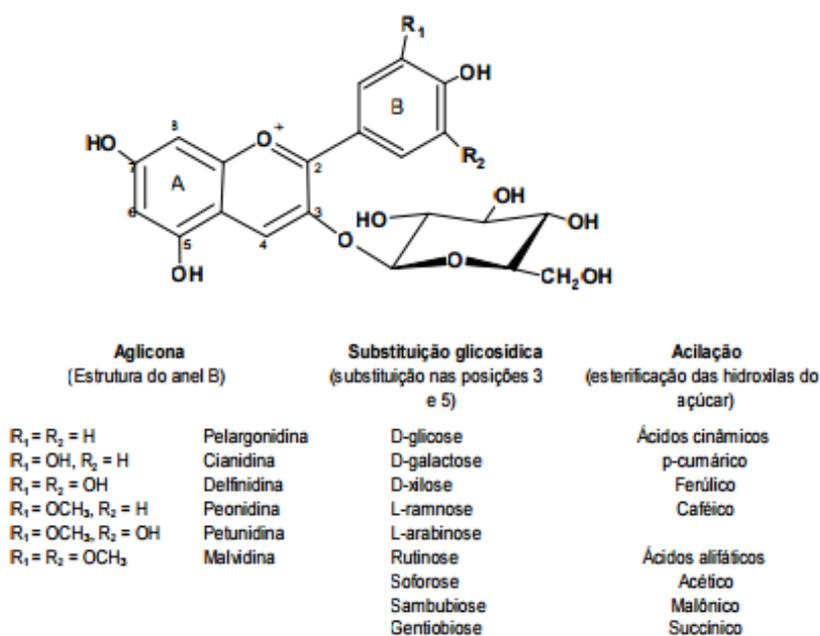


Figura 2.4: Estruturas químicas das antocianinas.

Fonte: Malacrida, Mota (2006).

Na framboesa, as antocianinas mais abundantes são as Antocianinas cianidina 3-O glucosídeo e cianidina 3-O soforosídeo (Mullen *et al.*, 2002).

2.2.1.1.1 Estabilidade das antocianinas

Uma limitação no uso das antocianinas na indústria é devido a sua estabilidade, que pode ser afetada por propriedades intrínsecas do processo, como temperatura, presença de enzimas, pH, luz, oxigênio e íons metálicos (Rein, 2005). A seguir são apresentados maiores detalhes dos fatores que podem influenciar a estabilidade das antocianinas.

a) pH

O pH é o principal fator que influencia na estabilidade das antocianinas. Segundo Markakis (1982), as antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras ou alcalinas. Brouillard e Dubois (1977) mostraram em seus estudos que existem quatro diferentes estruturas de antocianinas em equilíbrio. O cátion flavílio (coloração vermelha), a base quinoidal (coloração azul), a pseudo base carbinol (incolor) e a

chalcona (levemente amarelada). A quantidade de cada uma dessas formas é decorrente do pH do meio (Iacobucci e Sweeny, 1983).

Em condições muito ácidas (pH inferior a 2), as antocianinas existem na forma de cátion flavílio. Elevando-se o pH ocorre a formação das formas quinoidais, ocorrendo em paralelo a hidratação do cátion flavílio, formando-se o carbinol que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona incolor. Todas essas formas podem ser vistas na Figura 2.5.

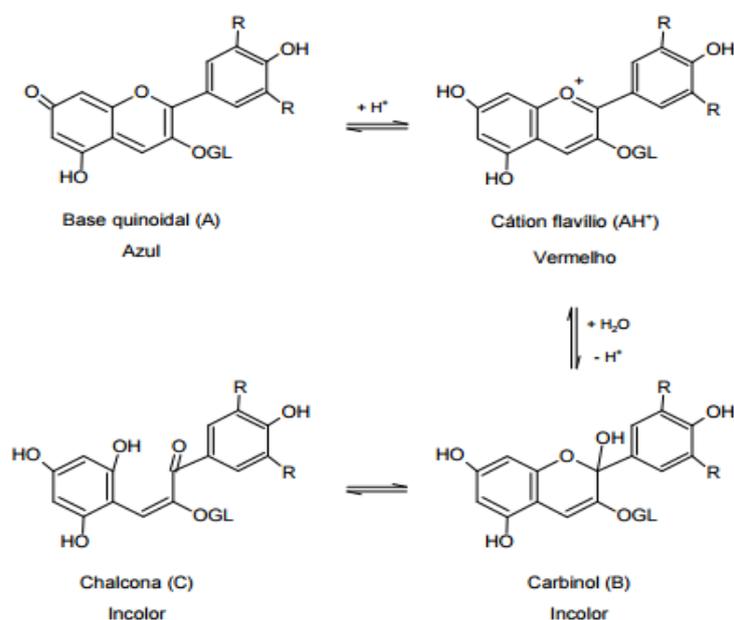


Figura 2.5: Formas estruturais de antocianinas em equilíbrio em solução aquosa.

Fonte: Francis (1989)

Estudos realizados por Bordignon *et al.* (2009) mostram que a concentração das antocianinas extraídas do suco de morango é fortemente afetada pelo pH do meio. Segundo os autores, a extração de antocianinas é mais eficiente em meio ácido, devido à formação do cátion flavílio, que acentua as características espectroscópicas das antocianinas, gerando uma melhor representação do conteúdo dos frutos frescos. Os melhores resultados foram em pH 1, onde os valores das concentrações de antocianinas foram quase dez vezes maiores do que os obtidos em pH 4,5.

b) Oxigênio

O oxigênio é considerado o segundo fator em ordem de importância na degradação de antocianinas. Isso foi constatado por Daravingas e Cain (1968), após estudos da degradação do pigmento do suco de framboesa. Em todos os experimentos realizados, a estabilidade das antocianinas aumentou quando o nitrogênio foi usado em substituição ao oxigênio.

Essa degradação pode ocorrer através de dois mecanismos: a oxidação direta ou indireta dos constituintes do meio que reagem com as antocianinas. Precipitados e desenvolvimento de turbidez em sucos de frutas podem ser resultado da oxidação direta da base carbinol de antocianinas (Jackman e Smith, 1992).

A oxidação indireta, mais comumente relatada, ocorre em produtos que contém ácido ascórbico. Na oxidação do ácido ascórbico, em presença de íons cobre, ocorre a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que causa a descoloração das antocianinas. Além disso, a degradação das antocianinas também pode ocorrer pela reação de condensação entre o ácido ascórbico e as antocianinas, que forma produtos instáveis que se degradam em compostos incolores (Markakis e Pericles, 1982).

c) Luz

A luz, ultravioleta ou visível, é outro fator que influencia na estabilidade das antocianinas. Experimentos realizados por Palamidis e Markakis (1975) com bebidas carbonatadas coloridas com antocianinas extraídas da polpa da uva, comprovaram que a presença de luz acelera a destruição das antocianinas. Com as mesmas condições de temperatura, o tempo de meia-vida das antocianinas diminuiu de 416 dias, quando no escuro, para 197 dias quando expostas à luz ambiente.

Segundo Dirby *et al.* (2001) e Carlsen e Stapelfeldt (1997), o efeito da luz está estreitamente ligado ao efeito do pH. Eles realizaram experimentos determinando a quantidade aparente de foto-branqueamento de antocianinas oriundas do repolho roxo e do fruto do sabugueiro, respectivamente. Sendo observada a baixa sensibilidade à foto-degradação para valores de pH 3,0 a 3,8.

d) Temperatura

A temperatura é um fator muito importante no que diz respeito à estabilidade das antocianinas. Na medida em que as antocianinas são submetidas a uma temperatura superior a ambiente ($25^{\circ}C$), começa a ocorrer a degradação da mesma (Havlikovae e Mikova 1985; Rhim, 2002). Com isso, o controle da temperatura desde a estocagem até os processos utilizados é de extrema importância.

Segundo Meschter (1954), reduzindo a temperatura de estocagem de $38^{\circ}C$ para $20^{\circ}C$, o tempo de meia-vida das antocianinas aumentou de 10 para 54 dias, chegando, por extrapolação, a um tempo de meia-vida de 11 meses a $0^{\circ}C$. Já para tratamentos térmicos, baixos tempos em alta temperatura são recomendados para menor degradação. Experimentos realizados por Markakis e Pericles (1982) mostraram que para sucos de frutas vermelhas, a perda de antocianinas foi insignificante para tratamentos térmicos com duração inferior a 12 minutos a $100^{\circ}C$.

Apesar de o mecanismo da degradação térmica das antocianinas ainda não ser conhecido, experimentos realizados por Sapers *et al.* (1981) mostram que a estabilidade das antocianinas frente à temperatura é influenciada pelo grau de acilação. Bridle & Timberlake (1997) e Chigurupati *et al.* (2002) confirmaram que a ocorrência extensiva de acilação confere aos vegetais características superiores na estabilidade e na cor.

e) Enzimas

As enzimas também são responsáveis pela degradação das antocianinas. São exemplos de enzimas que podem alterar a estrutura química das antocianinas, as glicosidases, polifenol oxidases, fenolases e peroxidases. As primeiras, também conhecidas por antocianases, hidrolizam as ligações glicosídicas com a liberação do açúcar e da aglicona.

Como essa é instável, acaba se degradando e formando a chalcona incolor. As enzimas polifenol oxidases, por sua vez, atuam por outro mecanismo: oxidam as antocianinas usando o-dihidroxifenóis como substrato formando o-quinonas. Essas reagem entre si ou com outros compostos, inclusive antocianinas, e formam polímeros escuros. As fenolases também reagem com as antocianinas, sendo essa reação favorecida quando outros fenólicos estão presentes no meio (Francis, 1989).

As peroxidases também são responsáveis pelo escurecimento enzimático, decorrente da oxidação dos compostos quando há a presença de peróxido de hidrogênio no meio (Malacrida e Motta, 2006); é também devido à presença dessas enzimas que é necessário a aplicação de tratamento térmico nos alimentos, para que ocorra a inativação delas e as propriedades dos alimentos sejam mantidas.

2.3 Aspectos microbiológicos

A capacidade de sobrevivência de micro-organismos nos alimentos está ligada a uma série de fatores; esses fatores podem ser intrínsecos (características do alimento) ou extrínsecos (características do meio).

Entre os fatores extrínsecos podem-se citar a temperatura e a umidade relativa do ambiente como os que mais afetam no desenvolvimento dos micro-organismos. Em relação à temperatura, a velocidade específica de crescimento dos micro-organismos vai diminuído à medida em que a temperatura se afasta da ótima (em torno de 30°C) até que atinja um valor onde o crescimento cesse e ocorra a morte das células. Essa temperatura varia de acordo com o micro-organismo. A umidade relativa, por sua vez, influencia diretamente a atividade de água (a_w) do alimento. Estocando um alimento de baixa atividade de água em ambiente com alta umidade relativa, a a_w do alimento irá aumentar, podendo ocorrer deterioração do mesmo. Assim, o binômio UR/temperatura deve ser controlado e, geralmente, quanto mais baixa a temperatura de estocagem, menor deverá ser UR (Qualidade microbiológica dos alimentos, 2016).

Considerados alimentos com alta atividade de água ($a_w > 0,90$) e alta acidez ($\text{pH} < 4,0$) os sucos naturais são passíveis de contaminação por diversos tipos de organismos. Esses dois fatores são intrínsecos e de extrema importância para determinar os tipos de micro-organismos que podem se desenvolver no alimento. O pH muito ácido, como o do suco de framboesa, limita o crescimento de micro-organismos basicamente a mesófilos aeróbios, bolores e leveduras (Qualidade microbiológica dos alimentos, 2016). De acordo com a ICMSF (1984) esses são os principais micro-organismos que servem de indicadores para monitorar a qualidade de processos industriais.

Os bolores são fungos filamentosos, multicelulares, podendo estar presentes no solo, água, ar e matéria orgânica em decomposição; eles possuem uma boa capacidade de adaptação ao meio, crescendo sob condições extremamente variáveis de pH (2,0 a 9,0) e resistindo bem à desidratação. Eles também são pouco exigentes quanto aos nutrientes disponíveis necessitando basicamente da presença de oxigênio para seu crescimento. A presença de bolores está, na maioria das vezes, associada ao crescimento visível de colônias na superfície e em alguns casos na elaboração de microtoxinas, o que torna importante o controle da proliferação dos bolores nos alimentos (Barbosa, 2012)

As leveduras são fungos não filamentosos, normalmente disseminados por insetos ou pelo vento (Siqueira, 1995). No entanto, é interessante observar que uma mesma levedura pode ser benéfica ou maléfica, dependendo do tipo de alimento. Um exemplo são as leveduras do gênero *Saccharomyces*, utilizadas nos processos tecnológicos de produção de etanol, cerveja e vinho e que, ao mesmo tempo, é uma das principais agentes deteriorantes em suco de frutas (Barbosa, 2012).

Os organismos mesófilos aeróbios são bactérias que podem estar presentes tanto na forma vegetativa quanto esporulada (Hayes, 1995; Siqueira, 1995). Esses organismos se desenvolvem melhor em condições de temperatura moderada, entre 15 e 40°C, sendo a temperatura ótima a de 32°C. O número desses organismos presentes nos sucos serve como indicador de qualidade do suco, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle de temperatura do processo estão adequados (Silva, 2002)

Outro fator que determina o desenvolvimento microbiano é a atividade de água. A atividade de água (a_w) é um fator importante porque o crescimento e o metabolismo microbiano exige a presença de água livre para realização de suas reações, e é a atividade de água que indica a disponibilidade da água para esse fim. Sendo 1 o valor de a_w para água pura, o valor de a_w para alimentos varia de 0 a 1. Grande parte dos micro-organismos patogênicos encontra-se controlados com a_w inferior a 0,85, sendo a produção de toxinas inibidas com a_w inferiores a 0,9 (Garcia, 2004).

Sendo assim, fica claro que os sucos são alimentos que favorecem o crescimento de micro-organismos. Segundo a Portaria nº 451, de 19 de Setembro de 1997, do Ministério da Saúde, os padrões microbiológicos para sucos concentrados congelados, sucos e refrescos *in natura*, preparado para refrescos e refrigerantes, sucos concentrados adicionados ou não de conservantes, polpas e produtos de frutas devem possuir valores máximos de bolores e leveduras entre 10^3 e 10^4 UFC mL⁻¹. Já de acordo com a Portaria nº 451 e a RDC nº 12 não se estabelecem padrões microbiológicos para produtos à base de frutas em relação à contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios.

2.4 Tratamento térmico

Na indústria alimentícia, o tratamento térmico é uma etapa muito importante para preservação dos alimentos. O principal objetivo desse processo é a eliminação de micro-organismos e enzimas que podem ser perigosos para a saúde humana e também podem degradar os alimentos, diminuindo sua qualidade e tempo de prateleira.

O tratamento térmico possui três etapas: o aquecimento, o tempo de exposição e o resfriamento. O principal parâmetro que deve ser controlado é a temperatura durante o período de exposição. O ideal é que essas etapas ocorram o mais rapidamente possível, para que os danos aos alimentos sejam mínimos (Días *et al.*, 2007)

A temperatura e o tempo de exposição irão depender de vários fatores, sendo os principais a resistência térmica dos micro-organismos e enzimas presentes no alimento, o teor microbiano inicial contido no alimento antes do tratamento, o pH e o estado físico do alimento.

Apesar de ser um método muito eficiente na eliminação dos micro-organismos e enzimas, o tratamento térmico possui como desvantagens alterações desagradáveis no alimento. Dentre essas alterações indesejáveis, pode-se destacar a perda de nutrientes

importantes, além de alterar negativamente as características organolépticas do alimento como cor, textura e aroma.

Assim, dependendo do produto a ser tratado, existem diversos binômios tempo-temperatura que podem ser usados. Para sucos de frutas, por exemplo, existem três principais binômios: 65°C por 30 min, 77°C por 1 min e 88°C por 15s.

Existem basicamente duas formas de tratamentos térmicos dos alimentos, o processo LTLT (*Low Temperature Long Time*) e o processo HTST (*High Temperature Short Time*). O primeiro normalmente ocorre em equipamentos bateladas, em sistemas de produção menores e pode ser realizado, por exemplo, utilizando temperaturas entre 62 e 68 °C durante 30 min. Já o segundo é realizado em trocadores de calor, em sistemas contínuos e em escalas maiores, em uma faixa de temperatura de 72 a 85 °C durante 15 a 20 s.

Conforme mencionado, ao realizar o tratamento térmico em alimentos não se busca apenas a eliminação dos micro-organismos para o aumento da vida de prateleira, mas também outros aspectos de qualidade dos alimentos. Nesse contexto, novas tecnologias de processos não térmicos têm sido alvos de pesquisas para avaliar o potencial desses processamentos como métodos alternativos ao tratamento térmico convencional, eliminando ou minimizando a degradação de nutrientes o que aumenta os benefícios dos alimentos (Aronsson *et al.*, 2005). Dentre essas tecnologias pode-se destacar os processos de campo elétrico moderado e ultrassom que serão abordados em maiores detalhes a seguir.

2.5 Campo elétrico moderado (CEM)

A tecnologia do campo elétrico moderado não é nova e foi muito utilizada durante o século XX, sendo seu uso deixado de lado devido ao efeito de corrosão dos eletrodos. No entanto, no fim do século passado, com a descoberta de materiais mais resistentes à corrosão, essa tecnologia foi redescoberta e virou assunto de pesquisa de muitos trabalhos. O processo de CEM possui uma vasta gama de aplicações na indústria de alimentos podendo ser usada, por exemplo, no tratamento de alimentos sólidos, alimentos líquidos e misturas de alimentos sólido-líquidos (Stancil e Zitny, 2010).

O processo de CEM pode ser definido como a passagem de corrente elétrica alternada através do alimento, com forma de onda arbitrável e intensidade de campo elétrico que pode variar de 1 a 1000 V cm⁻¹, com ou sem os efeitos do aquecimento ôhmico (Sensoy e Sastry, 2004).

Quando se deseja aquecer o alimento, o processo será denominado de aquecimento ôhmico e a geração de energia é proporcional ao quadrado da intensidade do campo elétrico local e inversamente proporcional à condutividade elétrica (Mercali, 2013). O princípio básico que governa a geração de calor é dado pela Equação 2.1, onde Q é a quantidade de calor ou energia gerada (J.s⁻¹); I é a intensidade da corrente elétrica que passa através da amostra (A); e R é a resistência elétrica da amostra (Ω).

$$Q = I^2 \times R \quad (2.1)$$

Quando os efeitos do calor não estão associados ao processo, essa tecnologia é denominada campo elétrico moderado e os efeitos resultantes da passagem de corrente elétrica pelo alimento são os chamados efeitos não térmicos; esses efeitos podem promover a permeabilização das membranas das células (Eugene Vorobiev, 2008; Somavat, Mohamed e Sastry, 2013).

A permeabilização ou eletroporação consiste na formação de poros na membrana celular; com a passagem de corrente elétrica, a célula exposta ao campo elétrico sofre desestabilização da bicamada lipídica e das proteínas da membrana celular, levando à formação de poros e por consequência, a danificação parcial ou total da estrutura celular. A permeabilização das células será parcial quando a formação dos poros for reversível, e isso ocorre quando a diferença de potencial fica abaixo do potencial de colapso; assim, os poros só existem enquanto o campo elétrico é aplicado. A danificação será total quando a diferença de potencial atingir valores acima do potencial de colapso, assim a formação dos poros será irreversível (Knorr *et al.*, 1994). Os valores de potencial de colapso são dependentes de cada célula e variam de acordo com o material submetido ao campo elétrico (Eugène Vorobiev, 2008).

O processo de eletroporação consiste em três diferentes fases. A primeira delas consiste na formação dos poros, que é uma resposta das membranas celulares ao potencial induzido. Esse processo dura microssegundos e o potencial deve superar o potencial de colapso. A segunda fase é a de expansão dos poros e depende da intensidade e tempo de exposição ao campo. A última fase consiste na recuperação da membrana, que começa após o término da exposição do alimento ao campo elétrico e dura por vários minutos. Essa fase é fortemente afetada pela temperatura (Eugène Vorobiev, 2008).

Existem diversos fatores que influenciam a eletroporação, dentre eles os mais importantes são as características do campo elétrico aplicado e as propriedades das células a serem expostas a essa tecnologia. Entre as propriedades do campo elétrico que devem ser controladas estão a intensidade, a amplitude, a duração e a frequência de repetição de pulsos, para o caso de aplicação de campo elétrico pulsado.

Sabe-se que a inativação dos micro-organismos devido ao uso do campo elétrico ocorre devido a mudanças na estrutura da membrana citoplasmática (Ramos *et al.*, 2006). Aronsson *et al.* (2005) realizaram tratamento com campo elétrico pulsado em *Escherichia coli*, *Listeria innocua* e *Saccharomyces cerevisiae* e verificaram a formação de poros nas células dos micro-organismos pelo aumento da captação do corante fluorescente iodeto de propídeo pela liberação de compostos intracelulares.

Além das características de cada material biológico a ser tratado, os fatores do meio como pH, condutividade térmica, compostos iônicos e atividade de água também influenciam a eletroporação. A condutividade elétrica, por exemplo, é inversamente proporcional à taxa de destruição, ou seja, quanto menor a condutividade elétrica maior é a taxa de destruição de micro-organismos devido ao aumento no fluxo de substâncias iônicas através da membrana. A atividade de água é outro fator importante na inativação, e quanto menor a atividade de água maior será a resistência microbiana. Por último, tem-se o pH que atua como fator de estresse adicional (Garcia *et al.*, 2007).

Estudando o efeito do pH na inativação de micro-organismos na presença de campo elétrico, Garcia *et al.* (2005) relataram que *L. monocytogenes* foi sensível ao tratamento por campos elétricos pulsados em pH 4,0 e apresentou maior resistência em pH 7,0. Já

a *E. coli* e a *Salmonella senftenberg* foram sensíveis ao tratamento em pH 7,0 e resistente em pH 4,0.

Além das características de cada espécie já citadas, a morfologia, a concentração e a fase de crescimento também influenciam nos efeitos que a aplicação de campo elétrico exercerá sobre cada micro-organismo. As bactérias gram-positivas, por exemplo, são mais resistentes ao tratamento por pulso elétrico do que as gram-negativas, já que as do primeiro tipo apresentam parede celular. Outro exemplo são os fungos, que devido ao maior tamanho das células, normalmente são mais sensíveis à aplicação de campo elétrico do que bactérias. Por fim, pode-se citar as células nas fases logarítmicas de crescimento, que são mais sensíveis aos tratamentos do que aquelas na fase *lag* ou estacionária (Azerêdo *et al.*, 2008)

Em relação aos efeitos do campo elétrico em micronutrientes, como compostos bioativos e vitaminas, muitos estudos têm relatado vantagens da aplicação do CEM para a conservação desses. Não se sabe ao certo o efeito dessa tecnologia sobre os componentes dos alimentos, porém muitos estudos relatam a manutenção das características nutricionais dos produtos tratados com campo elétrico moderado. Bazhal *et al.* (2001,) tratando suco de laranja com pulsos elétricos, verificaram retenção de todas suas propriedades físicas e cerca de 97,5% de retenção da vitamina C. Agcam, Akyildiz e Evrendilek (2014) também estudaram a influência do campo elétrico pulsado sobre os micronutrientes do suco de laranja e verificaram que a retenção de compostos fenólicos foi maior de que quando o produto foi tratado com a metodologia tradicional de pasteurização.

Outra vantagem do CEM é que provoca praticamente nenhuma alteração nas características físico-químicas dos alimentos. Cserhalmi *et al.* (2006) realizaram o tratamento de suco de frutas cítricas (limão, laranja, tangerina) e não verificaram nenhuma diferença significativa no pH, °Brix, condutividade elétrica, viscosidade, índice de escurecimento não enzimático e hidroximetil-furfural se comparado ao tratamento térmico convencional.

2.6 Ultrassom (US)

Apesar de existirem pesquisas sobre a tecnologia do US na indústria química desde o início do século XX, somente na metade do mesmo século é que cogitou-se utilizar essa tecnologia em alimentos (Alves *et al.*, 2013). Atualmente, as pesquisas buscam utilizar o US tanto na substituição de algumas técnicas tradicionais de processamento como emulsificação, homogeneização, esterilização e pasteurização, quanto para aperfeiçoar técnicas convencionais de extração, congelamento, descongelamento, filtração, secagem ou desidratação (Mason, 1998; Chemat *et al.*, 2011).

Existem basicamente dois tipos de ondas ultrassônicas, dependendo da frequência e intensidade. As primeiras possuem alta frequência e baixa intensidade (20 a 100 Hz e $< 1 \text{ W cm}^{-2}$ respectivamente), caracterizando o US de baixa energia, que não possui poder destrutivo aos alimentos e por isso pode ser utilizado em técnicas analíticas para promover informações sobre propriedades físico-químicas, composição, estrutura e estado físico de alimentos. Já as ondas de baixa frequência e alta intensidade (2 a 20 Hz e 10 a 1000 W cm^{-2} , respectivamente) também podem ser utilizadas na indústria de alimentos. Esse tipo de onda é mais utilizada em casos onde se deseja certas

modificações, já que essas possuem energia suficiente para romper ligações intermoleculares, capazes de modificar algumas propriedades físicas e favorecer reações químicas (Alves *et al.*, 2013).

Uma das vantagens do US é que essa tecnologia pode ser utilizada em líquidos, líquidos com sólidos em suspensão ou semissólidos. Em líquidos, o princípio físico do ultrassom baseia-se no fenômeno da cavitação: quando o ultrassom é aplicado, ocorre a alternância de compressão (pressão positiva) e expansão (pressão negativa) das ondas. Assim, ocorre o crescimento e colapso de bolhas dentro do líquido (Mason, 1990), e essas bolhas se expandem durante a pressão negativa e implodem violentamente durante a pressão positiva, promovendo ondas com elevadas energias de cisalhamento e turbulência (Suslick, 1988).

Existem dois tipos de equipamentos utilizados na formação de ondas ultrassônicas, o banho ultrassônico e a sonda. No presente trabalho utilizou-se o equipamento do tipo sonda e, portanto, serão abordados em maiores detalhes o funcionamento desse tipo de equipamento.

O equipamento do tipo sonda é utilizado quando se deseja alcançar altas intensidades de potência. Nesse equipamento a energia ultrassônica é produzida em um transdutor e transmitida ao meio através de uma sonda metálica. A Figura 2.6 apresenta um esquema do equipamento de ultrassom do tipo sonda.

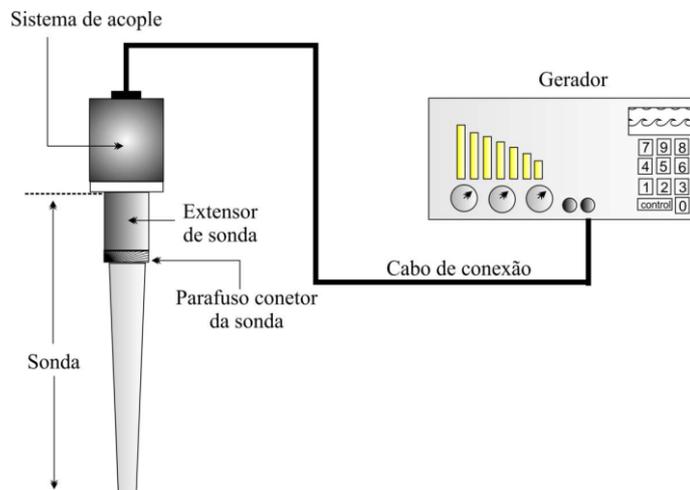


Figura 2.6: Sistema de sonda para aplicação de ultrassom (Lingyu Yu; Giurgutiu, 2009).

O sistema é composto por um gerador que produz um sinal elétrico na frequência e potência desejada, um transdutor piezoelétrico que transforma a energia elétrica em acústica e uma sonda que transmite esta energia acústica ao meio. A intensidade da onda emitida, que é proporcional a amplitude de vibração da ponta da sonda, é controlada alterando a potência aplicada pelo gerador. Como praticamente todos os equipamentos dispõem de um controle de potência deste tipo, é possível a aplicação do sinal em forma de pulsos (Pinjari e Pandit, 2010).

Os benefícios do ultrassom são inúmeros na indústria alimentícia. Knorr *et al.* (2004) estudaram a melhoria no processamento de alimentos utilizando essa tecnologia diretamente no alimento, melhorando a extração de componentes importantes com proteínas e compostos oxidantes, e verificando a inativação de enzimas e micro-

organismos. Outros autores, como por exemplo, Chandrapala *et al.* (2012b), também avaliaram a inativação de micro-organismos e enzimas através do ultrassom, verificando que esse método poderia substituir o tratamento térmico que geralmente é aplicado sobre os alimentos para esse fim.

3 Materiais e métodos

Neste capítulo são apresentadas as metodologias empregadas para realização dos experimentos de pasteurização, bem como os métodos analíticos utilizados.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), localizado no Anexo 1 do Campus Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As análises microbiológicas foram realizadas no ICTA (instituto de ciência e tecnologia de alimentos) localizado no campus do Vale, na UFRGS.

3.1 Preparação do suco

As framboesas foram adquiridas congeladas, em embalagens de 1 kg, da empresa Italbraz (Vacaria, RS). Após o recebimento, as embalagens foram mantidas congeladas até o dia do preparo do suco, quando foram descongeladas em temperatura ambiente.

Depois de descongeladas, as framboesas foram processadas em um Juicer (Phillips Walita, modelo RI1870, EUA) para a separação do suco e do bagaço. Mesmo após processado no equipamento, o bagaço ainda continha uma grande quantidade de suco, por isso optou-se por extrair mais suco utilizando sacos de tecidos sintéticos.

O suco foi armazenado em sacos plásticos e congelado a -8°C até o momento da realização dos experimentos. Assim, no momento dos experimentos, o saco plástico contendo o suco foi retirado do freezer e mantido em banho de água à temperatura ambiente para o descongelamento.

A fim de avaliar a pasteurização do suco de framboesa, experimentos de tratamento térmico convencional e na presença das tecnologias de ultrassom e campo elétrico moderado foram realizados. Previamente à realização dos experimentos, coletou-se 140 mL do suco *in natura* utilizado no experimento para posterior comparação dos resultados. Após o término dos experimentos, as alíquotas foram armazenadas a 4°C em sacos plásticos em geladeira até o início das análises. A seguir são descritos, em maiores detalhes, a metodologia utilizada para cada um dos tratamentos.

3.2 Pasteurização do suco de framboesa

3.2.1 Tratamento térmico convencional

O tratamento térmico convencional foi realizado em triplicata na temperatura de 90°C . Em cada tratamento 140 mL de suco de framboesa foram colocados em uma célula de vidro encamisada com 5,5 cm de diâmetro interno. A temperatura do suco foi controlada com a ajuda de um banho termostático e a agitação foi realizada com um agitador magnético (Fisatom, modelo 752A, São Paulo, Brasil) com rotação de 780 rpm. A duração de cada tratamento foi de 10 min após a estabilização da temperatura no valor desejado (aproximadamente 5 min para alcançar os 90°C).

3.2.2 *Pasteurização assistida pela tecnologia de ultrassom*

Os experimentos com o ultrassom foram realizados no equipamento Sonics & Materials, Inc., modelo VC750, Newtown, Estados Unidos. Esse equipamento possui uma sonda com 1,2 cm de diâmetro e opera até uma potência máxima de 625 W cm^{-2} e frequência máxima de 20 kHz.

Para esses tratamentos, as amostras do suco de framboesa foram colocadas na mesma célula de vidro encamisada que foi descrita previamente. Após a inserção das amostras de suco de framboesa na célula, a sonda do ultrassom era imersa na amostra. A seguir, iniciava-se o tratamento com o ultrassom, permanecendo a amostra por 10 min sob o efeito da tecnologia. Foram realizados experimentos utilizando as potências de 423 W cm^{-2} e 508 W cm^{-2} (75 % e 90 % da capacidade de potência do equipamento, respectivamente). Durante a aplicação do ultrassom, conectou-se a célula de pasteurização a um banho termostático, mantendo a temperatura da amostra abaixo de 35 °C. Isso foi necessário para eliminação do efeito da temperatura na pasteurização do suco e fossem analisados somente os efeitos do ultrassom nas amostras de suco.

Além desse cuidado, para garantir que os efeitos observados fossem devidos apenas ao ultrassom, também foram realizados experimentos controle para cada intensidade de potência testada. Nesses experimentos, a amostra foi submetida à máxima temperatura atingida pelo suco quando submetida ao ultrassom (25°C para 75% da potência e 35°C para 90% da potência) sendo que, neste caso, o ultrassom manteve-se desligado e a célula teve sua temperatura controlada apenas pelo banho termostático.

3.2.3 *Pasteurização assistida por campo elétrico moderado*

Para realização dos experimentos de campo elétrico moderado utilizou-se um sistema composto pela célula de pasteurização, uma fonte de energia, um sistema de aquisição de dados, um transdutor de corrente, um transdutor de tensão e um termopar. A fonte de energia era composta por um estabilizador (Forceline, modelo EV 1000 T/2-2 Brasil), um variador de tensão de 0 V a 220 V (Sociedade técnica paulista LTDA, modelo Varivolt, Brasil) e um disjuntor (Siemens, Brasil).

Os experimentos foram realizados em duas tensões diferentes, 25 e 50 V e a temperatura dos experimentos foi mantida abaixo de 30 °C para avaliar somente os efeitos não térmicos da tecnologia de campo elétrico moderado. Para tanto, 140 mL de suco de framboesa foram acondicionados na célula de pasteurização, conectada a um banho termostático, de maneira similar ao já descrito para os experimentos de ultrassom. Quando a temperatura da amostra atingiu 6 °C, iniciou-se a passagem de corrente elétrica pela amostra por 10 min.

Os experimentos controle foram realizados de maneira similar ao realizado nos experimentos do ultrassom; nesses experimentos, as amostras foram submetidas à máxima temperatura alcançada durante o tratamento com campo elétrico moderado (30°C para o 50 V), sendo que, nesse caso, o campo elétrico manteve-se desligado e o controle da temperatura na célula foi realizado pela conexão da camisa da célula de pasteurização com um banho termostático.

3.3 Análises do suco pasteurizado

3.3.1 Compostos bioativos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu adaptado da metodologia de Weterhouse (2002) e utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoli-ácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente acaba por oxidar os fenolatos, reduzindo os ácidos e formando um complexo azul que possui máxima absorção em 765 nm.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada relacionando as concentrações dos fenólicos com diferentes absorbâncias do ácido gálico através da equação 3.1, que foi construída através de curva analítica com padrão de ácido gálico (Sigma Aldrich, USA, em anexo), onde A_{765} é a absorbância da amostra medida em 765nm.

$$\text{Concentração fenólicos} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A_{765} - 0,0555)}{0,012} \quad (3.1)$$

Previamente à realização das análises, foram realizados testes para que se chegasse aos valores de diluições adequados, visto que os valores de absorbância deveriam estar dentro dos da curva padrão de ácido gálico (entre 0 e 1). Desse modo, a concentração de compostos bioativos foi expressa em μg de ácido gálico por mL de amostra.

Primeiramente 35 μL da amostra foram diluídos em 1 mL de água ultrapura, seguido de agitação. Após, 850 μL de água ultrapura foram transferidos para tubos Falcon, seguidos de 200 μL da amostra previamente diluída (35 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e 100 μL de Folin-Ciocalteu (marca Fator 1). Após a adição desses reagentes, as amostras foram agitadas em vórtex, sendo adicionados posteriormente, 850 μL de carbonato de sódio 7%. Por último, deixou-se a solução repousar no escuro por 1 hora e à temperatura ambiente para, por fim, realizar a leitura de absorbância no comprimento de onda de 765 nm.

3.4 Determinação de antocianinas monoméricas totais

Para determinação de antocianinas manoméricas o método utilizado foi o do pH diferencial, proposto por Lee *et al.* (2005). Para realização dessas análises as amostras foram diluídas em duas soluções com diferentes pHs. A primeira, de pH 1 (0,025 M de cloreto de potássio) e a segunda pH 4,5 (0,4 M de acetato de sódio). Nessa análise, também foi necessário realizar testes de fator de diluição, para que os valores das absorbâncias ficassem entre 0,2 e 0,8 no comprimento de onda de 520 nm, que é o de máxima absorção das antocianinas. Para tanto, 50 μL de amostra e 1950 μL de solução tampão foram utilizadas, visto que o volume reacional precisava ser de 2000 μL . Após a adição desses dois volumes as soluções foram agitadas em vórtex e, posteriormente, mantidas em repouso no escuro e em temperatura ambiente por 10 minutos.

Após esse tempo, a absorbância das amostras foi determinada, utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (PG Instruments Ltda., T80 UV/VIS Spectrometer, Reino

Unido) em 520 nm (máxima absorção das antocianinas) e 700 nm (nenhuma absorbância da amostra ocorre).

Para determinação da absorbância diluída utilizou-se a Equação 3.2, onde A_{520} é a absorvância em 520nm (comprimento de onda de máxima absorção da antocianina cianidina-3-glucosídeo) e A_{700} é o comprimento de onda onde as antocianinas não absorvem. Essa ultima medida tem por objetivo corrigir erros ocorridos devido a materiais coloidais suspensos na amostra e que acarretam em difusão e turbidez, aumentando o erro da análise.

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH 1} - (A_{520} - A_{700})_{pH 4,5} \quad (3.2)$$

A concentração de antocianinas monoméricas é expressa em mg/L da antocianina cianidina-3-glucosídeo e calculada pela seguinte equação:

$$Antocianinas\left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{A \times MM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (3.3)$$

onde A foi calculada anteriormente pela Equação 3.2, MM é a massa molar da cianidina-3-glucosídeo ($449,2 \text{ g mol}^{-1}$), FD é o fator de diluição predeterminado e ϵ é a absorvidade molar da mesma antocianina ($26.900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.5 Cor polimérica

A análise de cor polimérica baseia-se nos métodos propostos por Wrolstad (1976), o qual descreveu processos para determinar a densidade de cor, a cor decorrente de antocianinas poliméricas e a porcentagem de contribuição de antocianinas poliméricas para a cor.

Para que os valores das absorbâncias para 520nm se mantivessem dentro dos valores de 0,2 e 0,8 foi mantido o mesmo fator de diluição das análises de antocianinas monoméricas totais. Primeiramente as amostras foram diluídas em duas soluções diferentes, sendo a primeira com água ultrapura e metabissulfito de potássio, e a segunda somente com água ultrapura.

Para as soluções com metabissulfito, foi previamente preparada outra solução contendo apenas 5 g de metabissulfito diluído em 10 mL de água destilada. Após o preparo dessa, foram adicionados aos tubos falcons os volumes de 70 μL de amostra, 2730 μL de água ultrapura e 200 μL de da solução de metabissulfito de potássio. Já para o preparo das outras soluções foram utilizados os valores de 70 μL de amostra e 2930 μL de água ultrapura, para que os volumes de ambas ficassem iguais.

As soluções foram agitadas em vórtex e a absorbância das amostras foi determinada, utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (PG Instruments Ltd, T80 UV/VIS Spectrometer, Reino Unido) em 420 nm (absorve os produtos de escurecimentos, provenientes da degradação das antocianinas), 520nm (máxima absorção das antocianinas), 700 nm (nenhuma absorbância da amostra ocorre). Essa última medida serve apenas para descontar a influência de outros materiais suspensos que poderiam interferir.

Realizadas as leituras, primeiramente foi determinada a densidade de cor pela soma das absorbâncias da amostra a 420 e 520 nm. Assim, avalia-se a contribuição das

antocianinas e também de seus produtos de degradação para a cor. Para determinação da densidade de cor foi utilizada a Equação 3.4.

$$\text{Densidade de cor} = (420 \text{ nm} - 720 \text{ nm})_{\text{água}} + (520 \text{ nm} - 720 \text{ nm})_{\text{água}} \times FD \quad (3.4)$$

Posteriormente, a cor polimérica foi calculada e corresponde à contribuição das antocianinas poliméricas e dos pigmentos marrons provenientes de escurecimento enzimático, reação de Maillard e degradação de antocianinas. Essa medida baseia-se no fato de que os pigmentos polimerizados são resistentes ao branqueamento com bissulfito. Desta forma, após a adição de bissulfito de potássio, a soma das absorvâncias nos comprimentos de onda de 420 e 520 nm corresponde à cor polimérica (Wrolstad, 1976).

Assim, a cor polimérica é determinada através da Equação 3.5:

$$\text{Cor polimérica} = (420 \text{ nm} - 720 \text{ nm})_{\text{água}} \text{bissulfito} + (520 \text{ nm} - 720 \text{ nm})_{\text{bissulfito}} \quad (3.5)$$

E por fim, determinamos a percentagem de cor polimérica através da Equação 3.6.

$$\text{Cor polimérica (\%)} = \frac{\text{Cor polimérica}}{\text{Densidade da cor}} \quad (3.6)$$

3.6 Análise de cor

A análise de cor das amostras de suco de framboesa foi determinada no sistema CIELAB utilizando um colorímetro (Color QUEST XE, Hunterlab, USA), com uma lente de luz D45 em um ângulo de observação de 10° e no modo de refletância especular incluída por leitura de amostra. Foram determinados o parâmetro L^* , que representa a luminosidade ($L^* = 0$ é preto e $L^* = 100$ claridade total), a coordenada a^* indica cor variando entre verde e vermelho e a coordenada b^* indica cor variando do azul ao amarelo.

A partir desses três parâmetros, podemos calcular dois importantes valores: o croma e o ângulo Hue (°hue). O primeiro, diz respeito a intensidade da cor, já o segundo representa o ângulo de localização da amostra no espaço cor (Figura 3.1).

Para calcular os valores de croma e °hue utilizamos as Equações 3.7 e 3.8.

$$\text{croma} = (a^* + b^*)^{1/2} \quad (3.7)$$

$$\text{°hue} = \arctan(b^* / a^*) \quad (3.8)$$

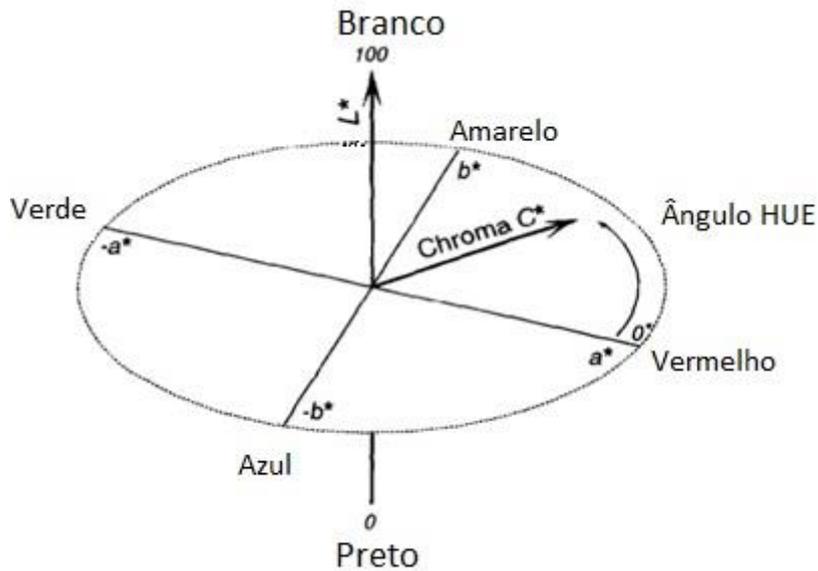


Figura 3.1: Espaço de cores, segundo a escala CIELAB.

3.7 Análises físico-químicas

3.7.1 pH

O pH das amostras foi medido em um pHmetro digital (Digimed, modelo DM-22, São Paulo). Foram medidos os pHs de todas as amostras de cada triplica para cada tecnologia utilizada, além das amostras *in natura* coletadas antes de cada experimento.

3.7.2 Acidez total titulável

Para determinar a acidez titulável, as amostras foram previamente aquecidas a 90°C e mantidas nessa temperatura por 10 min sob agitação, para que ocorresse a eliminação dos gases incorporados. Após essa etapa, foram transferidos 10 mL do suco para um erlenmeyer e completou-se com 100 mL de água destilada. Essa mistura foi então titulada com NaOH 0,1 M até o pH da amostra atingisse $8,2 \pm 0,1$.

Os resultados foram obtidos a partir da Equação 3.9 e expressos em grama de ácido cítrico por 100 mL de amostra, onde n é o volume da solução de NaOH gastos na titulação em mL, N é a normalidade da solução de NaOH, Eq é o equivalente-grama do ácido (64,02 para ácido cítrico) e V é o volume da amostra em mL.

$$ATT \left(\frac{g}{100 \text{ mL}} \right) = \frac{n \times N \times Eq}{10 \times V} \quad (3.9)$$

3.8 Análises microbiológicas

Para realização das análises microbiológicas, foram coletados 15 mL de cada amostra após cada tratamento térmico, com Ultrassom e Campo Elétrico Moderado. Também foram coletadas amostras dos sucos *in natura* e dos experimentos controle. Todas as amostras foram congeladas até os dias das análises sendo posteriormente descongeladas sob refrigeração a 4°C conforme a ISSO6887-4 (2003). Por serem os principais contaminantes de sucos, foram realizadas as análises para micro-organismos mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, sendo todas elas realizadas em duplicata. A metodologia utilizada foi descrita por Swanson, Petran e Hanlin (2001).

Inicialmente foram preparadas seis diluições seriadas de cada amostra, transferindo 1 mL da solução anterior para 9 mL de solução diluente (Água Salina Peptonada). A etapa seguinte foi à preparação do meio de cultura. Para a contagem de mesófilos totais, foi utilizado meio de cultura PCA (Plate Count Agar), com contagem a partir de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} e incubação a 37°C por 48 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹). Já para a contagem de bolores e leveduras, foi preparado meio de cultura PDA (Potato Agar Dextrose), com inoculação a partir de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} e incubação a 25°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹).

Para etapa de inoculação as placas foram divididas em seis setores diferentes, marcando seu fundo com caneta videográfica, para que cada setor recebesse uma das diluições previamente preparadas. Para a inoculação das placas, os tubos contendo as amostras diluídas foram agitados para homogeneização. Em seguida, foram depositados três gotas de 0,02 mL de cada diluição em um dos setores da placa. As placas foram mantidas em uma superfície plana até que a amostra fosse absorvida pelo meio de cultura, o que requer aproximadamente 30 minutos. Passado esse período as placas foram invertidas e incubadas até o dia da contagem.

Por fim, foi feita a contagem do número de UFC mL⁻¹ em cada placa. Para isso, conta-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por setor, e divide-se esse valor pela diluição, chegando à Equação 3.10, onde D é o valor da diluição utilizada nos cálculos.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{UFC}}{\text{setor}} (0,2 \cdot 10^D)^{-1} \quad (3.10)$$

Por fim, para chegarmos em um valor final, calculamos a média entre todas as diluições.

3.9 Análises estatísticas

Todos os experimentos de ultrassom, campo elétrico moderado e tratamento térmico foram realizados em duplicata e as análises foram realizados em triplicada. Para avaliação dos resultados, utilizou-se o software *Statistica*® versão 13.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos) para a realização dos Testes ANOVA e de Tukey com nível de significância de 95%.

4 Resultados

Neste capítulo serão apresentados os resultados dos experimentos de pasteurização do suco de framboesa para os tratamentos realizados (tratamento térmico convencional, assistido por ultrassom e por campo elétrico moderado). A discussão dos resultados está dividida na avaliação de compostos bioativos (compostos fenólicos, antocianinas monoméricas totais e cor polimérica), avaliação de possíveis mudanças de cor, análises físico-químicas e avaliação microbiológica.

4.1 Compostos fenólicos

A Tabela 4.1 apresenta os resultados das médias dos compostos bioativos para os três tipos de tratamentos realizados. Esses resultados serão discutidos separadamente, para cada grupo de compostos bioativos, conforme segue.

Tabela 4.1: Média dos resultados dos compostos Bioativos nos três tipos de pasteurizações realizadas.*

| Tecnologia | Tratamento | Compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) | Antocianinas (mg/L) | Cor polimérica (%) |
|-------------------------|------------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------|
| Ultrassom | 423 W cm^{-2} | 1757,65 \pm 216,94 ^a | 115,72 \pm 5,43 ^a | 51,13 \pm 5,5 ^a |
| | 508 W cm^{-2} | 1522,93 \pm 34,85 ^a | 80,73 \pm 10,98 ^b | 52,7 \pm 5 ^a |
| | Controle 25°C | 1420,04 \pm 63 ^a | 104,78 \pm 6,73 ^a | 55,41 \pm 4,08 ^a |
| | Controle 35°C | 1581,45 \pm 298,55 ^a | 130 \pm 8,86 ^a | 43,12 \pm 1,40 ^a |
| Campo elétrico Moderado | Controle 30 °C | 2142,29 \pm 335,55 ^a | 145 \pm 12,00 ^a | 47,25 \pm 11,1 ^a |
| | | 1900,79 \pm 278,87 ^a | 139,68 \pm 13,10 ^a | 45,68 \pm 2,73 ^a |
| | | 2128,32 \pm 51,33 ^a | 134,92 \pm 2,82 ^a | 47,98 \pm 3,95 ^a |
| Tratamento térmico | Térmico 90°C | 1564,68 \pm 113,65 ^a | 118,84 \pm 7,71 ^a | 50,20 \pm 4,02 ^a |
| | | 1458,58 \pm 119,81 ^a | 119,81 \pm 13,24 ^a | 56,42 \pm 3,87 ^a |
| In natura | | | | |

*letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A análise da tabela mostra que não existiu diferença significativa nas concentrações dos compostos fenólicos entre as amostras avaliadas. Esse resultado indica que os tratamentos de pasteurização assistidos por ultrassom e campo elétrico moderado, bem como o tratamento térmico não exerceram influência na concentração de compostos de fenólicos no suco de framboesa em relação ao suco *in natura*. Esse resultado é interessante visto que é desejável que a quantidade desses compostos seja mantida no suco após a etapa de pasteurização.

Días (2014) avaliou o efeito do ultrassom no suco de graviola com potências entre 75-373 W cm^{-2} e tempos entre 2 e 10 min. O autor verificou uma boa capacidade de retenção destes compostos (91,4%) utilizando uma intensidade de potência de 373 W.cm^{-2} . No entanto, o melhor resultado obtido neste estudo foi utilizando uma potência de 75 Wcm^{-2} por 6 min; neste caso, a degradação dos compostos fenólicos foi de 4%.

LE e LE (2012) realizaram experimentos com ultrassom a fim de melhorar a disponibilidade de compostos fenólicos do suco de acerola, e obtiveram como resultado um aumento de 12,5% na disponibilidade após 15 W.cm^{-2} por 6 min.

Esses resultados, assim como os obtidos por Fonteles *et al.* (2012) com suco de melão, indicam que as melhores condições de operação do ultrassom são com potências intermediárias e baixos tempos de tratamento; elevadas potências combinadas com um elevado tempo de tratamento podem ocasionar a diminuição da disponibilidade de compostos fenólicos no meio, pois estimulam a formação de radicais livres e esses afetam os compostos bioativos, como os fenólicos (Wan *et al.*, 2005).

O aumento de compostos fenólicos no meio após o tratamento com o ultrassom, observado por diferentes autores, pode estar ligado ao mecanismo de rompimento da parede celular, ocasionada pela mudança de pressão gerada pela implosão de bolhas durante a cavitação, liberando assim esses compostos no líquido (Carcel *et al.*, 2012).

Estudos mostraram que o campo elétrico pode ser muito eficiente no processamento de alimentos. Experimentos realizados por Binoti *et al.*, (2012) tratando purê de abóbora com campo elétrico pulsado de moderada intensidade ($0,4$ e $0,2 \text{ kV.cm}^{-1}$ com 30 pulsos) mostraram que o aumento da disponibilidade dos compostos fenólicos disponíveis no meio aumentaram em grandes quantidades dependendo da temperatura em que o meio foi mantido. Entre os melhores resultados encontrados nesse estudo os compostos fenólicos aumentaram sua concentração entre 111% e 300% em relação às amostras não tratadas. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Gueven e Knorr (2011) que realizaram experimentos com soja aplicando um campo de $1,6 \text{ kV cm}^{-1}$ e encontraram valores semelhantes, aumentando em até cinco vezes a disponibilidade desses compostos.

Em relação ao tratamento térmico convencional foram encontrados estudos que apresentaram grande diferença entre resultados. Dutra *et al.* (2012) estudaram o tratamento térmico do suco de tangerina morcote, e verificaram o aumento de até 15% na concentração dos compostos fenólicos após diferentes tratamentos realizados entre 90°C e 100°C em diferentes tempos. Teófilo *et al.* (2011), em seus experimentos com suco de uva e vinho tinto, obtiveram uma degradação de 8% dos compostos fenólicos com 10 min de tratamento a 100°C para o vinho tinto, e não foi observado nenhuma alteração desses compostos do suco de uva com o mesmo tratamento. Estudando a influência do processamento do suco tropical de goiaba, Fernandes *et al.* (2006) verificaram a degradação de compostos fenólicos após todas as etapas de produção do suco. Eles verificaram que a etapa de pasteurização (90°C por 60 s) foi responsável por uma degradação de 8% dos compostos fenólicos.

Assim, é possível notar que a tecnologia do CEM costuma ser mais eficiente que as outras duas, já que consegue deixar uma maior quantidade de compostos fenólicos disponíveis no meio; nesse trabalho, tal fato não foi observado, uma vez que todas as tecnologias obtiveram resultados iguais, não alterando a quantidade de compostos em relação ao suco *in natura*.

4.2 Antocianinas totais monoméricas e Cor polimérica

Os resultados obtidos para o conteúdo de antocianinas monoméricas totais, mostrados na tabela 4.1, mostraram que o tratamento de pasteurização via ultrassom em potências maiores (508 W cm^{-2}) resultou em uma menor concentração de antocianinas no suco de framboesa. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si, bem como, apresentaram valores de concentração de antocianinas que não diferiram do suco *in natura*.

Possivelmente, a aplicação do ultrassom em potências elevada ocasionou a degradação de parte das antocianinas devido ao fenômeno da cavitação. Conforme descrito anteriormente, o fenômeno de cavitação promove a formação de zonas de alta energia devido à formação e colapso das bolhas de cavitação. Esse processo pode acarretar a formação e acúmulo de radicais livres (OH^\bullet e H^\bullet), desencadeando diversas reações envolvendo produtos de degradação que podem reagir com compostos antioxidantes, como as antocianinas (Pingret *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos para a cor polimérica, mostrados na tabela 4.1, não apresentaram diferença significativa entre as tecnologias estudadas. Também não houve diferença significativa entre essas tecnologias e o suco *in natura*. Diante dos resultados obtidos, observa-se que não houve a formação de compostos poliméricos, resultantes da degradação de antocianinas, nos diferentes tratamentos de pasteurização realizados, que poderiam alterar a coloração do suco de framboesa. Esse é um resultado satisfatório, já que a cor de um alimento é um atributo essencial para a aceitabilidade do mesmo.

Diferentes estudos vêm sendo realizados para investigar a influência dessas tecnologias na concentração de antocianinas em alimentos. Dubrović *et al.* (2011) investigaram a influência do ultrassom de baixa intensidade no conteúdo de antocianinas do suco de morango. Foram realizados diversos experimentos a 20Hz e com diferentes tempos (entre 3 e 6 min) e potências (entre 6 e 16 W cm^{-2}). Os autores compararam os resultados com o suco *in natura* e com o suco tratado termicamente a 85°C por 2 min. Como conclusão, notou-se que a disponibilidade das antocianinas em todas as amostras tratadas com ultrassom foi intermediária entre o suco *in natura* e o suco tratado termicamente, ou seja, o ultrassom causou degradação, mas em uma menor quantidade que o tratamento térmico. Já Tiwari *et al.* (2009a), em seus estudos com suco de amora, relataram retenção maior que 94% de antocianinas em condições máximas de tratamento com US (durante 10 minutos).

Diversos autores estudaram o efeito do tratamento térmico sobre a concentração de antocianinas. Experimentos com suco de acerola mostraram uma degradação de 19% quando o suco foi submetido a 90°C por 10 min Maia *et al.* (2007). Já Mikkelsen e Poll (2002) estudaram a decomposição e a transformação de antocianinas durante a pasteurização do suco de groselha preta e verificaram uma perda entre 25 e 30% desses compostos. Vilar *et al.* (2012) analisaram a concentração de antocianinas no suco de amora preta após tratamentos com temperaturas que variaram de 65°C a 85°C e tempos que variaram de 10 a 30 s. Os autores obtiveram uma diversidade nos resultados, desde 18,6% degradação de antocianinas para tratamentos a 85°C por 30s, até liberação e antocianinas ao meio com tratamentos a 65°C por 30s.

Poucos são os relatos na literatura de estudos que tenham investigado o conteúdo de antocianinas após a aplicação de CEM. López *et al.* (2008) observou um incremento no conteúdo de antocianinas monoméricas quando suco de uva foi submetido ao campo elétrico pulsado, tecnologia que também utiliza a passagem de corrente elétrica através da amostra, mas com intensidades superiores ao CEM e na forma de pulsos.

Esse resultado está de acordo com os resultados do presente trabalho, visto que a tecnologia de CEM não atuou na degradação desses compostos. Os resultados para o US também estão de acordo com os encontrados na literatura, onde foi verificado que essa tecnologia, utilizada em potências elevadas, causa certa degradação de antocianinas. Apesar disso, nota-se que o tratamento térmico convencional não degradou as antocianinas, o que é diferente da maioria dos resultados observados.

4.3 Análise de cor

A Tabela 4.2 apresenta os resultados da análise de cor para todos os tratamentos realizados.

Tabela 4.2: Análise calorimétrica para todos experimentos

| Tecnologia | Tratamento | L* | a* | Croma | °Hue |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Ultrassom | 75% | 32,14 ± 0,009 ^a | 12,10 ± 0,016 ^a | 12,29 ± 0,02 ^a | 1,53 ± 0,000 ^a |
| | 90% | 32,88 ± 0,009 ^a | 14,24 ± 0,012 ^a | 14,52 ± 0,01 ^a | 1,54 ± 0,000 ^a |
| | Controle | 32,67 ± 0,012 ^a | 10,62 ± 0,018 ^a | 10,86 ± 0,02 ^a | 1,54 ± 0,000 ^a |
| | U.S 75% | 32,71 ± 0,007 ^a | 10,16 ± 0,007 ^a | 10,37 ± 0,01 ^a | 1,54 ± 0,000 ^a |
| Campo elétrico Moderado | Controle | 31,07 ± 0,144 ^a | 14,13 ± 0,118 ^a | 14,13 ± 0,118 ^a | 1,542 ± 0,003 ^a |
| | U.S 90% | 30,50 ± 0,189 ^a | 13,55 ± 0,144 ^a | 13,55 ± 0,144 ^a | 1,537 ± 0,003 ^a |
| Tratamento Térmico | Controle | 29,71 ± 0,156 ^a | 12,51 ± 0,092 ^a | 12,51 ± 0,092 ^a | 1,531 ± 0,004 ^a |
| | 25 V | | | | |
| In natura | 50 V | 32,01 ± 0,671 ^a | 12,612 ± 0,952 ^a | 12,871 ± 0,95 ^a | 12,871 ± 0,95 ^a |
| | Tratamento Térmico | 31,73 ± 0,43 ^a | 12,472 ± 0,135 ^a | 12,472 ± 0,135 ^a | 1,53 ± 0,00 ^a |

 Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Conforme mostrado na tabela, não houve alterações nos parâmetros de cor para as amostras dos diferentes tratamentos realizados. Também não houve diferença entre as amostras do suco *in natura* e após o uso das tecnologias. Esses resultados são importantes, pois não é interessante que essa etapa do processamento do suco altere as características sensoriais.

Diferentes autores realizaram a análise da influência do ultrassom na cor de diversos tipos de sucos. Tiwari *et al.* (2009b) verificaram a alteração no parâmetro L* da cor do suco de laranja submetido ao tratamento com ultrassom, eles utilizaram uma frequência de 20 Hz, com temperaturas variando de 10 a 30°C, amplitudes de 40 a 100% e tempos de tratamento de 2 a 10 min. Eles explicaram esse fato devido ao fenômeno da cavitação, que proporciona diversas reações químicas, físicas e biológicas ao suco. Esse mesmo autor verificou a diminuição do parâmetro L* do suco de amora, quando tratada com ultrassom em altas frequências.

Adekunte *et al.* (2010) também reportaram mudanças na cor de suco de tomate após tratamento ultrassônico com frequências de 20 kHz e duração entre 2 e 10 min. A sonicação resultou em decréscimo nos valores dos parâmetros L^* e a^* , indicando o escurecimento do suco resultante da degradação de carotenoides. Costa *et al.*, (2011), realizando estudos com suco de abacaxi e utilizando altas potências (376 W cm^{-2} por 10 min), relataram alterações na cor do suco, atribuindo essas alterações ao rompimento celular que libera o conteúdo intracelular podendo desencadear alterações na cor do produto,

Aguiló-Aguaio *et al.* (2010) relataram o aumento do parâmetro a^* do suco de melancia após tratamento com campo elétrico pulsado (35 kV/cm com pulsos de 4 μs a 188 Hz). Os autores relacionaram esse efeito a maior extração de carotenos que é facilitada pelo campo elétrico.

O tratamento térmico convencional também não influenciou nos parâmetros relacionados à cor do suco. Resultado semelhante foi observado por Della Torre *et al.* (2003) com suco de laranja com temperaturas em torno de 80°C e tempos de 1 min. Nenhuma diferença significativa foi encontrada pelo autor nos parâmetros referentes a cor antes e depois do tratamento. Correa Neto e Faria (1999), estudando o efeito do tratamento térmico com dois binômios diferentes, $72^\circ\text{C}/16\text{s}$ e $91^\circ\text{C}/40\text{s}$, no suco de laranja, não encontraram variação em nenhum dos parâmetros referentes à cor após o tratamento do suco.

Assim, nota-se que os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com a maioria dos resultados encontrados na literatura, que mostram que os três métodos de pasteurização estudados, US, CEM e térmico não são capazes de alterar essa característica do suco.

4.4 Análises físico-químicas

Foram realizadas análises de acidez titulométrica e pH para todas as amostras pós tratamentos e suas respectivas amostras de sucos *in natura* e os resultados estão mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Análises físico-químicas para todos os tratamentos realizados.

| Tecnologia | Tratamento | Acidez titulométrica (g/100g) | pH |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Ultrassom | 75% | 1,615 ± 0,166 ^a | 3,11 ± 0,13 ^a |
| | 90% | 1,545 ± 0,109 ^a | 3,10 ± 0,13 ^a |
| | Controle U.S 75% | 1,547 ± 0,086 ^a | 3,10 ± 0,11 ^a |
| | Controle U.S 90% | 1,611 ± 0,061 ^a | 3,09 ± 0,09 ^a |
| Campo elétrico Moderado | Controle | 1,684 ± 0,083 ^a | 2,897 ± 0,087 ^a |
| | 25 V | 1,677 ± 0,051 ^a | 2,900 ± 0,087 ^a |
| | 50 V | 1,682 ± 0,054 ^a | 2,920 ± 0,087 ^a |
| Tratamento Térmico | Tratamento Térmico | 2,041 ± 0,010 ^a | 3,053 ± 0,007 ^a |
| <i>In natura</i> | ----- | 2,041 ± 0,010 ^a | 3,053 ± 0,007 ^a |

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A análise desta tabela indica que não ocorreu diferença significativa entre os tipos de tratamento na análise de acidez titulométrica e pH ($p > 0,05$). Também não foram observadas diferenças entre as amostras tratadas e a *in natura*. Esse resultado é satisfatório, pois essas alterações não são desejadas no suco após a pasteurização.

Resultados similares foram reportados por diversos autores. Tiwari *et al.* (2009b) também não verificaram alteração do pH do suco de laranja submetido a tecnologia de ultrassom em condições já citadas. Igualmente para Zafra-Rojas (2013), que efetuou o tratamento do suco de pera com ultrassom (20Hz, 40 a 80% de potência e tempos de 3 a 25 min) e não verificou variação no pH e na acidez titulométrica.

Em experimentos com sucos cítricos tratados pela tecnologia de campo elétrico moderado (28 V cm^{-1}), Cserhalmi *et al.* (2006) também não encontraram diferenças na acidez dos sucos antes e pós tratamento. Binoti (2012), utilizando campo elétrico moderado (0,4 e 0,2 kV cm^{-1} com 30 pulsos), não encontrou diferenças significativas em seus resultados com polpa de abóbora. Rivas *et al.* (2006) também estudaram a diferença do tratamento com campo elétrico (25 kV/cm por 280 ms; e 25 kV/cm por 330 ms) e térmico (98°C por 21s) de sucos mistos de cenoura e laranja e também não verificaram diferença significativa nos valores de pHs e acidez antes e depois dos tratamentos.

Teixeira (2008) estudou a diferença do tratamento do suco de cenoura por campo elétrico (35 kV com pulsos bipolares de 6 μs) e pela pasteurização térmica (90°C/30 s e 90°C/60 s). Em seus resultados o pH e a acidez do suco não sofreram alterações por nenhuma das tecnologias.

Nas condições utilizadas nesse trabalho para as três tecnologias, os resultados estão de acordo com os resultados observados na literatura, uma vez que não alteraram as características físico-químicas do suco de framboesa.

4.5 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas forneceram valores médios iniciais para o suco *in natura* de $2,225 \pm 0,68 \cdot 10^5$ UFC ml⁻¹ para micro-organismos mesófilos aeróbios e de $7,25 \pm 2,8 \cdot 10^4$ UFC ml⁻¹ para bolores e leveduras. Para as amostras tratadas, todos os valores ficaram abaixo de 10^3 UFC mL⁻¹, seja para mesófilos aeróbios ou bolores e leveduras. Sendo assim, não foi possível comparar a eficiência dos diferentes tratamentos realizados no suco. Por outro lado, verificou-se que todos os tratamentos foram capazes de reduzir em, pelo menos, 2 log o número de micro-organismos presentes no suco, indicando que, possivelmente, os tratamentos tenham contribuído para a inativação dos micro-organismos avaliados.

Outros autores já realizaram estudos microbiológicos em sucos de frutas pasteurizados. Estudando o efeito da pasteurização térmica no suco de maracujá, Amaro *et al.* (2002) verificaram uma diminuição de 90% no número de micro-organismos mesófilos aeróbios após tratamentos térmicos a 82°C, e uma diminuição de 98% no número de bolores e leveduras com o mesmo tratamento. Yuyama *et al.* (2012) avaliaram as características microbiológicas do suco de cubiu pasteurizado a 65°C por 30 min. Como resultados eles obtiveram uma grande diminuição no número de bolores e leveduras, partindo de $4 \cdot 10^5$ UFC ml⁻¹ para menos de 10 UFC ml⁻¹.

Utilizando campo elétrico moderado na inativação da *Escherichia coli*, Machado *et al.* (2009) utilizaram tensões desde 50 V cm⁻¹ até 280 V cm⁻¹ e chegaram a reduções de 25 UFC ml⁻¹ para o 50 V cm⁻¹ para o primeiro e de quase 10^3 UFC ml⁻¹ para o segundo. A diferença encontrada para a tensão de 50 V cm⁻¹ em relação a esse trabalho provavelmente se deve a diferente resistência dos micro-organismos estudados em ambos os trabalhos, sendo a *Escherichia coli* mais resistente do que os bolores e leveduras e do que os mesófilos aeróbios.

Schuina (2014) estudou a pasteurização do suco de laranja com ultrassom em conjunto com a temperatura. Ele realizou experimentos com frequências de 40 kHz e temperaturas de 20 a 60°C e comparou os resultados com o suco *in natura* e com um tratamento térmico convencional a 90°C por 30 s. Quando utilizada a temperatura de 25°C o autor não encontrou diferenças significativas em relação ao suco *in natura*. Já para 30°C ocorreu uma diminuição tanto no número de mesófilos aeróbios quanto no de leveduras e bolores. O primeiro diminuiu de $1,9 \times 10^3$ para $3,2 \times 10^2$ UFC ml⁻¹ enquanto que os segundos diminuíram de $2,9 \times 10^3$ para $8,4 \times 10^2$ UFC ml⁻¹. Já para temperaturas de 50 e 60°C, com a mesma frequência de ultrassom, os resultados foram muito parecidos com o tratamento térmico, reduzindo praticamente 10^3 UFC ml⁻¹, eliminando praticamente todos os micro-organismos.

Zafra-Rojas *et al.* (2013) utilizaram ultrassom a 20 kHz e 1000 W cm⁻² para inativação bacteriana total no suco de pera e encontraram redução total 10^2 UFC ml⁻¹. Já Valero *et al.* (2007), utilizando uma potência de 200 W cm⁻², não observaram nenhuma redução no número de bolores e leveduras para nenhuma condição estudada por eles. No presente trabalho, verificou-se que os resultados obtidos estão de acordo com os observados em

outras pesquisas, uma vez que se observou redução na concentração de micro-organismos.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho buscou avaliar as tecnologias de ultrassom, campo elétrico moderado e tratamento térmico convencional na pasteurização do suco de framboesa. As características do suco analisadas foram o conteúdo de compostos fenólicos, antocianinas, cor, pH, acidez titulométrica e quantificação de micro-organismos.

Em relação aos resultados obtidos, foi verificada diferença significativa na concentração de antocianinas nas amostras tratadas com a tecnologia de ultrassom quando foi utilizada uma potência mais alta (508 W cm^{-2}). Esse resultado pode indicar que parte das antocianinas disponíveis no suco foram degradadas, possivelmente pela formação de radicais livres que reagiram com esses compostos. Os resultados das análises de cor polimérica demonstraram que não houve formação de compostos poliméricos com cor, resultantes da degradação de antocianinas, para nenhum dos tratamentos realizados.

Nos aspectos físico-químicos não foram notadas diferenças, uma vez que os parâmetros L^* , a^* , croma e °Hue não foram alterados após nenhum dos experimentos realizados. O mesmo ocorreu para as análises de pH e acidez titulométrica, visto que esses valores se mantiveram praticamente constante antes e depois de cada experimento.

Nas análises microbiológicas foi possível verificar que todos os tratamentos realizados diminuíram o número de micro-organismos no suco. No entanto, não foi possível verificar a diferença entre os tratamentos, pois a contagem inicial de micro-organismos foi baixa, não podendo ser determinada corretamente pelo método utilizado.

Com base nos resultados, observa-se que a pasteurização do suco de framboesa assistida pelas tecnologias de US e CEM pode servir como uma alternativa ao tratamento térmico, já que, em tempos e intensidades de potência e campo elétrico adequados, essas tecnologias contribuíram para a manutenção do conteúdo de compostos bioativos, parâmetros de cor e físico-químicos.

Contudo, outros estudos devem ser realizados para elucidar os reais efeitos das tecnologias de US e CEM na inativação de micro-organismos. Para tanto, sugere-se realizar novos experimentos em amostras que contenham uma quantidade inicial maior de micro-organismos para que se possa verificar a diferença entre os tipos de tratamentos realizados.

Além disso, deve-se levar em consideração que, a partir das análises realizadas, não foram observadas diferenças na pasteurização assistida pelas tecnologias emergentes e na pasteurização convencional. Contudo, sugere-se realizar estudos sensoriais com o objetivo de verificar uma possível diferença de sabor, textura e aceitação entre os tratamentos. Ainda, é importante ressaltar que, na escolha do tratamento de pasteurização, devem-se levar em conta os aspectos econômicos de cada tratamento, assunto não abordado neste trabalho.

6 Referências

ADEKUNTE, A. O., TIWARI, B. K., CULLEN, P. J., SCANNELL, A. G. M., O'DONNELL, C. P. Effect of sonication on color, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, v.122, p.500-507, 2010.

AGCAM, E.; AKYILDIZ, A.; EVRENDILEK, A. G. Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurization. *Food Chemistry*, v. 143, p. 354-361, 2014.

AGUILÓ-AGUAYO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN BELLOSO, O. Color and viscosity of watermelon juice treated by high intensity pulsed electric fields or heat, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 299–305, 2010.

ALVES, L.L. et al. O ultrassom no amaciamento de carnes. *Ciência Rural*, v.43, n.8, p.1522-1528, 2013.

Disponível em: . Acesso em: 12 out. 2016. doi: 10.1590/S0103- 84782013000800029.

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

ANGELO, PRISCILA MILENE; JORGE, NEUZA. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, São Paulo, v. 66, n. 1, 2007 .

ARONSSON, K. et al. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *International Journal of Food Microbiology*, v.99, p.19-32, 2005.

AYALA, F. de L.J. Amora - framboesa - grosella - kiwi - mirtilo e sua comercialização. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1999, 57p.

AZERÊDO, G.A. et al. Pulsos elétricos na conservação de alimentos: fatores críticos na inativação microbiana e efeitos sobre os constituintes alimentares. **Boletim do CEPPA**, v.26, n.2, p.171-178, 2008.

BARBOSA, C. D.; Microbiologia de interesse em alimentos. Disponível em:

<https://www.portaleducacao.com.br/nutricao/artigos/13993/microrganismos-de-interesse-em-alimentos-bolores-e-leveduras>

BAZHAL, M.I. et al. Pulsed field treatment of apple tissue during compression for juice extraction. **Journal of Food Engineering**, v.50, p.129-139, 2001.

BENDICHO S, BARBOSA-CÁNOVAS G V, Martín O (2002) Milk Processing by High Intensity Pulsed Electric Fields. *Food Science & Technology* 13:195-204

BHAT, R.; KAMARUDDIN, N. S. B. C.; MIN-TZE, L.; KARIM, A. A. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality, *Ultrason. Sonochem.* V. 18 p. 1295-1300, 2011.

BINOTI, MIRELLA LIMA et al . Campo elétrico pulsado. Cienc. Rural, Santa Maria , v. 42, n. 5, p. 934-941, May 2012 .

Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000500028&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Nov. 2016.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. Food Chemistry, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.

BORDIGNON JR., C.; FRANCESCOTTO, V.; NIENOW, A. A., CALVETE, E.; REGINATTO, F. H.; Influencia do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 29, n. 1, p. 183, 2009.

BROUILLARD, R.; DUBOIS, J. E. Mechanism of the structural B.CEPPA, Curitiba, v. 24, n. 1, jan./jun. 2006 77 transformations of anthocyanins in aqueous media. Journal of American Chemistry Society, v. 99, p. 1359-1363, 1977.

BUCKOW, ROMAN, SIEH NG, AND STEFAN TOEPFL. "Pulsed electric field processing of orange juice: a review on microbial, enzymatic, nutritional, and sensory quality and stability." *Comprehensive reviews in food science and food safety* 12.5 (2013): 455-467.

BURTON-FREEMAN, B. M.; SANDHU, A. K.; EDIRISINGHE, I. Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. Advances in Nutrition: An International Review Journal , v. 7 , n. 1 , p. 44–65, 2016.

BYAMUKAMA, R. et al. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. Journal of Food Composition and Analysis, San Diego, v. 18, n. 1, p. 599-605, 2005.

CÁRCEL, J.A.; GARCÍA-PÉREZ, J.V.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. Journal of Food Engineering, v.110, n.2, p. 200–207, 2012.

CARLSEN, C.; STAPELFELDT, H. Light sensitivity of elderberry extract. Quantum yields for photodegradation in aqueous solution. Food Chemistry, v. 60, p. 383-387, 1997

CASTAÑEDA -OVANDO A, PACHECO-HERNÁNDEZ ML, PÁEZ - HERNÁNDEZ ME, RODRÍGUEZ JA AND GALÁN -VIDAL CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chem 113: 859–871.

CHEMAT, F. et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry, v.18, n.4, p.813-835, 2011

CHIGURUPATI, N.; SAIKI, L.; GAYSER JR., C., Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. International Journal of Pharmaceutics, v. 241, p. 293- 299, 2002

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

COSTA, M.G.M., FONTELES, T.V., JESUS, A.L.T., ALMEIDA, F.D.L., MIRANDA, M.R.A., FERNANDES, F.A.N., RODRIGUES, S. High-Intensity ultrasound processing of pineapple juice. *Food and Bioprocess Technology*, doi: 10.1007/s11947-011-0746-9, 2011.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville. p. 1250-1318.

CSERHALMI, Z. et al. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.7, p.49-54, 2006

DARAVINGAS, G.; CAIN, R.F. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model system, *Journal of Food Science*, v. 33, p 138-142, 1968

DELLA TORRE, JUSSARA C. de M. et al . Perfil sensorial e aceitação de suco de laranja pasteurizado minimamente processado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas , v. 23, n. 2, p. 105-111, Aug. 2003 .

DIAS, DANIELY DA ROCHA CORDEIRO. "Efeito do ultrassom em parâmetros de qualidade do suco de graviola (annona muricata l.). 2014

DIRBY, M.; WESTERGAARD, N.; STAPELFELDT, H., et al. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, v. 72, p.431-437, 2001.

DUBROVIC, I., HERCEG, Z., JAMBRAK, A. R., BADANJAK, M., DRAGOVIC – UZELAC, V. Effect of high intensity ultrasound and pasteurization on anthocyanins contend in strawberry juice. *Food Technology and Biotechnology*, v. 49, p. 196-204, 2011.

DUTRA, ANDRÉ DE SOUZA et al. Effect of thermal treatment on the carotenoid, phenolic compound and ascorbic acid concentrations, and the antioxidant capacity of murcott tangerine juice. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, n. 3, p. 198-207, 2012.

ESPIN JC, SOLER-RIVAS C, WICHERS HJ (2000). Characterization o the total free radical scavenging capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 48: 648-656.

EUGÈNE VOROBIEV, N. L. *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*: Springer. 1 2008.

FERNANDES, ALINE GURGEL, et al. "Comparação dos teores em vitamina C, carotenóides totais, antocianinas totais e fenólicos totais do suco tropical de goiaba nas diferentes etapas de produção e influência da armazenagem." *Alimentos e Nutrição, Araraquara* 18.4 (2007): 431-438.

FLANZY, Claude. *Enologia: Fundamentos científicos y tecnológicos*. 2ª ed. AMV Ediciones. Ediciones Mundi-Prensa. Espanha (Madrid), 2003.

FONTELES, T.V., COSTA, M.G.M., JESUS, A.L.T., MIRANDA, M.R.A., FERNANDES, F.A.N., & RODRIGUES, S. (2012). Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: effects on quality parameters. *Food Research International*, 48, 41–48.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. *Critical Review B.CEPPA*, Curitiba, v. 24, n. 1, jan./jun. 2006 *78 of Food Science and Nutrition*, v. 28, p. 273-314, 1989

GARCIA, DENISE MARQUES. Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola. 2004.

GARCIA D, GÓMEZ N, RASO J, PAGÁN R (2005) Bacterial Resistance after Pulsed Electric Fields Depending on the Treatment Medium pH. *Innovative food science & emerging technologies* 6:388-395.

GHNIMI, S.; FLACH-MALASPINA, N.; DRESCH, M. et al. Design and performance evaluation of an ohmic heating unit for thermal processing of highly viscous liquids. *Chemical Engineering Research and Design*, v.86, p.626-632, 2008.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. ORSOLANI, L. MARTÍNEZ-YÉPEZ, A. TAPIA, M. S. Microbiological and sensory quality of soicated calcium-added orange juice. *LWT- Food Science and Technology*. v 43, p. 808-813, 2010.

GONÇALVES, E. D. et al. Implantação, cultivo e pós-colheita de framboesa no sul de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG, 2011. 5 p. (Circular Técnica, 145)

GORINI, F. Comportamenti dei frutti nel corso della commercializzazione. *ATTI – Dell'ist. Valor. Tecn. Prod. Agrar.V.XII*, Milano, p. 185-209, 1989. GONÇALVES, E D, et al. Implantação, cultivo e pós-colheita de framboesa no Sul de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG, 2011. 5p (Circular técnica, 145).

GUEVEN, A.; KNORR, D. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. *Journal Food and Engineering*. V 103, p. 237 – 243, 2011.

HAVLIKOVA, L., & MIKOVA, K. (1985). Heat stability of anthocyanins. *Z LebensmUnters Forsch*, 181, 427-432.

HAYES, P.R. *Food microbiology and hygiene*. 2ed. New York: Chapman and Hall, 1995. 516p.

HERNÁNDEZ, Manoel Ruiz. *La crianza del vino tinto desde la perspectiva vitícola*. 2ª ed. AMV Ediciones. Ediciones Mundi-Prensa. Espanha (Madrid), 2002.

IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins, and related flavilium salts. *Tetrahedron Letters*, v. 39, p. 3005-3012, 1983.

IWASHINA T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J Plant Res*. 2000; 113:287-99.

JACKMAN, R.L.; SMITH, J.L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G.A.F. and HOUGHTON, J.D. *Natural Food Colorants*. London: Blackie Academic. p.183-241, 1992.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals *Journal of the American Dietetic Association*, 1999.

- KNORR D, GEULEN M, GRAHL T, SITZMANN W (1994) Food Application of High Electric Field Pulses. *Trends in Food Science and Technology* 5:71-75.
- KNORR, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V.; LEE, D. U. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 261-266, May 2004.
- LE, H. V., LE, V. V. M. Comparison of enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of vitamin C and phenolic compounds from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 47, n. 6, p. 1206–1214, 2012.
- LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.
- LINGYU YU; GIURGIUTIU, V. Multi-mode Damage Detection Methods with Piezoelectric Wafer Active Sensors. *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, Michigan, v. 20, n. 11, p. 1329-1341, 2009
- LÓPEZ, N. et al. Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of tempranillo grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.9, p.477-482, 2008.
- MAIA, GERALDO ARRAES et al . Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas , v. 27, n. 1, p. 130-134, Mar. 2007 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612007000100023&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Nov. 2016.
- MACHADO, LUÍS F et al. "Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature." *Journal of food engineering* 96.4 (2010): 520-527.
- MARKAKIS, P. ; PERICLES, M. Chapter 6 – Stability of Anthocyanins in Food. In: *Anthocyanins as Food Colors*. [s.l.] Academic Press, 1982. P. 163-180, 1982.
- MARTÍN O, ZHANG Q, CASTRO AJ, BARBOSA-CÁNOVAS GV, SWANSON BG (1994) Empleo de Pulsos Eléctricos de Alto Voltage Para la Conservación de Alimentos. *Revista Española de Ciencia e Tecnología de Alimentos* 34:(1)1-34.
- MASON, T.J. A general introduction to sonochemistry. In: MASON, T.J. (Ed.). *Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1990. p.18
- MAZZA, G. (Ed.) *Functional foods: biochemical and processing aspects*. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 1998. 460p.
- MALACRIDA, R. C.; MOTTA, S. DA. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. p. 59–82, 2006.
- MASON, T.J. Power ultrasound in food processing- the way forward. In: POVEY, M.J.W.; MASON, T.J. (Eds.). *Ultrasound in food processing*. London: Thomson Science, 1998. p.105-126.

MASON, T.J. Sonochemistry. The uses of ultrasound in chemistry, Royal Society of Chemistry, 1990. Large Scale Sonochemical processing: aspiration and actuality. Ultrasonics Sonochemistry, Oxford, nº 7, p. 145 – 149, 2000.

MESCHTER, E. L. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 1, p. 579-583, 1954.

MERCALI, G.D. Tratamento térmico de polpa de acerola via aquecimento ôhmico. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. 2013. 252p.

MESCHTER, E. L. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 1, p. 579-583, 1954.

MIKKELSEN, B. B.; POLL, L. Decomposition and transformation of aroma compounds and anthocyanins during black currant (*Ribes nigrum* L.) juice processing. J. Food Sci. v. 67, n. 9, p. 3447-55, 2002.

MOKKILA, M., MUSTRANTA, A., BUCHERT, J., POUTANEN, K (2004): Combining power ultrasound with enzymes in berry juice processing, at: 2nd Int. Conf. Biocatalysis of Food and Drinks, 19-22.9.2004, Stuttgart, Germany.

MULET, A.; BENEDITO, J.; BON, J.; SANJUÁN, N. Low intensity ultrasonics in food technology. Journal of Food Engineering, Davis, v. 5, n. 4, p. 285-297, 1999.

MULLEN, W.; MCGINN, J. (2002) Ellagitannins, Flavonoids, and Other Phenolics in Red Raspberries and Their Contribution to Antioxidant Capacity and Vasorelaxation Properties. Journal of the Agricultural and Food Chemistry 50, 18, 5191-5196.

NEUMANN, P., et al. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos....você já ouviu falar? Higiene Alimentar. v. 14, p. 19-23, 2002.

NAVARRE, COLETTE. Enologia, técnicas de produção do vinho. Edição nº137049/6763. Europa-América. Portugal, 1997.

Quali.pt, Qualidade microbiológica dos alimentos. Disponível em: <http://www.quali.pt/seguranca-alimentar/209-qualidade-microbiologica-alimentos>
Acesso em 12/11/2016

PALAMIDIS, N. and T. MARKAKIS, 1975. Structure of anthocyanin. Food Sci., 40: 104-104.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; CHEMAT, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 593-606, 6// 2013. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351200641X> >.

PINJARI, D. V.; PANDIT, A. B. Cavitation milling of natural cellulose to nanofibrils. Ultrasonics Sonochemistry, Coventry, v. 17, p. 845-852, 2010.

PIO, R notícias: como cultivar framboesas. Toda fruta. 2007. Disponível em:< <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=16165>>

Acesso em: 16 setembro 2016

RAMOS, A.M. et al. Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade na conservação de alimentos. *Ceres*, v.53; n.308, p.425-438, 2006.

RAWSON, A.; TIWARI, B.K.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; BRENNAN, C.; CULLEN, P.J.; O'DONNELL, C.P. Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice, *Food Research International*, v.44, p. 1168-1173, 2011.

REIN, M. Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. [s,] University of Helsinki, 2005.

RHIM, J. W. (2002). Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from flower cabbage. *Food Science and Biotechnology*, 11, 361-364

RIBÉREAU-GAYON, Pascal et al. Tratado de enología: Química del vino, estabilización y tratamientos. 1ª ed. Argentina (Buenos Aires), Hemisferio Sur, 2003.

RIVAS, A.; RODRIGO, D.; MARTÍNEZ, A.; BARBOSACÁNOVAS, G.V.; RODRIGO, M. Effect of PEF and heat pasteurization on the physicochemical characteristics of blended orange and carrot juice. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie- Food Science and Technology*. v.39, p.1163-1170, 2006.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMOES, C. M. O. et al. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC. 1104, 2007.

SAPERS, G.M.; TAFFER, I.; ROSS, L.R. et al. Functional properties of a food colorant prepared from red cabbage. *Journal of Food Science*, v. 46, p. 105-109, 1981.

SCHUINA, GUILHERME LORENCINI. "Utilização de ultrassom na conservação de suco de laranja: efeito sobre características físico-químicas, enzimáticas, microbiológicas e sensoriais." (2014).

SENSOY, I.; SASTRY, S. K. Extraction Using Moderate Electric Fields. *Journal of Food Science*, v. 69, n. 1, p. FEP7-FEP13, 2004. ISSN 1750-3841. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17861.x>>.

SGARBIERI, V.C. & PACHECO, M.T.B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.2, n.1,2, p.7-19, 1999.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications. In: *Food Chemistry*. [s.l: s.n.]. v. 57p. 481–482. 1995ª

SILVA, M. C. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do Sistema tamplate. 2002. Tese (Mestre em Ciências). Escola Superior de agricultura, Universidade de São Paulo, 2002, Piracicaba. Disponível em : <http://www.teses.usp.br/>. Acesso em: 12/11/2016

SIQUEIRA, R.S. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTA, 1995. P.159.

SOMAVAT, R.; MOHAMED, H. M. H.; SASTRY, S. K. Inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores under ohmic and conventional heating. *LWT- Food Science and Technology*, v. 54, n. 1, p. 194-198, 2013.

STANCIL, J.; ZITNY, R. Milk fouling at direct ohmic heating. *Journal of Food Engineering*, v.99, n.4, p.437-444, 2010.

SUSLICK, K.S. Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects. In: SUSLICK, K.S. (Ed.). *Ultrasound*. New York: VCH, 1988. p.123-164

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes, F.P.; Ito, K. (ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed., American Public Health Association, Washington, p. 53-62. 2001.

TAIPINA, M. S.; FONTES, M. A. S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. *Higiene Alimentar*. v. 16, n. 100, p 28-29, 2002.

TAO, Y.; SUN, D. Enhancement of food processes by ultrasound: a review. *Food Science and Nutrition*, v.55, n.4, p.570-594, 2015.

TEIXEIRA, LUCIANO JOSÉ QUINTÃO, AFONSO MOTA RAMOS, AND OLGA MARTÍN-BELLOSO. "Avaliação durante a estocagem do suco de cenoura processado por campos elétricos pulsados de alta intensidade (cepai) e por tratamento térmico."

TEOFILO, JEANINE SCHÜTZ CARDOSO et al . Aquecimento de vinho tinto e suco de uva utilizados em preparações culinárias não afeta a capacidade antioxidante e o teor de fenóis totais. *Rev. Nutr.*, Campinas , v. 24, n. 1, p. 153-159, Feb. 2011

TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science and Technology*, v. 20, n. 3-4, p. 137–145, 2009a.

TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Effect of low temperature sonication on orange juice quality parameters using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology* , v. 2 (1), p. 109-114, 2009b.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Chicago, n. 81, p. 853-879, 2001.

VALERO, M.; RECROSIO, N.; SAURA, D.; MUÑOS, N.; MARTÍ, N.; LIZAMA, V. Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 509-516, 2007.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S. *Tecnologia de Frutas e Hortaliças Módulo VII: Geléias, doces cremosos e em massa*. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2009. 84p.

VIZZOTTO, M. Propriedades funcionais de pequenas frutas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.33, n.268, p.84-88, maio/jun. 2012.

WAN, J., MAWSON, R., ASHOKKUMAR, M., RONACHER, K., COVENTRY, M. J., ROGINSKI, H. (2005). Emerging processing technologies for functional foods. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60, 167–169.

WANG, S.Y.; BOWMAN, L.; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*, Oxford, v.107, n.3, p.1261-1269, 2008.

WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, p. I1.1.1.–I1.1.8, 2002.

WROLSTAD, R.E. *Colors and Pigment Analysis in Fruit Products*. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station, 1976, 17 p

YOU, Q. et al. Comparasion of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grow blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry*, Barking, v. 125, n. 1, p. 201-208, 2011.

YUYAMA, L. K. O. et al. avaliação microbiológica do suco de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) pasteurizada e armazenada congelada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18, 2002, Porto Alegre. Anais... Porto alegre: SBCTA, 2002. CD-ROM.

ZAFRA-ROJAS. Q. Y.; CRUZ-CANSINO, N.; RAMIREZ-MORENO, E.; DELGADO-OLIVARES, L.; VILLANUEVA-SANCHEZ, R.; ALANIS-GARCIA, E. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics sonochemistry* v 20. P. 1283-1288, 2013.

ZHANG, L.; LI, J.; HOGAN, S.; CHUNG, H.; WELBAUM, G. E; ZHOU, K. inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidante properties and phenolic composition. *Food Chemistry*. v 119. p. 592-599. 2009.

7 Anexos

Logo abaixo apresentamos a curva analítica com ácido gálico (marca Sigma) para realização do método de Folin-Ciocalteu com leitura de absorbância após uma hora de repouso da amostra.

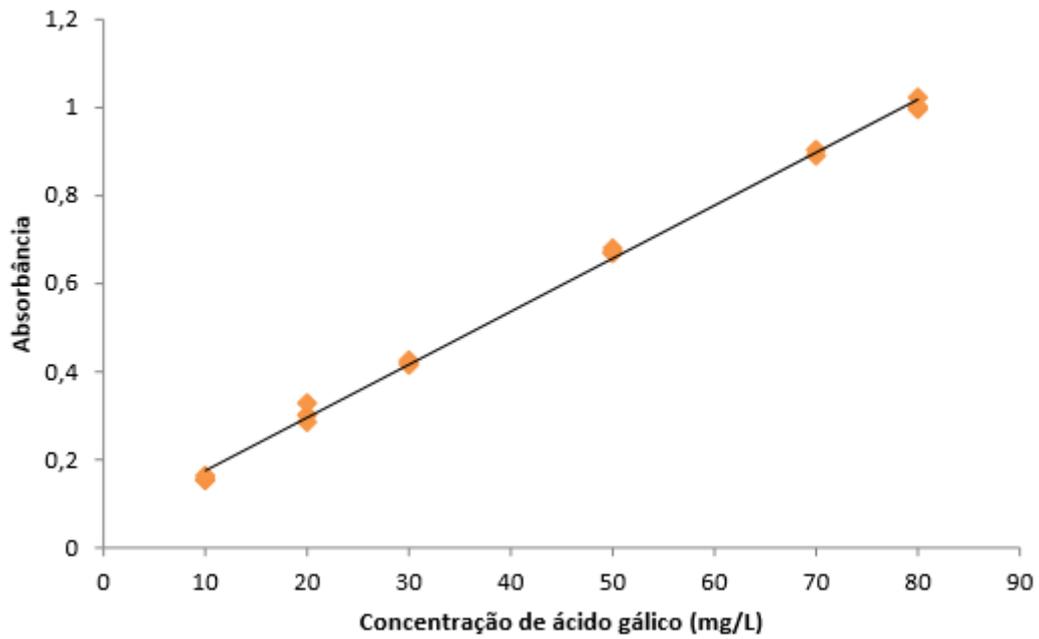


Figura 7.1: Curva analítica com ácido gálico

A equação que corresponde da reta é $y = 0,012 x + 0,0555$ com $R^2 = 0,9974$.